

Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

doi 10.18699/vjgb-26-38

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

С.А. Лашин – д-р биол. наук (Россия)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Н.С. Юдин – канд. биол. наук (Россия)

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

Online edition

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

*Founded in 1997**Publication frequency: 8 issues a year*

doi 10.18699/vjgb-26-38

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief*A.V. Kochetov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), The Netherlands*L.A. Bepalova*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*N.P. Bondar*, Cand. Sci. (Biology), Russia*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A. Börner*, Dr. Sci., Germany*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Corr. Member of the RAS, Professor of the RAS,

Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),

Belarus

A.M. Kudryavtsev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*S.A. Lashin*, Dr. Sci. (Biology), Russia*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Corr. Member of the RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.),

Russia

I.V. Maksimov, Dr. Sci. (Biology), Russia*B.A. Malyarchuk*, Dr. Sci. (Biology), Russia*Yu.G. Matushkin*, Cand. Sci. (Biology), Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),

Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),

Russia

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

Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Shakhtshneider, Dr. Sci. (Medicine), Russia*S.V. Shekhovtsov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),

Russia

V.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),

Russia

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),

Russia

A.V. Vasiliev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),

Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),

Russia

N.S. Yudin, Cand. Sci. (Biology), Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS,

Dr. Sci. (Biology), Russia

Молекулярная и клеточная биология

345

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Концепция природной реконструкции генома. Часть 5. Анализ изменения продолжительности жизни старых животных после реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных hDNA^{gr} и ангиогенином рекомбинантным человеческим.
В.С. Рузанова, Л.Ю. Гривцова, С.Г. Ошихмина, А.С. Проскурина, Г.С. Риттер, Е.В. Долгова, С.С. Кирикович, Е.В. Левитес, Я.Р. Ефремов, Т.Д. Дубатолова, М.И. Мещанинова, А.Л. Мамаев, О.С. Таранов, С.В. Сидоров, О.Ю. Леплина, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, А.С. Брюховецкий, С.С. Богачев

362

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPSCMi014-A и RCPSCMi014-B из Т-лимфоцитов здорового донора и верификация их моноклонального происхождения по V(D)J-перестройкам генов TCR. Д.К. Шерман, М.Е. Богомякова, Э.А. Кастуева, И.В. Звягин, В.К. Руппель, Е.В. Барсова, А.Ю. Горбачев, Н.А. Кулемин, А.А. Баринаева, Е.А. Зеркаленкова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

372

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Разработка молекулярного маркера к гену *Run8* для отбора устойчивых к пыльной головне генотипов ячменя.
Е.А. Орлова, Н.П. Бехтольд, Ю.Н. Григорьев, О.Ю. Шоева, А.Ю. Глаголева, Т.В. Кукоева

381

ОБЗОР

Соматическая изменчивость у видов рода *Saccharum*: раскрытие ее потенциала в современных условиях.
С. Мунир, М.А.Б. Джаффар, Ш. Ясмин, М.Т. Хан, И.А. Хан (на англ. языке)

Устойчивость растений к абиотическому стрессу

391

ОБЗОР

Факторы морозоустойчивости пшеницы – белки-ингибиторы рекристаллизации льда. Н.Е. Коротаева, А.В. Федяева, К.К. Мусинов, А.С. Сурначев, Г.Б. Боровский

403

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Пути адаптации разных сортов груши к низкотемпературному стрессу в весенний период.
А.Е. Мишко, А.В. Ключкина

412

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристика генов галактуронат-редуктаз (*GalUR*) чеснока (*Allium sativum* L.) и изменение их экспрессии в ответ на абиотические стрессоры.
М.А. Филишин, Т.М. Середин, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

Симбиотические системы

424

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изменение транскрипции генов аквапоринов в листьях люцерны хмелевидной в результате микоризации грибом арбускулярной микоризы в условиях дефицита воды.
А.П. Юрков, Т.Р. Кудряшова, А.И. Беляева, А.А. Крюков

435

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Производственный штамм клубеньковых бактерий сои RZ300 *Bradyrhizobium japonicum*, устойчивый к высушиванию на поверхности семян: культуральные свойства и специфические особенности генома. Ю.В. Косильников, А.А. Крюков, К.Н. Бердышева, А.И. Ковальчук, А.П. Юрков, Ю.В. Лактионов

Генетика животных

444

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сравнительный цитогенетический анализ хромосомы, ограниченной клетками зародышевой линии, у вьюрковых птиц (Passeriformes, Aves).
Л.П. Малиновская, К.В. Тишакова, П.М. Бородин

451

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Генетическое разнообразие лошадей саргаринско-алексеевской и ирменской культур Западной Сибири и их генетическое родство с современными лошадьми аборигенных пород.
М.А. Куслий, А.А. Юрлова, Н.В. Воробьева, А.А. Проскуракова, М.А. Демин, С.М. Ситников, В.Н. Жаронкин, С.С. Онищенко, А.К. Каспаров, А.Е. Тупикин, А.С. Графодатский, А.С. Молодцева, А.А. Тишкин (на англ. языке)

Генетика человека

- 461 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Токсичные металлы и генетический полиморфизм у коренного населения Севера Азии и Америки.
Б.А. Малярчук, Н.В. Похилюк
- 470 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Исследование ассоциации генетических вариантов с развитием музыкальных способностей человека.
А.В. Казанцева, А.В. Торопова, Э.К. Хуснутдинова, С.Б. Малыш

Медицинская генетика

- 482 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Диагностическая эффективность полноэкзомного секвенирования в поиске генетических причин наследственных заболеваний в ХМАО-Югре (Западная Сибирь, Россия).
М.Ю. Донников, П.А. Сучко, А.В. Морозкина, Л.Н. Колбасин, Е.А. Попова, С.И. Папанов, Ю.С. Кошечкина, Л.Г. Данилов, Ю.А. Эйсмонт, О.С. Готов, Л.В. Коваленко (на англ. языке)
- 490 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Редкие варианты в генах транспортеров холестерина у пациентов с нарушениями липидного обмена. *А.Д. Изюмченко, М.Н. Грунина, К.В. Драчева, О.А. Чумакова, К.О. Танаянц, К.В. Легостаева, А.Н. Куликов, О.А. Беркович, Е.И. Баранова, С.Н. Пчелина, В.В. Мирошникова*

Биоинформатика и системная биология

- 502 **ОБЗОР**
Математическое и компьютерное моделирование биологических систем на разных иерархических уровнях организации. *С.А. Лашин, Р.А. Иванов, Ю.Г. Матушкин*
- 515 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Эволюционные аспекты динамики мутаций в репликационно-транскрипционном комплексе SARS-CoV-2. *А.Ю. Пальнов, А.П. Девятериков, Н.В. Пальнова, А.М. Шестопалов*
- 527 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетический анализ архитектуры колоса пшеницы и его компьютерное фенотипирование у F₂ гибридов тетраплоидных пшениц *Triticum aethiopicum* и *T. carthlicum*.
Ю.В. Кручинина, Е.Г. Комышев, М.А. Генаев, В.С. Коваль, Д.А. Афонников, Н.П. Гончаров

Molecular and cell biology

- 345 **ORIGINAL ARTICLE**
Concept of natural genome reconstruction. Part 5. Analysis of changes in the lifespan of old animals after reinfusion of bone marrow cells derived from old animals and treated with hDNA^{gr} in combination with recombinant human angiogenin.
V.S. Ruzanova, L.U. Grivtsova, S.G. Oshikhmina, A.S. Proskurina, G.S. Ritter, E.V. Dolgova, S.S. Kirikovich, E.V. Levites, Y.R. Efremov, T.D. Dubatolova, M.I. Meschaninova, A.L. Mamaev, O.S. Taranov, S.V. Sidorov, O.Y. Leplina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh, N.A. Kolchanov, A.S. Bryukhovetskiy, S.S. Bogachev
- 362 **ORIGINAL ARTICLE**
Generation of the RCPCMi014-A and RCPCMi014-B lines from T-lymphocytes of a healthy donor and verification of their monoclonal origin by TCR V(D)J rearrangement analysis.
D.K. Sherman, M.E. Bogomiakova, E.A. Kastueva, I.V. Zvyagin, V.K. Ruppel, E.V. Barsova, A.Y. Gorbachev, N.A. Kulemin, A.A. Barinova, E.A. Zerkalenkova, A.N. Bogomazova, M.A. Lagarkova

Plant breeding for immunity and performance

- 372 **ORIGINAL ARTICLE**
Development of a molecular marker for the *Run8* gene for the selection of barley genotypes resistant to smut.
E.A. Orlova, N.P. Bechtold, Yu.N. Grigoriev, O.Yu. Shoeva, A.Yu. Glagoleva, T.V. Kukoeva
- 381 **REVIEW**
Somaclonal variation in *Saccharum* spp.: unraveling its potential despite current neglect. S. Munir, M.A.B. Jaffar, S. Yasmeen, M.T. Khan, I.A. Khan

Abiotic stress tolerance in plants

- 391 **REVIEW**
Factors of wheat frost hardiness – ice recrystallization inhibitor proteins.
N.E. Korotaeva, A.V. Fedyeva, K.K. Musinov, A.S. Surnachev, G.B. Borovskii
- 403 **ORIGINAL ARTICLE**
Adaptive responses of pear cultivars to low-temperature stress in the spring period.
A.E. Mishko, A.V. Klyukina

- 412 **ORIGINAL ARTICLE**
Characteristics of galacturonate reductase (*GalUR*) genes in garlic (*Allium sativum* L.) and changes in their expression in response to abiotic stressors.
M.A. Filyushin, T.M. Seredin, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

Symbiotic systems

- 424 **ORIGINAL ARTICLE**
Transcriptional changes of aquaporin genes in leaves of black medic induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation under water deficit.
A.P. Yurkov, T.R. Kudriashova, A.I. Belyaeva, A.A. Kryukov
- 435 **ORIGINAL ARTICLE**
A production strain of soybean nodule bacteria RZ300 *Bradyrhizobium japonicum* resistant to drying on the seed surface: cultural properties and genomic features.
Yu.V. Kosulnikov, A.A. Kryukov, K.N. Berdysheva, A.I. Kovalchuk, A.P. Yurkov, Yu.V. Laktionov

Animal genetics

- 444 **ORIGINAL ARTICLE**
Comparative cytogenetic analysis of the germline-restricted chromosome in Fringillidae species (Passeriformes, Aves).
L.P. Malinovskaya, K.V. Tishakova, P.M. Borodin
- 451 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic diversity of horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures of the Ob-Irtysh region of Western Siberia and their genetic proximity to modern horses of indigenous breeds. M.A. Kusliy, A.A. Yurlova, N.V. Vorobyeva, A.A. Proskuryakova, M.A. Demin, S.M. Sitnikov, V.N. Zharonkin, S.S. Onishchenko, A.K. Kasparov, A.E. Tupikin, A.S. Graphodatsky, A.S. Molodtseva, A.A. Tishkin

Human genetics

- 461 **ORIGINAL ARTICLE**
Toxic metals and genetic polymorphism in indigenous populations of northern Asia and America. B.A. Malyarchuk, N.V. Pokhilyuk
- 470 **ORIGINAL ARTICLE**
The association study of genetic variants with developing musical aptitude in humans. A.V. Kazantseva, A.V. Toropova, E.K. Khusnutdinova, S.B. Malykh

Medical genetics

- 482 **ORIGINAL ARTICLE**
Diagnostic efficiency of whole exome sequencing in the search for genetic causes of hereditary diseases in Yugra (West Siberia, Russia). *M.Yu. Donnikov, P.A. Suchko, A.V. Morozkina, L.N. Kolbasin, E.A. Popova, S.I. Papanov, Yu.S. Koshevaya, L.G. Danilov, Yu.A. Eismont, O.S. Glotov, L.V. Kovalenko*
- 490 **ORIGINAL ARTICLE**
Rare variants in cholesterol transporter genes in patients with lipid metabolism disorders. *A.D. Izyumchenko, M.N. Grunina, K.V. Dracheva, O.A. Chumakova, K.O. Tanayants, K.V. Legostaeva, A.N. Kulikov, O.A. Berkovich, E.I. Baranova, S.N. Pchelina, V.V. Miroshnikova*

Bioinformatics and systems biology

- 502 **REVIEW**
Mathematical and computational modeling of biosystems at different levels of organization. *S.A. Lashin, R.A. Ivanov, Y.G. Matushkin*
- 515 **ORIGINAL ARTICLE**
Evolutionary inferences from the analysis of mutation dynamics in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. *A.Yu. Palyanov, A.P. Devyaterikov, N.V. Palyanova, A.M. Shestopalov*
- 527 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic analysis of wheat ear architecture in F₂ hybrid of tetraploid wheats *Triticum aethiopicum* and *T. carthlicum* and its computer phenotyping. *Yu.V. Kruchinina, E.G. Komyshev, M.A. Genaev, V.S. Koval, D.A. Afonnikov, N.P. Goncharov*

doi 10.18699/vjgb-26-39

Концепция природной реконструкции генома.

Часть 5. Анализ изменения продолжительности жизни старых животных после реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных hDNA^{gr} и ангиогенином рекомбинантным человеческим

В.С. Рузанова ^{1*}, Л.Ю. Гривцова^{2*}, С.Г. Ошихмина ¹, А.С. Проскурина ¹, Г.С. Риттер ¹, Е.В. Долгова ¹, С.С. Кирикович ¹, Е.В. Левитес ¹, Я.Р. Ефремов ¹, Т.Д. Дубатолова ³, М.И. Мещанинова ⁴, А.А. Мамаев⁵, О.С. Таранов ⁶, С.В. Сидоров ^{7,8}, О.Ю. Леплина ⁹, А.А. Останин ⁹, Е.Р. Черных ⁹, Н.А. Колчанов ¹, А.С. Брюховецкий^{10#}, С.С. Богачев ^{1#} 

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

² Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁵ ООО «Лаборатория Ангиофарм», Новосибирск, Россия

⁶ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁷ Новосибирский национальный государственный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

⁸ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

⁹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

¹⁰ АО Клинический госпиталь «НейроВита», Москва, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. Проведены две серии тестов (на мышах и крысах) по оценке продолжительности жизни старых животных, которым были реинфузированы клетки костного мозга старых животных, обработанные фрагментированной ДНК человека (hDNA^{gr}), ангиогенином рекомбинантным человеческим и двумя препаратами совместно. В качестве групп сравнения использовались животные, которым реинфузировали необработанные клетки костного мозга старых животных или клетки костного мозга от молодых особей. В случае как аутбредных мышей, так и мышей линии CBA/Lac не выявлено достоверного увеличения продолжительности жизни животных при реинфузии клеток костного мозга, обработанных препаратом hDNA^{gr}, по сравнению с группой мышей, которым реинфузировали необработанные клетки костного мозга. При использовании линии CBA/Lac мыши, которым реинфузировали клетки костного мозга, обработанные ангиогенином, на 10-й месяц после обработки одновременно пали от характерного симптомокомплекса. Патоморфологический анализ предполагает, что одновременная гибель мышей произошла в результате патологических нарушений в выделительных системах животных. Реинфузия клеток костного мозга от старых животных, обработанных ангиогенином и hDNA^{gr}, и клеток костного мозга, взятых от молодых животных, значительно увеличивает продолжительность жизни мышей в группах. Совместное применение двух активаторов, ангиогенина и hDNA^{gr}, увеличивало среднюю продолжительность жизни 30 % экспериментальных мышей до 35 мес. при 28 мес. в контроле. При использовании в качестве модельных животных крыс линии Вистар в первом эксперименте было показано достоверное увеличение жизни крыс при реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных препаратом hDNA^{gr}, до 28 мес. по сравнению с группой, получавшей необработанные клетки костного мозга старых животных, где средняя продолжительность жизни крыс составила 24 мес. Во втором аналогичном эксперименте достоверной разницы в продолжительности жизни крыс для указанных двух групп показано не было. Животные, которым вводили клетки костного мозга, обработанные ангиогенином, прожили достоверно дольше, чем крысы из контрольной группы. Проведенный анализ количества теломерной ДНК в клетках костного мозга крыс экспериментальных и контрольной групп через 12 мес. после обработки свидетельствовал, что достоверного увеличения теломерной ДНК не произошло. Рассматривается молекулярная/клеточная модель старения организма, связанная с концепцией «природной реконструкции генома».

Ключевые слова: длина теломеры; продолжительность жизни; препарат двуцепочечной ДНК (hDNA^{gr}); ангиогенин рекомбинантный человеческий; патоморфологический анализ; реинфузия клеток костного мозга

Для цитирования: Рузанова В.С., Гривцова Л.Ю., Ошихмина С.Г., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Дубатолова Т.Д., Мещанинова М.И., Мамаев А.А., Таранов О.С., Сидоров С.В., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Брюховецкий А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 5. Анализ изменения продолжительности жизни старых животных после реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных hDNA^{gr} и ангиогенином рекомбинантным человеческим. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):345-361. doi 10.18699/vjgb-26-39

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

Concept of natural genome reconstruction.

Part 5. Analysis of changes in the lifespan of old animals after reinfusion of bone marrow cells derived from old animals and treated with hDNA^{gr} in combination with recombinant human angiogenin

V.S. Ruzanova ^{1*}, L.U. Grivtsova^{2*}, S.G. Oshikhmina ¹, A.S. Proskurina ¹, G.S. Ritter ¹, E.V. Dolgova ¹, S.S. Kirikovich ¹, E.V. Levites ¹, Y.R. Efremov ¹, T.D. Dubatolova ³, M.I. Meschaninova ⁴, A.L. Mamaev⁵, O.S. Taranov ⁶, S.V. Sidorov ^{7,8}, O.Y. Leplina ⁹, A.A. Ostanin ⁹, E.R. Chernykh ⁹, N.A. Kolchanov ¹, A.S. Bryukhovetskiy^{10#}, S.S. Bogachev ^{1#} 

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

² National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁵ Laboratory Angiopharm LLC, Novosibirsk, Russia

⁶ State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁷ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁸ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

⁹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

¹⁰ Clinical Hospital "NeuroVita", Moscow, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. Two series of tests were performed, on mice and rats, to assess the lifespan of old animals reinfused with bone marrow cells from old animals treated with fragmented human DNA (hDNA^{gr}), recombinant human angiogenin, and both preparations together. Animals reinfused with untreated bone marrow cells from old animals or bone marrow cells from young animals were used as comparison groups. Using both outbred mice and CBA/Lac mice, no significant increase in the lifespan of animals reinfused with bone marrow cells treated with the hDNA^{gr} was found compared with the group of mice reinfused with untreated bone marrow cells. Using the CBA/Lac line, mice reinfused with bone marrow cells treated with angiogenin simultaneously died of the characteristic symptom complex at 10 months after treatment. Pathomorphological analysis suggests that the simultaneous death of mice occurred as a result of pathological disorders in the excretory systems of animals. Reinfusion of bone marrow cells from old animals treated with angiogenin and hDNA^{gr} and bone marrow cells taken from young animals significantly increases the lifespan of mice in groups. The combined use of two activators, angiogenin and hDNA^{gr}, increased the average lifespan of 30 % of experimental mice to 35 months compared to 28 months in the control. Using Wistar rats as model animals in the first experiment, a reliable increase in the lifespan of rats with reinfusion of bone marrow cells from old animals treated with the hDNA^{gr} preparation to 28 months was shown compared to the group that received untreated bone marrow cells from old animals, where the average lifespan of rats was 24 months. In the second similar experiment, no reliable difference in the lifespan of rats for the two groups was shown. Animals injected with bone marrow cells treated with angiogenin lived significantly longer than rats from the control group. The analysis of the amount of telomeric DNA in bone marrow cells of rats from the experimental and control groups 12 months after treatment showed that there was no significant increase in telomeric DNA. A molecular/cellular model of aging of the organism associated with the concept of "natural reconstruction of the genome" is considered.

Key words: telomere length; life expectancy; double-stranded DNA preparation (hDNA^{gr}); recombinant human angiogenin; pathomorphological analysis; reinfusion of bone marrow cells

For citation: Ruzanova V.S., Grivtsova L.U., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Sidorov S.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bryukhovetskiy A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 5. Analysis of changes in the lifespan of old animals after reinfusion of bone marrow cells derived from old animals and treated with hDNA^{gr} in combination with recombinant human angiogenin. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):345-361. doi 10.18699/vjgb-26-39

Введение

В современной биологической науке доминирует проблема старения. Это связано с тем, что основным ориентиром научной мысли и практической науки является поиск возможностей остановить прогрессивное увеличение количества людей, страдающих так называемыми болезнями цивилизации, которые сопряжены именно с этим естественным биологическим процессом.

Старение и смерть – базовые, сущностные биологические свойства, отражающие функционирование и эволю-

цию всех живых организмов, включая человека. С точки зрения термодинамики старение представляет собой переломный момент времени между способностью организма уменьшать свою энтропию, что также является базовым сущностным свойством организма, и переходом к последовательному продвижению к необратимо стационарному, т. е. мертвому состоянию, которое характеризуется максимальной энтропией (Lefever, 2018; Tlidi et al., 2018a, b). В отношении живого организма старение – это динамический патофизиологический процесс накопле-

ния изменений на разных уровнях живого, приводящий к постепенному снижению жизненной активности и, как следствие, к смерти. Скорость этого универсального необратимого (в рамках традиционного существования) процесса определяется многими внешними и внутренними факторами, в основе которых, как нам видится, лежит «генетическое старение» репаративной машины организма в виде стволовых клеток различного генеза, поддерживающих скоординированные реакции, сохраняющие постоянство внутреннего состояния организма. Все остальные патологические процессы – это следствие неспособности стволовых клеток поддерживать гомеостаз (Bowen, Atwood, 2004; Михеев и др., 2023).

Существует множество теорий старения, которые, как правило, объединяют в две категории: «программные» (эволюционные) теории и теории «повреждения».

Согласно программным теориям, функционирование живого организма запрограммировано природой лишь на период его активной жизнедеятельности, включающей в себя развитие, а именно рост организма, и способность к репродукции, так называемой биологической полезности, что определяется видовой популяционной целесообразностью (da Costa et al., 2016). То есть изменения, связанные со старением, подконтрольны своего рода биологическому датчику, основная функция которого состоит в том, чтобы следить за «расписанием» развития биологического организма до тех пор, пока он не достигнет половой зрелости и способности размножения (Козлов, 1999).

Теории повреждения предполагают, что старение не является неизбежным результатом жизни организма, а представляет собой следствие накопления повреждений, или случайных ошибок, в системе хранения и передачи генетической информации, компенсация которых со временем становится невозможной, что и приводит к смерти (Kirkwood, 2005; Vijg, Campisi, 2008; Gems, Partridge, 2013; Михеев и др., 2023).

Представители теорий «программированного» старения исходят из положения, согласно которому процесс старения определяется генетическими механизмами, направляющими эволюцию живой природы. Однако в процессе изменений, связанных со старением, могут действовать и другие механизмы, не включенные в генетическую программу, которые оказывают «непрограммированное» воздействие на организм, тоже приводящее к завершению жизни. Такое воздействие может происходить в результате случайного повреждения клетки, меняющего ее структуру, функцию и метаболизм (в первую очередь структуру мембран). Эти воздействия могут затронуть и генетическую информацию в виде ДНК хромосом, содержащую, как считается, программу старения, модулируя ее активацию. Кроме того, в результате нормальных метаболических процессов в клетке образуются ядовитые побочные продукты и свободные радикалы, деструктивная активность которых компенсируется дезактивирующими системами клетки. При сбое в механизмах дезактивации, аналогично с внешними воздействиями, также могут возникнуть повреждения мембран и ДНК хромосом, что тоже будет сопровождаться активацией или модуляцией механизмов старения.

Таким образом, подход, в основе которого лежит представление о старении как о процессе, запрограммированном эволюцией, и который является программой генетического кода (программируемое старение), и подход, согласно которому повреждения клеток не детерминируются генетически, но при этом или модулируют, или сами составляют механизм старения (непрограммированное старение), имеют общий биологический характер в объяснении причин инволюции, старости и окончания жизни.

В связи с вышесказанным, на наш взгляд, будет более корректным, анализируя вопросы старения организма, рассматривать не причины старения в их философском понимании, а уделить внимание изменениям в организме на уровне функций, клеток и молекулярных процессов, которые служат маркерами процесса старения (признаки старения). Каждое из этих изменений сопровождает процесс старения и является детектируемым «отражением» идущего инволюционного процесса. Мы сознательно уходим от термина «механизм старения», поскольку этот термин обозначает процесс запуска и развития событий, который определяется основополагающими причинами старения, в настоящий момент не поддающимися пониманию.

Известно много обзорных работ, классифицирующих выраженные, детектируемые признаки старения. В этих обзорах систематизированы данные, характеризующие признаки, сопровождающие старение организма. К ним относятся: нестабильность генома, истощение теломер, эпигенетические изменения, потеря протеостаза, нарушение макроаутофагии, дерегулирование восприятия питательных веществ, митохондриальная дисфункция, клеточное старение, истощение стволовых клеток, изменение межклеточной коммуникации, хроническое воспаление, дисбаланс микробиоты, нарушение нейроэндокринной регуляции. В рамках этих основных категорий находятся практически любые классифицируемые по определенному признаку молекулярные и биохимические процессы, которые затрагиваются процессами старения (Kenyon, 2010; López-Otín et al., 2013, 2023; Krauss, de Haan, 2016; Proshkina et al., 2020; Zhu et al., 2021; Михеев и др., 2023).

Одним из удивительных результатов настоящего исследования является тот факт, что фрагменты экстракционной двуцепочечной ДНК (дцДНК), доставленные в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) естественным природным механизмом, индуцируют процессы, вследствие которых увеличивается количество теломерной ДНК без участия теломеразы и предположительно по механизму альтернативного удлинения теломер. В работе (Рузанова и др., 2025) дана характеристика структуры и функционирования теломер и охарактеризованы механизмы сохранения длины этой структуры хромосомы.

Кратко, теломеры – это участки генома на концах линейных хромосом. Теломерная ДНК позвоночных состоит из повторов TTAGGG, связанных с ними наборов белков, формирующих теломерный гетерохроматин, которые модулируют биологические функции теломеры. Терминальная часть одноцепочечной нити теломеры вместе с белками кэпинга образует комплекс, предохраняющий рекомбиногенную структуру от распознавания факторами, запускающими механизм репарации повреждения ДНК.

Общепризнано, что ДНК-полимераза в силу консервативного механизма репликации не в состоянии полностью реплицировать линейные ДНК-матрицы, что в случае с теломерами приводит к прогрессивному укорачиванию концов хромосом (Harley et al., 1990). При достижении критической длины теломеры становятся не способными связывать достаточное количество белков, что воспринимается как открытые двуцепочечные концы. Эта крайне рекомбиногенная структура запускает механизм репарации повреждения ДНК, который, в свою очередь, активирует ингибиторы циклин-зависимых киназ p21 и p16 и останавливает пролиферацию (Stein et al., 1999). Несмотря на критическое укорочение, такие теломеры сохраняют некоторое количество белков, что предотвращает слияние теломер разных хромосом, но при этом не останавливает активированный репаративный механизм. В этой ситуации пролиферативный арест становится перманентным. Иницируется и поддерживается основной триггер инволюции организма и множества возрастных заболеваний – клеточное старение-сенесценс (He, Sharpless, 2017). Одним из маркеров сенесценса являются ассоциированные с теломерами фокусы репарации повреждений, возникших в результате атаки репликативных вилок теломерной ДНК активированной молекулярной репаративной машиной.

Показано, что фокусы репарации, связанные с возникшими повреждениями, также возникают в теломерном гетерохроматине на длинных теломерах в терминально дифференцированных клетках (Di Micco et al., 2021). В этом случае механизм инициации старения неделящихся клеток может выглядеть следующим образом. В делящихся клетках белки, связывающие теломеры, ингибируют репарацию ДНК *in cis*, что предотвращает слияние хромосом. Как следствие, нечувствительность к репарации повреждений ДНК, возникающих внутри теломерного гетерохроматина укорачивающихся хромосом делящихся клеток, входит в конфликт с молекулярной репаративной машиной и репаративным процессом в целом, что вызывает межклеточное распространение сигнала механизма репарации повреждения ДНК и образование фокусов репарации в теломерном гетерохроматине длинных теломер терминально дифференцированных клеток. Фокусы репарации, образующиеся в теломерах таких клеток, не репарируются, накапливаются и индуцируют фенотип, подобный старению. Следуя указанной логике, стойкая активация механизма репарации повреждения ДНК является общепологающим событием как репликативного клеточного старения, вызванного критически короткими теломерами, так и состояния, подобного старению, вызванного поврежденными теломерами в нереплицирующихся клетках (Rossiello et al., 2022).

При выраженной дисфункции теломер индуцируется апоптотическая клеточная гибель или аутофагия со всеми сопровождающими эти процессы молекулярными событиями (Nassour et al., 2019). Стареющие клетки приобретают связанный со старением секреторный фенотип, секретируя набор провоспалительных цитокинов, негативно влияющих на структуру внеклеточного матрикса и жизнеспособность стволовых клеток (Tchkonia et al., 2013).

Таким образом, неспособность восстановить количество утраченного теломерного гетерохроматина является одной из причин клеточного старения и его распространения на весь организм. Конфликт нечувствительности к репарации повреждений теломерной ДНК и репаративного механизма еще раз свидетельствует о доминирующей роли целостности ДНК хроматина в инициации процесса старения. Активация механизма репарации повреждения ДНК и накопление теломерных фокусов репарации, как предполагается, связаны и с другими процессами, ассоциированными со старением, такими как митохондриальная дисфункция, измененное восприятие питательных веществ, нарушенная аутофагия, потеря протеостаза и эпигенетическая дисрегуляция. Предлагается «теломероцентрическое» обоснование многих признаков старения (Chakravarti et al., 2021), среди которых уменьшение длины теломер – один из ключевых. Эрозия теломерного гетерохроматина является причиной многочисленных заболеваний, ассоциированных с возрастом (Rossiello et al., 2022).

В работе (Рузанова и др., 2025) показано, что при обработке ГСК в составе клеток костного мозга препаратом фрагментированной дцДНК (hDNA^{gr}) на трех модельных организмах в клетках потомков ГСК, в которые эти фрагменты интернализовались естественным природным механизмом, произошло значительное достоверное увеличение количества теломерной ДНК, ставшего соизмеримым с количеством теломерной ДНК юных животных. Также в цитируемой работе показано, что это увеличение не связано с теломеразной активностью.

В настоящем исследовании в свете «теломероцентрической» идеи процесса старения и его распространения на систему гемопоэтических предшественников предложен экспериментальный подход, оценивающий связь продолжительности жизни экспериментальных животных и количества теломерной ДНК в ГСК и их потомках. Экспериментальный дизайн исследования включал реинфузию старым животным суспензии клеток костного мозга, обработанных *ex vivo* препаратами фрагментированной геномной ДНК (hDNA^{gr}), ангиогенином и двумя активаторами совместно. Ангиогенин рекомбинантный человеческий был выбран в качестве препарата сравнения, поскольку при его использовании тоже происходит увеличение количества теломерной ДНК в клетках потомков ГСК, но это увеличение, в отличие от действия препарата ДНК, связано с активацией гена теломеразы (Рузанова и др., 2025). Предполагалось, что в результате проведенных обработок будет детектироваться увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Для пилотных экспериментов были использованы половозрелые самцы крыс линии Wistar массой тела 400–450 г. Возраст крыс на начало работы с ними составлял 13.5 мес. В работу были также включены 18 аутбредных мышей-самок массой тела 50–60 г. Их возраст на начало экспериментов – 12 мес. Животные были получены из питомника Науч-

ного центра биомедицинских технологий ФМБА России, имеют ветеринарный сертификат. После прохождения двухнедельного карантина продолжали содержаться в виварии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба, пока не достигли соответствующего возраста для проведения экспериментов. Животные находились в полипропиленовых клетках со свободным доступом к пище и воде, по 5 особей в каждой. Вся работа с лабораторными животными выполнялась в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом с последующей дислокацией шейных позвонков.

Для повторных экспериментов были использованы самцы мышей СВА/Лас в возрасте 14 мес. и самки крыс линии Wistar в возрасте 16 мес., выведенные в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали группами по 6–10 мышей и по 3–4 крысы в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Института цитологии и генетики СО РАН. Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации шейных позвонков, крыс – методом CO_2 -эвтаназии или декапитацией. Для выделения клеток костного мозга были использованы 14- и 2-месячные самцы мышей линии СВА/Лас, 15-месячные самцы и 2.5-месячная самка крыс линии Wistar.

Выделение клеток костного мозга. Для выделения костного мозга животных умерщвляли, выделяли бедренные и большеберцовые кости, отсекали эпифизы и промывали костномозговую полость DMEM+2 % FBS. Клеточную суспензию пропускали несколько раз через иглу 21-го калибра, чтобы избавиться от костномозговых розеток, фильтровали через 40 мкм. Клетки осаждали 10 мин при 400g и ресуспендировали в буфере со 130 мМ хлоридом аммония для лизиса эритроцитов на 3–5 мин. Затем буфер разбавляли в 10 раз PBS, клетки переосаждали, ресуспендировали в среде DMEM и подсчитывали в камере Горяева.

Обработка клеток костного мозга индукторами. В ходе пилотного эксперимента клетки костного мозга, выделенные из животных, инкубировали с hDNA^{gr} в течение 1 ч при комнатной температуре (20–22 °C). Количество hDNA^{gr} для экспозиции с 1×10^6 клеток костного мозга – 200 нг.

В ходе повторного эксперимента клетки костного мозга, выделенные из животных, инкубировали с индукторами в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO_2 , влажности 95 %, 37 °C из расчета: на 3 млн клеток – 500 мкг hDNA^{gr}, либо 500 нг ангиогенина, либо 500 мкг hDNA^{gr} и 500 нг ангиогенина совместно в 1 мл среды DMEM без сыворотки.

Препарат hDNA^{gr}. Реконструктор ДНК генома человека (hDNA^{gr}) выделен из плацент здоровых женщин. ДНК была фрагментирована до 1–20 нуклеосомных мономеров (200–2000 п.н.) с помощью ультразвука, депротеинизирована с использованием протеиназы К и экстрагирована фенол-хлороформом.

Ангиогенин предоставлен ООО «Лаборатория Ангиофарм» (Новосибирск, Россия). Мечение ангиогенина Cy5 проводили согласно протоколу производителя, компании Lumiprobe (Германия).

Внутривенное введение препарата клеток костного мозга. В ходе пилотного эксперимента опытным мышам и крысам в хвостовую вену однократно вводили по 1×10^6 клеток костного мозга в 0.3 или 0.5 мл 0.9 % раствора хлористого натрия. Контрольным животным вводили внутривенно 0.3 и 0.5 мл 0.9 % раствора хлористого натрия соответственно.

В ходе повторного эксперимента мышам и крысам в хвостовую вену однократно вводили по 1×10^6 клеток костного мозга в 0.2 или 0.5 мл 0.9 % раствора хлористого натрия. Контрольным животным вводили по 1×10^6 необработанных клеток костного мозга, выделенных из старых и молодых животных.

Оценка влияния препарата клеток костного мозга. В течение всего исследования животных ежедневно осматривали. Отслеживали общее поведение и состояние животных. Оценивали экстерьер, который продемонстрирован на фотографиях. Измеряли массу тела. Проведены морфология спонтанно возникших опухолей и регистрация естественной гибели экспериментальных животных.

Патоморфологический анализ органов мышей. Органы и опухоли были выделены из животных и фиксированы в 4 % нейтральном параформальдегиде. Образцы органов были дегидратированы в возрастающих концентрациях этанола, осветлены в ксилоле и залиты в парафин. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм были окрашены гематоксилином и эозином. Визуализацию препаратов и микрофотографирование осуществляли на световом микроскопе Axio Imager ZI (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Приготовление мазков крови. Для приготовления мазков использовали кровь, взятую из хвостовой вены. Мазки крови фиксировали метанолом (ОАО «Вектон», Россия) в течение 6–10 мин, промывали водой, высушивали и окрашивали по Гимзе–Романовскому, pH 7.4. Препараты просматривали с помощью микроскопа Leica DV 4000V (Германия) в проходящем свете с иммерсией, увеличение $\times 100$.

Приготовление мазков костного мозга. Подготовка препаратов костного мозга проводилась либо по стандартной методике приготовления мазка с использованием небольшого количества суспензии клеток костного мозга, либо простым отпечатыванием сечения грудной кости животных. Дальнейшая подготовка препарата костного мозга была выполнена аналогично приготовлению мазков крови.

Анализ изменения количества теломерной ДНК. Для оценки теломерной ДНК использовались клетки костного мозга, выделенные из животных, обработанных индукторами, через 12 мес. после реинфузии; клетки костного мозга человека через 15 сут культивирования на метилцеллюлозе после обработки индукторами. Клетки костного мозга заливали в блоки 1 % легкоплавкой агарозы из расчета 500 тыс. клеток на один блок. До проведения анализа блоки хранили в 0.5 М ЭДТА при 4 °C. Перед электрофорезом блоки споласкивали в ТЕ-буфере и

инкубировали с лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % саркозил (Serva, Германия), 1 мг/мл протеиназы К (Thermo Fisher Scientific, США)) в течение 20 мин при 50 °С. Затем блоки легкоплавкой агарозы фиксировали в карманах агарозного блока и подвергали электрофоретической разгонке в системе пульс-фореза в режиме: forward – 3 с, reverse – 1 с, RAM-фактор – 0.9.

После этого ДНК переносили на мембрану Hybond N с использованием капиллярного способа в 20×SSC (Маниатис и др., 1984). Образцы ДНК прижигали к мембране в течение 10 мин под ультрафиолетовой лампой и хранили до гибридизации.

Мембрану с пришитой к ней ДНК переносили в 50 мл предгибризационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5× раствор Денхарда, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей, и инкубировали при 37 °С в течение 1–3 ч. Меченый образец ДНК (P^{32} олигонуклеотид G-зонд – (TTAGGG)₉, C-зонд – (CCCTAA)₉) денатурировали кипячением 10 мин и вносили в 50 мл гибридизационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5 % декстран сульфат 500000, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей. Предгибризационный раствор сливали и к мембране после перемешивания приливали гибридизационный буфер, содержащий меченый материал. Гибридизацию вели при 37 °С на протяжении ночи при постоянном перемешивании. После гибридизации мембрану отмывали раствором, содержащим 0.1 % SDS и 0.1×SSC, три раза по 15 мин при 37 °С. Режим гибридизации (буферная система и количество отмывок) коротких олигонуклеотидов выбран эмпирически при проведении многочисленных экспериментов с радиоактивным фосфором (Dolgoва et al., 2012). Температура гибридизации находилась в пределах 37–42 °С.

Мембрану с перенесенными на нее образцами экспонировали на экран К-типа. Сканирование радионуклидных образцов проводили при помощи системы PharosFX. Полученные изображения анализировали в программе Quantity One с использованием параметра плотности пятен (интенсивность/мм²) или программы GEL-Pro.

Статистический анализ проводили с программным обеспечением Statistica 8 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, США). Анализ выживаемости выполняли построением кривых Каплана–Мейера с применением логрангового теста (критерий Мантеля–Кокса). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Выявленные различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных hDNA^{gr}, на продолжительность жизни и общее состояние экспериментальных животных

На основании модели, характеризующей изменение количества теломерной ДНК, и результатов FISH показана возможность появления генетической информации, содержащейся в экстраклеточных ДНК фрагментах, в реципиентном геноме, как предполагается, в интегрированном состоянии или в форме колец. Результаты свидетельствуют,

что произошло увеличение количества теломерной ДНК и появились многочисленные сайты на хромосомах, гибридизующиеся с материалом ДНК исходно внехромосомной локализации (которые, как свидетельствуют эксперименты, могут представлять собой кольца, охватывающие нить ДНК хромосом и сосуществующие в такой форме определенное время (Рузанова и др., 2025)).

Известно, что количество теломерной ДНК является одним из маркеров продолжительности жизни (Rossiello et al., 2022). Была проведена серия экспериментов по оценке продолжительности жизни экспериментальных мышей и крыс. Мы использовали ксеногенную ДНК человека, которая стойко давала увеличение количества теломерной ДНК в клетках мышей и крыс в экспериментах по клонированию, что предполагало наличие условий увеличения продолжительности жизни животных. Однако мы четко понимали, что помимо удлинения теломер могут происходить неконтролируемые взаимоотношения на уровне ДНК между человеческими ДНК фрагментами и хромосомами грызунов, что будет негативно влиять на состояние подопытных животных. Более того, в наших работах и в настоящем исследовании установлено, что только около 1 % от генома может доставляться в клетку. Это означает, что результат интернализации такой ДНК будет в высшей мере вырожденным. В разные клетки попадут различные геномные ДНК, что будет только усугублять последствия возможных неконтролируемых взаимоотношений между ксеногенной экстраклеточной ДНК человека и ДНК хромосом грызунов. В совокупности высказанные соображения предполагали непредсказуемость результатов таких обработок и возможность проявления как искомого увеличения продолжительности жизни животных, так и противоположного отрицательного результата.

Влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных активаторами, на продолжительность жизни и общее состояние мышей

Для пилотного исследования влияния реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных hDNA^{gr}, на продолжительность жизни животных были отобраны девять аутбредных мышей-самок с одинаковым весом без проявлений спонтанно развивающихся подкожных опухолей. Контрольной группе, состоящей из пяти особей, вводили внутривенно 0.9 % раствор натрия хлорида, а опытной, состоящей из четырех особей, – клетки костного мозга, экспонированные с hDNA^{gr}. На начало работы возраст мышей составлял 12 мес. Средняя масса тела опытных и контрольных мышей – 42.1 ± 2.4 г.

Динамика гибели экспериментальных животных отражена на рис. 1, А. Средняя продолжительность жизни мышей составила 16 мес.: в контроле – 487 ± 30 дней, в опыте – 490 ± 31 дней. В группе опытных мышей через 2 мес. после начала эксперимента наблюдался прирост массы тела, тогда как в контрольной группе наблюдали потерю в весе в среднем на 20 % (см. рис. 1, В). Физическое состояние мышей в опытной группе существенно отличалось от состояния мышей в контрольной группе (см. рис. 1, С). Контрольные мыши в терминальной

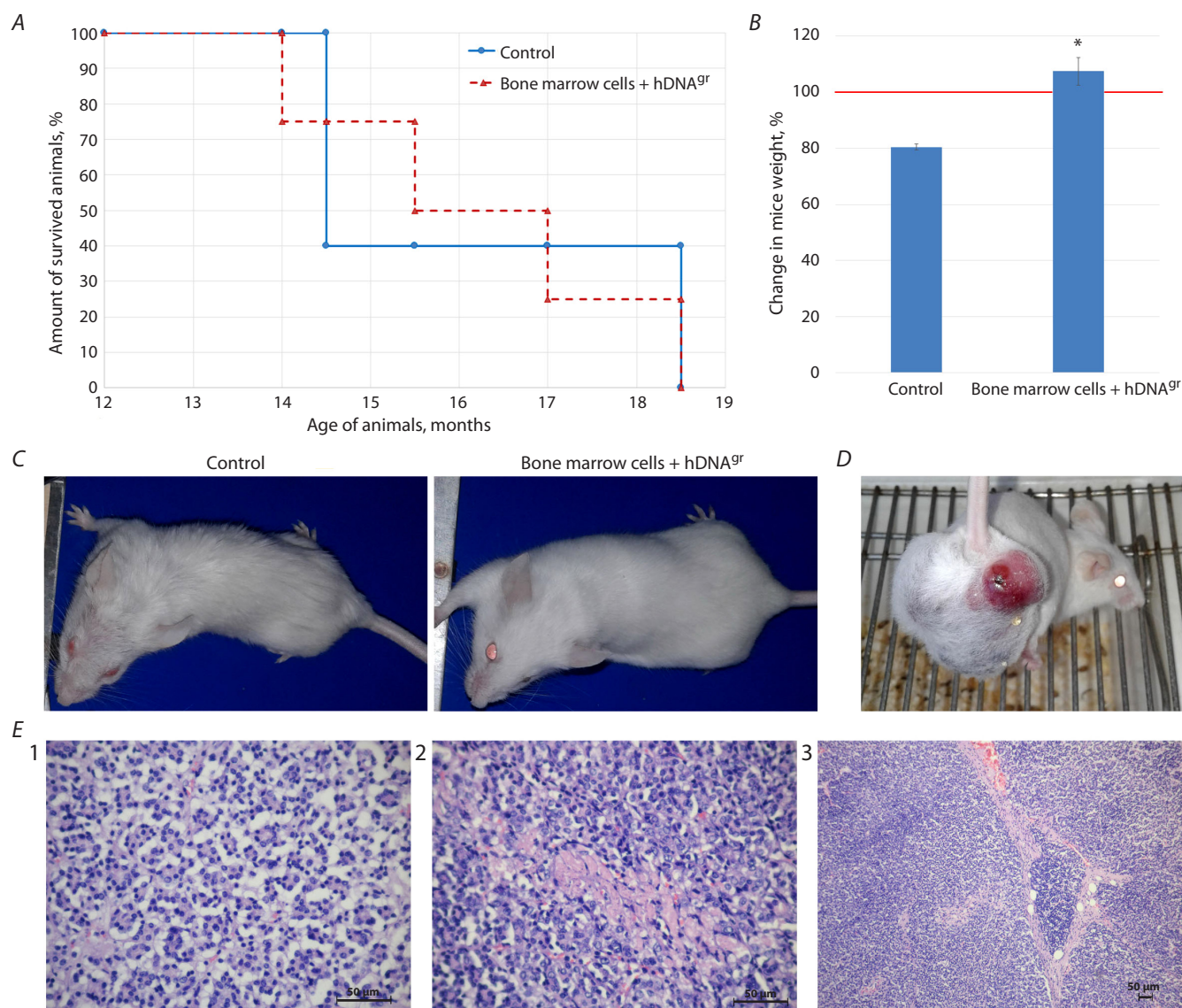


Рис. 1. Влияние hDNA^{gr} на продолжительность жизни мышей.

A – выживаемость животных; *B* – изменение массы тела мышей из контрольной и опытной групп в возрасте 14 мес. относительно исходного веса в 12 мес. в начале эксперимента, принятого за 100 % (обозначен красной линией). * Достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. *C* – сравнительный внешний вид особей из контрольной и опытной групп в возрасте 16 мес.; *D* – внешний вид мыши с опухолью из опытной группы в возрасте 16 мес.; *E* – патоморфологический анализ опухоли мыши из опытной группы в возрасте 16 мес.: 1 – гистоструктура карциномы молочной железы мыши, увеличение $\times 40$; 2 – микро некроз в толще паренхимы карциномы, увеличение $\times 40$; 3 – соединительнотканная септа в паренхиме карциномы, увеличение $\times 10$. Окраска гематоксилином и эозином.

стадии жизни были менее подвижны, волосяной покров неровный, с частичным отсутствием подшерстка. Мыши, которым вводили клетки костного мозга, обработанные hDNA^{gr}, сохраняли активность, пищевое поведение не отличалось от нормы, волосяной покров был ровным, с выраженным подшерстком.

В экспериментальной группе мышей у одной из особей в возрасте 16 мес. было обнаружено новообразование в виде спонтанно развивающегося опухолевого узла в районе малого таза (см. рис. 1, *D*). Опухоль была быстрорастущей и через две недели от даты обнаружения имела объем 7.5 см³. Опухоленоситель был выведен из опыта для макроскопического и морфологического исследования.

Проведенный патоморфологический анализ показал, что паренхима опухоли мыши состояла из эпителиальных клеток кубической формы с базофильной цитоплазмой, содержащих умеренно полиморфные ядра, занимающие половину клеток и содержащие хорошо выраженные ядрышки. В некоторых местах эпителий имел вид железистого с тенденцией к образованию ацинарных или папиллярных структур (см. рис. 1, *E1*). Фигуры митоза и апоптотические тельца редкие. Микро некрозы присутствуют в небольшом количестве (см. рис. 1, *E2*). Распределение эпителиальных клеток хаотичное, в отдельных местах выявлялась слабо выраженная дольчатость ткани, ограниченная тонкими соединительнотканскими септами, содержащими мелкие

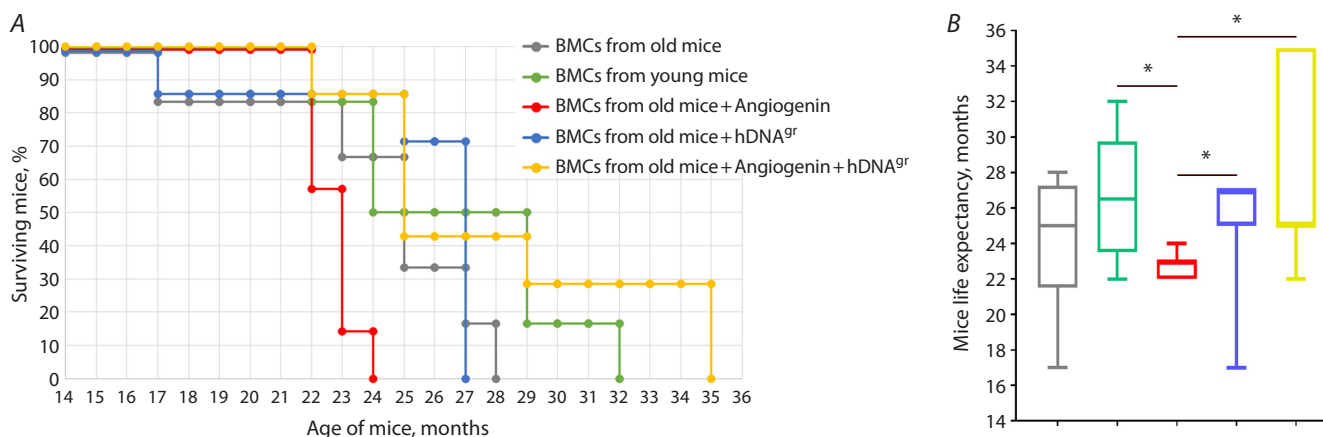


Рис. 2. Анализ продолжительности жизни экспериментальных мышей в группах.

А – кривая Каплана–Майера; В – продолжительность жизни мышей. * Достоверные отличия продолжительности жизни мышей между группами, $p < 0.05$, логранговый тест (критерий Мантеля–Кокса).

сосуды, в просвете которых находились эритроциты. Местами соединительнотканые перегородки утолщались, приобретая отростчатое строение (см. рис. 1, ЕЗ). Было сделано заключение, что произошло спонтанное развитие карциномы молочной железы.

В повторном эксперименте на мышах была выбрана линия СВА/Лас. Сформировано пять групп: 1) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных; 2) животные, которым вводили клетки костного мозга от молодых животных; 3) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином; 4) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные hDNA^{gr}; 5) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином и hDNA^{gr}. Анализ продолжительности жизни мышей в группах представлен на рис. 2.

Реинфузия ГСК, обработанных hDNA^{gr}, не влияет на продолжительность жизни мышей в сравнении с группой животных, которым вводили клетки костного мозга от старых животных (см. рис. 2, В). Этот факт, как и в первом эксперименте, предполагает отсутствие влияния обработки препаратом hDNA^{gr} на продолжительность жизни мышей. У мышей, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином, через 8 мес. после проведенной обработки начал стремительно развиваться симптомокомплекс, в результате которого мыши похудели до 17 г и в течение незначительного промежутка времени (1 мес.) последовательно пали (см. рис. 2).

Наибольшая продолжительность жизни была зафиксирована для групп мышей, которым вводили клетки костного мозга от молодых животных и клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином совместно с препаратом hDNA^{gr}: до 32 и 35 мес. дожили одна и две мыши соответственно (17 и 30 % от общего количества мышей). По окончании исследования на мышинной модели были получены четыре принципиальных результата.

1. Обработка клеток костного мозга ксеногенной дцДНК (hDNA^{gr}) не влияет на продолжительность жизни мышей.

Причины, на наш взгляд, связаны со сложным, плеiotропным влиянием фрагментов экзогенной гетерологичной дцДНК после ее интернализации в ГСК на основные метаболические константы, отвечающие за старение организма. Также следует учитывать тот факт, что в стволовую гемопоэтическую клетку попадает 0.1–1.0 % экстраклеточной ДНК, представляющей собой незначительную часть генома. Это означает, что всегда будет вероятность того, что в клетку не доставляется ДНК теломерных повторов или она доставляется в недостаточном для амплификации или сайт-специфической интеграции количестве.

2. Трансплантация старым животным клеток костного мозга молодых мышат приводит к существенному (до 32 мес.) увеличению продолжительности жизни мышей в группе.

3. Совместное применение двух препаратов, ангиогенина и hDNA^{gr}, интернализирующихся в ГСК (или в одну и ту же клетку, или в разные клетки, или в смешанном варианте), значительно увеличивает продолжительность жизни мышей (до 35 мес.) и превышает результаты, полученные на мышах, которым трансплантировали клетки костного мозга молодых мышат. Это свидетельствует о том, что два независимых активатора ГСК, относящихся к двум классам полимеров, синергично и положительно влияют на «основные метаболические константы» ГСК, отвечающие за старение клетки, что сопровождается увеличением продолжительности жизни экспериментальных мышей. Найденные феномены требуют дальнейшего экспериментального исследования.

4. Ангиогенин как монопрепарат инициировал у мышей развитие специфического симптомокомплекса, который послужил причиной гибели животных в группе. Для понимания произошедших событий в организме мышей при воздействии ангиогенина был проведен патоморфологический анализ (Приложения 1 и 2)¹. У одной мыши не детектировались патологические изменения в проанализированных тканях и органах. У двух других были

¹ Приложения 1–3 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx20.pdf>

выявлены участки атипической ткани в печени и почках. Основные патологические нарушения были выражены в печени и почках. В печени детектировалась дистрофия гепатоцитов, сопровождавшаяся полиморфноклеточной инфильтрацией, соответствующей морфологической характеристике острого гепатита. В почках наблюдались выраженные дистрофические изменения эпителия канальцев и клубочков, что соответствует острой почечной недостаточности. Обе патологические деструкции обнаруживаются в важнейших выделительных системах организма и в принципе могли бы быть причиной гибели животных, связанной с влиянием ангиогенина. Однако патоморфологический анализ, проведенный с животным, которому вводили клетки костного мозга старых животных, показал практически аналогичные результаты. В печени и почках также выявлена атипическая ткань. В печени обнаруживаются изменения паренхимы воспалительного характера, как у мышей после обработки ангиогенином. В почках выявлены дистрофические изменения канальцев и клубочков. Это говорит о том, что все указанные изменения могут являться следствием старения животных. Для двух других групп, которым вводили клетки костного мозга молодых животных и клетки, обработанные hDNA^{gr}, показаны похожие изменения в паренхиме печени и почек, но при полном отсутствии воспаления. Этот факт также предполагает, что причиной гибели животных после обработки ангиогенином являются как обнаруженные патоморфологические деструкции в печени и почках, так и другие не выявленные причины (см. Приложение 1).

Параллельно с патоморфологическим анализом тканей и органов мышей были проанализированы кровь и костный мозг животных, выведенных из эксперимента в предсмертной стадии. Клетки костного мозга для всех экспериментальных групп находились в нормальном состоянии. Для групп, которым вводили клетки костного мозга старых животных и клетки, обработанные ангиогенином, в крови наблюдался сдвиг в сторону повышения количества лимфоцитов. В группе животных, которым вводили клетки костного мозга, обработанные ангиогенином и hDNA^{gr}, была обнаружена патологическая картина морфологии эритроцитов «ёжики», что в большей степени предполагало функциональные нарушения, приведшие к патологическому изменению формы эритроцитов (см. Приложение 2). При этом изменения не повлияли на продолжительность жизни животных в группе.

*Влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК),
обработанных активаторами,
на продолжительность жизни крыс линии Вистар*

В первом пилотном эксперименте (АО Клинический госпиталь «НейроВита», Москва) для исследования влияния hDNA^{gr} на продолжительность жизни крыс-самок линии Вистар было заложено 35 особей. Животных разделили на три группы: доноры костного мозга; контрольная группа, состоящей из 10 особей, которым вводили внутривенно 0.9 % раствор натрия хлорида; и опытная группа из 19 особей, которым вводили клетки костного мозга, обработанные hDNA^{gr}. На начало работы возраст крыс состав-

лял 13 мес. Средняя масса тела опытных и контрольных крыс — 460.0 ± 18.2 г.

Динамика гибели экспериментальных животных отражена на рис. 3, А. Средняя продолжительность жизни крыс популяции Вистар в контрольной группе составила 717 ± 38 дней, или 24 мес., а в группе с введением клеток костного мозга, обработанных hDNA^{gr}, — 842 ± 25 дней, или 28 мес., что было статистически значимо различимо ($p < 0.01$) (см. рис. 3, В). Средняя масса тела крыс в возрасте 24 мес. в опытной группе была достоверно выше, чем в контрольной ($p < 0.05$) (см. рис. 3, С).

Наблюдения за физическим состоянием животных на протяжении всего эксперимента показали, что опытные крысы уже в возрасте 18 мес. существенно отличались от контрольных такими показателями, как лучшее состояние кожного и волосяного покровов, повышенная двигательная активность (см. рис. 3, D). Пищевая активность у опытных крыс была выше, чем у контрольных особей. При достижении возраста 21 мес. (8 мес. после введения препарата) изменения в физическом состоянии животных становятся отчетливыми. Волосяной покров у контрольных крыс редкий, груминг нарушен, тонус мышц снижен. Опытные крысы на этом этапе были более подвижны, отличались исследовательским поведением, тонус мышц не изменен, состояние волос и кожного покрова в норме. В возрасте 25 мес. (12 мес. после введения препарата) у опытных крыс сохранены подвижность и исследовательское поведение, тонус мышц незначительно снижен, координация движения не нарушена. Отмечается незначительное выпадение подшерстка. Кожный покров чистый, груминг не нарушен. Контрольные крысы на этом этапе жизни малоподвижны, тонус мышц снижен, частично нарушена координация движения. Отмечено многочисленное выпадение волосяного покрова и нарушение груминга. Дожившая до возраста 27 мес. контрольная крыса имеет сниженную массу тела, редкий волосяной покров, малоподвижна и имеет нарушенную координацию движения. В опытной группе до этого периода дожили 11 крыс. Их масса тела незначительно снижена, волосяной покров редкий. Но крысы подвижны, координация движения не нарушена, и присутствует исследовательское поведение.

Было проведено морфологическое исследование тканей внутренних органов двух крыс после терапии клетками костного мозга, обработанными hDNA^{gr}, подвергшихся эвтаназии в возрасте 30 и 32 мес. У особи в возрасте 30 мес. детектировалось спонтанно возникшее новообразование в брюшной полости (см. рис. 3, E). При морфологическом обследовании в проекции верхнего полюса правой почки было обнаружено доброкачественное новообразование нейрального происхождения — шваннома, которое носит спорадический характер (см. рис. 3, E, F). Вторую крысу из этой же группы подвергли эвтаназии в возрасте 32 мес. Патоморфологический анализ ткани сердца, легкого, печени, почки, селезенки, головного мозга, спинного мозга и красного костного мозга свидетельствовал об отсутствии патологий.

В повторном эксперименте на крысах той же линии (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) было сравнительно оце-

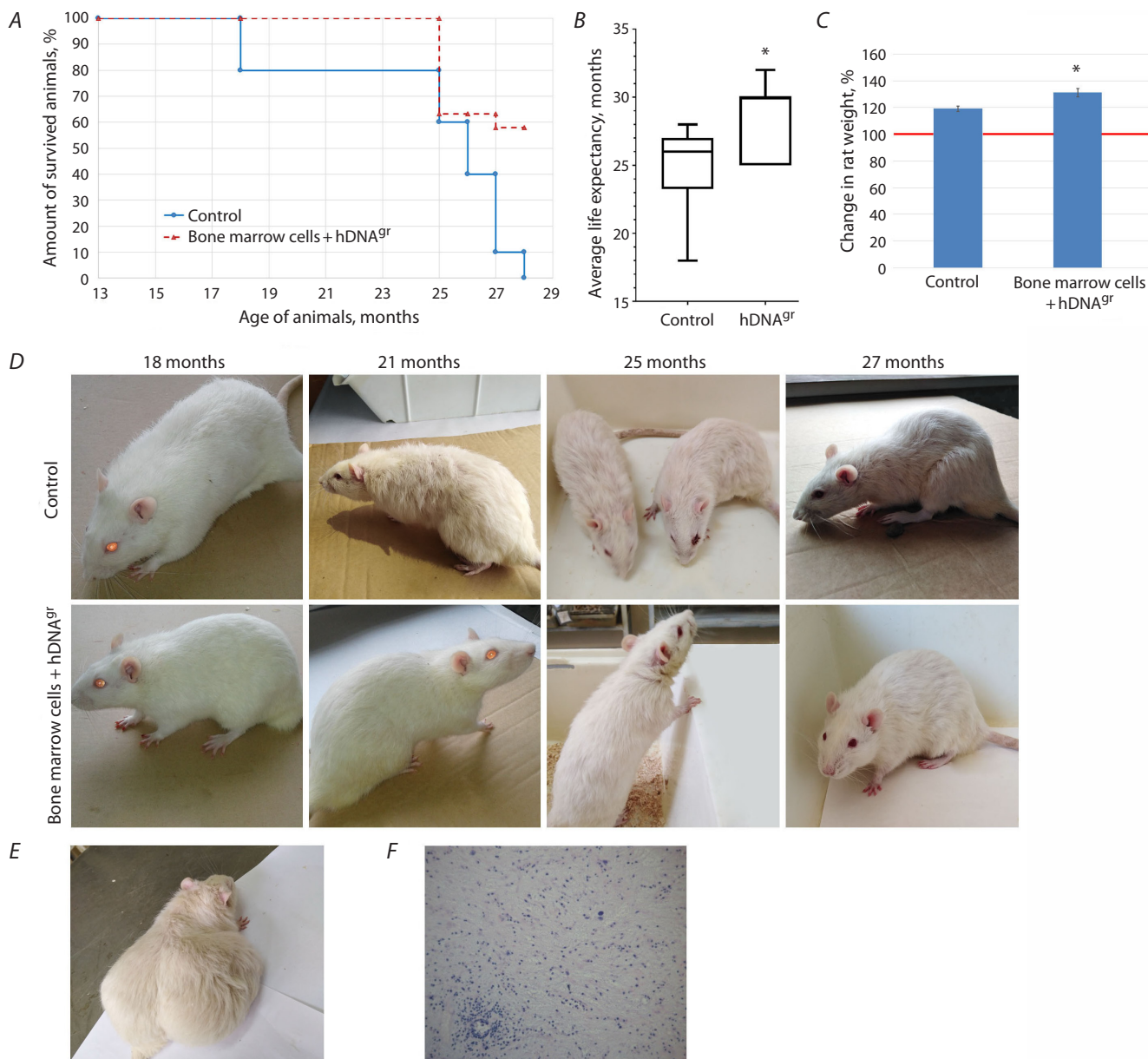


Рис. 3. Влияние hDNA^{gr} на продолжительность жизни крыс линии Вистар.

A – выживаемость животных; **B** – средняя продолжительность жизни животных. * Достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, $p < 0.01$, логранговый тест (критерий Мантеля–Кокса). **C** – изменение массы тела крыс из контрольной и опытной групп в возрасте 24 мес. относительно исходного веса в 13 мес. в начале эксперимента, принятого за 100 % (обозначен красной линией). * Достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. **D** – сравнительный внешний вид особей из контрольной и опытной групп в различном возрасте; **E** – внешний вид крысы с опухолью из опытной группы в возрасте 30 мес.; **F** – патоморфологический анализ опухоли крысы из опытной группы в возрасте 30 мес. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$.

нено влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК) старых животных, обработанных ангиогенином и hDNA^{gr} и совместно обоими препаратами. В качестве контрольных групп были взяты крысы, обработанные клетками костного мозга от молодых и старых животных (рис. 4). В этом исследовании было проанализировано изменение в количестве теломерной ДНК в костном мозге крыс в группах после инъекции клеток костного мозга от старых и молодых животных и клеток костного мозга, обработанных hDNA^{gr}, ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}, через 12 мес. после реинфузии методом саузерн-блот ги-

бридизации. Также в этой части исследования на крысиной и человеческой моделях проанализировано, какая из цепей (G или C) теломеры амплифицирована.

По результатам экспериментов сделаны следующие выводы. 1. Реинфузия клеток костного мозга от старых животных, обработанных препаратом hDNA^{gr}, не влияет на увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с контролем (клетки костного мозга от старых животных без обработки) (см. рис. 4). Средняя продолжительность жизни составила 25 мес. 2. Реинфузия клеток костного мозга молодых животных, клеток костного мозга,

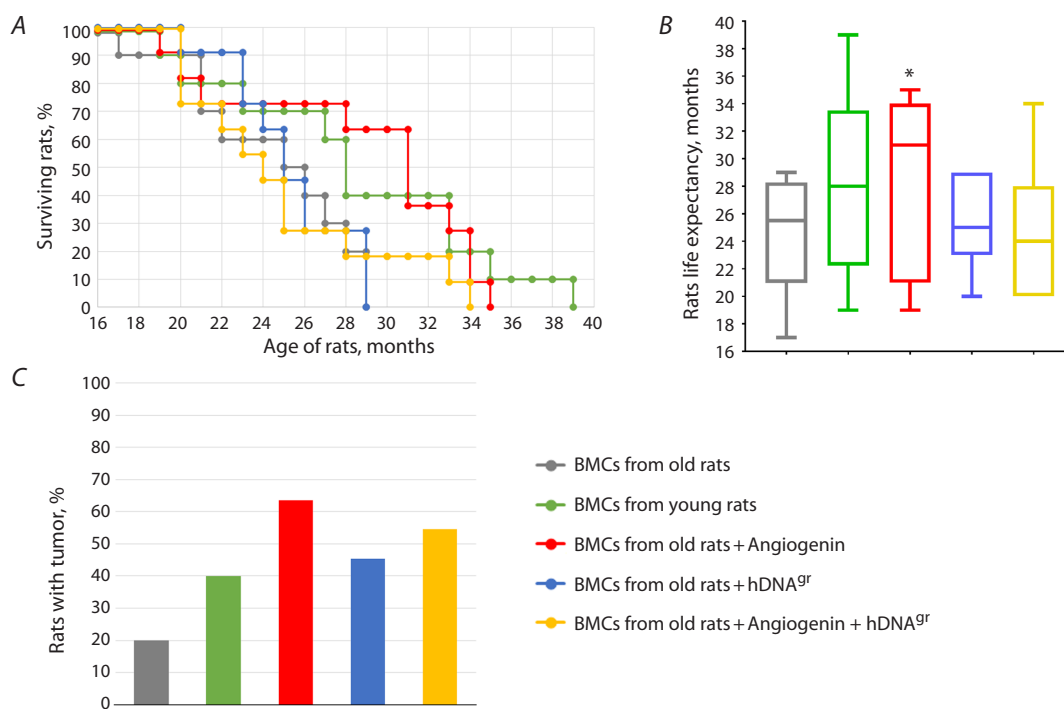


Рис. 4. Анализ продолжительности жизни экспериментальных крыс в группах.

А – кривая Каплана–Майера; В – продолжительность жизни крыс; С – количество крыс с опухолями. * Достоверные отличия продолжительности жизни крыс по сравнению с контрольной группой, которой вводили клетки костного мозга старых животных, $p < 0.01$, логранговый тест (критерий Мантия–Кокса).

обработанных ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}, увеличивает продолжительность жизни крыс в группах (см. рис. 4, А, В). Во всех экспериментальных группах у 40–60 % животных развилась спонтанная опухоль (см. рис. 4, С). В контрольных группах этот показатель составил 20–40 %. Для группы, которой вводили клетки, обработанные ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}, этот факт можно объяснить большей продолжительностью жизни и, как следствие, появлением новообразования у большего числа животных. В Приложении 3 представлены результаты патоморфологического исследования опухолей крыс из различных экспериментальных групп. Полученные данные свидетельствуют, что во всех группах были индуцированы или спонтанные солидные эпителиальные опухоли, или плоскоклеточные карциномы, или железистые опухоли, в некоторых случаях определяющиеся как опухоль молочной железы. Все опухоли имели низкую пролиферативную активность. Мы полагаем, что возникшие новообразования являются следствием содержания животных, а не индукции туморогенеза стволовыми клетками крови. ГСК могут дифференцироваться в клетки крови, но не в эпителиальные клетки, которые в результате спонтанной неотрансформации развились в опухоли. Тем не менее полученный результат настораживает и требует тщательной проверки.

Также следует отметить высокую долю животных с пневмонией, что связано с условиями содержания и в целом снижает ценность результатов. Полученные данные пионерных исследований позволяют более осмысленно определить следующий уровень задач.

Анализ некоторых деталей структуры теломер и сравнительный анализ количества теломерной ДНК в клетках костного мозга экспериментальных крыс и в образце клеток костного мозга человека

Используя специфические зонды, меченные P³², на G- и C-теломерный «хвост», мы проанализировали некоторые детали структуры теломер в клетках костного мозга экспериментальных крыс и в образце клеток костного мозга человека. Также проведен сравнительный анализ: 1) изменения количества теломерной ДНК в клетках костного мозга крыс, которым вводили клетки костного мозга старых животных без обработки (контроль), клетки костного мозга старых животных, обработанные hDNA^{gr}, ангиогенином и препаратами совместно, через 12 мес. после терапии; 2) изменения количества теломерной ДНК в клетках костного мозга человека в контроле и в образце после обработки hDNA^{gr} через 15 сут культивирования на метилцеллюлозе.

Были выполнены два независимых эксперимента по оценке количества теломерных ДНК в образцах клеток, полученных от крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга старых крыс, обработанные в первом эксперименте hDNA^{gr} и во втором эксперименте ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}. В первом эксперименте в тех же методических условиях, что и для крыс, анализировались также клетки костного мозга человека.

Анализ количества теломерной ДНК. Проанализировано количество теломерной ДНК в клетках костного мозга, полученных от крыс контрольной группы и крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга, обработанные

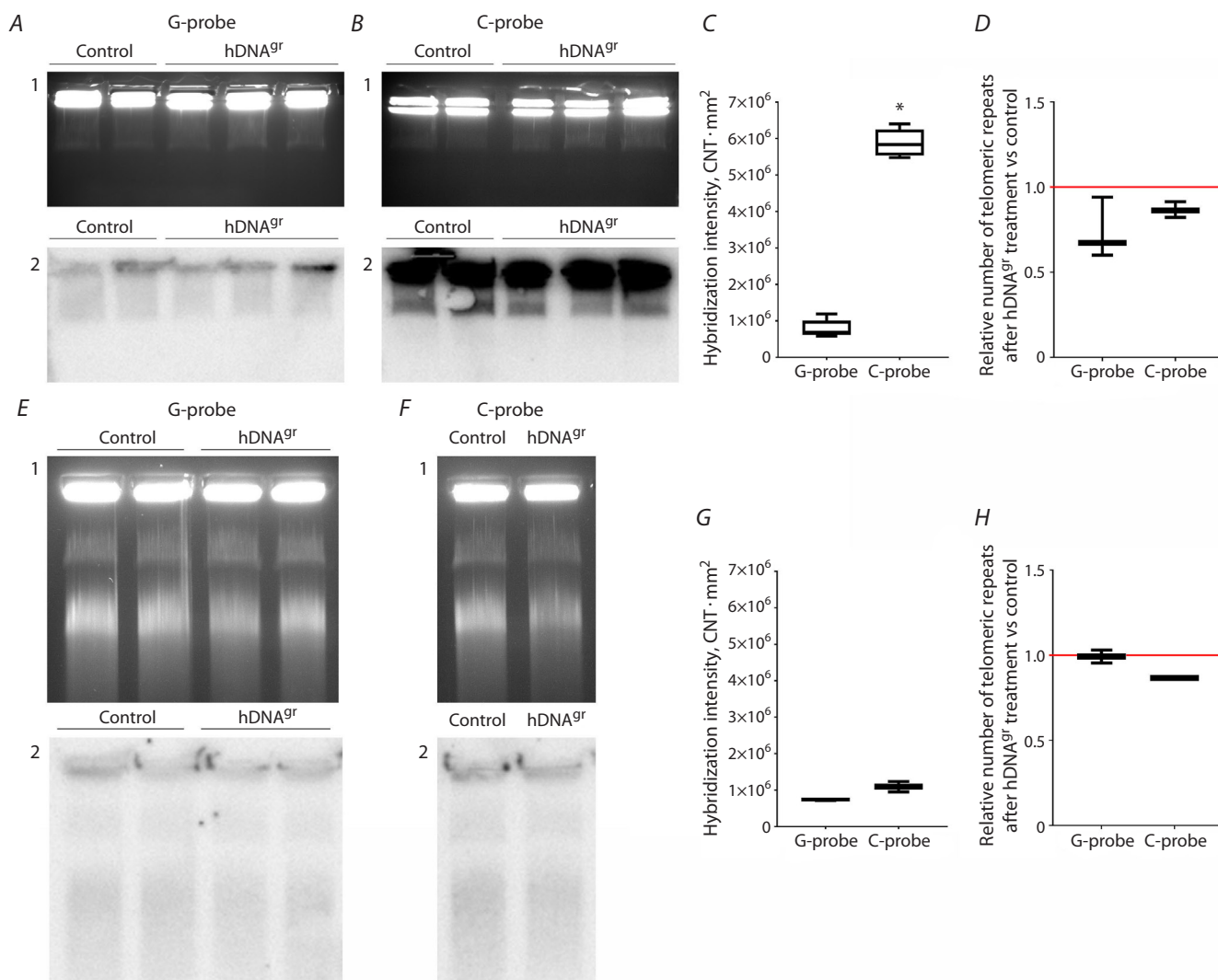


Рис. 5. Анализ некоторых деталей структуры теломер в клетках костного мозга экспериментальных крыс и в образце клеток костного мозга человека: *A–D* – крысиная модель; *E–H* – человеческая модель.

A, B, E, F – гель-электрофорез (1) и саузерн-блот (2) образцов ДНК после разгонки лизированных и депротеинизированных клеток костного мозга, залитых в блоки легкоплавкой агарозы. Гибридизацию проводили на P^{32} -меченые комплементарные олигонуклеотиды, содержащие девять повторяющихся теломерных гексануклеотидов, соответствующих G и C теломерным цепям (G-probe, C-probe). *C, G* – оценка разницы количества теломерных повторов G- и C-цепей в клетках костного мозга суммарно в контрольной и экспериментальной группах. Сравнивались значения (CNT·mm²) с использованием программы GEL-Pro. * Достоверные отличия при гибридизации с C-зондом относительно интенсивности гибридизации с G-зондом, $p < 0.01$, критерий Манна–Уитни. *D, H* – оценка количества теломерных повторов в образцах, обработанных hDNA^{9r}, относительно контрольных образцов. Сравнивались относительные цифры, полученные в результате деления значений светимости радиоактивной засветки на светимость этидиума бромид для каждой дорожки, выраженных в условных единицах с использованием программы GEL-Pro.

hDNA^{9r}, через 12 мес. после обработки, и в образцах клеток костного мозга человека также контрольных и обработанных hDNA^{9r} на 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе.

Литературные данные свидетельствуют, что теломера имеет протяженный G-хвост. Это означает, что при гибридизации с зондами на разные цепи более сильный сигнал гибридизации будет наблюдаться при использовании C-зонда.

Полученный результат в случае крыс полностью подтвердил имеющиеся сведения (рис. 5, *A–D*). Однако для клеток костного мозга человека эффективность гибридизации на разные зонды (G/C, P^{32} -удельная активность и количество ДНК зондов для гибридизации идентичны) до-

стоверно не различалась. Это означало, что в анализируемой системе обе цепи имеют одинаковую протяженность и что произошла терминальная редукция теломерного гетерохроматина и теломеры достигли критической длины. На наш взгляд, скорее всего, это связано с заболеванием пациента (были взяты криоконсервированные клетки костного мозга больного множественной миеломой, возраст 59 лет) (см. рис. 5, *E–H*).

В этом же эксперименте было проведено сравнение изменения количества теломерной ДНК в образцах клеток контрольных и экспериментальных образцов для обеих моделей (см. рис. 5, *D, H*).

Показано, что у крыс, которым перевели клетки костного мозга, обработанные hDNA^{9r}, через 12 мес. после

реинфузии увеличения количества теломерной ДНК (а значит, и длины теломер) не произошло. Эти данные совпадают с данными по средней продолжительности жизни, где тоже показано отсутствие достоверной разницы в анализируемых группах. Это означает, что в данном конкретном эксперименте препарат hDNA^{gr} или не индуцировал в клетках костного мозга увеличение теломер, или такие клетки были элиминированы в течение 12 мес. наблюдения. К сожалению, в случае первого пилотного эксперимента количественный анализ с использованием радиоактивно меченного зонда не был проведен, что связано с техническими проблемами.

Аналогичный результат (отсутствие увеличения количества теломерной ДНК) получен для человеческой модели (см. рис. 5, H). В данном случае мы объясняем эффект следующим образом. Для контрольных образцов для амплификации по механизму альтернативного удлинения теломер необходимо присутствие свободно расположенных колец теломерной ДНК. Такие кольца (t-кольца) формируются после отсоединения t-петли, которая находится на конце протяженного G-хвоста теломеры. Как свидетельствуют полученные результаты по гибридизации, в клетках костного мозга анализируемого образца, по всей видимости, такая протяженная цепь отсутствует и формирование t-колец ограничено (редуцировано). Этим и объясняется отсутствие разницы в количестве теломерной ДНК.

В случае активатора hDNA^{gr}, как было сказано ранее, основным механизмом увеличения длины теломер является альтернативное удлинение теломер, при котором на кольцах теломерных повторов, сформированных экстраклеточными фрагментами, происходит амплификация теломерной ДНК по механизму катящегося кольца. Мы полагаем, что отсутствие увеличения количества теломерной ДНК, так же как и в случае с мышинной моделью, связано с неоднозначностью процесса интернализации. Показано, что в стволовую гемопоэтическую клетку попадает 0.1–1.0 % экстраклеточной ДНК, представляющей собой незначительную часть генома. Это означает, что всегда будет вероятность того, что в клетку не доставляется ДНК теломерных повторов или она доставляется в недостаточном для амплификации или сайт-специфической интеграции количестве. Возможны другие объяснения феномена, связанные с биологией ГСК, что требует дальнейших глубоких исследований (например, конкурентная элиминация из пространства костного мозга модифицированной стволовой клетки клонами, приобретшими клональные характеристики в ходе возрастных изменений).

Таким образом, в первом пилотном эксперименте клетки костного мозга, экспонированные с hDNA^{gr} и введенные экспериментальным животным, существенно изменяли качество их жизни в терминальном периоде, а также увеличивали среднюю продолжительность жизни крыс. Проведенный эксперимент свидетельствовал об обоснованности предложенной концепции. Наблюдались оба предполагаемых биологических эффекта: положительная динамика в общем состоянии старых животных по ходу дожития; существенное и достоверное увеличение продолжительности жизни экспериментальных крыс.

В повторном эксперименте эффект увеличения продолжительности жизни как в случае мышинной модели, так и у крыс в группах, где клетки костного мозга экспонировались с hDNA^{gr}, отмечен не был. Более того, молекулярный анализ свидетельствовал, что отсутствуют и изменения в количестве теломерной ДНК. То есть можно констатировать сопряженность этих двух показателей.

Различия в конечных точках двух аналогичных экспериментов, как говорилось в начале статьи, могут определяться неоднозначностью поведения анализируемой системы ГСК vs hDNA^{gr}, что связано с последствиями возможных неконтролируемых взаимоотношений между ксеногенной экстраклеточной ДНК человека и ДНК хромосом грызунов.

Во второй серии гибридизаций было выполнено сравнение количества теломерной ДНК в клетках контрольных крыс и крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга старых крыс, обработанных ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr} через 12 мес. после терапии (рис. 6). Необходимость такого анализа была вызвана полученным результатом, свидетельствующим, что продолжительность жизни крыс после обработки клеток ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr} достоверно превышает продолжительность жизни как контрольных животных, так и животных после обработки hDNA^{gr}.

Был проведен сравнительный анализ силы сигналов свечения красителя бромистого этидия и радиоактивной засветки. Важно отметить, что в эксперименте все условия как электрофореза, так и гибридизации были идентичны. Это позволяет сделать определенную количественную оценку. Во всех образцах G-цепь теломерных повторов (С-зонд) доминирует над С-цепью (G-зонд) (количество ДНК зонда и удельная активность обоих зондов практически одинаковы). Это находится в согласии с имеющимися литературными данными (см. рис. 6, A2, C).

В предыдущей гибридизации было показано, что обработка клеток старых крыс препаратом hDNA^{gr} не влияет на увеличение количества теломерной ДНК в клетках костного мозга подопытных животных, а средняя продолжительность жизни в группе не отличается от контроля. В этой связи мы предположили, что после обработки ангиогенином совместно с hDNA^{gr} основной эффект обусловлен действием ангиогенина, но не hDNA^{gr}, и можно объединить значения групп «Ангиогенин» и «Ангиогенин + hDNA^{gr}». Анализ показал, что относительное содержание теломерных повторов С- и G-цепи в общей массе ДНК в выделенных группах достоверно не изменилось по сравнению с контролем. При этом количество повторов G-цепи достоверно превышает количество повторов С-цепи (см. рис. 6, C). Полученные данные по гибридизации теломерной ДНК свидетельствуют, что существенное увеличение продолжительности жизни крыс после обработки ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr} не связано с увеличением количества теломерной ДНК (теломерных повторов), а значит, или не зависит от способности ангиогенина активировать эндогенную теломеразную активность (Рузанова и др., 2025), или имеет другие причины (например, конкурентная элими-

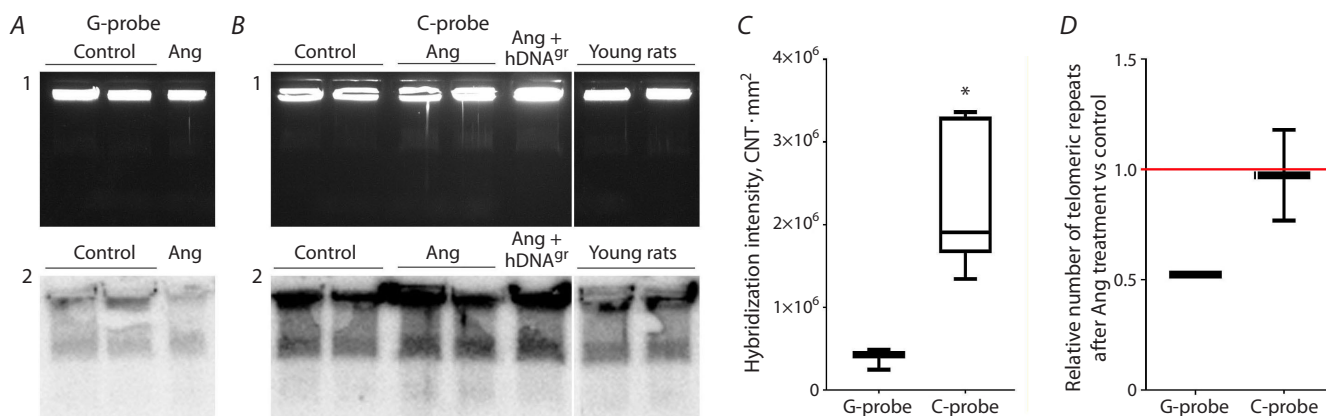


Рис. 6. Анализ некоторых деталей структуры теломер в клетках костного мозга экспериментальных крыс через 12 мес. после проведенной обработки.

A, B – гель электрофорез (1) и саузерн-блот (2) образцов ДНК после разгонки лизированных и депротеинизированных клеток костного мозга, залитых в блоки легкоплавкой агарозы. Гибридизацию проводили на P^{32} -меченые комплементарные олигонуклеотиды, содержащие девять повторяющихся теломерных гексануклеотидов, соответствующих G и C теломерным цепям (G-probe, C-probe). C – оценка разницы количества теломерных повторов G- и C-цепей в клетках костного мозга суммарно в контрольной и экспериментальной группах. Сравнивались значения (CNT·mm²) с использованием программы GEL-Pro. * Достоверные отличия при гибридизации с C-зондом относительно интенсивности гибридизации с G-зондом, $p < 0.01$, критерий Манна–Уитни. D – оценка относительного количества теломерных повторов в образцах, обработанных ангиогенином, относительно контрольных образцов. Сравнивались относительные цифры, полученные в результате деления значений светимости радиоактивной засветки на светимость этидиума бромид для каждой дорожки, выраженных в условных единицах с использованием программы GEL-Pro.

нация реинфузированного модифицированного клона гемопоэтическими предшественниками костного мозга с клональными характеристиками).

Обсуждение

Попытки продлить жизнь сопровождают человечество на протяжении всего существования цивилизации. В настоящее время сформировано представление о маркерах, характерных для процесса старения и присущих старому организму, и применяются различные противозрастные интервенции (López-Otín et al., 2013, 2023; Proshkina et al., 2020; Zhu et al., 2021). Тем не менее современные противозрастные подходы и разнообразные препараты, разработанные на основании знаний молекулярных процессов, протекающих в клетке и организме, редко позволяют преодолеть заветный столетний рубеж. На наш взгляд, это связано с тем, что старение – это не ответ конкретной функциональной системы на продолжительность существования, которую можно «поправить» терапевтическими процедурными и какими угодно интервенциями, а инволюционирующее интегральное состояние организма, причины деградации которого неизвестны. В этой связи здоровый образ жизни обеспечивает как минимум половину успеха долгой жизни. Генетический фактор также является главенствующим при разработке противозрастных подходов, и именно на него направлены усилия современной науки о старости. К таким терапиям относятся, например, перепрограммирование стареющих клеток с использованием факторов Яманаки (Takahashi, Yamanaka, 2006; Ocampo et al., 2016; Gowing et al., 2017; Brooks, Robbins, 2018; Sogabe et al., 2018), использование микроРНК, имеющих множество мишеней в генных сетях и регулирующих интегральные пути старения (Vaiserman et al., 2016), генная комплексная терапия (*FGF21+αKloho+sTGFβR2*)

(Davidsohn et al., 2019), терапия, связанная с увеличением длины теломер, и в первую очередь с активацией эндогенной теломеразы или трансдукцией теломеразного гена (Aubert, Lansdorp, 2008; Bernardes de Jesus et al., 2012; Li et al., 2017; Hong, Yun, 2019).

Как было сказано выше, длина теломер – один из основополагающих факторов, определяющий клеточное старение и развитие многих болезней цивилизации, особенно если события, связанные с укорочением теломер, происходят со стволовой клеткой (Rossiello et al., 2022). Поэтому понимание подходов, позволяющих увеличить длину теломер с проекцией на весь организм (а не на клетки, растущие в культуре), является нетривиальной задачей биологии и клинической медицины. Практически все найденные подходы к увеличению длины теломер основаны на воздействии на теломеразный комплекс и определяющие его гены (Aubert, Lansdorp, 2008). Нами не найдены клинические подходы, позволяющие увеличить длину теломер за счет другого, не менее важного механизма – альтернативного удлинения теломер (Lundblad, 2002; Hande, 2004; Pickett et al., 2009; Nabetani, Ishikawa, 2011; Rovatsos et al., 2011; Doksan, 2019; Loe et al., 2020).

Настоящее исследование было направлено на оценку возможности увеличения продолжительности жизни с использованием технологии, заложенной в новой концепции природной реконструкции генома и связанной с возможностью увеличения длины теломер *in vivo* в гемопоэтических стволовых клетках.

Проведенные тесты на животных свидетельствуют об относительной безопасности введения клеток костного мозга, обработанных активаторами. Ярко выраженных немедленных патологических изменений у экспериментальных животных обеих моделей не обнаружено.

Полученные результаты по характеристике продолжительности жизни крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга (ГСК), активированные фрагментированной ДНК человека, свидетельствуют, что существует принципиальная возможность увеличения продолжительности жизни старых животных. Эффект пластичен: в одних случаях наблюдалось достоверное увеличение продолжительности жизни, в других обработка не влияла на продолжительность жизни экспериментальных животных.

В случае, когда эффект не наблюдался, количество детектируемой теломерной ДНК в клетках костного мозга крыс через 12 мес. после обработки не отличалось от показателей контрольного образца. Предположительным механизмом отсутствия увеличения количества теломерной ДНК в клетках костного мозга через год после обработки препаратом hDNA^{gr} может быть клональная конкуренция. В этом случае обновленный клон с увеличенным количеством теломерной ДНК, который появляется в результате проведенной обработки, как показано в работе (Рузанова и др., 2025), вытесняется приобретенными клонными характеристиками доминантными клонами, расположенными в костном мозге. Если это соответствует действительности, то это важнейшее наблюдение, которое предполагает многократные начальные интервенции модифицированными клетками костного мозга для противостояния конкурентной экспансии доминантных клонов и стабильной фиксации признака в костном мозге.

Ангиогенин рекомбинантный человеческий может проявлять токсичность на уровне организма (мышинная модель), которая нивелируется при его сочетании с препаратом hDNA^{gr}. Синергичное использование ангиогенина и hDNA^{gr} приводит к увеличению продолжительности жизни мышей в группе.

Увеличение продолжительности жизни крыс в группах после обработки ангиогенином не связано с увеличением длины теломер, а определяется другими свойствами фактора, или клональной конкуренцией в костном мозге, или и тем и другим.

Концепция механизма «запрограммированного клонального гемопоэза» и механизма «запрограммированной старости»

В работе (Proshkina et al., 2020) сформировано представление о том, что старение является квазипрограммой, регуляторные элементы которой первоначально не предназначены для ее реализации, а отвечают за другие процессы (клеточный рост, регенерацию, стрессовый ответ, иммунологическую защиту). На основании этого делается вывод о том, что не существует программы старения, поскольку отсутствуют специфические молекулярные и клеточные подпрограммы, берущие на себя функцию управления дезинтеграцией элементов системы целого организма с возрастом. Это как раз и означает, что причины старения неизвестны и можно рассуждать только о маркерах старения.

Тем не менее мы сформулировали, на наш взгляд, достаточно адекватную концепцию, доказывающую, что ста-

рение организма – это программа, заложенная в диалектическом единстве определенных элементов его функционирования и непрерывного контакта с агрессивной средой существования и связанная с развитием клонального гемопоэза (возможно, такое представление характерно для любых систем стволовых клеток организма). Эта концепция объединяет все найденные биологические явления и события, с ними связанные. Также мы предлагаем способ, позволяющий преодолеть последствия укорочения теломер, фиксации патологических мутаций и их доминирования в ГСК (и в стволовых клетках другого генеза), что может составить основу будущей противозрастной терапии и терапии болезней цивилизации.

Предполагаемый механизм «запрограммированного клонального гемопоэза» и механизм «запрограммированной старости». При рождении у человека есть две принципиальные самонастраивающиеся относительно друг друга системы: это ГСК (возможно, все другие типы стволовых клеток, участвующих в репарации в организме) и вся совокупность клеток организма.

- ГСК отвечают за репарацию в теле. Спрятаны в самом потаенном месте, в костном мозге.
- Клетки тела контактируют с агрессивной окружающей средой.

Популяция ГСК в момент рождения характеризуется поликлональностью с представителем всей совокупности аллельных форм, требующихся для осуществления репаративной функции и поддержания многообразия возможностей иммунитета.

Следующие особенности являются основой механизма запрограммированного клонального гемопоэза и механизма запрограммированной старости:

- ГСК захватывают фрагменты экстраклеточной дцДНК, 0.02–1.0 % от гаплоидного генома.
- При терминальной дифференцировке ГСК перестраивают архитектуру хроматина за счет индукции одноцепочечных разрывов и релаксации нитей ДНК хромосом. Тем самым индуцируется «рекомбиногенная ситуация», во время которой возможна интеграция фрагментов дцДНК, находящихся во внутренних компартментах клетки, доставленных в клетку в результате различных обстоятельств.
- Попад в примитивную гемопоэтическую клетку, фрагменты дцДНК сами индуцируют терминальную дифференцировку этой клетки. И, таким образом, фрагменты дцДНК, доставленные в клетку, индуцируют «рекомбиногенную ситуацию» и одновременно становятся участниками репаративно-рекомбинационного процесса, который сами и активировали.
- В плазме крови всегда циркулируют фрагменты дцДНК, оставшиеся от апоптотированных клеток, хроматин которых в конце концов гидролизует до 1–20 нуклеосомных мономеров в результате вторичного некроза апоптотических телец.

Суть механизма. Клетки организма со всей совокупностью мутаций, накопленных в ходе существования, после естественной смерти – апоптоза, доведенного до вторичного некроза, поставляют в кровоток свою фрагмен-

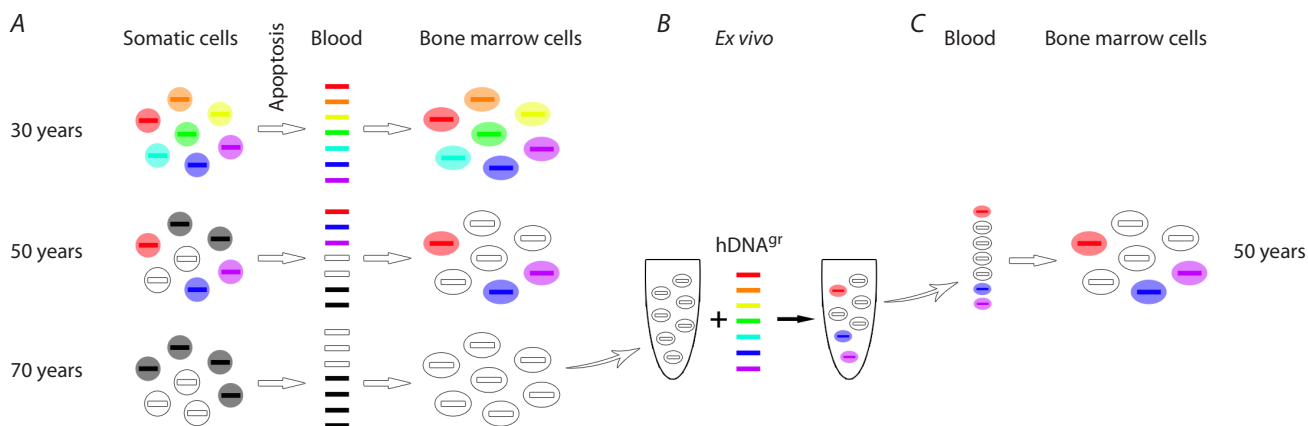


Рис. 7. Механистическая схема возникновения клонального гемопоэза и возможности его исправления.

А – появление мутаций в клетках сомы, их выход в периферическую кровь и фиксация в клетках костного мозга. Формирование олигоклонального гемопоэза. **В** – изменение генома ГСК фрагментами экстраклеточной дцДНК в системе *ex vivo*; **С** – реинфузия клеток с реконструированным геномом в периферическое русло и их фиксация в костном мозге. Восстановление поликлонального гемопоэза.

тированную дцДНК, с многочисленными генетическими нарушениями в структуре различных генов.

Эта экстраклеточная дцДНК постоянно транзитно попадает в ГСК, где в определенные моменты времени (например, при увеличении концентрации ДНК плазмы крови в связи с травмой или ишемией) индуцирует коммитирование и стохастически интегрирует в геном, по-видимому, по гомологичным участкам. Происходит генная конверсия, и ГСК меняют генетику, лишаясь своего статуса, и приобретают черты генетики клеток сомы, отреагировавших на воздействие агрессивной окружающей среды. Последовательно популяция ГСК как система стволовых клеток истощается, исчерпывается плюрипотентный ресурс, и система ГСК приобретает олигоклональные черты (рис. 7).

Отсюда теряются репаративные возможности ГСК и, главное, исчезает исходное многообразие возможностей иммунитета. Наступает физическая старость организма.

Существует возможность преодоления механизма запрограммированного клонального гемопоэза и механизма запрограммированной старости. Необходимо использовать то же самое «оружие», а именно: регулярно давать ГСК экстраклеточный дцДНК субстрат, полученный от молодых здоровых людей. Таким субстратом является препарат hDNA^{gr}. Здоровые аллели будут вытеснять накапливающиеся мутантные, и ГСК будет сохранять свой плюрипотентный статус.

Список литературы / References

- Козлов А.А. Старость: социальная разобщенность или целостность? Теории и традиции западной социальной психологии. *Мир психологии: научно-методический журнал*. 1999;2:80-96 [Kozlov A.A. Old age: social disunity or integrity? Theories and traditions of Western social psychology. *Mir Psikhologii: Nauchno-Metodicheskiy Zhurnal = World of Psychology: Research and Methodological Journal*. 1999;2:80-96 (in Russian)]
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984 [Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning. Moscow: Mir Publ., 1984 (in Russian)]

Михеев Р.К., Андреева Е.Н., Григорян О.Р., Шереметьева Е.В., Абсатарова Ю.С., Одарченко А.С., Оплетаяева О.Н. Молекулярные и клеточные механизмы старения: современные представления (обзор литературы). *Проблемы эндокринологии*. 2023;69(5): 45-54. doi 10.14341/probl13278

[Mikheev R.K., Andreeva E.N., Grigoryan O.R., Sheremetyeva E.V., Absatarova Y.S., Odarchenko A.S., Opletaeva O.N. Molecular and cellular mechanisms of ageing: modern knowledge (literature review). *Problems of Endocrinology*. 2023;69(5):45-54. doi 10.14341/probl13278 (in Russian)]

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

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

Aubert G., Lansdorp P.M. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008; 88(2):557-579. doi 10.1152/physrev.00026.2007

Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., Tejera A.M., Ayuso E., Bosch F., Blasco M.A. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):691-704. doi 10.1002/emmm.201200245

Bowen R.L., Atwood C.S. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology*. 2004;50(5):265-290. doi 10.1159/000079125

Brooks R.W., Robbins P.D. Treating age-related diseases with somatic stem cells. In: Mettinger K., Rameshwar P., Kumar V. (Eds) *Exosomes, Stem Cells and MicroRNA*. Advances in Experimental Medi-

- cine and Biology. Vol. 1056. Springer, 2018;29-45. doi 10.1007/978-3-319-74470-4_3
- Chakravarti D., LaBella K.A., DePinho R.A. Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*. 2021;184(2):306-322. doi 10.1016/j.cell.2020.12.028
- da Costa J.P., Vitorino R., Silva G.M., Vogel C., Duarte A.C., Rocha-Santos T. A synopsis on aging – theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev*. 2016;29:90-112. doi 10.1016/j.arr.2016.06.005
- Davidsohn N., Pezzone M., Vernet A., Graveline A., Oliver D., Slomovic S., Punthambaker S., Sun X., Liao R., Bonventre J.V., Church G.M. A single combination gene therapy treats multiple age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(47):23505-23511. doi 10.1073/pnas.1910073116
- Di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D., d'Adda di Fagnaga F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):75-95. doi 10.1038/S41580-020-00314-w
- Doksani Y. The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function. *Genes*. 2019;10(4):318. doi 10.3390/genes10040318
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishenko K.E., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., ... Taranov O.S., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Bogachev S.S., Shurlov M.A. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells. *Russ J Genet Appl Res*. 2012;2:440-452. doi 10.1134/S2079059712060056
- Gems D., Partridge L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:621-644. doi 10.1146/annurev-physiol-030212-183712
- Gowing G., Svendsen S., Svendsen C.N. Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders. *Prog Brain Res*. 2017;230:99-132. doi 10.1016/bs.pbr.2016.11.003
- Hande M.P. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104(1-4):116-122. doi 10.1159/000077475
- Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-460. doi 10.1038/345458a0
- He S., Sharpless N.E. Senescence in health and disease. *Cell*. 2017;169(6):1000-1011. doi 10.1016/j.cell.2017.05.015
- Hong J., Yun C.O. Telomere gene therapy: polarizing therapeutic goals for treatment of various diseases. *Cells*. 2019;8(5):392. doi 10.3390/cells8050392
- Kenyon C.J. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464(7288):504-512. doi 10.1038/nature08980
- Kirkwood T.B.L. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005;120(4):437-447. doi 10.1016/j.cell.2005.01.027
- Krauss S.R., de Haan G. Epigenetic perturbations in aging stem cells. *Mamm Genome*. 2016;27(7-8):396-406. doi 10.1007/s00335-016-9645-8
- Lefever R. The rehabilitation of irreversible processes and dissipative structures' 50th anniversary. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018;376(2124):20170365. doi 10.1098/rsta.2017.0365
- Li Y., Zhou G., Bruno I.G., Cooke J.P. Telomerase mRNA reverses senescence in progeria cells. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(6):804-805. doi 10.1016/j.jacc.2017.06.017
- Loe T.K., Li J.S.Z., Zhang Y., Azeroglu B., Boddy M.N., Denchi E.L. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev*. 2020;34(9-10):650-662. doi 10.1101/gad.333963.119
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. doi 10.1016/j.cell.2013.05.039
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-278. doi 10.1016/j.cell.2022.11.001
- Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*. 2002;21(4):522-531. doi 10.1038/sj.onc.1205079
- Nabetani A., Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem*. 2011;149(1):5-14. doi 10.1093/jb/mvq119
- Nassour J., Radford R., Correia A., Fusté J.M., Schoell B., Jauch A., Shaw R.J., Karlseder J. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. *Nature*. 2019;565:659-663. doi 10.1038/S41586-019-0885-0
- Ocampo A., Reddy P., Martinez-Redondo P., Platero-Luengo A., Hatanaka F., Hishida T., Li M., ... Nuñez Delicado E., Campistol J.M., Guillen I., Guillen P., Izpisua Belmonte J.C. In vivo amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming. *Cell*. 2016;167(7):1719-1733.e12. doi 10.1016/j.cell.2016.11.052
- Pickett H.A., Cesare A.J., Johnston R.L., Neumann A.A., Reddel R.R. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J*. 2009;28(7):799-809. doi 10.1038/emboj.2009.42
- Proshkina E.N., Solovov I.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Key molecular mechanisms of aging, biomarkers, and potential interventions. *Mol Biol*. 2020;54(6):777-811. doi 10.1134/S0026893320060096
- Rossiello F., Jurk D., Passos J.F., d'Adda di Fagnaga F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol*. 2022;24(2):135-147. doi 10.1038/s41556-022-00842-x
- Rovatsos M.T., Marchal J.A., Romero-Fernández I., Fernández F.J., Giagia-Athanosopoulou E.B., Sánchez A. Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosome Res*. 2011;19(7):869-882. doi 10.1007/S10577-011-9242-3
- Sogabe Y., Seno H., Yamamoto T., Yamada Y. Unveiling epigenetic regulation in cancer, aging, and rejuvenation with in vivo reprogramming technology. *Cancer Sci*. 2018;109(9):2641-2650. doi 10.1111/cas.13731
- Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):2109-2117. doi 10.1128/mcb.19.3.2109
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tchkonina T., Zhu Y., van Deursen J., Campisi J., Kirkland J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013;123(3):966-972. doi 10.1172/jci64098
- Tlidi M., Clerc M.G., Panajotov K. Dissipative structures in matter out of equilibrium: from chemistry, photonics and biology, the legacy of Ilya Prigogine (part 1). *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018a;376(2124):20180114. doi 10.1098/rsta.2018.0114
- Tlidi M., Clerc M.G., Panajotov K. Dissipative structures in matter out of equilibrium: from chemistry, photonics and biology, the legacy of Ilya Prigogine (part 2). *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018b;376(2135):20180276. doi 10.1098/rsta.2018.0276
- Vaiserman A.M., Lushchak O.V., Koliada A.K. Anti-aging pharmacology: promises and pitfalls. *Ageing Res Rev*. 2016;31:9-35. doi 10.1016/j.arr.2016.08.004
- Vijg J., Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008;454(7208):1065-1071. doi 10.1038/nature07216
- Zhu X., Chen Z., Shen W., Huang G., Sedivy J.M., Wang H., Ju Z. Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):245. doi 10.1038/S41392-021-00646-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.07.2024. После доработки 12.03.2025. Принята к публикации 23.06.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-40

Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi014-A и RCPMi014-B из Т-лимфоцитов здорового донора и верификация их моноклонального происхождения по V(D)J-перестройкам генов TCR

Д.К. Шерман ^{1&}, М.Е. Богомякова ^{1, 2&}, Э.А. Кастуева ¹, И.В. Звягин ³, В.К. Руппель^{3, 4}, Е.В. Барсова ^{3, 4}, А.Ю. Горбачев ¹, Н.А. Кулемин ¹, А.А. Баринаева ¹, Е.А. Зеркаленкова ^{5, 6}, А.Н. Богомазова ^{1, 2}, М.А. Лагарькова ¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² Центр «Генетическое репрограммирование и генная терапия» Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

³ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ООО «Майлаборатори», Москва, Россия

⁵ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁶ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

 dar.sher.man0@gmail.com

Аннотация. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из Т-лимфоцитов периферической крови представляет собой перспективную альтернативу использованию фибробластов кожи. Этот подход сочетает минимально инвазивный забор биоматериала совместно с быстрым получением обогащенной популяции целевых клеток. Дополнительным преимуществом является относительно низкий мутационный груз Т-лимфоцитов по сравнению с традиционным источником соматических клеток для репрограммирования – фибробластами кожи, ввиду того что Т-лимфоциты защищены от хронического воздействия ультрафиолетового излучения – одного из ключевых факторов накопления соматических мутаций. Объективная верификация моноклональности полученных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток возможна благодаря наличию V(D)J-перестроек генов Т-клеточного рецептора, формирующихся в результате соматической рекомбинации в тимусе в процессе естественного созревания Т-лимфоцитов. Эти перестройки остаются неизменными при репрограммировании и служат уникальным маркером, позволяющим достоверно идентифицировать моноклональные линии и исключать контаминированные линии или линии поликлонального происхождения. Надежная верификация клонального происхождения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток может быть важной в экспериментах, предъявляющих высокие требования к генетической однородности. Данная работа посвящена созданию и комплексной характеристике моноклональных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из CD3+ Т-лимфоцитов здорового донора методом эписомного репрограммирования. Полученные линии RCPMi014-A (PBM022E5) и RCPMi014-B (PBM022E7) соответствуют принятым критериям качества для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: они демонстрируют экспрессию ключевых маркеров плюрипотентности (OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81), способность к дифференцировке в производные всех трех зародышевых листков и обладают нормальным кариотипом. Обе линии показали способность к дифференцировке в definitivoную энтодерму с высокой эффективностью, оцененной по экспрессии CXCR4, что определяет их перспективность для разработки протоколов генерации β-клеток поджелудочной железы. Полученные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток могут быть использованы для фундаментальных исследований механизмов плюрипотентности и дифференцировки, а также для создания изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с внесенными мутациями при моделировании редких наследственных заболеваний.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; Т-лимфоциты; репрограммирование; Т-клеточный рецептор; клон клеток; V(D)J-рекомбинация; definitivoная энтодерма

Для цитирования: Шерман Д.К., Богомякова М.Е., Кастуева Э.А., Звягин И.В., Руппель В.К., Барсова Е.В., Горбачев А.Ю., Кулемин Н.А., Баринаева А.А., Зеркаленкова Е.А., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi014-A и RCPMi014-B из Т-лимфоцитов здорового донора и верификация их моноклонального происхождения по V(D)J-перестройкам генов TCR. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(2):362-371. doi 10.18699/vjgb-26-40

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, соглашение № 075-15-2025-518).

Generation of the RCPCMi014-A and RCPCMi014-B lines from T-lymphocytes of a healthy donor and verification of their monoclonal origin by TCR V(D)J rearrangement analysis

D.K. Sherman ¹ & , M.E. Bogomiakova ^{1, 2} & , E.A. Kastueva ¹, I.V. Zvyagin ³, V.K. Ruppel^{3, 4}, E.V. Barsova ^{3, 4}, A.Y. Gorbachev ¹, N.A. Kulemin ¹, A.A. Barinova ¹, E.A. Zerkalenkova ^{5, 6}, A.N. Bogomazova ^{1, 2}, M.A. Lagarkova ¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ LLC “MiLaboratori”, Moscow, Russia

⁵ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

⁶ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

 dar.sherman0@gmail.com

Abstract. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from peripheral blood T-lymphocytes offers a promising alternative to skin fibroblasts. This approach combines minimally invasive sample collection with rapid isolation of enriched target cell population and provides a lower baseline mutational burden, as T-lymphocytes are shielded from chronic ultraviolet radiation – a major driver of somatic mutations in skin fibroblasts. Objective verification of monoclonality of the resulting iPSC lines is possible due to V(D)J rearrangements in T-cell receptor (TCR) genes, which are formed as a result of somatic recombination in the thymus during the natural maturation of T-lymphocytes. These rearrangements remain unchanged during reprogramming and serve as a unique marker, allowing for reliable identification of monoclonal lines and exclusion of contaminated or polyclonal lines. Reliable verification of the clonal origin of iPSCs can be crucial in experiments that place high demands on genetic homogeneity. This work is dedicated to the generation and comprehensive characterization of monoclonal iPSC lines derived from CD3+ T-lymphocytes of a healthy donor using episomal reprogramming. The resulting lines, RCPCMi014-A (PBM022E5) and RCPCMi014-B (PBM022E7), meet the accepted quality criteria for iPSCs: they demonstrate expression of key pluripotency markers (OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81), the ability to differentiate into derivatives of all three germ layers, and possess a normal karyotype. Both lines showed a high-efficiency capacity to differentiate into definitive endoderm, as assessed by CXCR4 expression, highlighting their potential for developing protocols to generate pancreatic β -cells. The obtained iPSC lines can be used for fundamental research into the mechanisms of pluripotency and differentiation, as well as for creating isogenic iPSC lines with introduced mutations for modeling rare hereditary diseases.

Key words: induced pluripotent stem cells; T-lymphocytes; reprogramming; T-cell receptor; cell clone; V(D)J recombination; definitive endoderm

For citation: Sherman D.K., Bogomiakova M.E., Kastueva E.A., Zvyagin I.V., Ruppel V.K., Barsova E.V., Gorbachev A.Y., Kulemin N.A., Barinova A.A., Zerkalenkova E.A., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Generation of the RCPCMi014-A and RCPCMi014-B lines from T-lymphocytes of a healthy donor and verification of their monoclonal origin by TCR V(D)J rearrangement analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=*Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(2):362-371. doi 10.18699/vjgb-26-40

Введение

Открытие технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в 2006 г. открыло новые возможности в регенеративной медицине и биомедицинских исследованиях (Yamanaka, 2020). Благодаря способности дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков, ИПСК обладают значительным потенциалом для моделирования заболеваний *in vitro*, позволяя изучать тканеспецифические патологические процессы на клеточном уровне (Summers et al., 2024). При создании таких моделей, как правило, используют ИПСК, полученные от пациентов с наследственными заболеваниями (Grigor'eva et al., 2023), что позволяет воссоздать индивидуальные особенности болезни. В подобных исследованиях линии от здоровых доноров служат важным референсным контролем. Особую актуальность они приобретают при изучении орфанных заболеваний, где крайне малая численность пациентов затрудняет прямое получение клеточных моделей. В таких случаях перспективным решением будет создание изогенных пар методом геном-

ного редактирования на основе ИПСК здоровых доноров (Хомякова и др., 2023; Федоренко и др., 2024). Важно отметить, что ИПСК от здоровых доноров также представляют собой незаменимый ресурс для стандартизации протоколов дифференцировки, разработки «универсальных» клеточных продуктов и изучения базовых механизмов репрограммирования (Cerneckis et al., 2024).

Согласно общепринятой практике каждая морфологически однородная колония ИПСК считается клоном, происходящим из единственной репрограммированной клетки-предшественницы (Takahashi et al., 2007). В соответствии с этой практикой отдельные колонии культивируются независимо и рассматриваются как индивидуальные клеточные линии. Однако прямое подтверждение моноклональности редко осуществляется: отсутствие методов верификации означает, что поликлональные линии могут оставаться незамеченными, особенно если колонии сформировались в результате близкого расположения клеток. Аутентификация клеточных линий, включая подтверждение генетической принадлежности и отсутствие кон-

таминации, является критически важной лабораторной процедурой для обеспечения воспроизводимости научных исследований, минимизации финансовых потерь и поддержания достоверности получаемых данных (Harbut et al., 2024).

В этом контексте уникальное преимущество ИПСК, полученных из Т-лимфоцитов, состоит в возможности верификации моноклонального происхождения с помощью анализа геномных перестроек, возникающих в ходе V(D)J-рекомбинации при формировании зрелых генов цепей Т-клеточного рецептора (TCR) (Kishino et al., 2014). Эта клон-специфичная перестройка, сохраняющаяся после репрограммирования, служит молекулярным «баркодом» исходной Т-клетки. Современные подходы к анализу V(D)J-перестроек, включая мультиплексную ПЦР (Seki et al., 2010) и таргетное высокопроизводительное секвенирование (Nishimura et al., 2013), делают возможным прямое выявление поликлонального происхождения, что особенно важно для обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов в биомедицинских исследованиях. Сочетание объективной верификации клоальности и малоинвазивности получения биоматериала делает использование Т-лимфоцитов привлекательной стратегией для получения ИПСК как в фундаментальных исследованиях, так и при создании клеточных моделей заболеваний.

В настоящей работе методом эписомного репрограммирования получены линии ИПСК из Т-лимфоцитов здорового донора. Впервые с помощью анализа V(D)J-перестроек трех геномных локусов были исключены поликлональные популяции, что позволило достоверно идентифицировать моноклональные линии. Линии ИПСК с подтвержденным моноклональным происхождением RCPMi014-A (PBM022E5) и RCPMi014-B (PBM022E7) продемонстрировали полное соответствие критериям качества: сохранение нормального кариотипа, экспрессию ключевых маркеров (OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81) и способность к дифференцировке в производные всех трех зародышевых листков, и, в частности, высокую эффективность направленной дифференцировки в дефинитивную эндодерму.

Материал и методы

Этические аспекты исследования и забор биологического материала. Исследование проведено в соответствии с этическими нормами и одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 1 от 01.06.2021). Биологический материал (периферическая венозная кровь) был получен от добровольца-донора мужского пола в возрасте 35 лет. Забор крови осуществлял квалифицированный медицинский персонал поликлиники ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России с соблюдением всех стандартных медицинских процедур. Перед проведением процедуры донор был проинформирован о целях исследования и добровольно подписал информированное согласие на использование его биологического материала в научных целях.

Экзомное секвенирование и биоинформатический анализ. Геномную ДНК выделяли из замороженных образцов цельной крови с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells (Евроген). Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI), обогащение экзомных регионов проводили с помощью панели VAHTS Target Capture Core Exome Panel (Vazyme) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование полученных библиотек выполняли на платформе MGISEQ-2000 (MGI) в парно-конечном режиме (paired-end) для достижения среднего покрытия ~80× (не менее 30 млн парных прочтений на образце).

Первичный биоинформатический анализ включал контроль качества сырых прочтений с помощью FastQC, в ходе которого низкокачественные прочтения и адаптерные последовательности были отфильтрованы. Выравнивание прочтений на референсный геном человека GRCh37/hg19 проводили с использованием алгоритма BWA-MEM. Качество выравнивания и эффективность обогащения оценивали с помощью пакетов SAMtools, mosdepth и Picard Tools. Выявление однонуклеотидных вариантов и небольших инделов (SNV/InDel) выполняли с использованием программного пакета DeepVariant.

Выделение и активация Т-лимфоцитов. Мононуклеарные клетки периферической крови (ПВМС) выделяли из венозной крови методом градиентного центрифугирования, применяя коммерческий реагент NycosPrep™ (Axis-Shield) согласно стандартному протоколу (Григорьева и др., 2024). CD3+ Т-клетки выделяли из полученной фракции ПВМС методом магнитной сепарации с использованием набора Human CD3+ Cell Separation Kit (RWD) в соответствии с инструкцией производителя. Активацию Т-лимфоцитов проводили по модифицированному двух-этапному протоколу (Maslennikova et al., 2022). На первом этапе клетки инкубировали с магнитными частицами Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco). На следующий день частицы удаляли с помощью магнитного штатива, после чего клетки ресуспендировали в среде для Т-клеток: RPMI-1640 (ПанЭко), дополненной 10 % термоинактивированной HI-FBS (BioFroxx) и 100 МЕ/мл IL-2 (Биотех НПК), в концентрации 0.5×10^6 клеток/мл и культивировали дополнительно 24 ч.

Репрограммирование Т-клеток и культивирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Репрограммирование Т-клеток проводили методом трансфекции эписомными векторами (Okita et al., 2013), экспрессирующими факторы репрограммирования SOX2, OCT4, KLF4, L-MYC, LIN28, доминантно-негативную форму мышинного белка p53 (mp53DD) и фактор поддержания эписом – белок EBNA1 (Addgene #41813-14, 41855-57). Трансфекцию проводили с использованием системы Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) со стандартными параметрами: 1650 В–10 мс–3 пульса. В качестве контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду pCE-GFP (Addgene #41858). Через 24 ч после электропорации с помощью проточного цитометра

NovoCyte (ACEA Biosciences) подсчитывали количество живых, DAPI-негативных активированных бластных клеток (бластов), характеризующихся увеличением размеров (FSC) и гранулярности (SSC). Клеточную суспензию высевали на 35-мм чашки Петри, предварительно покрытые Матригелем (Corning) в разведении 1:50, исходя из плотности $10\text{--}12 \times 10^3$ жизнеспособных бластов/см² в среде для Т-клеток. На следующий день к культуральной среде добавляли равный объем среды для репрограммирования следующего состава: ReproTeSR™ medium (Stemcell Technologies), 100 нг/мл FGF2 (собственное производство ФНКЦ ФХМ), 10 мкМ ингибитора ROCK (Ri) – Y-27632, 0.5 мкМ PD0325901 и 2 мкМ SB431542 (все – DC Chemicals, Китай). В дальнейшем среду для репрограммирования заменяли через день. На 16-е сутки клетки переводили на модифицированную среду для ИПСК, состоящую из смеси ГибриС-8 (ПанЭко) и mTeSR1 (Stemcell Technologies) в соотношении 4:1, с ежедневной заменой среды. На 26-е сутки проводили механический отбор сформировавшихся колоний с использованием 0.1 % раствора диспазы (Invitrogen). Полученные клоны ИПСК культивировали в бесфидерных условиях по ранее описанному протоколу (Goliusova et al., 2025).

Анализ интеграции трансгенных конструкций методом кПЦР в реальном времени. Для оценки возможной интеграции эписомных векторов в геном линии ИПСК культивировали не менее 10 пассажей. Далее выделяли геномную ДНК с использованием набора М-Сорб (Синтол). Анализ интеграции трансгенных конструкций выполняли методом кПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) с использованием 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген) и специфических праймеров (табл. S1 Приложения)¹. Программа амплификации: 95 °С – 4 мин; 40 циклов: 95 °С – 10 с, 60 °С – 40 с (детекция флуоресценции); анализ плавления продукта: 95 °С – 5 с, 65 °С – 5 с (с непрерывным измерением флуоресценции), 95 °С – 50 с.

Анализ последовательностей участков V(D)J-перестроек. С целью определения клонального состава линий ИПСК проводили анализ последовательностей трех геномных локусов, формируемых в результате V(D)J-рекомбинации, определяющих последовательность зрелых генов α/δ -, β - и γ -цепей TCR. Библиотеки для высокопроизводительного секвенирования готовили из 42 нг геномной ДНК (эквивалент ~6500 диплоидных геномов) с использованием набора «Human IG/TCR DNA Multiplex Kit 7G» (Майлаборатори) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование выполняли на платформе Illumina MiSeq в режиме парного чтения, с длиной каждого прочтения 150 п. н. В результате было получено не менее 90 тыс. парных чтений для каждого образца.

Биоинформатический анализ данных проводили с помощью программного пакета MiXCR (<https://mixcr.com>). Не менее 83 % прочтений в каждом образце были успешно идентифицированы как содержащие последовательность, однозначно атрибутируемую к одному из исследуемых ло-

кусов по результатам сопоставления с референсными последовательностями соответствующих локусов с помощью ПО MiXCR. Для определения клональности исследовали распределение представленности по количеству прочтений и предполагаемую функциональность идентифицированных последовательностей V(D)J-перестроек в каждом из трех локусов. В анализ включались перестройки, подержанные не менее чем 100 независимыми прочтениями.

Скрининг микоплазменной инфекции. Отсутствие контаминации микоплазмой было подтверждено методом ПЦР с использованием праймеров на ген рибосомной 16S РНК (см. табл. S1), как описано ранее (Goliusova et al., 2024).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Тотальную РНК выделяли из 1 млн клеток с помощью реагента Extract RNA (Евроген) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген) и случайных декануклеотидных праймеров. ОТ-ПЦР проводили с использованием специфических праймеров (см. табл. S1). Программа амплификации: 95 °С – 3 мин; 32 цикла: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 30 с; финальная элонгация: 72 °С – 5 мин.

Кариотипирование выполняли согласно ранее описанной методике с разрешением 400 бэндов (Goliusova et al., 2024).

STR анализ для аутентификации клеточных линий. STR-профилирование выполняли с коммерческим набором COrDIS Plus (Гордиз), позволяющим анализировать 19 аутосомных локусов и половой маркер Amelogenin.

Анализ экспрессии маркеров плюрипотентности методом проточной цитометрии. Проточную цитометрию выполняли в соответствии с ранее описанной методикой (Хомякова и др., 2023). Антитела, использованные в работе, см. в табл. S2.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили согласно ранее опубликованному протоколу (Федоренко и др., 2024). Антитела, использованные в работе, представлены в табл. S2. Визуализацию проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX53F. Обработку полученных изображений выполняли с применением программного обеспечения GIMP-2.10.

Функциональная оценка плюрипотентности методом спонтанной дифференцировки. Для подтверждения плюрипотентного статуса ИПСК проводили тест на способность к спонтанной дифференцировке в производные трех зародышевых листков по ранее описанному протоколу (Goliusova et al., 2024). Через 15–20 дней адгезионного культивирования эмбрионидные тельца фиксировали в 4 % PFA и окрашивали на специфические маркеры трех зародышевых листков (см. табл. S2).

Дифференцировка в дефинитивную энтодерму. Дифференцировку в дефинитивную энтодерму проводили с помощью набора STEMdiff™ Definitive Endoderm Kit (STEMCELL Technologies) согласно протоколу производителя. Эффективность дифференцировки оценивали по экспрессии маркера CXCR4 с помощью антител, представленных в табл. S2.

¹ Табл. S1–S3 и рис. S1 Приложения доступны по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx21.pdf>

Результаты и обсуждение

Наша работа посвящена получению и детальной характеристике линий ИПСК, полученных из Т-лимфоцитов здорового донора. Полноэкзомное секвенирование донора не выявило патогенных или предположительно патогенных вариантов в генах, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, согласно базе данных PanelApp (Martin et al., 2019) и руководствам ACMG (Richards et al., 2015). Схема репрограммирования представлена на рис. 1, а. CD3⁺ Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови, активировали с использованием CD3/CD28 Dynabeads™ и трансфицировали коктейлем эписомных плазмид, кодирующих *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *LIN28*, *EBNA1* и *mp53DD*. Через 24 ч после трансфекции клетки высевали на чашки, покрытые Matrigel®, и культивировали в среде, дополненной комбинацией малых молекул: Y-27632 (ROCK-ингибитор), SB431542 (ингибитор TGF-β) и PD0325901 (MEK-ингибитор), что повышает выживаемость и эффективность репрограммирования (Watanabe et al., 2019). Через три недели после трансфекции наблюдали формирование компактных колоний, морфологически сходных с колониями эмбриональных стволовых клеток.

Общая стратегия отбора и валидации клонов ИПСК показана на рис. 1, б. В результате эписомного репрограммирования Т-лимфоцитов получено 14 первичных колоний ИПСК (PBM022E1–E14), отобранных на основе морфологических критериев. Каждая из них была выделена и культивирована как отдельная клеточная линия, что соответствует общепринятой практике при получении ИПСК (Takahashi et al., 2007). Теоретически, морфологически однородная колония может формироваться за счет близкого расположения нескольких репрограммированных клеток, что потенциально приводит к получению поликлональной линии. Хотя некоторые исследователи предполагают, что такие линии могут сохранять функциональную стабильность (Willmann et al., 2013), другие считают, что поликлональность может проявляться в виде различий в дифференцировочной способности (Yun et al., 2025) и скорости пролиферации (Mills et al., 2013), что может снижать воспроизводимость экспериментов.

Из 14 первичных клонов ИПСК, полученных в ходе репрограммирования, 10 продемонстрировали устойчивое культивирование в течение более чем 80 дней (не менее 10 пассажей) и были отобраны для дальнейшей функциональной характеристики. Анализ интеграции трансгенов методом кПЦР показал, что четыре клона: PBM022E5, PBM022E7, PBM022E9, PBM022E14 – полностью утратили эписомные векторы (см. рис. 1, в). В качестве отрицательного контроля, не содержащего интеграций трансгенов, использовали линию ИПСК RCPMi007-A-1, полученную с помощью неинтегрирующего вектора на основе вируса Сендай (Bogomiakova et al., 2021). Ген *B2M*, кодирующий белок бета-2-микроглобулин, был использован в качестве референсного однокопийного гена, расположенного на аутосомной хромосоме. Данные согласуются с литературными наблюдениями по элиминации эписомных плазмид в других линиях ИПСК, полученных с помощью этого метода (Григорьева и др., 2024; Подвысоцкая и др., 2025).

В отличие от других соматических клеток, зрелые Т-лимфоциты позволяют объективно подтвердить моноклональность полученных из них ИПСК путем анализа последовательностей геномных локусов, возникающих в результате V(D)J-рекомбинации в ходе созревания Т-клеток в тимусе (Alt et al., 1992). Случайная комбинация V-, D- и J-сегментов, а также инсерции и делеции нуклеотидов в местах их сшивок приводят к формированию CDR3 региона с последовательностью уникальной для каждой исходной Т-клетки-предшественника. Эта последовательность наследуется всеми потомками клетки и сохраняется после репрограммирования, позволяя оценить клональное разнообразие линий ИПСК, полученных из зрелых Т-лимфоцитов.

Так как в периферической крови здорового взрослого донора преобладают αβТ-клетки, наиболее вероятно, что полученные клоны ИПСК произошли от зрелых Т-лимфоцитов с функциональными генами α- и β-цепей TCR (Kreslavsky et al., 2008, 2010). Критерием моноклональности будет считаться наличие как минимум одной продуктивной пары V(D)J-перестроек в локусах *TRA* и *TRB*. Несколько продуктивных перестроек и/или суммарное число перестроек более двух в одном из этих локусов будут указывать на поликлональное происхождение. Перестройки в локусе *TRG* не будут влиять на интерпретацию клональности по локусам *TRA* и *TRB* при условии отсутствия перестроек в гене δ-цепи (расположен в локусе *TRAD*) и общего числа перестроек в *TRG* не более двух (Sherwood et al., 2011; Mahe et al., 2018).

Анализ V(D)J-репертуара подтвердил происхождение всех клонов от αβТ-клеток, поскольку продуктивные перестройки гена δ-цепи TCR отсутствовали. Два клона, PBM022E5 и PBM022E7, продемонстрировали типичный для моноклонального происхождения паттерн перестроек, характеризующийся наличием по одной продуктивной последовательности гена α- и β-цепи TCR (см. рис. 1, г, отмечены зеленым). Такой профиль позволяет с высокой достоверностью рассматривать эти линии как потомков отдельных родительских Т-клеток. В противоположность этому, клон PBM022E14 был классифицирован как поликлональный из-за наличия трех продуктивных перестроек β-цепи и двух – α-цепи TCR (см. рис. 1, г). Суммарно в этом клоне идентифицировано по четыре V(D)J-перестройки в локусах *TRA* и *TRB* (табл. S3). Клон PBM022E9 демонстрирует асимметричный профиль: обнаружена одна продуктивная последовательность β-цепи при наличии трех вариантов α-цепи, что может указывать на поликлональное происхождение. Анализ совпадений V(D)J-перестроек между клетками всех четырех исследуемых линий выявил наличие идентичных последовательностей α- и β-цепей TCR у клонов PBM022E9 и PBM022E14 (см. рис. 1, г и табл. S3, красный цвет), что может свидетельствовать о вероятной технической контаминации.

Таким образом, анализ геномных участков, формируемых в результате V(D)J-рекомбинации при созревании Т-лимфоцитов, представляет собой эффективный инструмент для верификации клональности ИПСК, полученных из зрелых Т-лимфоцитов. Уникальная последовательность

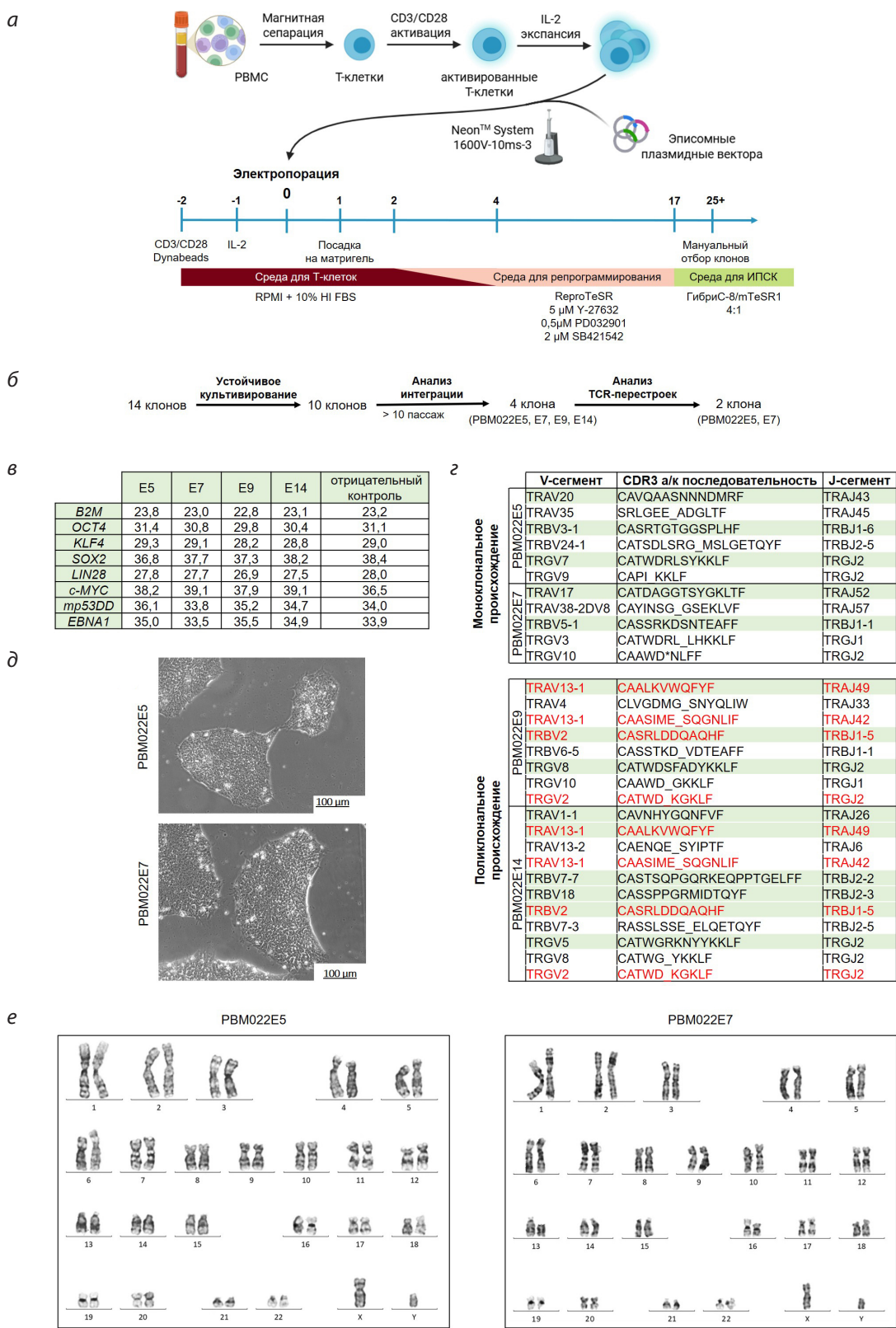


Рис. 1. Репрограммирование Т-клеток: **а** – схема активации и репрограммирования Т-клеток; **б** – стратегия отбора и валидации клонов ИПСК; **в** – анализ интеграции трансгенов по значению Ct: E5, E7, E9, E14 – линии PBM022E5, PBM022E7, PBM022E9, PBM022E14 соответственно, отрицательный контроль: линия ИПСК RCPMi007-A-1 (Bogomiakova et al., 2021). Сопоставимые значения Ct с отрицательным контролем свидетельствуют об отсутствии остаточных трансгенов в исследуемых клонах; **г** – анализ последовательностей V(D)J-перестроек: подчеркиванием обозначен собой рамки считывания; зеленым выделены предположительно функциональные цепи, в которых отсутствует сбой рамки считывания; красным выделены варианты V(D)J-перестроек, повторяющиеся в клонах PBM022E9 и PBM022E14; **д** – морфология линий PBM022E5, PBM022E7; **е** – кариотип линий PBM022E5 и PBM022E7.

CDR3-региона, формирующаяся в результате случайной комбинации V-, D- и J-сегментов, служит надежным «генетическим баркодом» для каждой исходной клетки, обеспечивая неопровержимое доказательство клонального происхождения. Стабильность этого маркера, сохраняющегося неизменным после репрограммирования, позволяет использовать его для долгосрочной идентификации клонального происхождения, в том числе в дифференцированных производных. Особенно ценным этот подход становится при работе с уникальными моделями, такими как ИПСК от монозиготных близнецов, где традиционные методы генотипирования, основанные на полиморфизме ДНК, теряют информативность из-за почти полной генетической идентичности доноров (Vlasov et al., 2021). Кроме того, подход обладает высокой чувствительностью к контаминации, позволяя выявлять перекрестную загрязненность между линиями по наличию идентичных V(D)J-последовательностей.

Вместе с тем метод имеет определенные ограничения. Во-первых, он применим только к Т-клеточному происхождению и не может быть использован для ИПСК, полученных из других типов соматических клеток, например фибробластов, не обладающих аналогичными клеточно-специфическими маркерами. Во-вторых, интерпретация

результатов требует установления четких пороговых значений (в нашей работе 100 прочтений) для разграничения технических ошибок и истинной поликлональности, также необходимы специализированное оборудование для секвенирования и биоинформатические компетенции для анализа данных. Несмотря на эти ограничения, V(D)J-профайлинг представляет собой мощный инструмент для стандартизации клеточных моделей и повышения воспроизводимости исследований в области клеточной биологии.

Полученные линии ИПСК PBM022E5 (RCPCMi014-A) и PBM022E7 (RCPCMi014-B) зарегистрированы в Human Pluripotent Stem Cell Registry (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>). Информация по данным клеточным линиям может быть найдена по следующим ссылкам: <https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-A> и <https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-B>. Обе линии продемонстрировали типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток (см. рис. 1, д), нормальный кариотип (46, XY) (см. рис. 1, е), а также подтвердили свою генетическую принадлежность донору по результатам STR-профилирования (данные доступны по запросу у авторов). Все линии были протестированы на отсутствие контаминации микоплазмой, что подтверждено отрицательным результатом ПЦР-анализа (рис. 2, а). Экс-

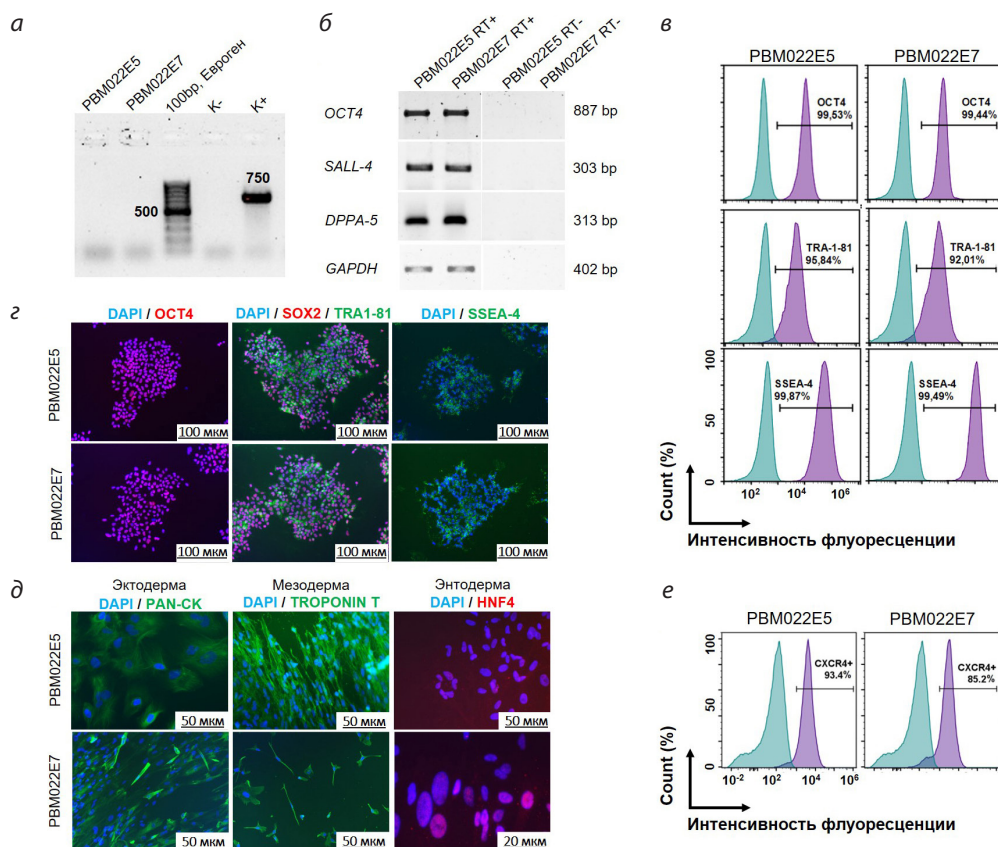


Рис. 2. Характеристика линий ИПСК RCPCMi014-A (PBM022E5) и RCPCMi014-B (PBM022E7): а – ПЦР-анализ на отсутствие микоплазменной инфекции; б – ОТ-ПЦР анализ экспрессии маркеров плюрипотентности; в – проточная цитометрия для маркеров плюрипотентности; г – ИЦХ окрашивание маркеров плюрипотентности: OCT4 (красный), SOX2 (красный), TRA-1-81 (зеленый), SSEA-4 (зеленый), ядро окрашено DAPI (синий); д – ИЦХ окрашивание маркеров трех зародышевых листков: эктодерма PAN-CK (зеленый), мезодерма TROPONIN T (зеленый), энтодерма HNF-4 (красный); е – проточная цитометрия раннего маркера definitive энтодермы CXCR4.

прессия ключевых маркеров плюрипотентности была подтверждена несколькими методами. Результаты ОТ-ПЦР показали высокий уровень экспрессии генов *OCT4*, *SALL4* и *DPPA5* (см. рис. 2, б). Данные проточной цитометрии подтвердили высокую долю положительных клеток: более 99 % экспрессировали *OCT4*, более 99 % – SSEA-4 и более 92 % – TRA-1-81 (см. рис. 2, в). Иммуноцитохимический анализ выявил экспрессию *OCT4* и *SOX2* в ядре, а также экспрессию поверхностных маркеров TRA-1-81 и SSEA-4 (см. рис. 2, г). Способность к дифференцировке в производные всех трех зародышевых листков была оценена в ходе спонтанной дифференцировки *in vitro*. Экспрессия панцитокератина подтвердила формирование производных эктодермы, тропонина Т – мезодермы, включая кардиомиоциты, а *HNf4a* – эндодермы (см. рис. 2, д).

Следующим аспектом характеристики полученных линий стала их способность к дифференцировке в дефини-

тивную эндодерму – критический этап для последующего получения β-клеток поджелудочной железы. Наши данные показывают значительную вариабельность дифференцировочного потенциала между различными линиями: лишь треть линий ИПСК демонстрируют высокую эффективность формирования дефинитивной эндодермы (рис. S1). С помощью проточной цитометрии было показано, что линии PBM022E5 и PBM022E7 имеют высокую и стабильную способность к дифференцировке в дефинитивную эндодерму, о чем свидетельствует экспрессия маркера *CXCR4* более чем у 85 % клеток по данным проточной цитометрии (см. рис. 2, е). Полученные результаты подтверждают перспективность использования этих линий для разработки и оптимизации протоколов направленной дифференцировки в инсулин-продуцирующие клетки. Паспорт клеточных линий RCPCMi014-A (PBM022E5) и RCPCMi014-B (PBM022E7) см. далее.

Паспорт клеточных линий RCPCMi014-A (PBM022E5) и RCPCMi014-B (PBM022E7)

Уникальный идентификатор	RCPCMi014-A, RCPCMi014-B
Альтернативное название линии	PBM022E5, PBM022E7
Учреждение	Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, протокол № 1 от 01.06.2021
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 35 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Т-клетки
Дата забора биоматериала	26.03.2024
Способ репрограммирования	Неинтеграционные эписомные векторы
Репрограммирующие факторы	<i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> , <i>KLF4</i> , <i>LIN28</i> , <i>L-MYC</i> , <i>EBNA1</i> и <i>mp53DD</i>
Клональность	Клональные
Заболевание	Нет
Ген/локус	–
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным стволовым клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных тел, спонтанную дифференцировку в производные трех зародышевых листков, а также экспрессию специфических маркеров
Кариотип	46, XY
Проверка контаминации	Микоплазма не обнаружена
Область применения	Референсная линия ИПСК здорового донора
Способ культивирования	На подложке из Матригеля
Среда культивирования	ГибриС-8 (ПанЭко):mTeSR 1 (STEMCELL) = 4:1, 50 мкг/мл пенициллин-стрептомицин или 10 мкг/мл гентамицин
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	Энзиматический, трипсин-ЭДТА (Gibco или ПанЭко)
Кратность пересева	1:4–1:6
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % ДМСО, 5 мкМ ROCK inhibitor Y-27632 (Stemcell Technologies)
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/RCPCMi014-A https://hpscreg.eu/cell-line/RCPCMi014-B
Дата паспортизации/депонирования	21.08.2024

Заключение

В ходе настоящей работы получены и охарактеризованы моноклональные линии ИПСК, репрограммированные из Т-лимфоцитов здорового донора. Анализ V(D)J-перестроек генов TCR обеспечил достоверную верификацию моноклональности линий, что критически важно для моделей, требующих высокой генетической однородности. Показано, что полученные линии RCPMi014-A (PBM022E5) и RCPMi014-B (PBM022E7) соответствуют всем критериям качества для ИПСК и демонстрируют высокую эффективность дифференцировки в definitive endoderm, что делает их перспективными для генерации β -клеток поджелудочной железы. Полученные линии могут служить надежными эталонными моделями как для фундаментальных исследований механизмов плюрипотентности и дифференцировки, так и для прикладных задач, включая создание изогенных пар при моделировании редких и других заболеваний, а также отработку методологических подходов в регенеративной медицине.

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 Дж.А., Медведев С.П., Закиан С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией 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 c.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Gen Breed*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/VJGB-24-76]
- Подвысоцкая В.С., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Коваленко Л.В., Закиан С.М. Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/VJGB-25-03 [Podvysotskaya V.S., Grigor'eva E. V., Malakhova A.A., Minina J.M., Vyatkin Y. V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Kovalenko L. V., Zakian S.M. Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Gen Breed*. 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/VJGB-25-03]
- Федоренко А.В., Хомякова Е.А., Сурдина А.В., Секретова Е.К., Лиманская Т.В., Беликова Л.Д., Воловиков Е.А., ... Федотов Д.А., Зеркаленкова Е.А., Лагарькова М.А., Лебедев И.Н., Богомазова А.Н. Создание клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для изучения функций гена *UBE2A*. *Гены и Клетки*. 2024;19(2):297-313. doi 10.17816/GC623799 [Fedorenko A.V., Khomyakova E.A., Surdina A.V., Sekretova E.K., Limanskaya T.V., Belikova L.D., Volovikov E.A., ... Fedotov D.A., Zerkalenkova E.A., Lagarkova M.A., Lebedev I.N., Bogomazova A.N. Design of iPSC-based cell model to study the functions of the *UBE2A* gene. *Genes and Cells*. 2024;19(2):297-313. doi 10.17816/GC623799 (in Russian)]
- Хомякова Е.А., Федоренко А.В., Сурдина А.В., Воловиков Е.А., Беликова Л.Д., Зеркаленкова Е.А., Лагарькова М.А., Богомазова А.Н. Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi009-A-1 с нокаутом гена *UBE2A* с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. *Онтогенез*. 2023;54(6):405-414. doi 10.31857/S0475145023060046 [Khomyakova E.A., Fedorenko A.V., Surdina A.V., Volovikov E.A., Belikova L.D., Zerkalenkova E.A., Lagarkova M.A., Bogomazova A.N. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi009-A-1) with knockout of the *UBE2A* gene by using CRISPR/Cas9 genome editing. *Russ J Dev Biol*. 2023;54(6):365-373. doi 10.1134/S1062360423060048]
- Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today*. 1992;13(8):306-314. doi 10.1016/0167-5699(92)90043-7
- Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Ereemeev A.V., Shuvalova L.D., Bobrovsky P.A., Zerkalenkova E.A., Lebedeva O.S., Lagarkova M.A. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Stem Cell Res*. 2021;55:102451. doi 10.1016/J.SCR.2021.102451
- 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
- Goliusova D.V., Lebedeva O.S., Sharikova M.Y., Kopylova I.V., Teryakova M.V., Lavrenteva K.A., Zerkalenkova E.A., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Derivation of RCPMi011-A induced pluripotent stem cell line from fibroblasts of a patient with restrictive cardiomyopathy caused by c.7416 7418delGAA mutation in the *FLNC* gene. *Russ J Dev Biol*. 2024;55(6):347-355. doi 10.1134/S1062360425700055
- Goliusova D.V., Bogomolova A.P., Davidenko A.V., Lavrenteva K.A., Sharikova M.Y., Zerkalenkova E.A., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Katrukha I.A., Lebedeva O.S. Metabolic culture medium enhances maturation of human iPSC-derived cardiomyocytes via cardiac troponin I isoform induction. *Int J Mol Sci*. 2025;26(15):7248. doi 10.3390/IJMS26157248/S1
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S *GBA* variant carriers with and without Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5). doi 10.3390/IJMS24054437
- Harbut E., Makris Y., Pertsemilidis A., Bleris L. The history, landscape, and outlook of human cell line authentication and security. *SLAS Discov*. 2024;29(8):100194. doi 10.1016/J.SLASD.2024.100194
- Kishino Y., Seki T., Fujita J., Yuasa S., Tohyama S., Kunitomi A., Tabai R., Nakajima K., Okada M., Hirano A., Kanazawa H., Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One*. 2014;9(5):e97397. doi 10.1371/journal.pone.0097397
- Kreslavsky T., Garbe A., Krueger A., von Boehmer H. T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. *J Exp Med*. 2008;205(5):1173-1186. doi 10.1084/jem.20072425
- Kreslavsky T., Gleimer M., von Boehmer H. Alphabeta versus gammadelta lineage choice at the first TCR-controlled checkpoint. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):185-192. doi 10.1016/j.coi.2009.12.006
- Mahe E., Pugh T., Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol*. 2018;71(3):195-200. doi 10.1136/jclinpath-2017-204761
- Martin A.R., Williams E., Foulger R.E., Leigh S., Daugherty L.C., Niblock O., Leong I.U.S., ... Kasperaviciute D., Smedley D., Caulfield M., Rendon A., McDonagh E.M. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet*. 2019;51(11):1560-1565. doi 10.1038/S41588-019-0528-2
- Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., Komkov D., Shepelev M., Golubev D., Siniavin A., Vzorov A., Filatov A., Mazu-

- rov D. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41. *mBio*. 2022; 13(1):e0358921. doi 10.1128/mbio.03589-21
- Mills J.A., Wang K., Paluru P., Ying L., Lu L., Galvão A.M., Xu D., ... Mostoslavsky G., Kotton D.N., French D.L., Weiss M.J., Gadue P. Clonal genetic and hematopoietic heterogeneity among human-induced pluripotent stem cell lines. *Blood*. 2013;122(12):2047-2051. doi 10.1182/blood-2013-02-484444
- Nishimura T., Kaneko S., Kawana-Tachikawa A., Tajima Y., Goto H., Zhu D., Nakayama-Hosoya K., ... Iwamoto A., Koseki H., Nakanishi M., Eto K., Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):114-126. doi 10.1016/j.stem.2012.11.002
- 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
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Gen Med*. 2015;17(5):405-424. doi 10.1038/gim.2015.30
- Seki T., Yuasa S., Oda M., Egashira T., Yae K., Kusumoto D., Nakata H., ... Okada Y., Seimiya H., Fusaki N., Hasegawa M., Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating t cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):11-14. doi 10.1016/j.stem.2010.06.003
- Sherwood A., Desmarais C., Livingston R., Andriesen J., Haussler M., Carlson C., Robins H. Deep sequencing of the human TCR γ and TCR β repertoires suggests that TCR β rearranges after $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell commitment. *Sci Transl Med*. 2011;3(90):90ra61. doi 10.1126/scitranslmed.3002536
- Summers R.A., Fagiani F., Rowitch D.H., Absinta M., Reich D.S. Novel human iPSC models of neuroinflammation in neurodegenerative disease and regenerative medicine. *Trends Immunol*. 2024; 45(10):799-813. doi 10.1016/j.it.2024.08.004
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-172. doi 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Vlasov I.N., Alieva A.K., Novosadova E.V., Arsenyeva E.L., Rosinskaya A.V., Partevian S.A., Grivennikov I.A., Shadrina M.I. Transcriptome analysis of induced pluripotent stem cells and neuronal progenitor cells, derived from discordant monozygotic twins with Parkinson's disease. *Cells*. 2021;10(12):3478. doi 10.3390/cells10123478
- Watanabe T., Yamazaki S., Yoneda N., Shinohara H., Tomioka I., Higuchi Y., Yagoto M., Ema M., Suemizu H., Kawai K., Sasaki E. Highly efficient induction of primate iPS cells by combining RNA transfection and chemical compounds. *Genes Cells*. 2019;24(7):473-484. doi 10.1111/gtc.12702
- Willmann C.A., Hemeda H., Pieper L.A., Lenz M., Qin J., Jousen S., Sontag S., Wanek P., Denecke B., Schüler H.M., Zenke M., Wagner W. To clone or not to clone? Induced pluripotent stem cells can be generated in bulk culture. *PLoS One*. 2013;8(5):e65324. doi 10.1371/journal.pone.0065324
- Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy – promise and challenges. *Cell Stem Cell*. 2020;27(4):523-531. doi 10.1016/j.stem.2020.09.014
- Yun J., So J., Jeong S., Jang J., Han S., Jeon J., Lee K., Jang H.R., Lee J. Transcriptome and epigenome dynamics of the clonal heterogeneity of human induced pluripotent stem cells for cardiac differentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2025;82(1):2. doi 10.1007/S00018-024-05493-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.10.2025. После доработки 26.11.2025. Принята к публикации 27.11.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-41

Разработка молекулярного маркера к гену *Run8* для отбора устойчивых к пыльной головне генотипов ячменя

Е.А. Орлова ¹, Н.П. Бехтольд ¹, Ю.Н. Григорьев ¹, О.Ю. Шоева ², А.Ю. Глаголева ², Т.В. Кукоева ²¹ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия² Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия Orlova.Lena10@yandex.ru

Аннотация. Пыльная головня ячменя, вызываемая базидиомицетом *Ustilago nuda* (Jens.) Roster, встречается во всех регионах, где возделывается эта культура. Селекция на резистентность к пыльной головне, основанная на использовании доноров, обладающих генами устойчивости, представляет экологически и экономически безопасный способ, сдерживающий отрицательное действие патогена на ячмень. Внедрение в селекционный процесс молекулярно-генетических подходов позволяет контролировать передачу генов резистентности в гибридный материал. Ген *Run8* контролирует устойчивость ко многим изолятам пыльной головки и служит источником высокой устойчивости к этому возбудителю. Цель представленной работы – разработка молекулярного маркера к гену *Run8* для отбора из гибридных популяций генотипов ячменя, устойчивых к пыльной головне. С помощью сравнения доступных из базы данных пангенома ячменя нуклеотидных последовательностей гена *Run8* определена инсерция/делеция шести пар нуклеотидов в кодирующей области гена. На основе выявленного полиморфизма разработан молекулярный маркер *Hor7050*, позволяющий дифференцировать аллели гена *Run8*. Маркер был протестирован на гибридных линиях F₅–F₆, полученных от скрещивания сорта Эльф – донора резистентности к пыльной головне – и несущего, по данным оригинаторов, ген *Run8*, с сортом Танай, обладающим практической устойчивостью к возбудителю. С помощью разработанного маркера из 84 гибридов были отобраны 18, несущих ген *Run8* сорта Эльф. Однако проведенная фитопатологическая оценка показала, что из выделенных линий восемь восприимчивы к заболеванию. Для уточнения генотипа 18 отобранных линий был проведен дополнительный анализ с помощью микросателлитного маркера *EBmac0541*, сцепленного с геном *Run6*. Была установлена взаимосвязь между наличием аллеля данного маркера от сорта Эльф и устойчивостью к заболеванию. Возможно, сорт Эльф, кроме гена *Run8*, несет ген *Run6*, эффективный против расы 1 возбудителя пыльной головки. Для уточнения наличия гена *Run6* у сорта Эльф требуются дополнительные исследования. Помимо устойчивости, отобранные линии были охарактеризованы по признакам продуктивности. По результатам двухлетнего анализа выделены три продуктивные резистентные линии с геном *Run8* – 32, 65 и 79, достоверно превышающие по урожайности контрольный сорт Эльф.

Ключевые слова: ячмень; пыльная головня; гены устойчивости; маркеры; линии

Для цитирования: Орлова Е.А., Бехтольд Н.П., Григорьев Ю.Н., Шоева О.Ю., Глаголева А.Ю., Кукоева Т.В. Разработка молекулярного маркера к гену *Run8* для отбора устойчивых к пыльной головне генотипов ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):372-380. doi 10.18699/vjgb-26-41

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке проекта РНФ № 25-26-20151 и Министерства науки и инновационной политики Новосибирской области (№ 30-2025-000964 от 21.05.2025).

Благодарности. Работа по оценке гибридных линий ячменя на устойчивость к пыльной головне проведена в Центре коллективного пользования репродукции растений ИЦиГ СО РАН при поддержке бюджетного проекта FWN-2026-0033. Авторы благодарят Галину Владимировну Генералову (ИЦиГ СО РАН) за помощь в работе.

Development of a molecular marker for the *Run8* gene for the selection of barley genotypes resistant to smut

E.A. Orlova ¹, N.P. Bechtold ¹, Yu.N. Grigoriev ¹, O.Yu. Shoeva ², A.Yu. Glagoleva ², T.V. Kukoeva ²¹ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia Orlova.Lena10@yandex.ru

Abstract. Loose smut of barley, caused by the basidiomycete *Ustilago nuda* (Jens.) Roster, occurs in all regions of the world where this crop is grown. This seed-borne disease causes significant losses in grain production. Selection for resistance to loose smut based on the use of donors with resistance genes is an ecologically and economically safe way to constrain the negative impact of the pathogen on barley. The introduction of molecular genetic approaches into

the breeding process makes it possible to control the transfer of resistance genes to hybrid material. The *Run8* gene controls resistance to many isolates of loose smut, including in the West Siberian region of Russia. The objective of the current study is to develop a molecular marker for *Run8* for the selection of barley genotypes resistant to loose smut from hybrid populations. By comparing the nucleotide sequences of the *Run8* gene available from the barley pangenome database, an insertion/deletion of six nucleotide pairs in the coding region of the gene was identified. Based on the identified polymorphism, a molecular marker *Hor7050* was developed, which allows differentiating the alleles of *Run8*. The developed marker was tested on hybrid lines (F_3 - F_6) obtained from crossing cultivar Elf, which is a donor of resistance to loose smut and carries, according to the originators, the *Run8* gene, with cultivar Tanai, which has practical resistance to the pathogen. Using the developed marker, 18 hybrids carrying *Run8* of Elf were selected from 84 hybrids; however, the phytopathological assessment showed that eight of the selected lines were susceptible to the disease. To clarify the genotype of 18 selected lines, an additional analysis was carried out using the microsatellite marker *EBmac0541* linked to *Run6*. A relationship was established between the presence of the allele of this marker from Elf and resistance to the disease. It is possible that Elf, in addition to *Run8*, carries *Run6*, which is effective against race 1 of the causative agent of loose smut. Additional studies are required to clarify the presence of *Run6* in the Elf variety. In addition to resistance, the selected lines were characterized by productivity traits. According to the two-year analysis, three productive resistant lines were identified, with *Run8* – 32, 65 and 79, significantly exceeding the control Elf in yield. The selected lines were transferred to breeding nurseries for their further evaluation by economically important traits.

Key words: barley; loose smut; resistance genes; markers; lines

For citation: Orlova E.A., Bechtold N.P., Grigoriev Yu.N., Shoeva O.Yu., Glagoleva A.Yu., Kukoeva T.V. Development of a molecular marker for the *Run8* gene for the selection of barley genotypes resistant to smut. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):372-380. doi 10.18699/vjgb-26-41

Введение

Ячмень – одна из основных зернофуражных культур. Высокая пластичность и короткий вегетационный период позволяют возделывать эту культуру во многих почвенно-климатических зонах. Современная селекция ячменя направлена на создание высокоурожайных сортов, обладающих устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. Получению высокого и стабильного урожая культуры препятствуют болезни, вызываемые фитопатогенными грибами, среди которых по распространению и вредоносности лидирует пыльная головня.

Пыльная головня ячменя, вызываемая базидиомицетом *Ustilago nuda* (Jens.) Roster, встречается во всех регионах, где возделывается эта культура (Nielsen, Thomas, 1996). Это заболевание, передающееся семенами, вызывает значительные потери зерновой продукции. При поражении патогеном у растения вместо колоса образуется головнёвый сорус, содержащий телиоспоры возбудителя. Таким образом, ущерб от пыльной головни будет пропорционален проценту пораженных колосьев в поле (Дружин, Крупнов, 2008). Однако экономические потери будут значительно выше. Угнетающее действие патогена отмечается на всех этапах развития растений. В результате гибели проростка снижается полевая всхожесть растений, отрицательное влияние пыльной головни проявляется в снижении продуктивной кустистости, высоты растений, длины главного колоса, количества зерен в колосе, массы 1000 зерен (Орлова и др., 2015; Усольцев, 2018). Большинство сортов ярового ячменя, включенных в Государственный реестр сортов и гибридов, допущенных к использованию в РФ (<https://gossortrf.ru/registry>), в различной степени восприимчиво к пыльной головне, борьба с которой заключается в обязательном протравливании семян системными фунгицидами. Поэтому, с точки зрения экономических затрат, предпочтительнее возделывать устойчивые сорта. Ценность непоражаемых сортов состоит еще и в том, что использование их без дополнительных средств защиты

позволяет применять их в органическом малозатратном земледелии для получения экологически безопасной продукции.

Многими исследователями в разное время было подтверждено, что генетическая устойчивость ярового ячменя к пыльной головне может контролироваться отдельными доминантными или несколькими рецессивными генами (Кривченко, 1984; Menzies et al., 2010). Впервые ген устойчивости *Run* к пыльной головне был идентифицирован J.E. Livingston (1942) в сорте Trebi, в дальнейшем им же у сорта Missouri был идентифицирован слабый ген устойчивости *Run2*. В 1952 г. W.P. Skoropad и L.P. Johnson установили у сорта Jet два независимых доминантных гена *Run3* и *Run6*. На основе этого сорта был создан сорт Keystone, несущий ген *Run6*. У сорта ячменя Dorsett и гибрида X173-10-5-6 C.W. Schaller (1949) идентифицировал два доминантных гена *Run4* и *Run5*. Устойчивость к сорту Anoidium контролируется рецессивным геном *run7*. Ген *Run8* был выделен D.R. Metcalfe (1966) из образца озимого ячменя C.I. 4966, интродуцированного в Америку из России. В настоящее время к возбудителю пыльной головни у ячменя идентифицировано 15 генов устойчивости (Zang et al., 2015; Legkun et al., 2016), однако, по литературным данным, эффективны только три – *Run3*, *Run6* и *Run8*. Остальные гены малоэффективны и не нашли практического применения в селекционной работе (Кривченко, 1984).

Оценка сортов ячменя на устойчивость к пыльной головне на естественном фоне не всегда может быть достоверной, что приводит к ошибочной классификации сортов по резистентности. Искусственное заражение растений – процесс трудоемкий и длительный, он охватывает два вегетационных периода: в первый год проводят инокуляцию колосьев суспензией патогена и сбор созревших семян; на следующий год полученные от инокулированных семян растения оценивают на устойчивость по фенотипическому проявлению признака. Кроме того, качество заражения в

значительной степени зависит от метеорологических условий в период инокуляции. По данным Л.В. Мешковой и ее коллег (2024), отмечена высокая корреляция между увлажнением, осадками и поражением ($r > 0.7$) и средняя отрицательная – с температурой воздуха ($r = -0.44$). Поэтому одним из эффективных методов создания устойчивых сортов является совместное использование классических приемов, основанных на гибридизации доноров генов устойчивости с реципиентными сортами, с новейшими методами отбора с помощью молекулярных маркеров. Такой метод способствует сокращению времени и объема неперспективного гибридного материала в селекционном процессе.

Определяя устойчивость образцов, необходимо учитывать распространенные расы возбудителя в предполагаемой зоне возделывания будущих сортов, только таким образом создание резистентных генотипов может быть на шаг впереди возбудителя. Понимание генетики устойчивости в контексте с вирулентностью патогена позволит выявить эффективные гены, к которым генетики смогут подобрать ДНК маркеры, необходимые для выделения гибридов, обладающих высоким сопротивлением к заболеванию на основе генотипа. Ген *Run8* придает устойчивость к большинству рас возбудителя пыльной головки и широко используется в селекции ячменя как в России, так и за рубежом. Этот ген был картирован на длинном плече хромосомы 1H (Zang et al., 2015). Он кодирует белок, содержащий два тандемных домена протеинкиназы, который, как недавно обнаружено, относится к важному классу белков, участвующих в обеспечении устойчивости растений. Выявлен полиморфизм белковых последовательностей *Run8*, на основе которого возможно разработать внутригенные диагностические молекулярные маркеры для точной идентификации аллелей гена *Run8*. До открытия нуклеотидной последовательности гена *Run8* в научных исследованиях и селекционной практике использовали сцепленные с этим геном молекулярные маркеры (Li et al., 2001; Eckstein et al., 2002). Однако из-за рекомбинации между сцепленными маркерами и целевым геном диагностическая эффективность таких маркеров ниже, чем внутригенных. В связи с чем актуальна разработка внутригенных молекулярных маркеров на основе известных нуклеотидных последовательностей целевых генов. Задачей наших исследований стала разработка внутригенного молекулярного маркера к гену *Run8* и его использование совместно со сцепленным с геном *Run6* маркером для генотипирования образцов ячменя с целью выделения из гибридных популяций линий с эффективными генами, обладающих высокой устойчивостью к пыльной головке.

Материалы и методы

Растительный материал. Материалом для исследований служили 84 селекционных линии, отобранные в поколениях F_5 – F_6 из комбинации Эльф × Танай. Сорт Эльф высокоустойчив к пыльной головке ячменя, его родословная: Роланд × Линия 1325. Линия 1325 – дигаллоид (Первенец × Зазерский 85) $F1 \times H. Bulbosum$, по данным оригинаторов (Государственный реестр селекционных достижений),

имеет ген устойчивости *Run8*, по-видимому, переданный ему от сорта Первенец. Сорт Танай обладает практической устойчивостью к возбудителю и получен от двух селекционных линий Г 20275 × Г 20191, в родословной которых прослеживается участие сортов Jet (*Run3*, *Run6*) и Paragon (*Run3*).

Исследовательская работа проводилась с 2021 по 2023 г. В 2021 г. 84 испытываемые линии выращивали в полевых условиях, в селекционном питомнике СП1; в дальнейшем отобранные по устойчивости линии повторно заражали и высевали на фитопатологическом участке СибНИИРС – филиале ИЦиГ СО РАН.

Дифференциация возбудителя пыльной головки *U. nuda*. Для изучения расового состава пыльной головки использовали эмпирический набор сортов-дифференциаторов, а также генетический набор тест-сортов с известными генами устойчивости, предложенный В.И. Кривченко (1984). Идентификацию расы определяли путем сравнения реакции сортов-дифференциаторов с ключом для определения физиологических рас. По восприимчивости генетического набора тест-сортов устанавливали формулу вирулентности расы. Реакцию устойчивости классифицировали по международной шкале: R – устойчивость (поражение до 10 %); S – восприимчивость (поражение выше 10 %).

Оценка устойчивости линий к пыльной головке. Линии с подтвержденным геном устойчивости и родительские сорта Эльф и Танай в июне 2021 г. заражали новосибирской популяцией пыльной головки. Контролем качества инокуляции служил восприимчивый сорт-индикатор Грейс. В 2022 г. провели повторное заражение выделившихся по устойчивости испытываемых линий. Инокуляцию колосьев ячменя (не менее 8) осуществляли вакуумным методом в период начала цветения растений согласно методике ВИР (Санин и др., 2008). Суспензию спор готовили непосредственно перед заражением из расчета 1 г спор на 1 л воды. Споры головки собирали с пораженных колосьев различных генотипов ячменя. Для определения расового состава возбудителя пыльной головки одновременно инокулировали дифференцирующий и генетический тест-наборы сортов ячменя.

Зараженные семена (не менее 100 инфицированных зерен) высевали на фитопатологическом участке СибНИИРС – филиале ИЦиГ СО РАН, расположенном в п. Мичуринском Новосибирской области. Обработка почвы: весеннее боронование, внесение азотных удобрений, культивация. Закладку опытов осуществляли по паре. Посев зараженных семян проводили в оптимальные для культуры сроки, когда температура почвы в период сева на глубине 5–8 см была 11.5–16.5 °C, что благоприятно для прорастания семян и патогена.

Классификацию устойчивости испытываемых образцов к пыльной головке осуществляли по шкале ВИР (Санин и др., 2008) путем подсчета больных и здоровых колосьев, с дальнейшим вычислением доли (в %) поражаемости образца, в фазы полного выколашивания – начала созревания растений. При определении расового состава популяции пыльной головки классификацию устойчивости

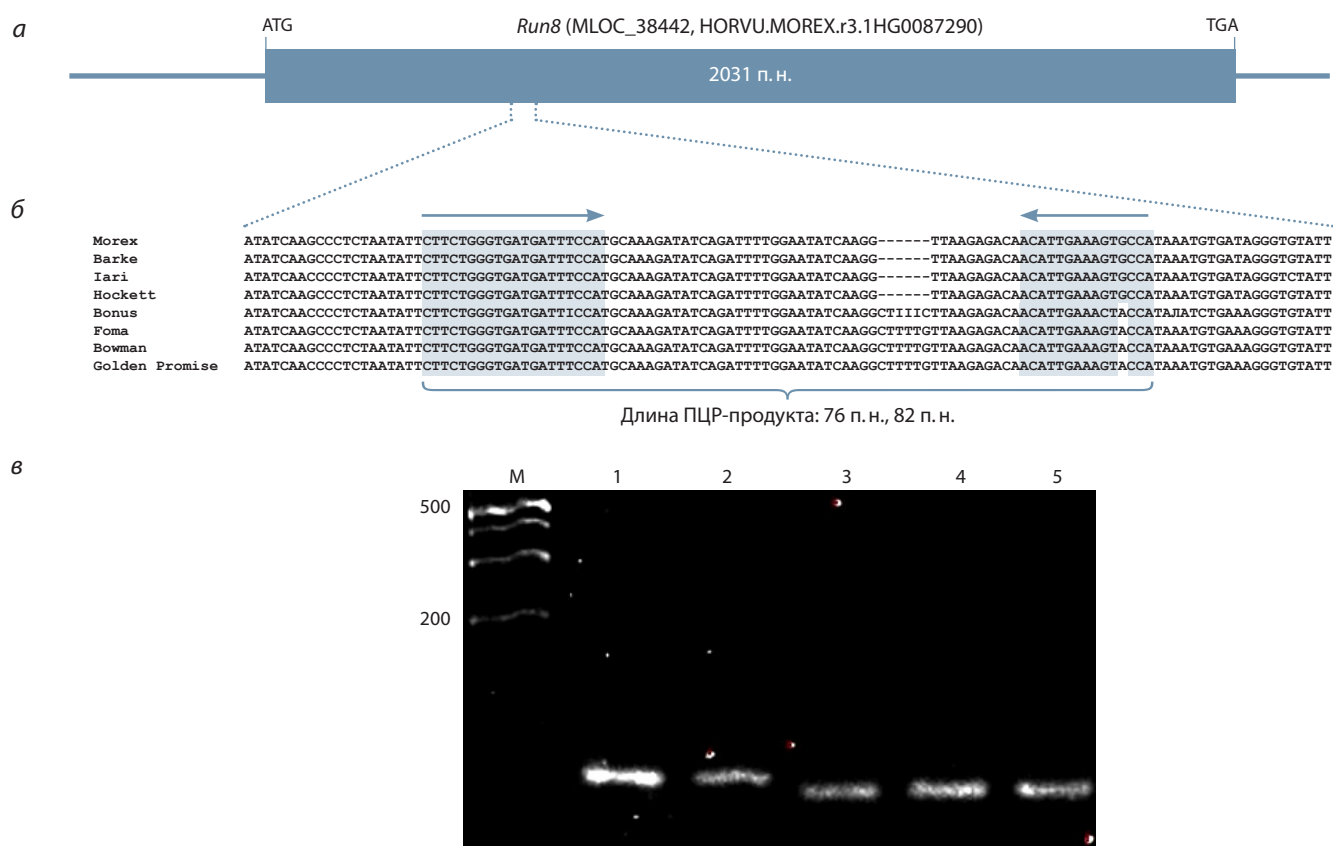


Рис. 1. Структурная организация гена *Run8* (а), множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей района гена, несущего инсерцию/делецию длиной 6 п.н., к которому разработан ДНК-маркер (б), и результаты тестирования разработанного маркера на сортах ячменя с известными генами устойчивости к пыльной головне: Раушан *Run8*, *Run15* (1), Эльф *Run8* (2), Jet *Run3*, *Run6* (3), Keystone *Run6* (4), Grace – стандарт восприимчивости (5). Места отжига праймеров отмечены серым цветом, указана ожидаемая длина ПЦР-фрагментов данного маркера (в).

определяли по международной шкале: R – устойчивость (поражение до 10 %); S – восприимчивость (поражение выше 10 %).

Оценка линий по хозяйственной ценности. Для оценки хозяйственно ценных признаков в осенний период 2022–2023 гг. был проведен структурный анализ селекционных линий ячменя по таким признакам, как высота растений, продуктивная кустистость, длина колоса, количество зерен в колосе, масса 1000 зерен. Перечисленные признаки оценивали согласно Методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1985).

Разработка молекулярного маркера к гену *Run8*. Молекулярный маркер *Hor7050* к гену *Run8* разработан на основе нуклеотидной последовательности MLOC_38442 (HORVU.MOREX.r3.1HG0087290, HORVU1Hr1G087050) (Zang et al., 2015) (рис. 1, а). Используя эту последовательность в качестве референсной в базе данных пангенома ячменя (Jayakodi et al., 2024), доступной на веб-ресурсе GrainGene (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>), мы обнаружили нуклеотидные последовательности гена *Run8* у восьми образцов ячменя: Barke, Bonus, Bowman, Foma, Golden Promise, Hockett, Igri, Morex. С помощью программы Multalin v5.4.1 (Corpet, 1988) проведено их множественное выравнивание, благодаря которому найден полимор-

физм между различными аллелями этого гена. Помимо однонуклеотидных замен, у четырех из восьми сортов отмечена делеция шести пар нуклеотидов. Для генотипирования выявленной делеции с помощью программы IDT PrimerQuest™ (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home>) была подобрана пара праймеров таким образом, чтобы места их отжига фланкировали ее (см. рис. 1, б). Тестирование разработанного маркера на образцах ячменя, несущих известные гены устойчивости к пыльной головне, показало возможность отличить аллели гена *Run8* с помощью электрофоретического анализа в 5 % HR агарозном геле у устойчивых к пыльной головне образцов ячменя, несущих ген *Run8*; целевой фрагмент амплификации составил 82 п.н., а у чувствительных – 76 п.н. (см. рис. 1, в).

Сопоставляя данные генотипирования и устойчивости линий к пыльной головне, мы оценили диагностическую эффективность маркера, которую определяли как долю правильных результатов тестирования в общем количестве результатов или как сумму истинно положительных и истинно отрицательных результатов теста, деленную на общее количество результатов.

Генотипирование линий по генам *Run6* и *Run8*. ДНК выделяли из листьев в фазе кущения, срезанных с пяти растений каждой линии, по методике, описанной ранее

Таблица 1. ДНК-маркеры, используемые в работе для генотипирования линий ячменя по генам *Run6* и *Run8*

Ген	Хромосомная локализация	Название маркера (тип)	Нуклеотидная последовательность праймера, 5' → 3'	Длина ПЦР-продукта, п. н.*	Литературный источник
<i>Run6</i>	3Н	<i>EBmac0541</i> (сцепленный)	F: acggatctacttttagctagca R: aaacaacccacacaatc	106 (S), 110+222 (R)	Rumsay et al., 2000
<i>Run8</i>	1Н	<i>Hor7050</i> (внутригенный)	F: ctcttggtgatgtattcca R: tgggtactttcaatgtgtctc	76 (S), 82 (R)	Данное исследование

* Указаны длины ПЦР-продуктов, характерные для чувствительных (S) и устойчивых (R) к пыльной головне образцов ячменя.

(Plaschke et al., 1995). ДНК анализировали с помощью микросателлитного маркера *EBmac0541*, сцепленного с геном *Run6* (Menzies et al., 2010), и внутригенного маркера *Hor7050*, разработанного в нашей работе к гену *Run8* (табл. 1). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с маркером *Hor7050* проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей 100 нг ДНК-матрицы, 1X ПЦР буфер (67 mM трис-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 0.01 % Tween 20, 18 mM (NH₄)₂SO₄), по 0.2 mM каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. Tag ДНК-полимеразы (Helicon, Москва). ПЦР с маркером *EBmac0541* проводили с использованием набора для БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Новосибирск). Амплификацию с указанными праймерами проводили в следующих условиях: – 1 мин 50 с при температуре 94 °C, денатурация – 30 с при 94 °C, отжиг матрицы с праймерами – 30 с при 50 °C (маркер *Hor7050*) либо 55 °C (маркер *EBmac0541*), полимеризация – 45 с при 72 °C, количество циклов – 45, достраивание ПЦР-фрагментов – 5 мин при 72 °C. Разделение продуктов ПЦР проводили в 5 % HR агарозном геле (HR Agarose PCR Grade, HydraGen, NJ, USA) в горизонтальной камере в течение 3–4 ч при напряжении 7 В/см. Фотографии в УФ-свете и анализ изображения делали с помощью системы документации гелей Gel DocTM XR+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Результаты

Характерной особенностью вегетационных периодов 2022–2023 гг. было недостаточное увлажнение в мае месяце. При этом в мае 2022 г. среднесуточная температура воздуха составила +15.4 °C, что на 4.5 °C выше среднеемноголетнего значения. В мае 2023 г., несмотря на то что среднемесячная температура этого периода была на уровне среднеемноголетних, распределение тепла по декадам было неравномерным. Во второй декаде температура воздуха была ниже на 2.3 °C, а в третьей выше на 3.4 °C среднеемноголетних. Температура почвы на глубине 5–8 см в период посева составила в среднем 14 °C, что благоприятно для инфекционного процесса головневых грибов в период прорастания семян. Средние температуры воздуха с мая по август составили в 2022 г. – 15.3, 17.3, 18.5, 16.6 °C, в 2023 г. – 11.8, 19.0, 21.6, 17.8 °C.

Суммарное количество осадков, выпавших за сезон, в 2022 г. составило 153.8 мм, что ниже многолетних на 30 %, в 2023 г. – 204 мм, из них 173.8 мм выпало в 3-й декаде июля и 2-й и 3-й декадах августа.

Дифференциация возбудителя пыльной головни *U. nuda*. По реакции эмпирического набора сортов-дифференциаторов установлено, что популяция пыльной головни в 2022–2023 гг. была представлена расой 1, не поражающей сорт Keystone. Анализ спорных образцов на генетическом наборе тест-сортов с генами устойчивости позволил установить, что в популяции пыльной головни присутствуют биотипы, вирулентные сортам Trebi с геном *Run 1*, OAC-21 (*Run 9*, *Run 10*), а также Московский 2 (*Run 15*). Таким образом, формула вирулентности расы P1 будет 1 – 1.9.10.15 (табл. S1 и S2 Приложения)¹.

Отбор селекционных линий с помощью молекулярного маркера к гену *Run8* и оценка их устойчивости к пыльной головне. С помощью маркера *Hor7050* выявлены отличия между аллелями гена *Run8* сортов Эльф и Танай: на ДНК сорта Эльф был получен ПЦР-продукт длиной 82 п.н., а на ДНК сорта Танай – 76 п.н. Благодаря наличию полиморфизма между родительскими сортами, этот маркер был использован для генотипирования 84 селекционных линий поколения F₅, полученных на основе гибридной популяции Эльф × Танай. По результатам проведенного анализа были отобраны 18 линий, унаследовавших ген *Run8* от сорта Эльф.

По данным искусственного заражения, проведенного в 2021 г., из 18 отобранных селекционных линий, несущих ген *Run8* сорта Эльф, высокая устойчивость к пыльной головне подтверждена у восьми – 12, 14, 25, 32, 45, 49, 78 и 79. Две линии, 42 и 65, отнесены к группе с практической устойчивостью (поражение менее 5 %). Таким образом, у 55.6 % линий фитопатологическим методом была подтверждена устойчивость к *U. nuda*, у остальных отмечали варьирование признака от слабо до сильно восприимчивых (табл. 2). Диагностическая эффективность маркера *Hor7050* составила 0.56.

В 2022 г. отобранные линии поколения F₆ были дополнительно генотипированы с помощью маркера *Hor7050*, подтвердившего наличие гена *Run8* у устойчивых линий 14, 32, 42, 45, 49, 65, 79. В отличие от сорта Эльф, демонстрирующего устойчивость к пыльной головне в течение трех лет, не все отобранные линии, несущие ген *Run8* этого сорта, устойчивы к данному заболеванию. Линии 4, 8, 10, 44, 57, 60, 71, 81 продемонстрировали поражение пыльной головней от 17.9 до 66.7 %. Поскольку в родословной родительского сорта Танай присутствует сорт Jet, известный как носитель гена *Run6*, отобранные линии

¹ Табл. S1 и S2 Приложения доступны по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx22.pdf>

Таблица 2. Характеристика устойчивости к пыльной головне селекционных линий, отобранных из комбинации Эльф × Танай, и данные генотипирования этих линий с помощью молекулярных маркеров к генам *Run8* и *Run6*

Сорт/линия	Максимальное поражение пыльной головней, %, 2022–2023 гг.	<i>Hor7050 (Run8)</i>		<i>EBmac541 (Run 6)</i>
		2021 г.	2022 г.	
4	19.5	–	82	106
8	29.7	82	–	106
10	56.7	82	82	106
12	0	82	–	110 + 222
14	0	82	82	110 + 222
25	0	82	–	110 + 222
32	0	82	82*	110 + 222
42	3.4	82	82	106
44	62.8	82	–	106
45	0	82	82	106, 110 + 222
49	0	82	82	106, 110 + 222
57	52.8	82	–	106
60	66.7	82	–	106
65	4.1	82	82	106, 110 + 222
71	17.9	82	82	110 + 222
78	0	82	–	110 + 222
79	0	82	82	106
81	28.4	82	82	106
Танай	1.2	76	76	106
Эльф	0	82	82	110 + 222

Примечание. Прочерк – анализ не проводился; * – не удалось однозначно определить, в гомо- или гетерозиготном состоянии находится аллель.

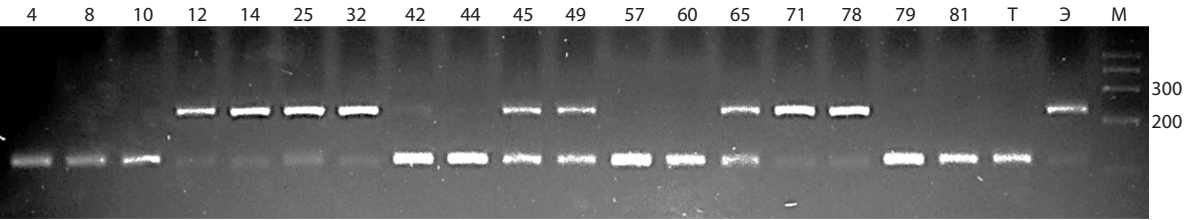


Рис. 2. Результаты генотипирования отобранных линий с помощью микросателлитного маркера *EBmac541*. Цифрами сверху обозначены номера линий, Т – Танай, Э – Эльф, М – маркер длины 100 bp, справа указаны длины в парах нуклеотидов фрагментов маркера длины.

были генотипированы с помощью микросателлитного маркера *EBmac541*, сцепленного с геном *Run6* (рис. 2). Из 18 проанализированных линий девять унаследовали оба аллеля маркера *EBmac541* от сорта Танай (4, 8, 10, 42, 44, 57, 60, 79, 81), шесть – от сорта Эльф (12, 14, 25, 32, 71, 78), три линии оказались гетерозиготными по этому маркеру (45, 49, 65). Сопоставляя данные генотипирования и устойчивости изучаемых линий к пыльной головне, мы установили, что из десяти линий, резистентных к пыльной головне (поражение пыльной головней от 0 до 4.1 %), восемь унаследовали аллель маркера *EBmac541* от сорта

Эльф в гомо- или гетерозиготном состоянии. Среди восьми неустойчивых линий с поражением пыльной головней от 17.9 до 66.7 % носителем аллеля маркера *EBmac541* от сорта Эльф оказалась единственная линия 71, тогда как остальные унаследовали аллель этого маркера от сорта Танай. По полученным данным была рассчитана диагностическая эффективность маркера *EBmac541*, составившая 0.83.

Оценка отобранных линий по хозяйственной ценности. Для оценки хозяйственно ценных признаков в осенний период 2022–2023 гг. был проведен структурный

Таблица 3. Основные хозяйственно ценные показатели селекционных линий комбинации Эльф × Танай, F₅ (среднее за 2022–2023 гг.)

Сорт/линия	Высота растений, см	Длина главного колоса, см	Количество зерен с колоса	Масса 1000 зерен, г	Продуктивная кустистость	Урожайность, г/м ²
Эльф (контроль)	59.3	6.5	19.2	48.0	2.5	419.2
Танай	69.5	6.8	19.4	50.05	2.8	724.4*
12	62.4	5.9	16.3	51.0	3.6*	509.6
14	65.4	6.8	19.4	48.9	2.8	593.9
25	64.9	6.2	19.2	47.4	2.5	480.4
32	70.3*	7.5*	20.9*	45.2	2.8	763.7*
42	71.5*	6.5	17.3	51.8	2.8	568.5
45	68.2	6.8	19.8	47.4	3.0	516.0
49	60.0	6.2	17.3	44.5	2.9	587.2
65	70.7*	7.8*	21.9*	45.8	3.2*	661.7*
78	72.2*	6.8	18.0	50.2	2.8	521.3
79	75.3*	7.6*	21.6*	47.1	2.9	712.0*
НСР ₀₅	10.681	0.308	0.992	4.3997	0.646	219.8

* Отмечены статистически достоверные различия с родительским сортом Эльф.

анализ выделившихся по устойчивости селекционных линий ячменя, несущих ген *Run8*. Учитывали как биометрические, так и продуктивные свойства растений. Контролем служил родительский сорт с геном *Run8*, Эльф.

Все испытываемые линии по высоте растений превосходили контрольный сорт Эльф. Линии 32, 42, 65, 78 и 79 также превышали и отцовскую форму Танай, их высота в среднем за два года варьировала от 70.0 до 75.3 см, остальные линии занимали промежуточное значение между родительскими формами. Известно положительное влияние длины колоса на продуктивность, так как этот показатель имеет высокую корреляционную связь с количеством зерен в колосе (Наумова, 2021). Длина колоса у выделившихся линий варьировала от 5.9 (линия 12) до 7.8 см (линия 65). По длине колоса и количеству зерен в колосе достоверное превышение родительских форм отмечено у линий 32, 65 и 79. Низкой продуктивностью колоса обладали линии 12, 42, 49 и 78 (табл. 3).

Не менее важным элементом в структуре урожая является крупность зерна. Наибольшую массу 1000 зерен наблюдали в 2022 г. у линии 49 – 54.5 г, у Эльфа – 51.1 г. В среднем за два года крупность зерна на уровне сорта Танай отмечена у линий 12, 42 и 78 – 51.0, 51.8, 50.2 г соответственно.

Продуктивная кустистость у линий 12 и 65 превысила контрольный сорт Эльф в 1.4–1.3 раза и составила 3.6–3.2 продуктивных стебля на растение.

По результатам двухлетнего анализа выделены три продуктивные линии – 32, 65 и 79, достоверно превышающие по урожайности контрольный сорт Эльф. У линии 65 этот признак варьировал: в 2022 г. он составил 809.7 г/м², в 2023 г. – 513.7 г/м². Наиболее стабильной по этому признаку была линия 32, ее урожайность по годам составила 756.0–771.3 г/м², эта же линия в среднем за два года пре-

высила лучшую родительскую форму – Танай, линия 79 выделялась по скороспелости и продуктивности.

Таким образом, с помощью молекулярно-генетического анализа из гибридной комбинации Эльф × Танай (F₅) отобраны 18 селекционных линий, несущих ген устойчивости к пыльной головне *Run8*, устойчивость десяти из них подтверждена результатами фитопатологического теста. К группам высоко и практически устойчивых генотипов ячменя были отнесены линии 12, 14, 25, 32, 42, 45, 49, 65, 78 и 79. Выделенные на основе структурного анализа гибридные линии 32, 65 и 79 были переданы в селекционные питомники для их дальнейшей оценки по хозяйственно ценным признакам.

Обсуждение

Из-за особенностей жизненного цикла базидиомицета *U. nuda* (Jens.) Roster фенотипирование устойчивости к вызываемому им заболеванием, пыльной головне, – длительный и трудоемкий процесс, в связи с чем диагностические молекулярные маркеры особенно востребованы при селекции на устойчивость к этому заболеванию. Однако в настоящее время многие гены *Run*, контролирующие устойчивость к пыльной головне, до сих пор не картированы в геноме ячменя (Abo-Elyousr et al., 2022). Среди генов с известной хромосомной локализацией описаны лишь два – *Run6* и *Run8*, которые картированы на хромосомах 3Н и 1Н соответственно (Menzies et al., 2010; Zang et al., 2015). Для последнего с помощью точного картирования была определена нуклеотидная последовательность, кодирующая протеинкиназу (Zang et al., 2015). В ходе многолетнего тестирования сортов с идентифицированными генами устойчивости установлено, что гены *Run6* и *Run8* эффективны против рас пыльной головки на территории Западной Сибири. В нашей работе сорт Эльф, источник гена

Run8, использован в качестве донора при создании устойчивых к пыльной головне линий. Для отбора устойчивых линий был разработан молекулярный маркер *Hor7050* на основе нуклеотидной последовательности гена *Run8*, обнаруженной W. Zang с коллегами (Zang et al., 2015). При сравнении аминокислотных последовательностей протеинкиназ, предсказанных на основе нуклеотидных последовательностей гена *Run8*, отмечено, что группа устойчивых к пыльной головне образцов характеризуется 15 уникальными аминокислотными заменами (Zang et al., 2015). Эти замены обусловлены однонуклеотидными заменами, обнаружение которых с помощью рутинной ПЦР трудоемко и требует разработки специфических праймеров, зондов либо подбора эндонуклеаз рестрикции. При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *Run8* из базы данных пангенома ячменя нами установлена распространенная делеция длиной шесть пар нуклеотидов, которая приводит к потере двух аминокислотных остатков в белке протеинкиназы. При сравнении белковых последовательностей *Run8* делеция двух аминокислотных остатков определена у чувствительных к пыльной головне образцов ячменя, тогда как эти две аминокислоты имелись как у устойчивых, так и у чувствительных образцов (Zang et al., 2015). Таким образом, разработанный маркер к выявленной делеции диагностически ограничен: не все образцы ячменя, несущие инсерцию шести пар нуклеотидов, будут характеризоваться устойчивостью к пыльной головне, но их использование для отслеживания передачи аллеля гена *Run8* от известного донора, вполне возможно. Применяя этот маркер, мы отобрали 18 линий ячменя, несущих ген *Run8* от донора устойчивости – сорта Эльф. Однако, в отличие от этого сорта, некоторые отобранные линии продемонстрировали чувствительность к расе 1 пыльной головни, идентифицированной с помощью сортов-дифференциаторов. Поскольку второй родитель, сорт Танай, имеет в своей родословной сорт Jet, донор гена *Run6*, сделано предположение, что устойчивые линии, помимо гена *Run8*, от сорта Эльф, могут нести ген *Run6* от сорта Танай. Для проверки этого предположения проведено генотипирование отобранных линий с помощью маркера *EBmac0541*, сцепленного с геном *Run6* (Menzies et al., 2010). Однако в результате проведенного анализа большая часть линий, продемонстрировавших устойчивость к пыльной головне, унаследовала маркер *EBmac0541* от сорта Эльф, а не от сорта Танай. Линии 4, 8, 10, 44, 57, 60, 81, унаследовавшие маркер *EBmac0541* от сорта Танай, характеризовались чувствительностью к пыльной головне, несмотря на то что они несли ген *Run8* от сорта Эльф. Единственная линия, характеризующаяся наличием маркера *EBmac0541* от сорта Танай и устойчивостью к пыльной головне, – линия 79. Поскольку маркер *EBmac0541* сцеплен с геном *Run6*, несоответствие аллельного состояния этого маркера и устойчивости к пыльной головне объясняется рекомбинацией между используемым для генотипирования маркером и геном, контролирующим этот признак. На основании проведенного анализа можно предположить, что геном сорта Эльф, помимо гена *Run8*, содержит ген *Run6*, эффективный против пыльной головни

расы 1. Дальнейший анализ нуклеотидных последовательностей гена *Run8* у известных доноров устойчивости к пыльной головне, а также выявленной в настоящей работе косегрегации между маркером *EBmac0541* от сорта Эльф и устойчивостью к пыльной головне позволит уточнить роль генов *Run6* и *Run8* в устойчивости к расам этого патогена, распространенным на территории Западной Сибири.

На основе фитопатологической оценки и оценки показателей продуктивности в ходе двухлетнего анализа среди отобранных линий были определены три перспективные селекционные линии, устойчивые к пыльной головне и достоверно превышающие по урожайности контрольный сорт Эльф. Отобранные линии переданы в селекционные питомники для их дальнейшей оценки по хозяйственно важным признакам.

Заключение

В представленной работе на основе нуклеотидной последовательности гена *Run8* разработан диагностический внутригенный молекулярный маркер. Его использование совместно с микросателлитным маркером *EBmac0541*, сцепленным с геном *Run6*, при генотипировании линий ячменя, полученных на основе сортов Эльф и Танай, позволило выявить взаимосвязь между аллелем маркера *EBmac0541* сорта Эльф и устойчивостью гибридов ячменя к пыльной головне. В результате проведенной исследовательской работы отобраны перспективные селекционные линии, не уступающие по показателям продуктивности исходным сортам.

Список литературы / References

- Дружин А.Е., Крупнов В.А. Пшеница и пыльная головня. Саратов, 2008
[Druzhin A.E., Krupnov V.A. Wheat and Dusty Firebrand. Saratov, 2008 (in Russian)]
- Кривченко В.И. Устойчивость зерновых колосовых к возбудителям головневых болезней. М., 1984
[Krivchenko V.I. Resistance of Grain Ears to Pathogens of Head Diseases. Moscow, 1984 (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1985
[Methodology of the State Variety Testing of Agricultural Crops. Moscow, 1985 (in Russian)]
- Мешкова Л.В., Сабаяева О.Б., Николаев П.Н. Пыльная головня ячменя в Омской области и источники устойчивости к ней. Вестник НГАУ. 2024;4(73):70-78. doi 10.31677/2072-6724-2024-73-4-70-78
[Meshkova L.V., Sabaeva O.B., Nikolaev P.N. The dusty smut of barley in the Omsk region and sources of resistance to it. Bulletin of NSAU. 2024;4(73):70-78. doi 10.31677/2072-6724-2024-73-4-70-78 (in Russian)]
- Наумова Н.А. Особенности формирования зерновой продуктивности и ее элементов у сортов ярового ячменя в условиях Астраханской области. Аграрный научный журнал. 2021;(5):29-34. doi 10.28983/asj.y2021i5pp29-34
[Naumova N.A. Peculiarities of grain productivity formation and its elements in varieties of spring barley collection of VIR in conditions of arid climate of Astrakhan region. Agrarnyy Nauchnyy Zhurnal = The Agrarian Scientific Journal. 2021;(5):29-34. doi 10.28983/asj.y2021i5pp29-34 (in Russian)]
- Орлова Е.А., Бехтольд Н.П., Лихенко И.Е. Влияние возбудителя твердой головни ячменя на хозяйственно-полезные признаки растений. Достижения науки и техники АПК. 2015;29(3):4-6

- [Orlova E.A., Bekhtold N.P., Likhenko I.E. Impact of the pathogen barley smut under economically valuable characteristics of plants. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(3):4-6 (in Russian)]
- Санин С.С., Неклеса Н.П., Санина А.А., Пахолкова Е.В. Методические рекомендации по созданию инфекционных фонов для иммунологических исследований пшеницы. М., 2008 [Sanin S.S., Nekles N.P., Sanina A.A., Pakholkova E.V. Methodological recommendations on the creation of infectious backgrounds for immunological studies of wheat. Moscow, 2008 (in Russian)]
- Усольцев Ю.А. Снижение потерь урожая ячменя от головнёвых заболеваний. *Вестник Курганской ГСХА*. 2018;3:65-69 [Usoltsev Yu.A. Reduction of losses of the harvest of spring barley from head diseases. *Bull Kurgan State Agric Acad*. 2018;3:65-69 (in Russian)]
- Abo-Elyous K.A.M., Mourad A.M.I., Baenziger P.S., Shehata A.H.A., Eckstein P.E., Beattie A.D., Sallam A. Identification of putative SNP markers associated with resistance to egyptian loose smut race(s) in spring barley. *Genes*. 2022;13(6):1075. doi 10.3390/genes13061075
- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(22):10881-10890. doi 10.1093/nar/16.22.10881
- Eckstein P.E., Krasichynska N., Voth D., Duncan S., Rossnagel B.G., Scoles G.J. Development of PCR-based markers for a gene (*Un8*) conferring true loose smut resistance in barley. *Can J Plant Pathol*. 2002;24(1):46-53. doi 10.1080/07060660109506970
- Jayakodi M., Lu Q., Pidon H., Rabanus-Wallace M.T., Bayer M., Lux T., Guo Y., ... Zhang X.-Q., Wicker T., Dockter C., Mascher M., Stein N. Structural variation in the pangenome of wild and domesticated barley. *Nature*. 2024;636(8043):654-662. doi 10.1038/s41586-024-08187-1
- Legkun I.B. Breeding and evaluation of winter barley varieties for group resistance to smut diseases. *Russ J Genet Appl Res*. 2016;6:264-269. doi 10.1134/S2079059716030060
- Li C.D., Eckstein P.E., Lu M., Rossnagel B.G., Scoles G.J. Targeted development of a microsatellite marker associated with a true loose smut resistance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Breed*. 2001;8:235-242. doi 10.1023/A:1013738108871
- Livingston J.E. The inheritance of resistance to *Ustilago nuda*. *Phytopathology*. 1942;32:451-466
- Menzies J.G., Steffenson B.J., Kleinhofs A. A resistance gene to *Ustilago nuda* in barley is located on chromosome 3H. *Can J Plant Pathol*. 2010;32(2):247-251. doi 10.1080/07060661003739977
- Metcalfe D.R. Inheritance of loose smut resistance: III. Relationships between the "Russian" and "Jet" genes for resistance and genes in 10 barley varieties of diverse origin. *Can J Plant Sci*. 1966;46(5):487-495. doi 10.4141/cjps66-082
- Nielsen J., Thomas P. Loose smut. Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management. Mexico: D.F. CIMMYT, 1996
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet*. 1995;91(6-7):1001-1007. doi 10.1007/bf00223912
- Ramsay L., Macaulay M., degli Iannisovich S., MacLean K., Cardle L., Fuller J., Edwards K.J., ... Marmiroli N., Sjakste T., Ganal M., Powell W., Waugh R. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*. 2000;156(4):1997-2005. doi 10.1093/genetics/156.4.1997
- Schaller C.W. Inheritance of resistance to loose smut, *Ustilago nuda*, in barley. *Phytopathology*. 1949;39(12):959-979
- Skoropad W.P., Johnson L.P. Inheritance of resistance to *Ustilago nuda* in barley. *Can J Bot*. 1952;30(5):525-536. doi 10.1139/b52-038
- Zang W., Peter E., Eckstein P.E., Colin M., Voth D., Himmelbach A., Beier S., Stein N., Scoles G.J., Beattie A.D. Fine mapping and identification of a candidate gene for the barley *Un8* true loose smut resistance gene. *Theor Appl Genet*. 2015;128(7):1343-1357. doi 10.1007/s00122-015-2510-4

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.06.2025. После доработки 12.11.2025. Принята к публикации 13.11.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-42

Somaclonal variation in *Saccharum* spp.: unraveling its potential despite current neglect

S. Munir ^{1, 2} , M.A.B. Jaffar ¹, S. Yasmeen¹, M.T. Khan³, I.A. Khan¹¹ Sugarcane Biotechnology Group, Nuclear Institute of Agriculture (NIA), Tando Jam, Pakistan² Plant Breeding and Genetics Division, Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad, Pakistan³ Agricultural Biotechnology Division, National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering, Faisalabad, Pakistan ch.sana11@gmail.com

Abstract. Hybridization of different landraces or wild crop species facilitates genetic recombination and leads to the development of improved cultivars, particularly in sexually propagated crops. In contrast, genetic recombination via hybridization in asexually propagated crops like sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) is challenging due to self or cross incompatibility (low fertility). Such crops can be improved by somaclonal variation, which is achieved by tissue culture techniques. As a major contributor to global sugar and bioethanol production, sugarcane suffers substantial yield loss due to various biotic or abiotic stresses, which may be attributed to its poor resistance mechanism. Despite the potential of *in vitro* culture techniques, somaclonal variation remains underexplored in sugarcane breeding programs. To address the challenges posed to sugarcane under changing environmental dynamics, this review critically evaluates the role of somaclonal variation in sugarcane variety development, its underlying mechanism, practical applications, and factors affecting its occurrence. This review also discusses the limitations and challenges in the practical implementation of this technique in variety development, resulting in its neglect in modern breeding efforts. The focus on the potential of somaclonal variation, sustained by cutting-edge approaches, can unlock its limitations and fulfill the growing future demands of sugar, biofuel, and bioenergy industries.

Key words: callus; genetics; *in vitro* culture; markers; regeneration; somaclonal variation; sugarcane

For citation: Munir S., Jaffar M.A.B., Yasmeen S., Khan M.T., Khan I.A. Somaclonal variation in *Saccharum* spp.: unraveling its potential despite current neglect. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):381-390. doi 10.18699/vjgb-26-42

Funding. The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

Authors contribution. SM conceived the study and wrote the first draft of the manuscript. ABJ designed the figure and wrote the manuscript. SY, MTK and IAK critically review and edit the manuscript. All authors revised the final version.

Data availability statements. All data supporting the findings of this study are available within the paper. Data sharing is not applicable to this article, as no new data were created or analyzed in this study.

Соматоклональная изменчивость у видов рода *Saccharum*: раскрытие ее потенциала в современных условиях

С. Мунир ^{1, 2} , М.А.Б. Джаффар ¹, Ш. Ясмин¹, М.Т. Хан³, И.А. Хан¹¹ Группа биотехнологий сахарного тростника, Ядерный институт сельского хозяйства (NIA), Тандо Джам, Пакистан² Отдел селекции и генетики растений, Ядерный институт сельского хозяйства и биологии, Фейсалабад, Пакистан³ Отдел сельскохозяйственной биотехнологии, Национальный институт биотехнологии и геномной инженерии, Фейсалабад, Пакистан ch.sana11@gmail.com

Аннотация. Гибридизация различных местных сортов или диких видов сельскохозяйственных культур способствует генетической рекомбинации и приводит к созданию улучшенных сортов, в особенности у культур, размножающихся половым путем. В отличие от этого, у культур с бесполом размножением, таких как сахарный тростник (гибрид *Saccharum* spp.), генетическая рекомбинация посредством гибридизации затруднена из-за само- или перекрестной несовместимости (низкой фертильности). Такие сельскохозяйственные культуры могут быть улучшены за счет соматоклональной изменчивости с помощью методов культуры ткани. Сахарный тростник, являющийся одним из основных источников мирового производства сахара и биоэтанола, из-за недостаточной устойчивости к биотическим и абиотическим стрессовым факторам несет значительные потери урожая. Несмотря на эффективность методов культивирования *in vitro*, соматоклональная изменчивость остается недостаточно изученной в программах селекции сахарного тростника. Для решения проблем, появляющихся у сахарного тростника в условиях меняющейся динамики окружающей среды, в настоящем обзоре критически оценивается роль соматоклональной изменчивости в создании сортов сахарного тростника, рассмотрены ее основные механизмы, практическое применение и факторы, влияющие

на ее возникновение. Кроме того, обсуждаются ограничения и проблемы практического применения этого метода при создании сортов, не позволяющие адекватно использовать его в современных селекционных работах. Использование потенциала соматоклональной изменчивости в сочетании с передовыми технологиями позволит преодолеть данные ограничения и удовлетворить растущие потребности в производстве сахара и биотоплива и в биоэнергетической промышленности.

Ключевые слова: каллус; генетика; культивирование *in vitro*; маркеры; регенерация; соматоклональная изменчивость; сахарный тростник

Introduction

The plant tissue culture technique is traditionally used for development of uniform genetic plants through micropropagation, which is the main benefit of clonal cultivars used for commercial cultivation (Duta-Cornescu et al., 2023). However, variation in plants generated from any cell or tissue culture under *in vitro* conditions has been identified and termed as “somaclonal variation” (Larkin, Scowcroft, 1981). This variation provides a potential substitute for crop improvement, especially in asexually propagated crops, such as sugarcane, or crops with narrow genetic bases, self or cross-incompatibility, and irregular inbreeding depression, which are considered significant limitations in using conventional methods for crop improvement. Such genetic improvement assists in reducing the effect of abiotic and biotic stresses in crops like sugarcane via development of resilient cultivars.

Sugarcane is a prominent genetic feedstock used in production of sugar (Azu et al., 2022), biofuel (Marques et al., 2024), and bioenergy (Ahmad, Ming, 2024). Sugar crops rank second in total production among staple crops (Fig. 1a). Among sugar crops, sugarcane yields up to 85 % of global sugar production with the rest contributed by sugarbeet (FAO, 2024). Although a large number of different crops are cultivated worldwide, only four account for half of the global production; sugarcane ranks first, being followed by maize, rice, and wheat, as shown in Figure 1b. Beyond sugar industry, the significance of sugarcane extends from biomass resources to biofuel production (Ahmad, Ming, 2024).

Conventional breeding by selecting superior parents for mating is hampered in sugarcane by limitations like asynchronous flowering, low seed viability, low fertility, and lack of

flowering caused by environmental conditions (Khan M.T. et al., 2018). In fact, sugarcane flowering is specific to certain regions of the world. Continuous efforts have been made to reduce the generational interval in other crops (e.g: doubled haploid, shuttle breeding, etc.), but sugarcane breeding has not benefited from such techniques.

These limitations have led to a narrow genetic base; as the modern genetic feedstock of sugarcane exhibits poor resistance to several diseases (Budeguer et al., 2021). To overcome the common breeding constraints, *in vitro* culture is of keen interest as a way to generate genetic variability for selecting desired genotypes. Variants with a good yield potential developed through tissue culture in sugarcane can be utilized for facing regional environmental challenges and biotic/abiotic stresses. Sugarcane variants developed from *in vitro* culture have been reported since 1971 (Heinz, Mee, 1971).

This paper focuses on how somaclonal variation can complement or replace conventional breeding to generate genetic variations among clones in sugarcane. It covers the mechanisms involved in development of variants along with the factors leading to a satisfactory rate of variation. Despite the successful practical application in developing variants in sugarcane, the progress over the last decade has been neglected. Therefore, this review draws attention towards the significance of somaclonal variation by highlighting its limitations, which may constrain its application on a commercial scale.

In vitro culture techniques

The most promising tissue culture techniques widely adopted in various crops include anther culture, cell suspension culture, callus culture, embryo culture, micropropagation, and proto-

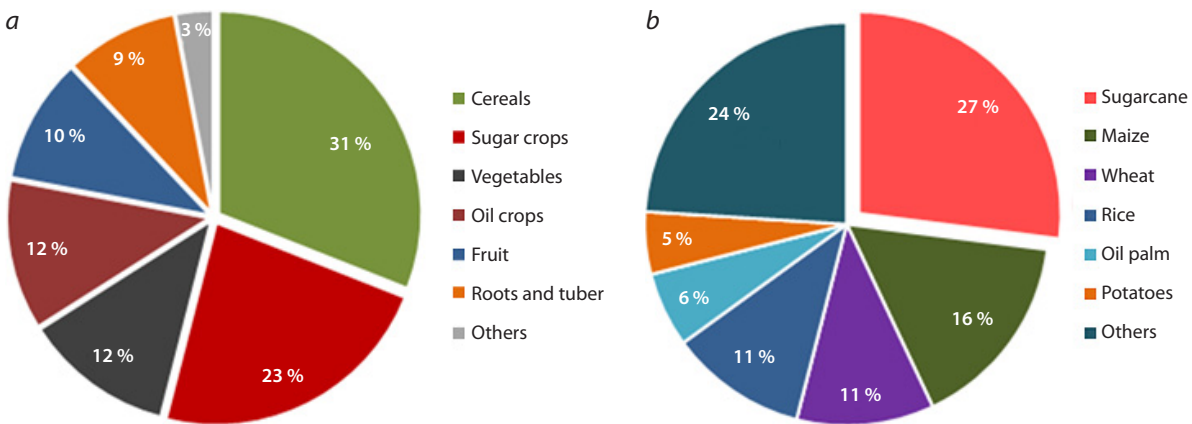


Fig. 1. Contribution of sugarcane to global production in 2023 by (a) commodity group and (b) individual commodity. Source: (FAOSTAT, 2024).

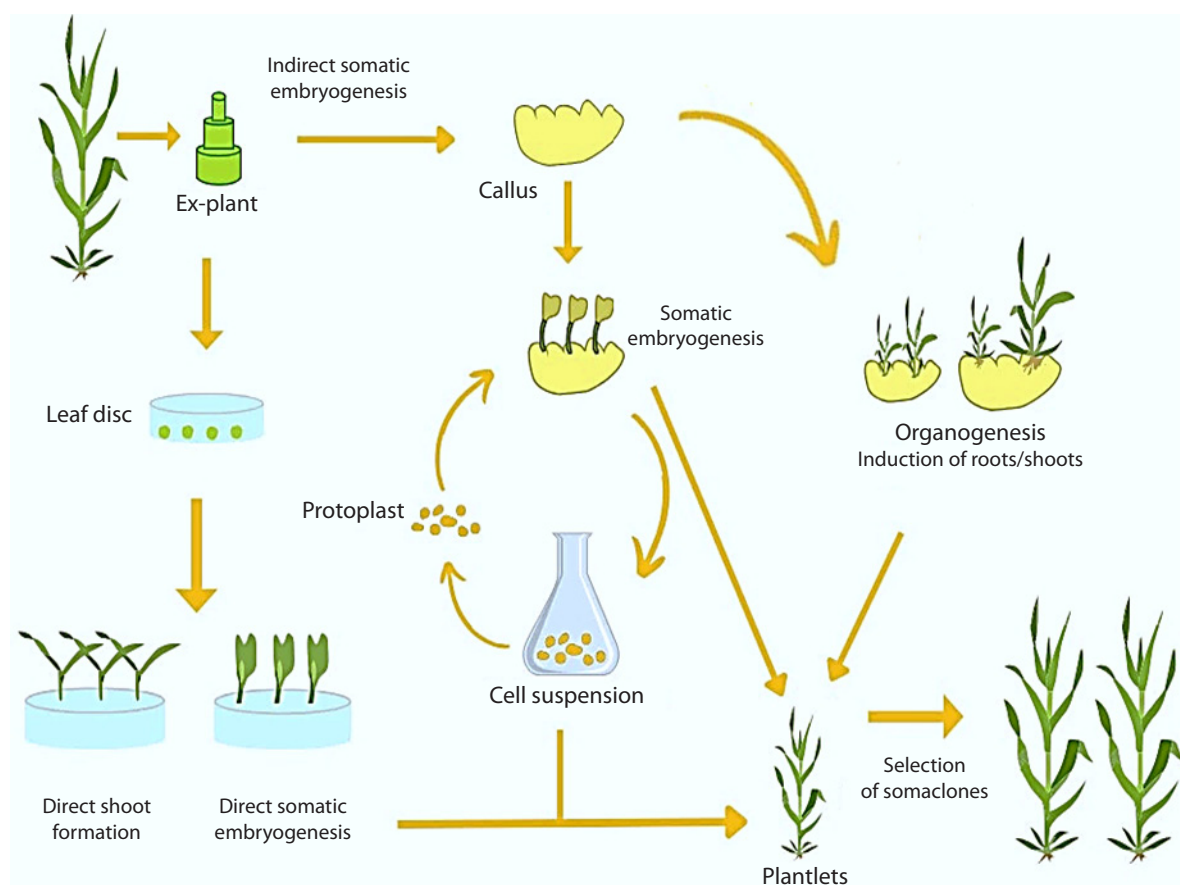


Fig. 2. Regeneration pathways in sugarcane.

plast culture. Different researchers have established different protocols for successful induction of somaclonal variation in sugarcane, but detailed discussion of their protocols is beyond the scope of this paper. However, the principles of extensively used techniques for *in vitro* culture and their regeneration in sugarcane are discussed briefly below.

Organogenesis and somatic embryogenesis are the main pathways for *in vitro* plant regeneration. They require totipotency and competency for plant regeneration under *in vitro* conditions as shown in Figure 2. Newly regenerated plants need to be acclimated to external growth conditions by placing them under low relative humidity and high illumination, which results in cuticle production (Warren, 1991).

In organogenesis, shoots are induced to differentiate from cells or cell clusters. The process involves the progression of leaves, shoots or roots from the explant and their transfer to a diverse medium for root formation (Bidabadi, Jain, 2020). It can be further classified into direct and indirect organogenesis. In the former, the root or shoot develops directly without going into a callus phase. Thorat et al. (2018) has found that sugarcane plants developed from indirect organogenesis exhibit more genetic variation than those developed from direct organogenesis.

In somatic embryogenesis, a cell or group of somatic cells gives rise to a somatic embryo, which morphologically resembles zygote embryos. The somatic embryo has a bipolar structure giving rise to both shoot and root meristems

(Khan I.A., Khatri, 2006). Somatic embryogenesis can also follow the direct or indirect (with an intermediate callus phase) pathways.

The first phase in somatic embryogenesis is the induction of embryogenic cells, which requires time to dedifferentiate. Competence and embryo formation depend upon auxins, mainly in the form of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). It represses morphogenesis and disrupts cell-to-cell interaction, leading to the fragmentation of a single cell or group of cells – the mechanism of the proliferation of embryogenic suspension cultures (De Klerk et al., 1997). It is a commonly used pathway for sugarcane micropropagation (Naz et al., 2008; Almeida et al., 2022), with different established protocols. However, these protocols are efficient for not all genotypes due to their differential behavior (Di Pauli et al., 2021).

Nickell and Maretzki (1969) were first to report cell suspension culture in sugarcane. For this purpose, friable callus is dispersed in a liquid medium and then agitated on a rotary shaker to obtain a culture of isolated cells. This process is genotype-dependent, and those with high phenolic compound levels do not perform well. Generally, suspension cultures have been utilized to study metabolic and physiological processes in sugarcane (Goldner et al., 1991; Thorat et al., 2017; Bottcher et al., 2021). However, Thorat et al. (2017) reported the presence of variation in sugarcane somaclones developed through cell suspension culture, although at a lower frequency, as confirmed by molecular markers.

Mechanisms of somaclonal variation

Somaclonal variation is a multifaceted phenomenon comprising genetic or epigenetic mechanisms (Leva, Rinaldi, 2017). The stability of mutations of qualitative features in subsequent generations relies on their molecular basis (Hung et al., 2018; Azizi et al., 2020). If these mutations are unstable or not inherited by the next generations, they may be regarded as epigenetic changes (Hung et al., 2018). Moreover, modifications in tails of histones and DNA methylation are also viewed as a part of epigenetic change (Azizi et al., 2020), which are usually caused by residual effects of plant growth regulators in tissue culture media (Jackson, Lyndon, 1990). Chromosomal variations are usually caused by explant source or culture media conditions (Phillips et al., 1994). Such variations also have been observed in sugarcane somaclones (Sobhakumari, 2012).

Somaclonal variation has been observed in several species and extensively utilized due to its commercial potential, irrespective of the type of mechanisms involved (Leva, Rinaldi, 2017). Economically, somaclonal variation should be valuable and heritable. Genetic changes can be induced by a variety of mechanisms, including changes in chromosome structure and number, chromosomal breakage or aberrations (deletions/inversions), and cryptic changes. Variations in chromosome number, structure, and aberrations are observed in regenerated plants (Mujib et al., 2007). Such changes may lead to loss of genes or their function (Leva et al., 2012). Point mutations responsible for cryptic changes may affect mitochondrial and chloroplast genomes and are typically predicted to take place. Moreover, cryptic changes such as gene silencing or activation of a transposable element play a vital role in somaclonal variation (Barret et al., 2006).

Factors affecting somaclonal variation

The frequency and type of somaclonal variations in sugarcane can be affected by different factors, such as the genotype composition, explant source, culture medium, time period, and number of culture cycles as discussed below.

Genotype

Different plant species or genotypes vary in their susceptibility to somaclonal variation. The most significant factor among various factors may be plant genotype (Shen et al., 2007; Tican et al., 2008; Nwauzoma, Jaja, 2013). Moreover, different genotypes show different responses under stress, pointing out that somaclonal variation is also affected by genotypic composition.

Shen et al. (2007) assessed plant regenerants and showed that plant genotype is a key factor influencing somaclonal variation during *in vitro* culture. The rate of somaclonal variation varies from 2.6 to 40.4 % depending upon the plant genotypes.

Thus, somaclonal variation is a genotype-dependent phenomenon specifically linked to the regeneration potential of different varieties (Manchanda et al., 2018).

Explant source

The origin of the explant exerts an important influence on the rate of somaclonal variation (Ahuja, 1998). Also, it has been reported that the explant source may greatly influence genetic

fidelity (Krikorian et al., 1993). Regenerates from explants with pre-existing meristems (such as axillary buds or shoot tips), exhibited less somaclonal variation than those developed from highly differentiated tissue (such as leaves, stems, or roots), which usually produce significant somaclonal variants (Duncan, 1997; Sharma et al., 2007).

However, successful cases of *in vitro* regeneration using leaf pieces, leaf sheath, shoot apical meristem, or pith have been reported in sugarcane (Ali et al., 2007; Abdullah et al., 2013). A comparative study investigated better sources of explant in sugarcane. Leaves, shoot apical meristem, or pith were used as explant sources. Leaves performed better than all other sources, followed by shoot apical meristem and pith during callus induction (Ali et al., 2007). Moreover, Abdullah et al. (2013) reported the leaf as the explant source that performed best for indirect somatic embryogenesis technique in sugarcane as compared to pith. The genetic fidelity of somaclones developed from leaves as explants showed polymorphism up to 81 %, demonstrating that direct regeneration from immature leaf slices could be helpful in exploitation of genetic variation and improvement of the existing genotype of sugarcane (Khan I.A. et al., 2009).

Culture medium composition

From the viewpoint of *in vitro* culture conditions, the composition of culture media is the most influential element for plant regeneration in sugarcane (Abdullah et al., 2013). For the practical application of *in vitro* culture, appropriate concentrations and combinations of cytokinins and auxins are necessary (Letham, Gollnow, 1985). The role of cytokinins in the development of shoot apical meristem of sugarcane has been reported in (Ali et al., 2007).

Plant growth regulators in culture media are potent agents of somaclonal variations (Leva et al., 2012). Suboptimal or supraoptimal concentrations of growth regulators, mainly synthetic compounds, have been associated with variation. Somaclonal variation is also favored by rapid, disorganized growth (Karp, 1994). Adding auxin to the culture media of unorganized callus increases the variation by augmenting the rate of DNA methylation (LoSchiavo et al., 1989). Shahid et al. (2012) reported superiority of 2,4-D as an auxin over IAA during callogenesis in sugarcane. Highly significant differences were observed among somaclonal variants developed in sugarcane using different levels of 2,4-D in media, thus pointing out that culture media greatly influence the occurrence of somaclonal variation. In comparison to explant source or plant genotype, remarkable differences were reported for 2,4-D in sugarcane (Abdullah et al., 2013).

2,4-D and kinetin are two common growth regulators that can lead to changes in chromosome number and induce chromosomal abnormalities (Daub, 1986). Growth regulators increase the cell division rate in the culture during the somatic differentiation stage, leading to endopolyploidy, polyteny, and chromosomal changes (D'Amato et al., 1977; Larkin, Scowcroft, 1981). Culture medium conditions are often responsible for chromosomal variations (Phillips et al., 1994). Such variations have also been observed in sugarcane somaclones (Sobhakumari, 2012). Khan I.A. et al. (2008) also

reported 2,4-D as the best source of somaclonal variation when comparing different auxins (Dicamba, Picloram, and IAA) in sugarcane. The maximum number of chlorophyll mutants was developed with 2,4-D as compared to other auxins, representing the highest rate of somaclonal variation in sugarcane. Plants obtained with 2,4-D auxin showed higher phenotypic variability in sugarcane mainly due to the true change in genetic makeup while showing its enhancing effect on cane yield and plant height.

Culture age and number of subcultures

Somaclonal variation increases with the duration of the culture (Farahani et al., 2011; Sun et al., 2013). As callus age increases, chances of diverse plant production increase during successive subcultures (Zayova et al., 2010). Khan S. et al. (2011) showed that somaclonal variation increased after the eighth subculture.

However, not only the number of subcultures but also the duration of each subculture is significant in creating somaclonal variation particularly in callus culture and cell suspension (Bairu et al., 2006; Sun et al., 2013). Somaclonal variation is more promising in plants regenerated after longer culturing, as rapid multiplication of tissue may influence the genetic stability (Israeli et al., 1995; Etienne, Bertrand, 2003; Petolino et al., 2003). About 30 % of genetic variations marked by morphological changes appeared in sugarcane clones after the fourth subculture (Nogueira et al., 2022).

Detection of somaclonal variation

Detection of somaclonal variation is the foremost step in selecting a cultivar with desirable traits or discarding material with unwanted characteristics. Various biochemical, cytological, morphological, and molecular approaches have been employed to detect the extent and type of somaclonal variation in sugarcane.

Somaclonal variants can be simply assessed by morphological traits such as abnormal pigmentation, plant height, or leaf morphology (Israeli et al., 1991).

The existence of somaclonal variation among *in vitro*-cultured sugarcane plants has been shown by different researchers using morphological markers (Doule, 2006; Dalvi et al., 2012; Khan I.A. et al., 2015; Yasmeen et al., 2017; Abo-Elwafa et al., 2021). In sugarcane variety CoJ 64, morphological variations in traits such as leaf length, stalk diameter, etc. were observed during three years (Sobhakumari, 2012). Likewise, Rajeswari et al. (2009) reported 51 commercially promising sugarcane somaclones out of 700 and evaluated their genetic variability using morphological traits. Morphological markers have been widely used in assessment of genetic variations among sugarcane somaclones (Khan I.A. et al., 2015; Yasmeen et al., 2017; Abo-Elwafa et al., 2021). Nonetheless, the detection of somaclonal variants using morphological tools is environmentally sensitive and time-consuming (Bairu et al., 2011).

Change in chromosome number or structure is assessed by cytological analysis (Sobhakumari, 2012; Abreu et al., 2014). Flow cytometry and complex microscopic techniques are usually used to detect somaclonal variation in tissue-cultured plants. Flow cytometry is widely accepted (Doležel et al., 2004), though it is time-consuming and chemicals used to

prepare cytosolic suspensions may interfere with DNA content (Krishna et al., 2016).

In characterization of the complex genome of sugarcane, genetic difference has been verified by flow cytometry (Oliveira et al., 2015; Metcalfe et al., 2019). Thus, Oliveira et al. (2015) detected variation in DNA content in sugarcane varieties and proposed a reliable analysis technique for flow cytometry. Sixteen varieties were classified into four groups relative to their DNA content. Similarly, Nogueira et al. (2022) observed changes in DNA content in regenerated sugarcane plants. Three out of ten genotypes showed change in DNA content. Among these three, two showed reduction of 0.45 pg DNA, while one genotype showed an increase up to 61 % in DNA content during *in vitro* culture. This increase in genome size might be due to polyploidy or transposable elements (Bennetzen et al., 2005), whereas the decrease might be caused by chromosomal breakage or deletions (Petrov, 2001).

Phenotypic variations among organisms are the outcome of biochemical variations that can be due to polymorphism in the genetic makeup of organisms. Isozyme analysis was first performed in sugarcane in 1969 (Heinz, 1969). Enzymes, such as peroxidase, superoxide dismutase, and malate dehydrogenase were used to study variation in sugarcane (Weising et al., 2005). Sugarcane somaclones showed improved activity of antioxidants like catalase, superoxide dismutase, peroxidase, ascorbate peroxidase, and ascorbate under drought stress (Naheed et al., 2020). Variation in sugarcane based on biochemical parameters was also reported by Yasmeen et al. (2017) and Dalvi et al. (2012). Nevertheless, the implementation of isozyme analysis is limited due to some limitations, such as their being tissue-specific, few in numbers, and being affected by environmental conditions.

The complete picture of variations in complex plant genomes can be assessed with the help of molecular markers. They are more reliable tools, as compared to biochemical markers, as they are more numerous, environment-independent, reproducible, and highly specific (Manchanda et al., 2018). Currently, different molecular markers, such as amplified fragment length polymorphism (AFLP), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), simple sequence repeats (SSR), and inter-simple sequence repeats (ISSR), are utilized in different plants to study somaclonal variation (Leva et al., 2012). Somaclonal variation was widely detected in sugarcane by using molecular markers (Thumjamras et al., 2011; Seema et al., 2014; Mahmud et al., 2015; Tawar et al., 2016). In particular, SSR markers are frequently utilized to study variation among somaclones in sugarcane (Nair et al., 2002). Smiullah et al. (2012) rated SSR markers the best tool to study genetic diversity and found up to 51 % polymorphisms using SSR primers in sugarcane somaclones.

Achievements through somaclonal variation in sugarcane

The success of any conventional breeding program depends on genetic variability. However, a program lasts for about 10–15 years and comprises genotype selection and variety testing, passing through different crop development stages. Therefore, to boost the variation, especially in asexually propa-

gated crops, plant tissue culture presents a novel technique, which assists breeders in creating variability in crops in a short time (Karp, 1992; Mathur, 2013). Tissue culture techniques significantly contributed to crop improvement in sugarcane. Useful somaclones have been developed around the globe

against different biotic and abiotic stresses (Oloriz et al., 2011; Dalvi et al., 2012; Kumar et al., 2012; Nikam et al., 2015).

The most significant somaclones developed mainly during the last two decades, along with their improved features, are shown in the Table. Ono was one of the pioneer tissue-cultured

Promising clones developed in sugarcane

Plant material	Findings	Resistance if any	Reference
LSC and B36464	Reported efficient callus-mediated regeneration system with a survival rate of 85–91 % of regenerated plants	–	Azu et al., 2022
GT-54 9	Eleven somaclones were assessed for yield and quality parameters	–	Abo-Elwafa et al., 2021
CPF-248	Somaclones (IPSV1 and IPSV2) exhibited improved photosynthesis and antioxidant response	Drought	Naheed et al., 2020
Co 05011	Induction of regeneration of shoot culture at a higher rate and multiplication ratio via pretreatment of explant with thidiazuron	–	Kumari et al., 2017
CoC 671	Somaclones with improved agronomical traits, tolerance to biotic and abiotic stress in sugarcane	Drought and red rot	Tawar et al., 2016
Isd 37, Isd 38, Isd 39, and Isd 40	Disease-tolerant somaclones were screened and further assessed for their genetic variability using RAPD and SSR markers	Red rot	Mahmud et al., 2015
NIA98, BL4, and AEC82-1026	RAPD was utilized to confirm the somaclonal variation in sugarcane clones derived from callus cultures	–	Seema et al., 2014
HSF-242	SSR markers were applied for the identification of somaclonal variation	Sugarcane mosaic virus	Abdullah et al., 2013
CoC 671	Clones with superior yield parameters	Smut	Dalvi et al., 2012
BF-162	Assessment of red rot disease tolerant clones developed from susceptible genotype BF-162 and genetic variation using SSR and RAPD markers	Red rot	Shahid et al., 2012
CoJ 64	Somaclones were evaluated for different morphological parameters	–	Sobhakumari, 2012
S97US297	Determination of somaclonal variation using RAPD and SSR markers	Red rot	Shahid et al., 2011
CP48-103	Salt-tolerant clones were developed via <i>in vitro</i> culture	Salinity	Shomeili et al., 2011
K84-200	Application of SSR and RAPD markers to detect genetic variability in somaclones in sugarcane	Salinity	Thumjamras et al., 2011
NIA-98, BL4, and NIA-2004	Use of SSR markers to confirm variations among somaclones	–	Khan I.A. et al., 2009
<i>S. officinarum</i> × <i>S. spontaneum</i> , <i>S. officinarum</i> × <i>Erianthus arundinaceus</i>	Thirty-nine hybrids were used as donors for <i>in vitro</i> culture. Fifty-one sub-clones showed good commercial potential	–	Rajeswari et al., 2009
CoJ 88 and CoJ 64	Somaclones regenerated from calli screened for red rot disease showed better tolerance to the disease than parents in the field	Red rot	Sengar et al., 2009
CoC 671	The selection of 147 plantlets was made at different salt concentrations	Salinity	Patade et al., 2008
CoJ 88	Three resistant and four moderately resistant clones of red rot disease were developed	Red rot	Singh et al., 2008
CoC671	Somaclones showed good performance for quality and yield parameters	–	Doule, 2006
CP65-357	Salt tolerant lines were developed via <i>in vitro</i> culture	Salinity	Gandonou et al., 2006
COC671	RAPD markers were used to detect genetic variability among somaclones	Salinity, drought	Yadav et al., 2006
CP-43/33	Somaclones with desirable traits were developed	Salinity	Khan S.J. et al., 2004
Q77N1232, Co6519	No inferior morphological parameter was observed in any developed somaclone	Drought	Wagih et al., 2004
CP 70-321, LCP 85-384, and HoCP 85-845	Plantlets regenerated from the callus of leaf roll have lower stalk weight and diameter with a higher stalk population than bud-propagated cane	–	Hoy et al., 2003

sugarcane varieties developed from the susceptible variety Pindar that was found resistant to Fiji disease (Krishnamurthi, Tlaskal, 1974). Two somaclonal variants of sugarcane variety CoC 671 were released as cultivars: Phule Savitri, which has high sucrose content, early maturity, and moderate tolerance to smut and red rot (Jalaja et al., 2006), and VSI 434, which showed an almost double increase in sugar and cane yield (Tawar et al., 2016). After VSI 434, no significant commercially released variety or clones have been produced in the last decade, as shown in the Table.

Challenges encountered in somaclonal variation

Regardless of various somaclones developed in sugarcane, genetic improvement remains limited with few varieties released to date. Some distressing concerns hindering its practical application on commercial scale are listed below:

- Quantitative inheritance in sugarcane is a major limiting factor for the generation of favorable mutations via tissue culture, explicitly regarding yield and sucrose content.
- Somaclonal variation is an expensive technique, as it demands a closed facility.
- The rate of somaclonal variation depends on the genotype of explant used.
- Somaclones exhibit uncontrolled and unpredictable variation.
- Most of the traits acquired by this variation are uncontrolled, unstable, and epigenetic in nature. Therefore it is essential to study the genetic diversity of tissue-cultured plants after their transplantation into field.
- Multilocation trials are demanded to test the stability of desired traits over generations.
- To assess the genetic stability of somaclones, extensive field trials are required.
- Issues such as poor acclimatization, contamination, and tissue dying also impede the practical application of variant development.

To overcome these limitations, somaclones can serve as an initial material for plant breeding rather than as finished cultivars. They act as donors of specific valuable traits, requiring further improvement through conventional breeding methods. Integrating conventional breeding with tissue culture technique, along with other advanced molecular tools such as marker assisted selection, genetic mapping, or gene editing tool (e. g. CRISPR-Cas9) or mutation can enhance sugarcane resilience to abiotic and biotic stresses. Moreover, gene editing approaches enable the modification of targeted genes linked to stress tolerance, ultimately improving the resistance mechanism in sugarcane. Implementing these advance approaches can help breeders overcome the aforesaid concerns.

Conclusions and future prospects

Genetic variability exists both in wild-type and commercial varieties, serving as the foundation for improving cultivars. However, in sugarcane, aspects such as the complex genome, narrow genetic pool, long breeding cycle, and low fertility are the key limiting factors for the development of superior cultivars via recombination. In this context, the tissue culture

technique can overcome the hardship of creating genetic variation in sugarcane. Somaclonal variation induced by tissue culture has become the most prevalent approach in sugarcane for developing varieties and superior lines or clones with tolerance to biotic or abiotic stresses, particularly in regions where climatic conditions limit fertilization.

Despite of its potential, somaclonal variation has been underexplored in recent years due to several challenges. These challenges can be met by integrating the tissue culture technique with other biotechnological or latest approaches. For instance, identification of variants at an early stage by means of molecular markers can be productive, as early selection or elimination of variants reduces the time expenditure, especially in long duration crops like sugarcane. Combinatorial use of induced mutagenesis with *in vitro* culture can further enhance variation frequency in crops with large complex genomes and lead to development of sugarcane for commercial use under changing environmental conditions. Moreover, harnessing genetic edition tools like CRISPR-Cas9 can enhance crucial traits related to biofuel and bioenergy production and fulfill the growing future demands in sugar, biofuel, and bioenergy industries.

References

- Abdullah, Smiullah, Khan F.A., Iftikhar R., Raza M.M., Aslam R., Hammad G., Ijaz A., Zafar W., Ijaz U. Detection of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane and SCMV screening through ELISA. *J Agr Sci*. 2013;5:199-208. doi 10.5539/jas.v5n4p199
- Abo-Elwafa A., Bakheit B.R., El-Taib A.B., Noby N.Y. Evaluation of some new somaclones of sugarcane for yield and quality. *SJU-IJAS*. 2021;3:129-139. doi 10.21608/svuijas.2021.59073.1073
- Abreu I.S., Carvalho C.R., Clarindo W.R. Massal induction of *Carica papaya* L. 'Golden' somatic embryos and somaclone screening by flow cytometry and cytogenetic analysis. *Cytologia*. 2014;79:475-484. doi 10.1508/cytologia.79.475
- Ahmad K., Ming R. Harnessing genetic tools for sustainable bioenergy: a review of sugarcane biotechnology in biofuel production. *Agriculture*. 2024;14:1312. doi 10.3390/agriculture14081312
- Ahuja M.R. Somaclonal genetics of forest trees. In: Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. (Eds) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998; 105-121
- Ali A., Naz S., Alam S., Iqbal J. *In vitro* induced mutation for screening of red rot (*Colletotrichum falcatum*) resistance in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pak J Bot*. 2007;39(6):1979-1994
- Almeida F.A., Santa-Catarina C., Silveira V. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp.). In: Ramirez-Mosqueda M.A. (Ed.) Somatic Embryogenesis. Methods in Molecular Biology. New York: Humana, 2022;83-95. doi 10.1007/978-1-0716-2485-2_7
- Azizi P., Hanafi M.M., Sahebi M., Harikrishna J.A., Taheri S., Yassoralipour A., Nasehi A. Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: a need to monitor the micropropagation of plantation crops. *Funct Plant Biol*. 2020;47(6):508-523. doi 10.1071/FP19077
- Azu E., Elegba W., Asare A.T., Asare K., Akama C., Asare P., Annor C., Azure S., Danso K. Efficient callus-mediated system for commercial production of sugarcane (*Saccharum* spp.) planting material in Ghana. *Afr J Biotechnol*. 2022;21:208-217. doi 10.5897/AJB2021.17440
- Bairu M.W., Fennell C.W., van Staden J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci Hortic*. 2006;108:347-351. doi 10.1016/j.scienta.2006.01.039

- Bairu M.W., Aremu A.O., Staden J.V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 2011;63:147-173. doi 10.1007/s10725-010-9554-x
- Barret P., Brinkman M., Beckert M. A sequence related to rice *Pong* transposable element displays transcriptional activation by *in vitro* culture and reveals somaclonal variations in maize. *Genome.* 2006; 49:1399-1407. doi 10.1139/g06-109
- Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot.* 2005;95(1):127-132. doi 10.1093/aob/mci008
- Bidabadi S.S., Jain S.M. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants.* 2020;9(6):702. doi 10.3390/plants9060702
- Bottocher A., Domingues-Junior A.P., Souza L.P., Tohge T., Araújo W.L., Fernie A.R., Mazzafera P. Sugarcane cell suspension reveals major metabolic changes under different nitrogen starvation regimes. *Bragantia.* 2021;80:e2921. doi 10.1590/1678-4499.2021-0009
- Budeguer F., Enrique R., Perera M.F., Racedo J., Castagnaro A.P., Noguera A.S., Welin B. Genetic transformation of sugarcane, current status and future prospects. *Front Plant Sci.* 2021;12:768609. doi 10.3389/fpls.2021.768609
- Dalvi S.G., Vasekar V.C., Yadav A., Tawar P.N., Dixit G.B., Prasad D.T., Deshmukh R.B. Screening of promising sugarcane somaclones for agronomic traits, and smut resistance using PCR amplification of inter transcribed region (ITS) of *Sporisorium scitamineum*. *Sugar Tech.* 2012;14:68-75. doi 10.1007/s12355-011-0132-y
- D'Amato F., Buiatti M., Raghavan V., Johri B.M., Bhojwani S.S., Rangaswamy N.S., de Nettancourt D., Devreux M. Cytology, cytogenetics and plant breeding. In: Reinert J., Bajaj Y.P.S. (Eds) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Springer, 1977;343-464. doi 10.1007/978-3-662-02279-5_3
- Daub M.E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 1986;24:159-186. doi 10.1146/annurev.py.24.090186.001111
- De Klerk G.J., Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R., Neumann K.H. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biol Plant.* 1997;39:53-66. doi 10.1023/A:1000304922507
- Di Pauli V., Fontana P.D., Lewi D.M., Felipe A., Erazzú L.E. Optimized somatic embryogenesis and plant regeneration in elite Argentinian sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars. *J Genet Eng Biotechnol.* 2021;19(1):171. doi 10.1186/s43141-021-00270-8
- Doležel J., Valárik M., Vrána J., Lysák M.A., Hřibová E., Bartoš J., Gasmanová N., Doleželová M., Šafář J., Šimková H. Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* spp). In: Jain S.M., Swennen R. (Eds) *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. Enfield: Science Publishers Inc, 2004;229-244
- Doule R.B. Cane yield and quality characters of some promising somaclonal variants of sugarcane. *Sugar Tech.* 2006;8:191-193. doi 10.1007/BF02943660
- Duncan R.R. Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv Agron.* 1997;58:201-240. doi 10.1016/S0065-2113(08)60256-4
- Duta-Cornescu G., Constantin N., Pojoga D.M., Nicuta D., Simon-Gruita A. Somaclonal in micropropagation of variation-advantage or disadvantage the medicinal plants. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1):838. doi 10.3390/ijms24010838
- Etienne H., Bertrand B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol.* 2003;23:419-426. doi 10.1093/treephys/23.6.419
- Farahani F., Yari R., Masoud S. Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*). *Gene Conserve.* 2011; 10:216-221
- Food and Agriculture Organization. Agricultural production statistics 2010–2023. FAOSTAT database. 2024. <https://www.fao.org/statistics/highlights-archive/highlights-detail/agricultural-production-statistics-2010-2023/en>
- Gandonou C.B., Errabii T., Abrini J., Idaomar M., Senhaji N.S. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2006;87:9-16. doi 10.1007/s11240-006-9113-3
- Goldner W., Thom M., Maretzki A. Sucrose metabolism in sugarcane cell suspension cultures. *Plant Sci.* 1991;73(2):143-147. doi 10.1016/0168-9452(91)90021-Y
- Heinz D.J. Isozyme prints for variety identification. *ISSCT Breeders' Newsletter.* 1969;24:8
- Heinz D.J., Mee G.W.P. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *Am J Bot.* 1971;58:257-262. doi 10.1002/j.1537-2197.1971.tb09971.x
- Hoy J.W., Bischoff K.P., Milligan S.B., Gravois K.A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica.* 2003;129:237-240. doi 10.1023/A:1021928823445
- Hung Y.-H., Liu F., Zhang X.-Q., Xiao W., Hsieh T.-F. Sexual and non-sexual reproduction: inheritance and stability of epigenetic variations and consequences for breeding application. In: Gallusci P., Bucher E., Mirouze M. (Eds) *Plant Epigenetics Coming of Age for Breeding Applications*. Advances in Botanical Research. Academic Press, 2018;88:117-163. doi 10.1016/bs.abr.2018.09.002
- Israeli Y., Reuveni O., Lahav E. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Sci Hort.* 1991;48(1-2):71-88. doi 10.1016/0304-4238(91)90154-Q
- Israeli Y., Lahav E., Reuveni O. *In vitro* culture of bananas. In: Gowen S. (Ed.) *Bananas and Plantains*. World Crop Series. Springer, 1995;147-178. doi 10.1007/978-94-011-0737-2_6
- Jackson J.A., Lyndon R.F. Habituation: cultural curiosity or developmental determinant? *Physiol Planta.* 1990;79:579-583. doi 10.1111/j.1399-3054.1990.tb02120.x
- Jalaja N.C., Sreenivasan T.V., Pawar S.M., Bhoi P.G., Garker R.M. Co 94012 – a new sugarcane variety through somaclonal variation. *Sugar Tech.* 2006;8:132-136. doi 10.1007/BF02943647
- Karp A. The role of growth regulators in somaclonal variation. *Br Soc Plant Growth Regul Ann Bull.* 1992;2:1-9
- Karp A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil I.K., Thorpe T.A. (Eds) *Plant Cell and Tissue Culture*. Springer, 1994;139-151. doi 10.1007/978-94-017-2681-8_6
- Khan I.A., Khatri A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: histological studies. *Pak J Bot.* 2006; 38(3):631-636
- Khan I.A., Dahot M.U., Seema N., Bibi S., Khatri A. Genetic variability in plantlets derived from callus culture in sugarcane. *Pak J Bot.* 2008;40(2):547-564
- Khan I.A., Dahot M.U., Seema N., Yasmeen S., Bibi S., Raza G., Khatri A., Naqvi M.H. Direct regeneration of sugarcane plantlets: a tool to unravel genetic heterogeneity. *Pak J Bot.* 2009;41(2): 797-814
- Khan I.A., Seema N., Raza S., Yasmeen S. Comparative performance of sugarcane somaclones and exotic germplasm under agro-climatic conditions of Tando Jam. *Pak J Bot.* 2015;47(3):1161-1166
- Khan M.T., Khan I.A., Yasmeen S., Seema N., Nizamani G.S. Field evaluation of diverse sugarcane germplasm in agroclimatic conditions of Tandojam, Sindh. *Pak J Bot.* 2018;50:1441-1450
- Khan S.J., Khan M.A., Ahmed H.K., Khan R.D., Zafar Y. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and subsequent screening for salt tolerance. *Asian J Plant Sci.* 2004;3:330-334. doi 10.3923/ajps.2004.330.334
- Khan S., Saeed B., Kauser N. Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. *Pak J Bot.* 2011;43:233-242
- Krikorian A.D., Irizarry H., Cronauer-Mitra S.S., Rivera E. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa AAB*) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Ann Bot.* 1993;71:519-535. doi 10.1006/anbo.1993.1068
- Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sadh R.K. Somaclonal variations and their applications in horticultural

- tural crops improvement. *3 Biotech.* 2016;6:54. doi 10.1007/s13205-016-0389-7
- Krishnamurthi M., Tlaskal J. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. Pindar sub-clones from tissue cultures. In: Proceedings XV Congress, International Society of Sugar Cane Technologists. 1974;15(1):130-137
- Kumar P., Agarwal A., Tiwari A., Lal M., Jabri M. Possibilities of development of red rot resistance in sugarcane through somaclonal variation. *Sugar Tech.* 2012;14:192-194. doi 10.1007/s12355-012-0138-0
- Kumari K., Lal M., Saxena S. Enhanced micropropagation and tiller formation in sugarcane through pretreatment of explants with thidiazuron (TDZ). *3 Biotech.* 2017;7:282. doi 10.1007/s13205-017-0910-7
- Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet.* 1981;60:197-214. doi 10.1007/BF02342540
- Letham D., Gollnow B. Regulators of cell division in plant tissues. XXX. Cytokinin metabolism in relation to radish cotyledon expansion and senescence. *J Plant Growth Regul.* 1985;4:129-145. doi 10.1007/BF02266951
- Leva A., Rinald L.M.R. Somaclonal variation. In: Thomas B., Murray B.G., Murphy D.J. (Eds) Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Cambridge: Academic Press, 2017;468-473. doi 10.1016/B978-0-12-394807-6.00150-7
- Leva A., Petrucci R., Rinaldi L. Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In: Leva A., Rinaldi L.M.R. (Eds) Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. London: Intech Open, 2012. doi 10.5772/50367
- LoSchiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Maraziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet.* 1989;77:325-331. doi 10.1007/BF00305823
- Mahmud K., Nasiruddin K.M., Hossain M.A., Hassan L. Screening sugarcane somaclones and their parent varieties against red rot (*Colletotrichum falcatum*) and assessment of variability by RAPD and SSR markers. *SAARC J Agric.* 2015;13(2):173-182. doi 10.3329/sja.v13i2.26578
- Manchanda P., Kaur A., Gosal S.S. Somaclonal variation for sugarcane improvement. In: Gosal S.S., Wani S.H. (Eds) Biotechnologies of Crop Improvement. Vol. 1. Springer, 2018;299-326. doi 10.1007/978-3-319-78283-6_9
- Marques J.C., Gasi F., Lourenço S.R. Biofuel in the automotive sector: viability of sugarcane ethanol. *Sustainability.* 2024;16:2674. doi 10.3390/su16072674
- Mathur S. Conservation of biodiversity through tissue culture. *Res Rev J Microbiol Biotechnol.* 2013;2(3):1-6
- Metcalf C.J., Li J., Giorgi D., Piperidis N., Aitken K.S. Flow cytometric characterisation of the complex polyploid genome of *Saccharum officinarum* and modern sugarcane cultivars. *Sci Rep.* 2019;9:19362. doi 10.1038/s41598-019-55652-3
- Mujib A., Banerjee S., Dev Ghosh P. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). *Propag Ornament Plants.* 2007;7(4):169-174
- Naheed R., Arfan M., Farhat F., Ijaz S., Khalid H. Acclimatization of drought tolerance with somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Adv Life Sci.* 2020;8(1):57-62
- Nair N.V., Selvi A., Sreenivasan T.V., Pushpalatha K.N. Molecular diversity in Indian sugarcane cultivars as revealed by randomly amplified DNA polymorphisms. *Euphytica.* 2002;127:219-225. doi 10.1023/A:1020234428681
- Naz S., Ali A., Siddique A. Somatic embryogenesis and plantlet formation in different varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) HSF-243 and HSF-245. *Sarhad J Agric.* 2008;24(4):593-598
- Nickell L.G., Maretzki A. Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiol Plant.* 1969;22:117-125. doi 10.1111/j.1399-3054.1969.tb07847.x
- Nikam A.A., Devarumath R.M., Ahuja A., Babu H., Shitole M.G., Suprasanna P. Radiation-induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Crop J.* 2015;3:46-56. doi 10.1016/j.cj.2014.09.002
- Nogueira G.F., Luis Z.G., Salles L.A., Pasqual M., Scherwinski-Pereira J.E. High-efficiency organogenesis and evaluation of the regenerated plants by flow cytometry of a broad range of *Saccharum* spp. hybrids. *Biologia.* 2022;77:3265-3278. doi 10.1007/s11756-022-01176-7
- Nwauzoma A.B., Jaja E.T. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa spp*): mechanisms and applications. *J Appl Biosci.* 2013;67:5252-5260. doi 10.4314/jab.v67i0.95046
- Oliveira A.C., Pasqual M., Bruzi A.T., Pio L.A., Mendonça P.M., Soares J.D. Flow cytometry reliability analysis and variations in sugarcane DNA content. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):7172-7183. doi 10.4238/2015.June.29.11
- Oliver M.I., Gil V., Rojas L., Veitia N., Hofte M., Jimenez E. Selection and characterisation of sugarcane mutants with improved resistance to brown rust obtained by induced mutation. *Crop Pasture Sci.* 2011;62(12):1037-1044
- Patade V.Y., Suprasanna P., Bapat V.A. Gamma irradiation of embryogenic callus cultures and *in vitro* selection for salt tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Agric Sci China.* 2008;7(9):1147-1152. doi 10.1016/S1671-2927(08)60158-3
- Petolino J.F., Roberts J.L., Jayakumar P. Plant cell culture: a critical tool for agricultural biotechnology. In: Vinci V.A., Parekh S.R. (Eds) Handbook of Industrial Cell Culture. Humana Press, 2003;243-258. doi 10.1007/978-1-59259-346-0_10
- Petrov D.A. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* 2001;17:23-28. doi 10.1016/s0168-9525(00)02157-0
- Phillips R.L., Kappler S.M., Olhof R. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(12):5222-5226. doi 10.1073/pnas.91.12.5222
- Rajeswari S., Thirugnanakumar S., Anandan A., Krishnamurthi M. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. *Euphytica.* 2009;168:71-80. doi 10.1007/s10681-009-9889-4
- Seema N., Khan I.A., Raza S., Yasmeen S., Bibi S., Nizamani G.S. Assessment of genetic variability in somaclonal variation in sugarcane. *Pak J Bot.* 2014;46:2107-2111
- Sengar A., Thind K., Kumar B., Pallavi M., Gosal S.S. *In vitro* selection at cellular level for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Growth Regul.* 2009;58:201-209. doi 10.1007/s10725-009-9368-x
- Shahid M.T., Khan F.A., Saeed A., Fareed I. Variability of red rot-resistant somaclones of sugarcane genotype S97US297 assessed by RAPD and SSR. *Genet Mol Res.* 2011;10:1831-1849. doi 10.4238/vol10-3gmrl122
- Shahid M.T.H., Khan F.A., Saeed A. Development of somaclones in sugarcane genotype BF-162 and assessment of variability by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeats (SSR) markers in selected red rot resistant somaclones. *Afr J Biotechnol.* 2012;11(15):3502-3513. doi 10.5897/AJB11.2729
- Sharma S., Bryan G., Winfield M., Millam S. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta.* 2007;226:1449-1458. doi 10.1007/s00425-007-0583-2
- Shen X., Chen J., Kane M., Henny R. Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007;91:21-27. doi 10.1007/s11240-007-9273-9
- Shomeili M., Nabipour M., Meskarbashe M., Memari H.R. Evaluation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) somaclonals tolerance to salinity via *in vitro* and *in vivo*. *HAYATI J Biosci.* 2011;18(2):91-96. doi 10.4308/hjb.18.2.91

- Singh G., Sandhu S., Meeta M., Singh K., Gill R., Gosal S.S. *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. *Euphytica*. 2008;160:35-47. doi 10.1007/s10681-007-9531-2
- Smiullah, Khan F.A., Abdullah, Afzal A., Javed M.A., Iqbal Z., Iftikhar R., Wattoo J.I. *In vitro* regeneration, detection of somaclonal variation and screening for mosaic virus in sugarcane (*Saccharum* spp.) somaclones. *Afr J Biotechnol*. 2012;11:10841-10850. doi 10.5897/AJB11.4073
- Sobhakumari V.P. Assessment of somaclonal variation in sugarcane. *Afr J Biotechnol*. 2012;11:15303-15309. doi 10.5897/AJB12.1627
- Sun S., Zhong J., Li S., Wang X. Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). *Bot Stud*. 2013;54:36. doi 10.1186/1999-3110-54-36
- Tawar P.N., Sushir K.V., Meti N.T. Somaclonal variation an aid for sugarcane improvement. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol*. 2016;3: 47-55.
- Thorat A.S., Sonone N.A., Choudhari V.V., Devarumath R.M., Babu K.H. Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*. 2017;7:16. doi 10.1007/s13205-016-0579-3
- Thorat A.S., Sonone N.A., Choudhari V.V., Devarumath R.M., Babu K.H. Plant regeneration from direct and indirect organogenesis and assessment of genetic fidelity in *Saccharum officinarum* using DNA-based markers. *Biosci Biotechnol Res Commun*. 2018;11: 60-69. doi 10.21786/bbrc/11.1/9
- Thumjamras S., Iamtham S., Lersrutaiyotin R., Prammanee S. Identification of sugarcane somaclones derived from callus culture by SSR and RAPD marker analysis. *Thai J Agric Sci*. 2011;44(5): 71-76
- Tican A., Câmpeanu G., Chiru N., Ivanovici D. Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. *Rom Biotechnol Lett*. 2008;13(4):3791-3798
- Wagih M.E., Ala A., Musa Y. Regeneration and evaluation of sugarcane somaclonal variants for drought tolerance. *Sugar Tech*. 2004;6: 35-40. doi 10.1007/BF02942615
- Warren G. The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In: Stafford A., Warren G. (Eds) *Plant Cell and Tissue Culture*. Milton Keynes: Open University Press, 1991;82-100
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. New York: CRC Press, 2005
- Yadav P.V., Suprasanna P., Gopalrao K.U., Anant B.V. Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerant regenerants of sugarcane. *Sugar Tech*. 2006;8:63-68. doi 10.1007/BF02943744
- Yasmeen S., Rajput M.A., Khan I.A., Hasseney S.S. Induced mutations and somaclonal variations in three sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties. *Pak J Bot*. 2017;49:955-964
- Zayova E., Vassilevska I.R., Kraptchev B., Stoeva D. Somaclonal variations through indirect organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biol Divers Conserv*. 2010;3:1-5

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

Received May 8, 2025. Revised September 21, 2025. Accepted February 16, 2026.

doi 10.18699/vjgb-26-43

Факторы морозоустойчивости пшеницы – белки-ингибиторы рекристаллизации льда

Н.Е. Коротаева ^{1, 2} , А.В. Федяева ², К.К. Мусинов ^{2, 3}, А.С. Сурначёв ^{2, 3}, Г.Б. Боровский ¹¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия³ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

 knev73@yandex.ru

Аннотация. Для озимой пшеницы зимостойкость – один из комплексных признаков, определяющих успешное возделывание этой культуры, а отвечающие за нее гены признаны высоко значимыми для селекционных работ. Накопление белков, препятствующих рекристаллизации льда (ice recrystallization inhibition proteins, IRIP), коррелирует с выживаемостью озимой пшеницы, что указывает на важность учета этого признака при получении более морозоустойчивых сортов. Значение IRIP для выживаемости определяется их способностью встраиваться в растущие кристаллы льда, что ограничивает формирование крупных ледяных конгломератов в тканях озимых растений. IRIP пшеницы, накапливающиеся преимущественно в апопласте листьев и узлов кущения в период холодовой акклимации, характеризуются типичной двойственной структурной организацией, определяющей как проявление IRI-активности, так и антипатогенные свойства. Молекула IRIP пшеницы содержит на С-конце консервативный, несколько раз повторяющийся фрагмент NxVx(x)G, формирующий ответственную за связывание с поверхностью льда β-спираль; на N-конце расположены типичная для активируемых патогенами киназ LRR-последовательность, а также направляющий сигнальный пептид. Геном пшеницы содержит до 11 *IRI*-генов. Промотор генов *TalRI* содержит типичные основные *cis*-активирующие элементы и некоторые элементы, реагирующие на абиотический стресс и гормоны. Изоформы ответственных за защиту от патогенов белков (pathogenesis related proteins, PRP), накапливающихся у озимой пшеницы в период холодовой акклимации, также обладают IRI-активностью. Экспрессия генов IRIP и PRP положительно коррелирует с холодоустойчивостью растений озимой пшеницы. Регуляция генов IRIP и генов PRP, активируемых холодом, согласно современным данным, АБК-независимая, но зависит от присутствия жасмоновой кислоты и от некоторых протеомных факторов транскрипции. В обзоре приведены примеры практического использования изолированных IRIP озимой пшеницы. Вопрос о факторах регуляции активности генов IRIP и активируемых холодом PRP является наименее разработанным на сегодняшний день. Связь этих белков с зимостойкостью пшеницы указывает на перспективность их дальнейшего изучения.

Ключевые слова: белки-ингибиторы рекристаллизации льда; *Triticum aestivum* L.; зимостойкость; регуляция активности генов

Для цитирования: Коротаева Н.Е., Федяева А.В., Мусинов К.К., Сурначёв А.С., Боровский Г.Б. Факторы морозоустойчивости пшеницы – белки-ингибиторы рекристаллизации льда. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):391-402. doi 10.18699/vjgb-26-43

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-24-00117 (<https://rscf.ru/project/25-24-00117/>).

Factors of wheat frost hardiness – ice recrystallization inhibitor proteins

N.E. Korotaeva ^{1, 2} , A.V. Fedyaeva ², K.K. Musinov ^{2, 3}, A.S. Surnachev ^{2, 3}, G.B. Borovskii ¹¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia³ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia knev73@yandex.ru

Abstract. For winter wheat, winter hardiness is one of the complex traits that determine the successful cultivation of this crop, and the responsible genes are recognized as highly significant for breeding work. The accumulation of proteins that prevent ice recrystallization (ice recrystallization inhibition proteins, IRIP) correlates with the survival of winter wheat, which indicates the importance of taking this trait into account when obtaining more frost-resistant varieties. The importance of IRIPs is determined by their ability to integrate into growing ice crystals, which limits the formation of large ice conglomerates in the tissues of winter plants. Wheat IRIPs, which accumulate mainly in the apoplast of leaves and in the crowns during cold acclimation, are characterized by a typical duality of structural

organization that determines both the manifestation of IRI activity and anti-pathogenic properties. The wheat IRIP molecule contains at the C-terminus a conserved NxVx(x)G fragment that repeats several times, forming a β -helix responsible for binding to the ice surface; at the N-terminus, there is an LRR sequence typical of pathogen-activated kinases, as well as a guiding signal peptide. The wheat genome contains up to eleven *IRI* genes. The *TaIRI* gene promoter contains typical basic *cis*-activating elements and some elements that respond to abiotic stress and hormones. Isoforms of proteins responsible for protecting against pathogens (pathogenesis related proteins, PRP), which accumulate in winter wheat during cold acclimation, also have IRI activity. The expression of the IRIP and PRP genes positively correlates with the cold resistance of winter wheat plants. According to modern data, the regulation of the IRIP genes and cold-activated PRP genes is ABA-independent, but depends on the presence of jasmonic acid and on some proteomic transcription factors. The review provides examples of the practical use of isolated winter wheat IRIPs. The issue of the factors regulating the activity of the IRIP genes and cold-activated PRPs is the least developed to date. The association of these proteins with the winter hardiness of wheat indicates the prospects for their further study.

Key words: ice recrystallization inhibition proteins; *Triticum aestivum* L.; winter hardiness; regulation of gene activity

For citation: Korotaeva N.E., Fedyaeva A.V., Musinov K.K., Surnachev A.S., Borovskii G.B. Factors of wheat frost hardiness – ice recrystallization inhibitor proteins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3): 391-402. doi 10.18699/vjgb-26-43

Введение

Озимая пшеница – хозяйственно важный злак, объект особого внимания селекционеров. Эту культуру выращивают по всему миру, в регионах, существенно различающихся по сочетаниям климатических условий, что требует большого разнообразия районированных высокоурожайных сортов. Наличие значительного набора исследованных признаков и определяющих их генов существенно расширяет возможности для районирования пшеницы и повышения ее урожайности в условиях конкретного региона.

Активный вегетативный рост, обеспечивающий высокую урожайность озимой пшеницы, зависит от уровня перезимовки озимых сельскохозяйственных злаков. Признаки, от которых зависит высокая выживаемость при прохождении зимне-весеннего периода, – особенно важные. Зимостойкость – это сложный комплексный признак, позволяющий бороться с несколькими внешними воздействиями, в том числе с промерзанием почвы (Ambroise et al., 2020).

Промерзание почвы, влекущее за собой образование льда в узлах кушения озимой пшеницы, – один из самых значимых повреждающих факторов, снижающих выживаемость и урожайность. Накопление антифризных белков защищает от промерзания узлы кушения и листовую часть растений и является одним из признаков, который свидетельствует о повышении ее морозоустойчивости. Результаты исследований антифризных белков злаковых растений ранее изложены в обзоре J.G. Duman и M.G. Wisniewski (2014). Известные нам статьи, как правило, посвящены холодоустойчивости либо антифризным белкам растений в целом. Имеющаяся к настоящему времени информация об этих белках у пшеницы остается разрозненной.

Целью настоящего обзора стало комплексное освещение имеющихся на сегодняшний день в литературе сведений об антифризных белках мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. В статье будет представлена общая характеристика этих белков, рассмотрена организация молекул на протеомном и геномном уровнях, приведены известные в настоящее время сведения о регуляции активности их генов и практическом применении антифризных белков *T. aestivum*.

Общая характеристика антифризных белков

Антифризные белки (antifreeze proteins, AFP) впервые описаны у антарктических рыб более 50 лет назад (DeVries, Wohlschlag, 1969). С тех пор знания об этих белках существенно расширены, были предложены и апробированы способы их практического применения (Voets, 2017; Liu et al., 2021). В литературных источниках встречается несколько вариантов названий этих белков: «структурирующие лед белки» (ice structuring proteins, ISP) (Kontogiorgos et al., 2007; Wang X. et al., 2024), «связывающиеся со льдом белки» (ice-binding proteins, IBPs) (Janech et al., 2006), «белки термогистерезиса» (thermal hysteresis protein, THP) (Ewart et al., 1999) или «белки-ингибиторы рекристаллизации льда» (ice recrystallization inhibition proteins, IRIP) (Knight et al., 1995). Часть AFP растений является гликозилированными белками, для них принято название «антифризные гликопротеины» (antifreeze glycoproteins, AFGPs) (Griffith et al., 1992). Для AFP пшеницы, гены которых аннотированы, в настоящее время принято название «IRI-белки» (IRI proteins, IRIP), которое в значительной степени соответствует форме активности (Wisniewski et al., 2020).

У растений AFP впервые описаны у паслена (Urrutia et al., 1992) и озимой ржи (Griffith et al., 1992). Позднее было установлено специфическое отличие антифризных белков растений от белков других живых организмов. Для растительных AFP характерна слабая способность к снижению температуры замерзания воды по сравнению с температурой ее плавления – свойство, называемое «термальный гистерезис». Лишь немногие виды растений проявляют термальный гистерезис, достигающий до +2 °C (Jarzabek et al., 2009; Bayer-Giraldi et al., 2011). Это свойство, напротив, очень ярко выражено у AFP животных (Kristiansen et al., 1999, 2011). Для листьев пшеницы термальный гистерезис при измерении в феврале составляет 0.2 °C (Duman, Olsen, 1993).

Рекристаллизация льда происходит на одном из этапов замерзания воды при медленном отводе скрытого тепла, образующегося в результате льдообразования (Пучков, 2017). Способность IRI-белков растений ингибировать рекристаллизацию льда заключается в связывании молекулы белка с поверхностью растущего кристалла льда

и встраивании в этот кристалл, что придает последнему форму шестигранного диска (при низком содержании IRIP в среде) или двусторонней призмы (при высоком содержании IRIP) (Griffith et al., 2005). Важно, что при этом не происходит образования крупных конгломератов льда (Yang et al., 2024), что могло бы повредить живым тканям.

Уровень IRI-активности зависит от количества IRIP в замораживаемом растворе (Regand, Goff, 2006). Способность IRIP растений ингибировать рекристаллизацию льда впервые была описана для ржи (Griffith et al., 1992), затем для других холодоустойчивых видов (Antikainen, Griffith, 1997). Оказалось, что это свойство характерно только для морозоустойчивых растений (Hon et al., 1995; Antikainen, Griffith, 1997).

Как зимующий холодостойкий вид, пшеница содержит гены *IRI*. Накопление IRIP для растений пшеницы особенно актуально поздней осенью и в начале зимнего периода, которым предшествует холодовая акклимация при низких плюсовых температурах. При температурах от -6 до -8 °C у акклиматизированных к холоду растений пшеницы происходит образование льда в межклеточном пространстве сосудистой зоны узла кушения, в который вода в большом количестве перемещается из зоны меристемы стебля. Такое перемещение воды делает зону меристемы более защищенной от повреждения образующимся льдом и предопределяет выживаемость после завершения зимнего периода (Willick et al., 2019). IRIP преимущественно накапливаются в сосудистой зоне узла кушения по сравнению с зоной стеблевой меристемы (Willick et al., 2018).

Важно отметить, что у растений пшеницы минимальная температура, при которой клетки меристемы остаются живыми после перезимовки, близка к показателю LT50 (lethal temperature 50 – температура, при которой наступает гибель 50 % растений исследуемой группы), в то время как накопление IRIP коррелирует с общей выживаемостью в зимних условиях (Chun et al., 1998). В весенний период гены *IRI* оказывают влияние на рост, колошение и начало цветения пшеницы, стимулируя активность генов, отвечающих за яровизацию (Cao et al., 2021).

Снежный покров создает благоприятные условия для поддержания жизни патогенных грибов (Gaudet, Laroche, 1997). В результате тканевых повреждений растущими внутри тканей конгломератами льда возникает высокая вероятность патогенного поражения растений озимой пшеницы в конце зимы после схода снежного покрова. В ответ на патогенное поражение растения синтезируют PR-белки (pathogenesis related proteins, PRP), которые высвобождаются в апопласт при инфицировании и ингибируют ферменты патогенных грибов либо ферментативно разрушают их клеточные стенки (Jain, Khurana, 2018).

Молекулы IRIP пшеницы имеют в своем составе распространенную среди PRP аминокислотную последовательность LRR (leucine-rich repeat) (Tremblay et al., 2005), определяющую PR-активность (Juurakko et al., 2022). Некоторые PRP пшеницы – β -1,3-глюканазы, хитиназы, тауматиноподобные белки, белок-ингибитор полигалактуроназы – обладают антифризной активностью (Hon et al., 1995; Kontogiorgos et al., 2007). В ответ на холод у пшени-

цы накапливаются специфические изоформы PR-белков, которые функционируют как IRIP и изменяют рост льда во время замораживания, а также обеспечивают устойчивость к патогенам еще до заражения (Griffith, Yaish, 2004).

IRIP пшеницы обнаружены в таких органах растений, как корни, стеблевая часть, листья и узлы кушения (Duman, Olsen, 1993; Willick et al., 2018, 2019; Jin et al., 2022; Vaitkevičiūtė et al., 2024). Первоначальная активация генов *TaIRI* после воздействия холодом происходит в листьях, а в последующем – в корнях и стеблях (Jin et al., 2022), что объясняется, по-видимому, первоочередной подверженностью листьев замораживанию из-за надземного положения. Так, транскрипт *TaIRI1* обнаружен в листьях, узле кушения и корнях, в то время как транскрипт *TaIRI2* – только в листьях (Tremblay et al., 2005).

В процессе акклиматизации к холоду у озимых злаков происходит значительное накопление IRIP во внеклеточном пространстве (Antikainen, Griffith, 1997). PRP, гены которых регулируются холодовой акклимацией/деакклимацией, и, вероятно, являющиеся IRIP, могут быть локализованы во внеклеточном пространстве, в плазматической мембране, ядре или цитоплазме (Vaitkevičiūtė et al., 2024).

Аминокислотная последовательность IRIP *T. aestivum*

Ранее было показано, что у выявленных зрелых IRIP *T. aestivum* TaIRI-1 и TaIRI-2 с массами 26.8 и 40.7 кД соответственно идентичность составляет 40.4 % (Tremblay et al., 2005). Основным консервативным фрагментом IRIP растений, в том числе пшеницы, признан фрагмент, расположенный на С-конце и состоящий из повторов $NxVxxG$ или $NxVxG$, где x – неконсервативный участок (Tremblay et al., 2005; Middleton et al., 2012; Jin et al., 2018). Несколько раз повторяющаяся консервативная аминокислотная последовательность С-конца образует бета-спираль, которая посредством двух сторон спирали позволяет IRIP связываться с поверхностями двух образующихся кристаллов льда (Middleton et al., 2009).

Есть предположение, что количество повторов этой консервативной последовательности возникло эволюционно в результате дупликаций в процессе приобретения растениями устойчивости к холоду, и увеличение их количества, вероятно, связано с ростом устойчивости к образованию льда (Sandve et al., 2008). Количество повторов консервативного С-концевого мотива может различаться. Так, у двух IRIP *T. aestivum*, TaIRI-1 и TaIRI-2, обнаружено соответственно 5 и 6 повторов консервативного С-концевого мотива (Tremblay et al., 2005). Позднее в другой работе в шести обнаруженных IRIP *T. aestivum* было выявлено от 9 до 13 повторов (Jin et al., 2018).

На N-концевом участке IRIP расположен фрагмент, богатый лейцином (leucine-rich repeat, LRR) (Jin et al., 2018). Аминокислотная последовательность LRR, которая широко встречается среди эу- и прокариотических организмов, определяет свойство белок-белковых и лиганд-связывающих взаимодействий и включена у растений в молекулы протеинов, синтезируемых в ответ на стресс, вызванный патогенными организмами (McHale et al., 2006). Домен

LRR белков *T. aestivum* TaIRI-1 и TaIRI-2 оказался гомологичен рецепторподобным киназам (Tremblay et al., 2005), задействованным в сигнальной цепочке реакции в ответ на появление молекул-элиситоров патогенных организмов (He, Wu, 2016).

Еще один участок молекул TaIRI оказался гомологичен рецепторной киназе пептидного фитогормона фитосульфокина (Tremblay et al., 2005), участвующего в дифференциации иммунного ответа растений в зависимости от вида патогена (Sauter, 2015). Как протеинкиназы с LRR последовательностью были аннотированы белки *T. aestivum*, кодируемые генами *Tr001_B19* и *Tr001_M19*, имеющими высокое сходство с последовательностями регулируемых холодом IRIP (Monroy et al., 2007). Хотя IRIP, в составе которых присутствует киназный домен, не проявляют протеинкиназной активности (Tremblay et al., 2005), перечисленные факты указывают на общность IRIP и PRP. На N-концевом участке IRIP *T. aestivum* также расположен сигнальный пептид, который направляет белки во внеклеточное пространство или к мембране (Tremblay et al., 2005).

Восемь IRIP пшеницы были распределены на группы в соответствии со сродством их аминокислотных последовательностей. Согласно филогенетическому анализу, аминокислоты, расположенные на C- или N-конце, определяют выделение части IRIP пшеницы в группу 2 (TaIRI-6, TaIRI-7 и TaIRI-8). В группу 1 вошли белки TaIRI-1, TaIRI-3, TaIRI-4 и TaIRI-5. Белок TaIRI-2, имеющий особый LRR-домен, принадлежит к группе 3 (Jin et al., 2018).

Организация генов IRIP *T. aestivum*

Семейство генов *IRI* у холодостойких трав подсемейства *Pooideae* стало формироваться и приобретать специфические черты около 75 млн лет назад после обособления подсемейства в отдельный таксон (Sandve et al., 2008). Согласно преобладающей гипотезе об эволюции *LRR-IRI*-подобных генов, самый поздний общий предок генов *IRI* у *Pooideae* – *OsLRR-PSR*-подобный ген, обнаруженный у риса. Этот ген содержал на 5'-конце LRR-последовательность, характерную для рецепторной киназы фитосульфокина; отмечается, что данная последовательность присутствует в генах *TaIRI* (Houde et al., 2006). Предположительно, IRI-кодирующий фрагмент в составе генов *TaIRI* появился в результате инсерционной вставки (Tremblay et al., 2005). Основное расширение группы генов *IRI* у *Pooideae* произошло около 36 млн лет назад в результате дупликаций специфического *IRI*-участка генов (Sandve et al., 2008). В разных исследованиях у *T. aestivum* обнаружено два (Tremblay et al., 2005), шесть (Jin et al., 2018) или одиннадцать (Sandve et al., 2008) *IRI*-генов, имеющих в составе LRR- и IRI-кодирующие фрагменты. Идентичность генов *TaIRI1* и *TaIRI2* составляет 74.7 и 54.1 % с 5'- и 3'-концов соответственно (Tremblay 2005).

За отдельными исключениями, у однодольных растений распределение генов *IRI* по группам по сходству геномных последовательностей происходит аналогично родовой принадлежности и филогенетическим связям таксонов. Следует отметить, что гены *IRI* у *Triticum* по

своей организации имеют тесную связь с генами *IRI* растений рода *Aegilops*, которые являются прародителями аллогексаплоидной пшеницы. Различия в характерных областях последовательностей генов *TaIRI* (*T. aestivum*) были обнаружены с *TdiIRI1* (*T. dicoccoides*), *TmIRI1* (*T. monoccum*) и *TuIRI1* (*T. urartu*), однако не найдено таких различий с *TdIRI1* (*T. durum*) (Jin et al., 2018).

Восемь последовательностей генов *TaIRI* распределяются на четыре группы: по одному гену в группах III и IV (*TaIRI6* и *TaIRI2* соответственно), четыре гена в группе I (*TaIRI1*, *TaIRI3*, *TaIRI4* и *TaIRI5*) и два гена в группе II (*TaIRI7* и *TaIRI8*) (Sandve et al., 2008; Jin et al., 2018).

Промоторы генов *TaIRI* содержат типичные основные *cis*-активирующие элементы и реагирующие на абиотический стресс и гормоны элементы. Три из них отвечают за реакцию на стресс при низкой температуре и засухе (MYB, Mybb и MYC), один – за реакцию на стресс при низкой температуре (LTR). Два элемента участвуют в реакции на действие метилжасмоната (CGTCA- и TGACG-мотив), четыре отвечают за чувствительность к свету (G-Box, 4cl-CMA2b, ATC-мотив и TCT-мотив), один – за чувствительность к абсцизовой кислоте (ABRE). Также промоторы содержат участки ARE, CAT-box, O2-сайт и TC-богатые повторы (Jin et al., 2022).

Картирование генов IRIP и активируемых холодом PRP *T. aestivum*

К настоящему времени получено достаточно много сведений о хромосомной локализации признаков, связанных с морозоустойчивостью пшеницы. Важные для морозоустойчивости пшеницы признаки размещены в QTL-областях (quantitative trait loci – локусы количественных признаков) хромосом 1D, 2A, 2B, 6D и 7B (Båga et al., 2007); 5B и 5D (Chun et al., 1998), 5A, 2D, 2A и 4B (Case et al., 2014); 5A и 4B (Kruse et al., 2017); хромосомах группы 5, 2B и 4B (Sutka, 1994, 2001). Гены *Fr1* и *Fr2* (Frost Resistance), контролирующие морозоустойчивость, были картированы на хромосомах 5A и 5D соответственно (Sutka et al., 1997). Замены хромосом 4A, 6A, 3B, 5D и 3D у неустойчивого к промораживанию сорта Chinese Spring на хромосомы сорта Cheyenne приводили к усиленной аккумуляции белков в апопласте, а замены хромосом 1A, 5A, 4B, 5B, 6B, 1D и 5D – к усилению антифризной активности.

Основные регуляторные гены, повышающие как антифризную активность, так и накопление белков в апопласте клеток листа, содержались в хромосомах 5B и 5D (Chun et al., 1998); в этих же хромосомах, полученных из листьев закаленной к холоду *T. aestivum* сорта Zhoulai, были картированы два гена *TaIRI* (Zheng et al., 2020). Гены *Tr015_M14* и *Tr017_M15*, кодирующие IRIP, у сорта пшеницы Chinese Spring оказались размещены в локусе 4A, при этом для анализа использовали части растений пшеницы, включающих как узел кущения, так и листья (Monroy et al., 2007), хотя на этапе промораживания основное содержание IRIP растений пшеницы приходится на сосудистую зону узла кущения, а меристематическая зона и листья демонстрируют свои специфические особенности ответа на промораживание (Willick et al., 2018).

Поскольку IRIP содержат фрагмент, родственный PRP, обоснованно искать локусы одновременного контроля признаков ответа на холод и на патогенное поражение. QTL-области *T. aestivum*, связанные с устойчивостью к обоим признакам, были идентифицированы на хромосоме 5A и тесно связаны с локусом *Fr2*. Отдельные QTL, относящиеся к устойчивости к промораживанию, обнаружены на хромосомах 5A и 4B; QTL, связанный с устойчивостью к снежной плесени, был идентифицирован на хромосоме 6B (Kruse et al., 2017). Накопление β -1,3-глюканаз, хитиназ, тауматиноподобных белков в условиях промораживания было понижено в растениях с заменами хромосом 2A, 3A, 6B и 7A. Замена хромосомы 7A приводила к значительному удлинению периода промораживания, по истечении которого происходит активация генов PRP (Chun et al., 1998).

Судя по приведенным фактам, у пшеницы состав QTL-областей, ответственных за морозоустойчивость и антифризную активность, отличается для разных сортов. Кроме того, имеет значение, какую часть растения использовали при картировании. Таким образом, анализ организации генома растений пшеницы при исследовании белков с IRI-активностью требуется проводить с учетом этих особенностей.

Влияние низких температур на активность генов IRIP *T. aestivum*

К настоящему времени накоплено достаточно доказательств того, что экспрессия генов антифризных белков *T. aestivum* вызывается охлаждением (см. таблицу) и связана с холодо- и морозоустойчивостью растений этого вида.

Экспрессия четырех генов, *TaIRI*, *TaIRI16*, *TaIRI17*, *TaIRI18*, в тканях стеблей, листьев и корней молодых растений *T. aestivum* индуцировалась холодом (+4 °C, от 2 до 72 ч); среди них индукция гена *TaIRI16* оказалась наиболее существенной (Jin et al., 2018, 2022). Транскрипт *TaIRI1* у мягкой пшеницы начинает накапливаться после воздействия пониженной температуры (+4 °C) и достигает своего максимального уровня после 36 дней акклимации. Дальнейшее воздействие низкой температуры не приводит к более высокому содержанию данного транскрипта. Транскрипт *TaIRI2* также накапливается сразу после начала закаливания, однако его количество достигает максимального значения раньше в период акклимации. После деакклимации уровень транскриптов возвращается к таковому у неакклиматизированных растений (Tremblay et al., 2005).

При действии закаливания в течение 1–6 суток на проростки пшеницы сортов Jagger и Alabaskaya было выявлено увеличение количества транскриптов генов *Tr001_B19* (GB ID CK197231) и *Tr001_M19* (GB ID CK201227), которые имеют высокое сходство последовательностей с последовательностями IRIP, регулируемых холодом (Monroy et al., 2007). Активность генов *TaIRI*, родственных генам, кодирующим IRIP *Lolium perenne*, усиливается более чем в два раза после помещения закаленных растений *T. aestivum* в условия с отрицательной температурой (Herman et al., 2006). Активность гена-предшественника антифриз-

ного белка I (represent sequence ID CK197682) возрастает более чем в 8 раз уже через сутки после начала промораживания молодых растений пшеницы при –5 °C и еще большего значения достигает на третьи сутки промораживания (Kang et al., 2013).

Количество транскриптов *TaIRI-1* и *TaIRI-2* существенно возрастает в результате как постепенного, так и резкого снижения температуры. Их индукция наступает позже, чем индукция генов, кодирующих PRP. Наибольшее накопление происходит в листьях, особенно в случае транскрипта *TaIRI-2* (Winfield et al., 2010).

Значительная часть доказательств участия IRIP в формировании холодо- и морозоустойчивости получена с использованием сортов пшеницы, различающихся по устойчивости к холоду. Усиленную экспрессию *TaIRI-1* и *TaIRI-2* в ответ на понижение температуры наблюдали у озимых сортов пшениц по сравнению с яровыми (Winfield et al., 2010). При всех исследованных режимах охлаждения активность генов *TaIRI* оказалась выше у растений более устойчивого сорта Мироновская 808 (Jin et al., 2022). После первых 6 ч закаливания количество транскриптов генов *Tr015_M14* и *Tr017_M15*, кодирующих антифризные белки, у озимого сорта CDC Clair (LT50 –17 °C) было меньше, чем у ярового сорта Quantum (LT50 –8 °C). Однако начиная с 1 сут закаливания активность этих генов у озимого сорта стала превышать активность у ярового сорта, причем разница для гена *Tr017_M15* оказалась почти втроекратной. Экспрессия гена *Tr015_J17*, аннотированного как IRIP-кодирующий, через сутки закаливания при +4 °C была в 2 раза больше у проростков озимого сорта по сравнению с яровым, и эта разница возрастала при увеличении времени закаливания до 14 сут. Количество транскриптов гена *Tr001_B19* у озимого сорта CDC Clair превышало количество транскриптов этого гена у ярового сорта Quantum на всех этапах закаливания (от 6 ч до 14 сут) (Monroy et al., 2007).

Ряд доказательств значения IRIP для холодоустойчивости растений *T. aestivum* был получен с использованием переноса генов. Экспрессия в табаке генов *TaIRI4* и *TaIRI6*, обнаруженных у зимостойкого сорта Мироновская 808, при действии промораживания способствовала снижению проницаемости мембран (при трансформации *TaIRI4*) и снижению активности окисления липидов (при трансформации *TaIRI4* и *TaIRI6*) трансгенных растений (Jin et al., 2018).

Описанные исследования достаточно убедительно доказывают, что экспрессия генов IRIP *T. aestivum* активируется отрицательными и низкими положительными температурами у растений этого вида и вносит вклад в формирование морозоустойчивости.

Регуляция активности генов PRP *T. aestivum* низкими температурами

Ряд генов, кодирующих PRP пшеницы, начинает экспрессию при действии низких температур (см. таблицу). Предположительно, именно такие гены кодируют изоформы PRP с IRI-активностью. М. Houde с коллегами (2006) получили высококачественные EST (expressed sequence tags –

IRIP- и PR-кодирующие гены, активность которых возрастает в результате холодового воздействия

Ген	Условия	Этап развития или часть растения	Литературный источник
IRIP			
<i>TaIRI4</i> , <i>TaIRI16</i> , <i>TaIRI17</i> , <i>TaIRI1</i>	+4 °C, 2–72 ч	Стебли, листья, корни	Jin et al., 2018, 2022
<i>TaIRI-1</i>	+4 °C, 36 сут	Листья, корни, узлы кушения	Tremblay et al., 2005
<i>TaIRI-2</i>	+4 °C, 6 сут	Листья	
<i>Tr001_B19</i> (GB ID K197231); <i>Tr001_M19</i> (GB ID K201227); <i>Tr015_M14</i> (GB ID Y742123); <i>Tr017_M15</i> (GB ID Y742648)	+4 °C, 1–14 сут	Проростки	Monroy et al., 2007
<i>Tr015_J17</i>	+4 °C, 1–6 сут	Проростки	
<i>Contig3670_at</i> ; <i>Contig3668_at</i> ; <i>Contig7221_s_at</i>	+3 °C, 3 нед. → –3 °C, 6 ч–3 сут	–	Herman et al., 2006
<i>Ta.12663.1.S1_at</i> (CK197682)	–5 °C, 1–3 сут	Листья	Kang et al., 2013
<i>TaIRI-1</i> ; <i>TaIRI-2</i>	«Шок» (снижение температуры с +16 до +4 °C в течение 2 сут); «акклиматизация» (снижение температуры с +16 до +4 °C в течение 5–9 нед.)	Листья	Winfield et al., 2010
<i>TaIRI-1</i>	+3 °C, 3 нед.	Листья	Livingston et al., 2021
PRP			
Pathogenesis-related protein 1-21 (TraesCS7B03G0275300)	+2 °C, 7 нед. → +10 °C, 24 ч–1 нед. → + 2 °C, 24 ч–2 нед.	Узлы кушения	Vaitkevičiūtė et al., 2024
PRP – хитиназы			
<i>CL386Contig5*</i> <i>CL386Contig1*</i> <i>CL1911Contig1*</i> <i>CL40Contig11*</i> <i>CL40Contig9*</i> <i>CL754Contig1*</i>	+4 °C, 14 сут	–	Houde et al., 2006
<i>JCS5845</i>	+3 °C, 3 нед. → –3 °C, 6 ч–3 сут	–	Herman et al., 2006
Хитиназа (ID AB029936.1)	–5 °C, 1–3 сут	Листья	Kang et al., 2013
Хитиназа (класс II)	+2 °C, 1–28 сут	Узлы кушения	Gaudet et al., 2000
<i>TaCHT-1</i>	+3 °C, 3 нед.	Листья	Livingston et al., 2021
Хитиназа EC 3.2.1.14 (TraesCS1B03G0732400) (TraesCS3A03G0663800) (TraesCS4D03G0756500)	+2 °C, 7 нед. → +10 °C, 24 ч–1 нед. → + 2 °C, 24 ч–2 нед.	Узлы кушения Листья	Vaitkevičiūtė et al., 2024
PRP – тауматин-подобные белки			
TraesCS5B03G1182300 TraesCS2A03G0227600 TraesCS4A03G0142000 TraesCS4A03G0750400 TraesCS4A03G1252200 TraesCS4D03G0549700 TraesCS5A03G0810000 TraesCS5A03G0043700 TraesCS7B03G1303000 TraesCS7B03G1122500 TraesCS5B03G0034800 TraesCS7A03G1360800 TraesCS6B03G1288000	+2 °C, 7 нед. → +10 °C, 24 ч–1 нед. → + 2 °C, 24 ч–2 нед.	Узлы кушения Листья	Vaitkevičiūtė et al., 2024
PRP – глюканазы			
<i>TaGLB2b</i>	+16 → +4 °C в течение 5–9 нед.	Листья	Winfield et al., 2010
β-1,3-глюканаза	+2 °C, 1–28 сут	Узлы кушения	Gaudet et al., 2000

* При идентификации гомологов по базе данных Arabidopsis TAIR (Hannah et al., 2005).
GB ID – GenBank Identification Description.

экспрессируемые метки последовательностей) из библиотек кДНК пшеницы, связанных с холодовым стрессом. Был получен набор из 75488 уникальных последовательностей (31 580 контигов и 43 908 синглетов), обогащенный генами, регулируемые стрессом. Среди них оказались EST, которые содержат контиги, кодирующие хитиназы, β -1,3-глюканазу и тауматиноподобные белки. Пятнадцать последовательностей из них были аннотированы как предшественники или собственно хитиназы, шесть из них активировались холодом. Количество транскриптов гена *TaGLB2b*, кодирующего глюканазу, значительно возрастает только в результате постепенного снижения температуры; при шоковом снижении температуры количество данных транскриптов не увеличивается. Их индукция наступает раньше, чем у генов *TaIRI*, и происходит между третьей и пятой неделями после начала охлаждения (Winfield et al., 2010).

Активность гена *JC5845*, кодирующего хитиназу, усиливается более чем в 2 раза после помещения закаленных растений *T. aestivum* в условия с отрицательной температурой (Herman et al., 2006). Ген, кодирующий хитиназу 3 (represent sequence ID AB029936.1), оказался одним из генов, активность которых возросла более чем в 8 раз в ответ на промораживание молодых растений пшеницы при -5°C . Уровень его активности существенно возрастал в зависимости от дозы воздействия, поскольку при измерении уровня экспрессии на 1-е и 3-и сутки промораживания разница в уровне экспрессии была почти в 20 раз (Kang et al., 2013).

Зафиксированы различия в уровне экспрессии генов PRP при действии охлаждения на растения сортов, различающихся по PR- и морозоустойчивости. При изучении активности геномов ярового и озимого сортов пшеницы в ответ на холодовое закаливание ($+4^{\circ}\text{C}$, продолжительность от 6 ч до 14 суток) не обнаружено существенных различий в активности генов, кодирующих тауматин или хитиназу. Но рост количества транскриптов гена *Tr017_C17*, кодирующего предшественник хитиназы II, в ответной реакции на закаливание оказался выше у озимого сорта (Monroy et al., 2007).

Ряд генов хитиназы и β -1,3-глюканазы регулируется осенней холодовой акклимацией: их экспрессия происходит поздней осенью, достигает высоких уровней к середине зимы, затем снижается и доходит до максимальных значений весной. При действии холодового закаливания транскрипты гена β -1,3-глюканазы слабо экспрессируются при кратковременном воздействии, при более длительном воздействии их экспрессия существенно усиливается и остается на том же уровне после возвращения условий к контрольным. Ген, кодирующий хитиназу, начинает активно экспрессироваться сразу после начала охлаждения, уровень его экспрессии снижается после возвращения условий к контрольным. Различия в уровне экспрессии этих генов у устойчивого и менее устойчивого к поражению снежной плесенью сортов начинали проявляться в условиях осенней холодовой акклимации; уровень экспрессии был выше у сорта, более устойчивого к поражению (Gaudet et al., 2000).

D.P. Livingston с коллегами обнаружили, что холодовое закаливание молодых растений пшеницы способствует усилению экспрессии генов, кодирующих хитиназу-1 (*TaCHT-1*) и IRIP. Однако связь между температурой заморозания листьев, полученных от предварительно закаленных растений, и уровнем экспрессии этих генов оказалась отрицательной: их экспрессия была ниже в листьях, заморозавших при более низкой температуре (Livingston et al., 2021).

Известно, что антифризные белки растений понижают температуру заморозания лишь на долю градуса (Tremblay et al., 2005), поэтому отсутствие прямой положительной связи между уровнем экспрессии генов *TaIRI-1* и *TaCHT-1* и температурой заморозания листьев выглядит объяснимым. Уровни экспрессии генов *TaIRI-1* и *TaCHT-1* положительно коррелируют с численностью и сложностью бактериальных и грибковых сообществ, что объясняется, по-видимому, структурной близостью антифризных белков с белками ответа на патогенное заражение и сходными с последними функциями.

Перечисленные факты указывают на существование дифференциальной экспрессии генов PRP, регулирующей их активность в зависимости от холодоустойчивости сорта пшеницы, продолжительности воздействия, его направления, которая имеет также органоспецифические особенности.

G. Vaitkevičiūtė с коллегами (2024) исследовали влияние холодовой деакклимации и повторной акклиматизации к холоду на активность генома у устойчивого/чувствительного к промораживанию сортов *T. aestivum*. Показано, что значительное число генов, связанных с ответом на патогенное поражение, реагировало как на раззакаливание, так и на повторную холодовую обработку, при этом на активность генов влияла продолжительность обработок. Так, и при кратковременном, и при длительном раззакаливании узлов кущения произошло снижение активности гена тауматин-подобного белка, тогда как при более длительной обработке также снизилась активность генов, кодирующих фермент хитиназу.

В ходе повторного закаливания наблюдалась дифференциальная экспрессия генов, кодирующих PRP с идентичной активностью. Так, среди генов, кодирующих в узлах кущения хитиназу, при повторном закаливании часть генов снижала активность, тогда как активность других генов возрастала. Для генов тауматин-подобного белка при повторном закаливании узлов кущения была показана дифференциальная активность в зависимости не только от направления изменения их активности, но и от продолжительности этой обработки.

Гораздо большее разнообразие генов, кодирующих тауматин-подобные белки и хитиназы, в листьях *T. aestivum*, по сравнению с узлами кущения, отвечало дифференциальной экспрессией на раззакаливание и повторное закаливание в зависимости от продолжительности этих воздействий. В узлах кущения устойчивого сорта Lakaja DS активность генов, связанных с ответом на заражение, меньше регулировалась флуктуациями температур по сравнению с менее устойчивым сортом KWS Ferrum. В ли-

стях у более устойчивого сорта, напротив, регуляции под действием температурных флуктуаций подвергалось большее количество генов по сравнению с неустойчивым сортом, причем значительным числом из них были гены тауматин-подобных белков (Vaitkevičiūtė et al., 2024). Исследование раскрывает связь холодостойкости пшеницы с транскрипцией генов PRP, которые, предположительно, обладают IRI-активностью.

Таким образом, можно заключить, что гены пшеницы, кодирующие PRP, активируются холодом и повторной холодовой акклимацией и вносят вклад в усиление холодо- и морозоустойчивости. При этом гены, относящиеся к одной и той же подгруппе PRP (хитиназы, тауматин-подобные белки), регулируются дифференцированно, и не все из них активируются охлаждением.

Пути регуляции экспрессии генов IRIP и активируемых холодом PRP *T. aestivum*

Показано, что IRI-гены пшеницы начинают экспрессироваться при понижении температуры. Активность генов растений, отвечающих за устойчивость к охлаждению, регулируется АБК-зависимым и АБК-независимым путями. Из АБК-независимых регуляторных путей основным является сигнальная цепь ICE-CBF-COR: регулируемые холодом гены (COLD Related, COR) активируются связывающимся с С-повтором фактором транскрипции (C-repeat binding factor, CBF), активность последнего контролируется собственным индуктором (inducer of CBF expression, ICE) (Chinnusamy et al., 2003). Роль данного пути в активизации генов адаптации к холоду у *T. aestivum* общепризнана, однако регуляция IRI-генов группой транскрипционных факторов ICE-CBF-COR не доказана, хотя ICE *T. aestivum* связываются с MYC-элементами (Badawi et al., 2008), присутствующими в промоторах *TaIRI* (Jin et al., 2022). Мы обнаружили одно исследование, указывающее на существование связи пути ICE-CBF-COR с IRI у *T. aestivum* (Tchagang et al., 2017).

Другой известный путь регуляции адаптационных изменений в ответ на холод является АБК-зависимым (Хуе-Хуан et al., 2010). Несмотря на то что известна важная роль АБК в формировании устойчивости *T. aestivum* к холоду и заморозкам (Zheng et al., 2020), часть факторов, ответственных за холодо- и морозоустойчивость, активируется независимо от АБК (Wang W. et al., 2017). Участие АБК в активации генов *TaIRI* и PRP также не доказано, хотя промоторы генов *TaIRI* содержат элементы, отвечающие за чувствительность к абсцизовой кислоте (Jin et al., 2022). Активации генов *TaIRI1* и *TaIRI2* после опрыскивания 6-суточных проростков *T. aestivum* абсцизовой кислотой не обнаружено (Tremblay et al., 2005).

Рост содержания АБК в листьях и узлах кущения *T. monosocum* происходит на первом этапе нелетального холодового воздействия; с начала третьего дня воздействия наступает этап адаптации, при этом снижение содержания АБК совпало с ростом содержания салициловой кислоты. Таким образом, возможно, что в холодный период влияние АБК на экспрессию генов *TaIRI* и активируемых холодом PRP ограничивается продолжительностью воздействия и АБК не включается в адаптационный ответ на поздних

фазах, когда возникает необходимость в накоплении IRIP, при этом роль управления адаптивными изменениями переходит к другим факторам (Vanková et al., 2014).

IRIP пшеницы структурно близки к PRP, а ее PRP (β -1,3-глюканазы, тауматин, хитиназы) дополнительно обладают свойствами антифризных белков. Обоснованным кажется предположение, что факторами транскрипции генов группы растительных антифризных белков могут быть PR-связанные факторы, в частности группа факторов транскрипции WRKY (Pandey, Somssich, 2009). Ряд фактов косвенно указывает на такую возможность. Например, с экспрессией генов WRKY связано повышение устойчивости растений пшеницы на начальном этапе холодового закаливания (Talanova et al., 2008; Winfield et al., 2010); ряд генов WRKY активируется в ответ на охлаждение только у озимой пшеницы (Winfield et al., 2010); рост активности генов WRKY происходит при отрицательных температурах и зависит от продолжительности воздействия (Herman et al., 2006). Дополнительно некоторые гены, кодирующие глюканазы, хитиназы и тауматиноподобные белки пшеницы, регулируются совместно с генами, кодирующими факторы транскрипции WRKY (Winfield et al., 2010); ген *TaWRKY1* активируется как атакой патогена, так и охлаждением (Wang W. et al., 2017), а некоторые WRKY сами проявляют свойства IRIP (Huang, Duman, 2002).

Обнаружено, что в регуляции генов антифризных белков участвуют фитогормоны, активирующие ответ на действие патогенов – этилена, жасмоновой и салициловой кислот. Эти фитогормоны также задействованы в регуляции активности IRI-генов пшеницы (Tremblay et al., 2005), хотя их роль в формировании холодо- и морозоустойчивости пшеницы не всегда подтверждается однозначно (Kurepin et al., 2013), а для этилена было показано, что с устойчивостью пшеницы к холоду он не связан (Macháčková et al., 1989).

Экспрессия генов *TaIRI17*, *TaIRI18* и в особенности *TaIRI16* в тканях стеблей, листьев и корней молодых растений *T. aestivum* усиливалась в побегах, корнях и листьях молодых растений пшеницы при экзогенной обработке метилжасмонатом одновременно с охлаждением (+4 °C, 24 ч) (Jin et al., 2022). На активность промоторов генов *TaIRI* также оказывал стимулирующее влияние экзогенный метилжасмонат (Jin et al., 2022). В то же время жасмоновая кислота по-разному влияла на экспрессию генов *TaIRI1* и *TaIRI2* у 6-суточных проростков морозоустойчивого сорта *T. aestivum*: опрыскивание раствором жасмоновой кислоты приводило к индукции экспрессии гена *TaIRI1*, но не *TaIRI2* (Tremblay et al., 2005). Анализ активности мотивов промоторов генов *TaIRI* в табаке и оценка их экспрессии в *A. thaliana* после соответствующих трансформаций показали, что мотивы MYB, Mybb, MYC, CGTCA и TGACG из промотора *TaIRI1* обладали значительной активностью и индуцировались обработкой холодом и метилжасмонатом (Jin et al., 2022).

Роль салициловой кислоты в регуляции генов антифризных белков в настоящее время не подтверждена однозначно. Не выявлено активации генов *TaIRI1* и *TaIRI2* после опрыскивания 6-суточных проростков морозоустойчивого сорта *T. aestivum* салициловой кислотой (Tremblay et al., 2005). Обработка молодых растений пшеницы

сорта Yangmai 16 раствором, содержащим салициловую кислоту, с последующим 6-суточным промораживанием в полевых условиях при средней температуре +5.3 °C и минимальной температуре, достигавшей –7 °C, не привела к росту экспрессии гена *IRI2* (AY968589) по сравнению с такой обработкой в условиях контрольной температуры (среднее значение +12 °C) (Wang W. et al., 2021). При этом промораживание в отсутствие орошения раствором салициловой кислоты приводило к двукратному росту уровня экспрессии этого гена по сравнению с контрольными условиями. Как отмечают авторы исследования, предыдущие эксперименты продемонстрировали, что предварительная обработка салициловой кислотой может повышать уровень экспрессии гена *TaIRI2* в течение 48-часовой низкотемпературной обработки (Wang W. et al., 2020). Таким образом, вероятно, что регуляция салициловой кислотой экспрессии гена *TaIRI2* зависела от продолжительности воздействия, но это предположение требует дополнительных исследований.

Этилен участвует в регуляции антифризной активности у озимой ржи в ответ на холод и засуху, при этом в апопласте листьев озимой ржи происходит накопление β-1,3-глюканаз, хитиназ и тауматин-подобных белков (Yu et al., 2001). У *T. aestivum* опрыскивание 6-суточных проростков морозоустойчивого сорта раствором этилена приводило к дифференциальной регуляции генов *TaIRI1* и *TaIRI2*: этилен индуцировал экспрессию гена *TaIRI1*, но не *TaIRI2* (Tremblay et al., 2005). Однако связь этилена с формированием холодоустойчивости пшеницы оказалась отрицательной (Macháčková et al., 1989).

В целом сведений об участии факторов транскрипции в регуляции экспрессии генов антифризных белков пока немного, а информация об участии фитогормонов в их регуляции достаточно противоречива. По-видимому, для регуляции фитогормонами большое значение имеют продолжительность, интенсивность и этап холодового воздействия. Также остается неясным, почему исследованные фитогормоны, несмотря на способность активировать гены *TaIRI*, не усиливают устойчивость растений пшеницы к холоду. Эта сторона реализации антифризной активности нуждается в дополнительных исследованиях.

Практическое применение IRIP и активируемых холодом PRP *T. aestivum*

Использование растительных AFP ограничено их сниженной способностью к развитию термального гистерезиса по сравнению с AFP животных и обосновано в большей степени их IRI-активностью. Важным направлением практического применения AFP могло бы быть получение более морозоустойчивых растений и сортов. Хотя в исследовательских работах перенос генов антифризных белков пшеницы приводил к обнадеживающим результатам (Jin et al., 2022), такое применение знаний об IRIP пшеницы на практике пока ограничено.

Основные направления практического применения растительных AFP на сегодняшний день – это криоконсервация в медицине и пищевой промышленности. AFP природного происхождения менее токсичны, чем используемый в

настоящее время диметилсульфоксид (Chow-Shi-Yée et al., 2020), что делает их весьма перспективными криоконсервантами. Неочищенный экстракт из проростков пшеницы защищает гепатоциты крыс во время криоконсервации. Улучшить эффект удалось после дополнительной очистки экстракта или при применении рекомбинантного белка TaIRI-2, что обеспечило более длительное хранение гепатоцитов и восстановление большого количества здоровых клеток после размораживания с сохранением их активности (Grondin et al., 2009).

При использовании рекомбинантного белка TaIRI-2 для криоконсервации секретирующих инсулин клеток INS832/13 оказалось, что TaIRI-2 способен проникать внутрь этих клеток, а также внутрь гепатоцитов, что, по-видимому, существенно улучшает сохранность клеток после размораживания и снижает вероятность их гибели (Chow-Shi-Yée et al., 2016). Важно учитывать, что использование криоконсерваторов растительного происхождения может обладать иммуногенностью, индуцирующей нежелательные иммунные и аллергические реакции, это является существенным ограничением в их использовании для медицинской криоконсервации (Костяев и др., 2016).

В пищевой промышленности природные AFP широко применяются при производстве мороженого, для чего было получено несколько патентов, в том числе патент на использование AFP озимой ржи (Boonsupthip, Lee, 2003). AFP, содержащиеся в экстракте акклиматизированной к холоду пшеницы, существенно улучшали текстуру мороженого, шоковое замораживание не повлияло на это свойство (Regand, Goff, 2006). Добавление к хлебному тесту AFP, экстрагированных из муки озимой пшеницы с повышенной морозоустойчивостью, снижает текучесть воды и ее миграцию в тесте во время цикла замораживания-размораживания, что позволяет сохранить внутреннюю структуру и клейковинную сетку теста, повышает вязкость и эластичность и улучшает текстурные свойства теста (Wang X. et al., 2024).

Прямое применение сырого растительного экстракта в пищевой промышленности предпочтительнее использования чистого вещества из-за трудоемкости получения последнего и его низкого выхода, но использование концентрированного экстракта проблематично из-за наличия ферментов, активность которых может ухудшать вкусовые или текстурные качества продукта. Избавление экстракта от нежелательной ферментативной активности происходит путем нагревания, таким образом, термоустойчивость должна быть обязательным свойством природных AFP, используемых в пищевой промышленности. Перспективный с этой точки зрения термостабильный тауматин-подобный AFP обнаружен в составе экстракта из апопласта листьев акклиматизированной к холоду *T. aestivum* (Kontogiorgos et al., 2007).

Заключение

Связь экспрессии генов антифризных белков (с последующим накоплением соответствующих продуктов) с усилением морозоустойчивости озимой пшеницы показана достаточно убедительно в ряде модельных экспериментов.

Выявлено, что накопление апопластных и антифризных белков коррелирует с выживаемостью растений озимой пшеницы в полевых условиях (Chun et al., 1998). Однако остается неизвестным, насколько велико значение антифризной активности для выживаемости растений озимой пшеницы по сравнению с другими известными факторами (например, накоплением свободного пролина и олигосахаридов, глубиной залегания узла кущения). Следовательно, пока неясны обоснования для включения признака накопления антифризных белков в направленные селекционные мероприятия. АФР пшеницы проявляют двойную активность (антифризную и антипатогенную), такая активность, с одной стороны, затрудняет описание вклада антифризных белков в выживаемость пшеницы, с другой – делает наличие признака накопления антифризного белка особенно ценным, поскольку он определяет присутствие удвоенного числа факторов устойчивости и урожайности.

В преобладающем большинстве модельных экспериментов оценивали влияние на экспрессию генов IRIP и активируемых холодом PRP низких положительных температур; единичные исследования выявляли влияние отрицательной температуры (Herman et al., 2006; Kang et al., 2013; Willick et al., 2018). Таким образом, исследователи могут сделать вывод о связи экспрессии соответствующих генов только с холодоустойчивостью пшеницы. Но необходимость в этих белках возникает именно при наступлении отрицательных температур. Имитация полевых условий с отрицательными температурами в модельных экспериментах могла бы не только значительно углубить знания об экспрессии генов IRIP и PRP, но и приблизить к пониманию того, каким образом реализуются их функции в действительности.

Важной задачей остается выяснение механизмов регуляции активности генов антифризных белков, поскольку в общем и целом картина их регуляции неясна, особенно это касается белковых факторов экспрессии генов. Неизвестны в точности закономерности гормональной регуляции АФР пшеницы. Весьма вероятно, что двойственная природа растительных АФР определила существование регуляторной системы управления генами АФР, когда в ней могут быть задействованы сигнальные пути ответа как на биотический, так и на абиотический стрессы, что требует особенно тщательного исследования.

Результаты эффективного практического применения антифризных белков пшеницы, получение доказательств связи между холодоустойчивостью, экспрессией генов и накоплением этих белков у озимой пшеницы говорят в пользу необходимости продолжения исследований этой группы белков низкотемпературной адаптации.

Список литературы / References

Костяев А.А., Мартусевич А.К., Андреев А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья). *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2016;6:54-74
[Kostyaev A.A., Martusevich A.K., Andreev A.A. Toxicity of cryoprotectants and cryoconservants on their basis for blood components and bone marrow (review article). *Nauchnoe Obozrenie. Meditsinskie Nauki = Scientific Review. Medical Sciences*. 2016;6:54-74 (in Russian)]

Пучков Е.О. Биогенное управление образованием льда. *Природа*. 2017;2:27-37
[Puchkov E.O. Biogenic control of ice formation. *Priroda*. 2017;2:27-37 (in Russian)]
Ambroise V., Legay S., Guerriero G., Hausman J.F., Cuypers A., Sergeant K. The roots of plant frost hardness and tolerance. *Plant Cell Physiol*. 2020;61(1):3-20. doi 10.1093/pcp/pcz196
Antikainen M., Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol Plant*. 1997;99(3):423-432. doi 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00556.x
Badawi M., Reddy Y.V., Agharbaoui Z., Tominaga Y., Danyluk J., Sarhan F., Houde M. Structure and functional analysis of wheat ICE (inducer of CBF expression) genes. *Plant Cell Physiol*. 2008;49(8):1237-1249. doi 10.1093/pcp/pcn100
Båga M., Chodaparambil S.V., Limin A.E., Pecar M., Fowler D.B., Chibbar R.N. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Funct Integr Genomics*. 2007;7(1):53-68. doi 10.1007/s10142-006-0030-7
Bayer-Giraldi M., Weikusat I., Besir H., Dieckmann G. Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice. *Cryobiology*. 2011;63(3):210-219. doi 10.1016/j.cryobiol.2011.08.006
Boonsupthip W., Lee T.-C. Application of antifreeze protein for food preservation: effect of type III antifreeze protein for preservation of gel-forming of frozen and chilled actomyosin. *J Food Sci*. 2003;68(5):1804-1809. doi 10.1111/j.1365-2621.2003.tb12333.x
Cao Y., Hu G., Zhuang M., Yin J., Wang X. Molecular cloning and functional characterization of *TaIR19* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*. 2021;791:145694. doi 10.1016/j.gene.2021.145694
Case A.J., Skinner D.Z., Garland-Campbell K.A., Carter A.H. Freezing tolerance-associated quantitative trait loci in the brundage × coda wheat recombinant inbred line population. *Crop Sci*. 2014;54(3):982-992. doi 10.2135/cropsci2013.08.0526
Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M., Zhu J.K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2003;17(8):1043-1054. doi 10.1101/gad.1077503
Chow-Shi-Yée M., Briard J.G., Grondin M., Averill-Bates D.A., Ben R.N., Ouellet F. Inhibition of ice recrystallization and cryoprotective activity of wheat proteins in liver and pancreatic cells. *Protein Sci*. 2016;25(5):974-986. doi 10.1002/pro.2903
Chow-Shi-Yée M., Grondin M., Ouellet F., Averill-Bates D.A. Control of stress-induced apoptosis by freezing tolerance-associated wheat proteins during cryopreservation of rat hepatocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2020;25(6):869-886. doi 10.1007/s12192-020-01115-y
Chun J., Yu X., Griffith M. Genetic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat. *Euphytica*. 1998;102:219-226. doi 10.1023/A:1018333730936
DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*. 1969;163(3871):1073-1075. doi 10.1126/science.163.3871.1073
Duman J.G., Olsen T.M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*. 1993;30(3):322-328. doi 10.1006/cryo.1993.1031
Duman J.G., Wisniewski M.J. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. *Env Exp Bot*. 2014;106:60-69. doi 10.1016/j.envexpbot.2014.01.001
Ewart K.V., Lin Q., Hew C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(2):271-283. doi 10.1007/s000180050289
Gaudet D.A., Laroche A. Winter survival of cereals parasitized by Snow Mold. In: Li P.H., Chen T.H.H. (Eds) *Plant Cold Hardiness*. Boston: Springer, 1997;331-342. doi 10.1007/978-1-4899-0277-1_31
Gaudet D.A., Laroche A., Frick M., Davoren J., Puchalski B., Ergon A. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2000;57(1):15-24. doi 10.1006/pmpp.2000.0275

- Griffith M., Yaish M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.* 2004;9(8):399-405. doi 10.1016/j.tplants.2004.06.007
- Griffith M., Ala P., Yang D.S., Hon W.C., Moffatt B.A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol.* 1992;100(2):593-596. doi 10.1104/pp.100.2.593
- Griffith M., Lumb C., Wiseman S.B., Wisniewski M., Johnson R.W., Marangoni A.G. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiol.* 2005;138(1):330-340. doi 10.1104/pp.104.058628
- Grondin M., Hamel F., Averill-Bates D.A., Sarhan F. Wheat proteins improve cryopreservation of rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103(3):582-591. doi 10.1002/bit.22270
- Hannah M.A., Heyer A.G., Hinch A.G. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 2005;1(2):e26. doi 10.1371/journal.pgen.0010026
- He K., Wu Y. Receptor-like kinases and regulation of plant innate immunity. *Enzymes.* 2016;40:105-142. doi 10.1016/bs.enz.2016.09.003
- Herman E.M., Rotter K., Premakumar R., Elwinger G., Bae H., Ehler-King L., Chen S., Livingston D.P. 3rd. Additional freeze hardness in wheat acquired by exposure to -3 degrees C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *J Exp Bot.* 2006;57(14):3601-3618. doi 10.1093/jxb/erl111
- Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.C., Yang D.S.C. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 1995;109(3):879-889. doi 10.1104/pp.109.3.879
- Houde M., Belcaid M., Ouellet F., Danyluk J., Monroy A.F., Dryanova A., Gulick P., Bergeron A., Laroche A., Links M.G., MacCarthy L., Crosby W.L., Sarhan F. Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomics.* 2006;7:149. doi 10.1186/1471-2164-7-149
- Huang T., Duman J.G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol.* 2002;48(4):339-350. doi 10.1023/A:1014062714786
- Jain D., Khurana J.P. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Singh A., Singh I. (Eds) *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Singapore: Springer, 2018;265-281. doi 10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Janech M.G., Krell A., Mock T., Raymond J.A. Ice-binding proteins from sea ice diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol.* 2006;42(2):410-416. doi 10.1111/j.1529-8817.2006.00208.x
- Jarząbek M., Pukacki P.M., Nuc K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* sp.). *Cryobiology.* 2009;58(3):268-274. doi 10.1016/j.cryobiol.2009.01.007
- Jin Y.N., Bai L.P., Guan S.X., Zhong M., Ma H., Wang S., Guo Z.F. Identification of an ice recrystallization inhibition gene family in winter-hardy wheat and its evolutionary relationship to other members of the *Triticeae*. *J Agron Crop Sci.* 2018;204(4):400-413. doi 10.1111/jac.12270
- Jin Y., Ding X., Li J., Guo Z. Isolation and characterization of wheat ice recrystallization inhibition gene promoter involved in low temperature and methyl jasmonate responses. *Physiol Mol Biol Plants.* 2022;28(11-12):1969-1979. doi 10.1007/s12298-022-01257-6
- Juurakko C.L., diCenzo G.C., Walker V.K. *Brachypodium* antifreeze protein gene products inhibit ice recrystallization, attenuate ice nucleation, and reduce immune response. *Plants.* 2022;11(11):1475. doi 10.3390/plants11111475
- Kang G., Li G., Yang W., Han Q., Ma H., Wang Y., Ren J., Zhu Y., Guo T. Transcriptional profile of the spring freeze response in the leaves of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiol Plant.* 2013;35(02):575-587. doi 10.1007/s11738-012-1099-3
- Knight C.A., Wen D., Laursen R.A. Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice. *Cryobiology.* 1995;32(1):23-34. doi 10.1006/cryo.1995.1002
- Kontogiorgos V., Regand A., Yada R., Goff H.D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. *J Food Biochem.* 2007;31(2):139-160. doi 10.1111/j.1745-4514.2007.00112.x
- Kristiansen E., Pedersen S.A., Ramløv H., Zachariassen K.E. Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor*. *J Comp Physiol B.* 1999;169:55-60. doi 10.1007/s003600050193
- Kristiansen E., Ramløv H., Højrup P., Pedersen S.A., Hagen L., Zachariassen K.E. Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011;41(2):109-117. doi 10.1016/j.ibmb.2010.11.002
- Kruse E.B., Carle S.W., Wen N., Skinner D.Z., Murray T.D., Garland-Campbell K.A., Carter A.H. Genomic regions associated with tolerance to freezing stress and snow mold in winter wheat. *G3 (Bethesda).* 2017;7(3):775-780. doi 10.1534/g3.116.037622
- Kurepin L.V., Dahal K.P., Savitch L.V., Singh J., Bode R., Ivanov A.G., Hurry V., Hüner N.P. Role of CBFs as integrators of chloroplast redox, phytochrome and plant hormone signaling during cold acclimation. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12729-12763. doi 10.3390/ijms140612729
- Liu X., Pan Y., Liu F., He Y., Zhu Q., Liu Z., Zhan X., Tan S. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *J Nanomater.* 2021;2021(1):9990709. doi 10.1155/2021/9990709
- Livingston D.P. 3rd, Bertrand A., Wisniewski M., Tisdale R., Tuong T., Gusta L.V., Artlip T. Factors contributing to ice nucleation and sequential freezing of leaves in wheat. *Planta.* 2021;253(6):124. doi 10.1007/s00425-021-03637-w
- Macháčková I., Hanisova A., Krekule J. Levels of ethylene, ACC, MACC, ABA and proline as indicators of cold hardening and frost resistance in winter wheat. *Physiol Plant.* 1989;76(4):603-607. doi 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05486.x
- McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.* 2006;7(4):212. doi 10.1186/gb-2006-7-4-212
- Middleton A.J., Brown A.M., Davies P.L., Walker V.K. Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein. *FEBS Lett.* 2009;583(4):815-819. doi 10.1016/j.febslet.2009.01.035
- Middleton A.J., Marshall C.B., Faucher F., Bar-Dolev M., Braslavsky I., Campbell R.L., Walker V.K., Davies P.L. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. *J Mol Biol.* 2012;416(5):713-724. doi 10.1016/j.jmb.2012.01.032
- Monroy A.F., Dryanova A., Malette B., Oren D.H., Ridha Farajalla M., Liu W., Danyluk J., Ubayasena L.W., Kane K., Scoles G.J., Sarhan F., Gulick P.J. Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol Biol.* 2007;64(4):409-423. doi 10.1007/s11103-007-9161-z
- Pandey S.P., Somssich I.E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol.* 2009;150(4):1648-1655. doi 10.1104/pp.109.138990
- Regand A., Goff H.D. Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. *J Dairy Sci.* 2006;89(1):49-57. doi 10.3168/jds.S0022-0302(06)72068-9
- Sandve S.R., Rudi H., Asp T., Rognli O.A. Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses. *BMC Evol Biol.* 2008;8:245. doi 10.1186/1471-2148-8-245
- Sauter M. Phytosulfokine peptide signaling. *J Exp Bot.* 2015;66(17):5161-5169. doi 10.1093/jxb/erv071
- Sutka J. Genetic control of frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica.* 1994;77:277-282. doi 10.1007/BF02262642
- Sutka J. Genes for frost resistance in wheat. *Euphytica.* 2001;119:169-177. doi 10.1023/A:1017520720183
- Sutka J., Galiba G., Snape J.W. Inheritance of frost resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agron Hung.* 1997;45:257-263
- Talanova V.V., Titov A.F., Topchieva L.V., Malysheva I.E., Venzhik Y.V., Frolova S.A. Expression of genes encoding the WRKY transcription factor and heat shock proteins in wheat plants during cold harden-

- ing. *Dokl Biol Sci.* 2008;423:440-442. doi 10.1134/s0012496608060215
- Tchagang A.B., Fauteux F., Tulpan D., Pan Y. Bioinformatics identification of new targets for improving low temperature stress tolerance in spring and winter wheat. *BMC Bioinformatics.* 2017;18(1):174. doi 10.1186/s12859-017-1596-x
- Tremblay K., Ouellet F., Fournier J., Danyluk J., Sarhan F. Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant Cell Physiol.* 2005;46(6):884-891. doi 10.1093/pcp/pci093
- Urrutia M.E., Duman J.G., Knight C.A. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1992;1121(1-2):199-206. doi 10.1016/0167-4838(92)90355-h
- Vaitkevičiūtė G., Aleliūnas A., Brazauskas G., Armonienė R. Deacclimation and reacclimation processes in winter wheat: novel perspectives from time-series transcriptome analysis. *Front Plant Sci.* 2024; 15:1395830. doi 10.3389/fpls.2024.1395830
- Vanková R., Kosová K., Dobrev P., Vítámvás P., Trávníčková A., Cvikrová M., Pešek B., Gaudinová A., Přerostová S., Musilová J., Galiba G., Prasil I.T. Dynamics of cold acclimation and complex phytohormone responses in *Triticum monococcum* lines G3116 and DV92 differing in vernalization and frost tolerance level. *Env Exp Bot.* 2014;101:12-25. doi 10.1016/j.envexpbot.2014.01.002
- Voets I.K. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter.* 2017;13(28):4808-4823. doi 10.1039/c6sm02867e
- Wang W., Hao Q., Wang W., Li Q., Wang W. The genetic characteristics in cytology and plant physiology of two wheat (*Triticum aestivum*) near isogenic lines with different freezing tolerances. *Plant Cell Rep.* 2017;36(11):1801-1814. doi 10.1007/s00299-017-2195-z
- Wang W., Wang X., Zhang J., Huang M., Cai J., Zhou Q., Dai T., Jiang D. Salicylic acid and cold priming induce late-spring freezing tolerance by maintaining cellular redox homeostasis and protecting photosynthetic apparatus in wheat. *Plant Growth Regul.* 2020;90:109-121. doi 10.1007/s10725-019-00553-8
- Wang W., Wang X., Huang M., Cai J., Zhou Q., Dai T., Jiang D. Alleviation of field low-temperature stress in winter wheat by exogenous application of salicylic acid. *J Plant Growth Regul.* 2021;40:811-823. doi 10.1007/s00344-020-10144-x
- Wang X., Geng H., Wu D., Wang L., Zhang N., Wang W., Yu D. Isolation of ice structuring proteins from winter wheat in frigid region (Dongnongdongmai1) and the effect on freeze-thaw stability of dough. *Food Res Int.* 2024;197(Pt. 2):115295. doi 10.1016/j.foodres.2024.115295
- Willick I.R., Takahashi D., Fowler D.B., Uemura M., Tanino K.K. Tissue-specific changes in apoplastic proteins and cell wall structure during cold acclimation of winter wheat crowns. *J Exp Bot.* 2018; 69(5):1221-1234. doi 10.1093/jxb/erx450
- Willick I.R., Gusta L.V., Fowler D.B., Tanino K.K. Ice segregation in the crown of winter cereals: evidence for extraorgan and extratissue freezing. *Plant Cell Environ.* 2019;42(2):701-716. doi 10.1111/pce.13454
- Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D., Coghill J.A., Edwards K.J. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnol J.* 2010;8(7):749-771. doi 10.1111/j.1467-7652.2010.00536.x
- Wisniewski M., Willick I.R., Duman J.G., Livingston D.P. 3rd, Newton S.S. Plant antifreeze proteins. In: Ramløv H., Friis D. (Eds) *Antifreeze Proteins*. Vol. 1. Cham: Springer, 2020;189-226. doi 10.1007/978-3-030-41929-5_7
- Xue-Xuan X., Hong-Bo S., Yuan-Yuan M., Gang X., Jun-Na S., Dong-Gang G., Cheng-Jiang R. Biotechnological implications from abscisic acid (ABA) roles in cold stress and leaf senescence as an important signal for improving plant sustainable survival under abiotic-stressed conditions. *Crit Rev Biotechnol.* 2010;30(3):222-230. doi 10.3109/07388551.2010.487186
- Yang T., Zhang Y., Guo L., Li D., Liu A., Bilal M., Xie C., Yang R., Gu Z., Jiang D., Wang P. Antifreeze polysaccharides from wheat bran: the structural characterization and antifreeze mechanism. *Biomacromolecules.* 2024;25(7):3877-3892. doi 10.1021/acs.biomac.3c00958
- Yu X.M., Griffith M., Wiseman S.B. Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiol.* 2001;126(3):1232-1240. doi 10.1104/pp.126.3.1232
- Zheng X., Shi M., Wang J., Yang N., Wang K., Xi J., Wu C., Xi T., Zheng J., Zhang J. Isoform sequencing provides insight into freezing response of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Genet.* 2020;11:462. doi 10.3389/fgene.2020.00462

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.05.2025. После доработки 15.09.2025. Принята к публикации 24.09.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-44

Пути адаптации разных сортов груши к низкотемпературному стрессу в весенний период

А.Е. Мишко , А.В. Ключкина 

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

 mishko-alisa@mail.ru

Аннотация. Хорошо известная семечковая культура – груша – на территории России занимает около 7 % общих площадей насаждений многолетних плодовых культур. Основную долю грушевых садов составляют зарубежные европейские сорта. Возвратные заморозки, которые характерны для южных регионов страны в весенний период, приводят к значительным потерям урожая. В настоящей работе изучены особенности ответных реакций цветочных почек сортов груши на низкотемпературный стресс. Исследовали крымский сорт Джанкойская поздняя, два краснодарских сорта Левен и Фламенко, а также межвидовой гибрид Киффер. Цветочные почки на разных стадиях развития промораживали в климатической камере в течение 12 ч при температуре $-1.5 \dots -2.0$ °C. После стресса определяли активность некоторых ферментов антиоксидантной системы, содержание фенольных соединений, малонового диальдегида и уровень экспрессии генов тех же ферментов и белков, участвующих в холодовой адаптации. Выявлено, что осенний сорт Киффер в условиях Краснодарского края быстрее других изученных сортов начинает цвести, вследствие чего наиболее подвержен воздействию возвратных заморозков, о чем свидетельствуют высокие значения малонового диальдегида и уровень активности супероксиддисмутазы. Отечественные сорта Левен (зимний сорт) и Фламенко (летний) обладали самыми высокими показателями активности пероксидазы и экспрессии генов *PcDREB2*, *PcCAP160*, *PcCOR413*, *PcPOX1* на фоне сниженного уровня малонового диальдегида. Как правило, данные сорта позднее выходили из состояния покоя по сравнению с сортом Киффер. Крымский сорт зимнего срока созревания был ближе по исследуемым параметрам к межвидовому гибриду, но отличался меньшими показателями ферментативной активности и экспрессией рассматриваемых генов. Полученные результаты позволяют заключить, что в условиях произрастания груши на территории южного региона страны, где возможны возвратные заморозки в весенний период, большей физиологической устойчивостью обладают сорта с началом цветения во второй-третьей декадах апреля, характеризующиеся высокими показателями антиоксидантной ферментативной активности, в первую очередь пероксидазы, и уровнем экспрессии генов *PcDREB2*, *PcCAP160* и *PcCOR413*.

Ключевые слова: груша; холодовой стресс; устойчивость; антиоксидантная система защиты; экспрессия генов

Для цитирования: Мишко А.Е., Ключкина А.В. Пути адаптации разных сортов груши к низкотемпературному стрессу в весенний период. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):403-411. doi 10.18699/vjgb-26-44

Финансирование. Публикация подготовлена в рамках реализации государственного задания FGRE-2022-0001 (рег. номер 225020408372-9) Министерства науки и высшего образования РФ.

Adaptive responses of pear cultivars to low-temperature stress in the spring period

A.E. Mishko , A.V. Klyukina 

North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia

 mishko-alisa@mail.ru

Abstract. The pear is one of the most famous pome crops. It occupies about 7 % of the total area of perennial fruit crops in Russia. Orchard plantings are predominantly composed of foreign European cultivars. Spring frosts, which are typical for the southern regions of the country, lead to significant crop losses. This study determined the response characteristics of pear flower buds to low-temperature stress. The Crimean cultivar Dzhankoyskaya Pozdnyaya, two cultivars – Leven and Flamenco – of Krasnodar selection and the interspecific hybrid Kieffer were investigated. Flower buds at different developmental stages were exposed to a climatic chamber for 12 hours at temperatures $-1.5 \dots -2$ °C. After stress exposure, the activity of certain antioxidant enzymes was determined, along with the content of phenolic compounds, malondialdehyde, and the gene expression level of its enzymes and proteins involved in cold adaptation. It was revealed that the autumn-ripening cultivar Kieffer, under conditions of the Krasnodar region, begins to bloom earlier than other studied cultivars, making it more susceptible to recurrent frosts. This is evidenced by high values of malondialdehyde and the activity level of superoxide dismutase. The Russian cultivars, Leven (winter cultivar) and Flamenco (summer cultivar), showed the highest activity of peroxidase and gene expression of *PcDREB2*, *PcCAP160*, *PcCOR413*, *PcPOX1*, with a reduced level of malondialdehyde. These cultivars typically emerged from dormancy later compared to Kieffer. The

Crimean winter-ripening cultivar was closer to the interspecific hybrid in terms of the studied parameters but showed lower enzyme activity and gene expression levels. The obtained results suggest that under pear cultivation conditions in the southern region of the country, where spring frosts are possible, cultivars with flowering starting in the second-to-third decade of April and high indicators of antioxidant enzyme activity (primarily peroxidase) and gene expression levels of *PcDREB2*, *PcCAP160*, and *PcCOR413* demonstrate greater resistance.

Key words: pear cultivars; low-temperature stress; resistance; antioxidant system defense; gene expression

For citation: Mishko A.E., Klyukina A.V. Adaptive responses of pear cultivars to low-temperature stress in the spring period. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(3):403–411. doi 10.18699/vjgb-26-44

Введение

Семечковые культуры, в частности груша, являются ценным ресурсом для отрасли садоводства Краснодарского края. Доля груши в общих посадках многолетних плодовых насаждений чрезвычайно мала и составляет около 7 %, но заинтересованность производства в данной культуре постоянно растет. Причины недостаточного ее распространения даже в самых благоприятных условиях юга России просты – по сравнению с яблоней, груша отличается более высокой требовательностью к условиям произрастания, главным образом к уровню водообеспечения, особенно в начале вегетации и в период созревания плодов (Asayesh et al., 2023). Морозостойкость культуры высока – по данным различных исследователей, цветочные почки груши в состоянии органического покоя могут выдерживать температуры до -25°C (Сотник и др., 2017; Бандурко, 2024). Ключевую роль играют не только отрицательные температуры и продолжительность морозного периода (морозов), но и фаза цикла развития генеративных органов (Xiao et al., 2022).

Одним из важнейших свойств адаптации сортов плодовых культур к условиям выращивания является их устойчивость к низкотемпературным стрессам в период вегетации. В Краснодарском крае к значительным экономическим потерям приводят возвратные весенние заморозки, участвовавшие в последнее время. Многолетний мониторинг погодных условий позволил выявить основные стрессовые факторы для культуры груши на территории края в течение зимне-весеннего периода – это отсутствие низких температур в декабре–январе, необходимых для закалывания растений, и заморозки в период начала вегетации (март–апрель). Каждый из этих негативных факторов при воздействии на сорта груши может приводить к снижению урожайности или к полной потере урожая (Evers et al., 2021; Lee et al., 2023; Zhao et al., 2023). Установлено, что любая культура, и в частности сорт, имеет свой порог критических минимальных температур, способный инициировать с высокой долей вероятности гибель цветочных почек (Клюкина и др., 2024). Кроме того, для различных сортов характерны разные сроки периода глубокого покоя, продолжительность которого при конкретных условиях температурного режима будет определять дальнейшую скорость выхода из него (Gabay, Flaishman, 2024).

Устойчивость сортов к низкотемпературному стрессу представляет собой сложные взаимодействия физиолого-биохимических и молекулярно-генетических процессов, которые отражены рядом показателей. Любое значительное стрессовое воздействие на растение приводит к возникновению вторичного окислительного стресса, вы-

званного ростом активных форм кислорода (АФК) в клетках (Suzuki et al., 2012). Одной из важных защитных реакций на такое негативное влияние является увеличение активности антиоксидантных ферментов, сдерживающих рост свободных радикалов, избыточное накопление которых может привести к разрушению липидов, белков, нуклеиновых кислот, вплоть до клеточной гибели. Супероксиддисмутаза нейтрализует супероксидный анион, пероксидазы – перекись водорода (Dumanovic et al., 2021). Полифенолоксидаза катализирует реакции окисления разнообразных фенольных соединений, синтезируя или деградируя необходимые в поддержании гомеостаза растения метаболиты (Zhang S., 2023).

Одновременно с ферментами защитную функцию выполняют многочисленные фенольные соединения (Dumanovic et al., 2021). Флавоноиды относятся к главным антиоксидантам фенольной природы. Они способны восстанавливать АФК до стабильных и менее вредных форм (Trembl, Mejkal, 2016). На генетическом уровне низкотемпературный стресс индуцирует экспрессию функциональных и регуляторных генов, продукты которых либо непосредственно защищают клетки от повреждений (ферменты биосинтеза осмолитов, ферменты детоксикации и др.), либо участвуют в передаче сигналов и регуляции экспрессии генов (Yang, Huang, 2018; Zhang Y. et al., 2023).

В связи с участвовавшими возвратными заморозками на территории Краснодарского края целью данного исследования стало изучение ответных реакций сортов груши на низкотемпературный стресс в весенний период.

Материал и методы

Исследования проведены в Прикубанской зоне садоводства Краснодарского края ($45^{\circ}16'N$, $38^{\circ}93'E$) в марте–апреле 2023–2025 гг. на базе генетической коллекции ЦКП «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (СКФНЦСВВ). В качестве объектов изучения были выбраны сорта груши *Pyrus communis* L. отечественного происхождения Левен и Фламенко (селекция СКФНЦСВВ), крымский сорт Джанкойская поздняя и американский сорт Киффер, который является межвидовым гибридом (*P. communis* $\times$ *P. pyrifolia* Nakai). Сорта были привиты на подвое ВА-29. Год посадки – 2007, схема посадки – 5×2 м. Отбирали по 10 побегов с цветочными почками с 5–7 деревьев каждого сорта.

Анализ реакции генеративных органов на низкие температуры весеннего периода проводили на основе критических минимальных температур для каждой фазы развития цветочных почек в климатической камере BPC500D/CVSI-Spector (Fujian Jiupo Biotechnology Co, Китай) по

общепринятой методике (Программа и методика сортоизучения..., 1999; Новые методы..., 2023). Фазы развития цветочных почек определены согласно общепринятым методикам (Коломиец, 1952; Шитт, 1958). Температурные показатели изученного периода получены с местной метеостанции (синоптический индекс 34927). В лабораторных условиях был смоделирован температурный режим, соответствующий естественным возвратным заморозкам: постепенное понижение температуры в течение суток до критической в $-1.5...-2.0$ °C. Контрольные образцы не подвергали низкотемпературному стрессу. После окончания эксперимента растительный материал замораживали в жидком азоте для дальнейшего использования в серии биохимических и молекулярно-генетических анализов.

В цветочных почках груши определяли общее содержание фенольных соединений и флавоноидов (Ainsworth, Gillespie, 2007; Hikmawanti et al., 2021). Экстракцию растворимых белков проводили согласно методике (Wei et al., 2018), их концентрацию оценивали с помощью окрашивания раствором Кумасси (Bradford, 1976). Активность ферментов супероксиддисмутазы (SOD), пероксидазы (POX) и полифенолоксидазы (PPO) измеряли стандартными колориметрическими методами (Бояркин, 1951; Queiroz et al., 2011; Ефимова и др., 2018). Содержание малонового диальдегида (MDA) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Bouyanpour, Jamali, 2020).

Для анализа уровня экспрессии генов из цветочных почек груши выделяли РНК с помощью модифицированного СТАВ-метода (Сундырева и др., 2018). Синтез кДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Праймеры были подобраны из литературных источников (табл. 1). В качестве референсного гена был взят консервативный фрагмент последовательности гена актина. Относительную экспрессию исследованных генов рассчитывали с помощью $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода (Livak, Schmittgen, 2001).

Измерения проводили в 2–4-кратной аналитической повторности. Достоверность различий определяли по результатам теста Тьюки однофакторного дисперсионного анализа при уровне значимости 0.05. Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения STATISTICA 12. Результаты представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательности праймеров 5'→3'	Литературный источник
PPO1	F CCTACTCACAAGCCCAAGC	Busatto et al., 2021
	R CCTCCAAGACCAAGAAGCAC	
SOD1	F GGGAGATGGCCCAACTACTG	Azarabadi et al., 2017
	R CCAGTTGACATGCAACCGTT	
POX1	F AAGGCATGCGATGTGGTCAGT	Zhai et al., 2018
	R CGACATATCCACCATGCCCA	
DREB2	F GCAAAGAAACAGACCTTGTGC	Nham et al., 2017
	R GCATATAAGTCGTCATCAACC	
COR413	F GGTCGAACAGCACTGAAGGA	
	R CTCAATGGGTTGCCTCCCT	
CAP160	F GCCACTACTGTATTGCCGA	
	R ATACCCTGTTGCTCAGGTGC	
Actin	F CTGCTGGCATTCATGAGACT	Şahin et al., 2022
	R TCTGGTGGAGCTACAACCTT	

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный праймер.

Результаты

Температурные условия в изучаемый период были разнообразными (табл. 2), что отлично отражают фазы развития цветочных почек (рис. 1). Отбор растительного материала проводили в третьей декаде марта или первой декаде апреля, приуроченного к началу цветения груши.

Условия для распускания генеративных почек в 2023 г. были благоприятными: после весенних заморозков в марте (до -6.3 °C) наблюдали потепление в апреле до $+5.4$ °C, что привело к раннему прохождению фазы «начало цветения» у сорта Киффер, тогда как сорта Фламенко, Левен и Джанкойская поздняя остались в фазе «обособление бутонов».

Состояние генеративных органов в 2024 г. отличалось от данных за 2023 г. Заморозки в марте достигали температуры -4.3 °C, в апреле минимальная температура составила лишь $+2.0$ °C. Большинство сортов (Левен, Джанкойская поздняя и Фламенко) остались в фазе «распускание почек», а сорт Киффер – в фазе «обособление бутонов».

За три года исследований минимум температуры (до -13.9 °C) был зафиксирован только в марте 2025 г. Ми-

Таблица 2. Температурный режим в зимне-весенний период 2023–2025 гг.

Месяц	Минимальные температуры воздуха, °C								
	2023 г.			2024 г.			2025 г.		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Январь	-13.4	-9.7	-8.1	-11.3	-14.2	-12.0	-6.2	-5.5	-3.1
Февраль	-14.5	-11.5	-8.4	-2.9	-1.6	-4.5	-8.3	-8.4	-18.6
Март	-6.3	2.3	1.5	-4.3	-3.5	-0.8	-13.9	-0.6	0.2
Апрель	0.2	5.4	5.2	2.0	10.1	2.0	0.2	0.3	3.1

Примечание. I–III – декады месяцев. Жирным шрифтом выделен абсолютный минимум температур за месяц.

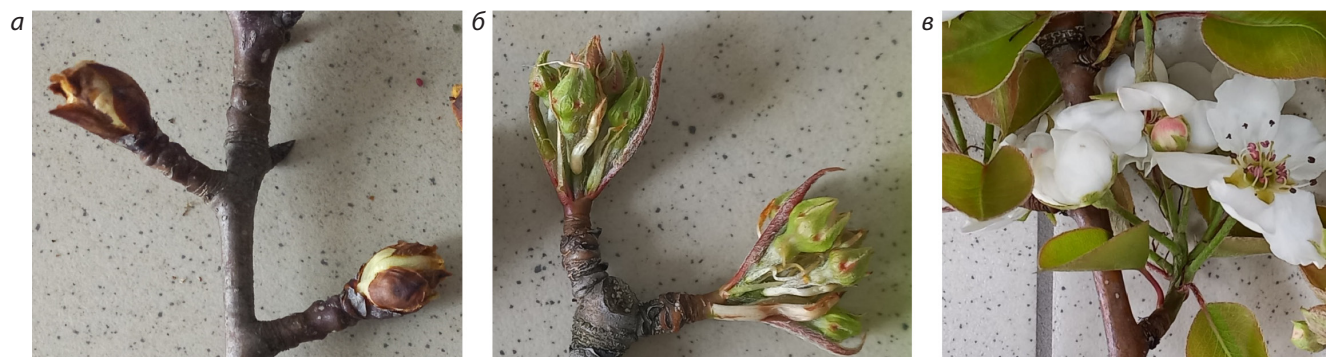


Рис. 1. Фазы развития цветочных почек груши.

a – распускание почек; *б* – обособление бутонов; *в* – начало цветения.

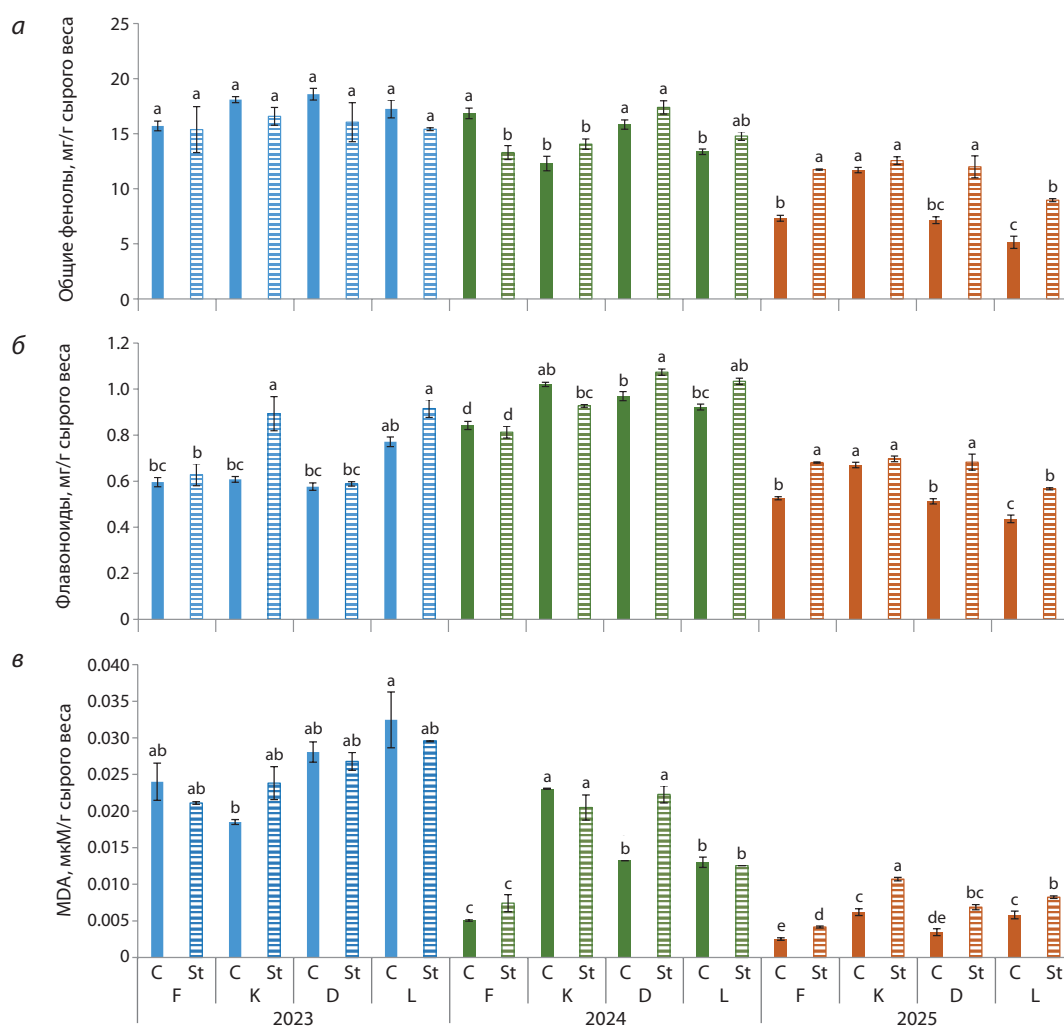


Рис. 2. Содержание общих фенолов, флавоноидов и малонового диальдегида (MDA) в генеративных почках груши при низкотемпературном стрессе в 2023–2025 гг.

F – Фламенко; K – Киффер; D – Джанкойская поздняя; L – Левен; C – контроль, St – стресс. Малыми латинскими буквами отмечены достоверные различия в определенный год исследования по результатам теста Тьюки при $p \leq 0.05$.

нимальная температура воздуха первой декады апреля составила $+0.2^{\circ}\text{C}$. При таких условиях сорта Джанкойская поздняя и Фламенко находились в фазе «распускание почек», в то время как сорта Киффер и Левен достигли фазы «обособление бутонов».

Содержание общих фенолов в цветочных почках груши было различным в зависимости от года исследования (рис. 2, *a*). Максимальные значения, варьирующие в среднем от 17.2 до 18.6 мг/г сырого веса, у большинства сортов были выявлены в 2023 г. Минимальные показатели

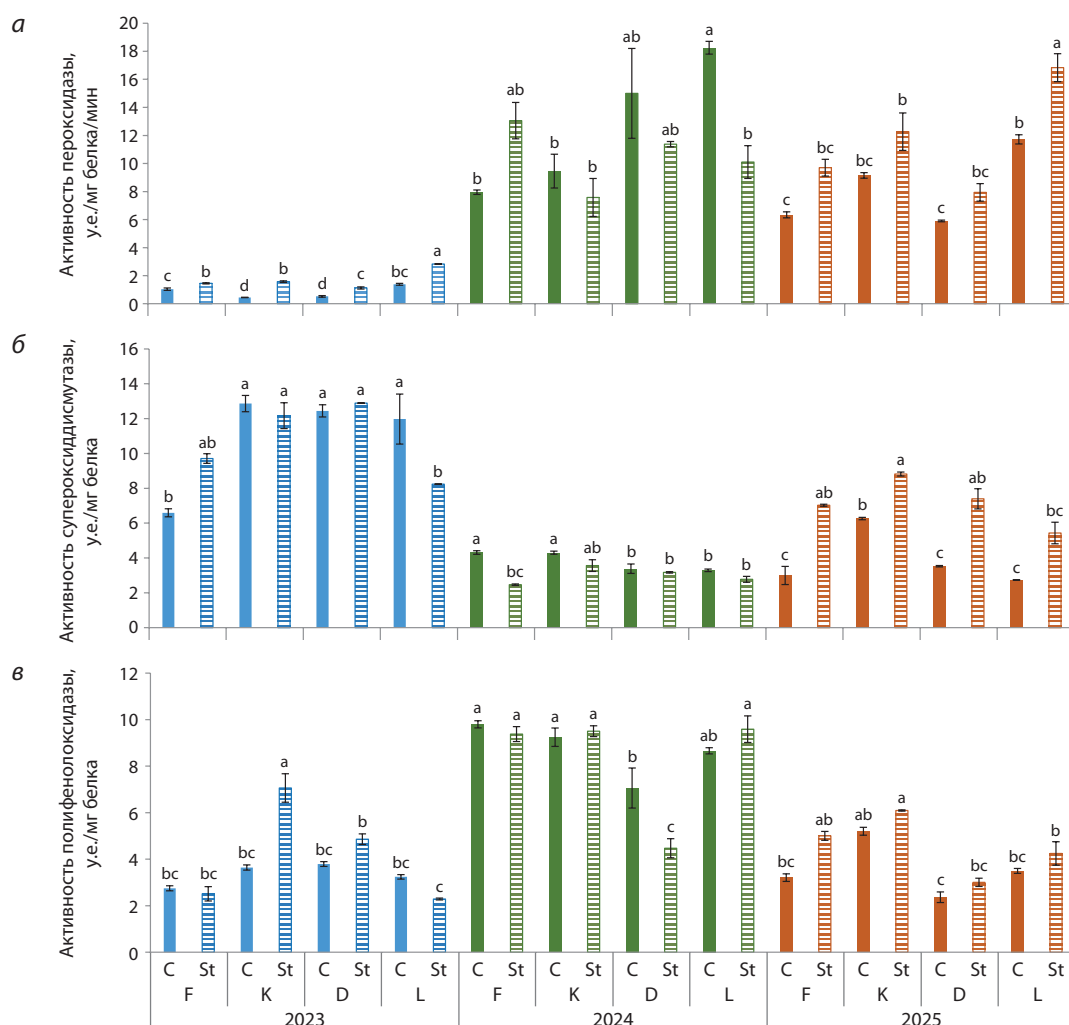


Рис. 3. Активность пероксидазы, супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы в генеративных почках груши при низкотемпературном стрессе в 2023–2025 гг.

Усл. обозн. см. на рис. 2.

(5.1–11.7 мг/г сырого веса) соответствовали весеннему периоду 2025 г. После кратковременного низкотемпературного стресса наблюдался значительный рост данного параметра только в 2025 г. Почти двукратное увеличение фенолов было характерно для таких сортов, как Фламенко, Джанкойская поздняя и Левен. Сорт Левен за весь период изучения в среднем имел самые низкие показатели этого параметра, составляющие ~12 мг/г сырого веса.

При сопоставлении данных по содержанию флавоноидов наибольшие показатели, изменяющиеся в пределах от 0.8 до 1.1 мг/г сырого веса, были выявлены в 2024 г. (см. рис. 2, б). В период 2025 г. накопление флавоноидов в цветочных почках груши достигало минимальных значений – 0.4–0.6 мг/г сырого веса. При этом у всех сортов, за исключением Киффер, в 2025 г. стрессовое воздействие инициировало рост флавоноидов более чем на 30 %. У сорта Киффер количество флавоноидов резко возросло (в 1.5 раза) в условиях 2023 г. Таким образом, на протяжении трехлетнего эксперимента максимальные показатели содержания флавоноидов после стресса были выявлены у разных сортов: в 2023 г. – Киффер и Левен, в 2024 г. –

Джанкойская поздняя и Левен, в 2025 г. – Фламенко, Джанкойская поздняя и Киффер.

Значительные различия по накоплению малонового диальдегида были обнаружены в зависимости от года исследования. Самые высокие показатели (в среднем 0.03 мкМ/г сырого веса) были характерны для 2023 г., наименьшие (0.004 мкМ/г сырого веса) – для 2025 г. (см. рис. 2, в). Низкотемпературный стресс вызвал увеличение MDA в 1.5–2 раза в 2025 г. у всех сортов груши, в 2024 г. – у сортов Фламенко и Джанкойская поздняя на 45 и 65 % соответственно, в 2023 г. – только у сорта Киффер на 30 %. При анализе средних значений данного параметра за 2023–2025 гг. стрессовые максимальные показатели имели сорта Левен, Джанкойская поздняя и Киффер.

Изменения в активности исследованных ферментов также зависели от года изучения (рис. 3). Активность пероксидазы достигала максимальных показателей (от 5.9 до 18.3 у.е./мг белка/мин) в весенний период 2024–2025 гг., минимальных, изменяющихся в пределах 0.5–1.4 у.е./мг белка/мин, – в 2023 г. (см. рис. 3, а). Стресс чаще всего приводил к увеличению активности ПОХ, в некоторых



Генетический анализ был проведен и для группы генов, отвечающих за устойчивость к низкотемпературному стрессу – были исследованы транскрипционный фактор PcDREB2 (рис. 5, *a*) и белки холодовой акклиматизации

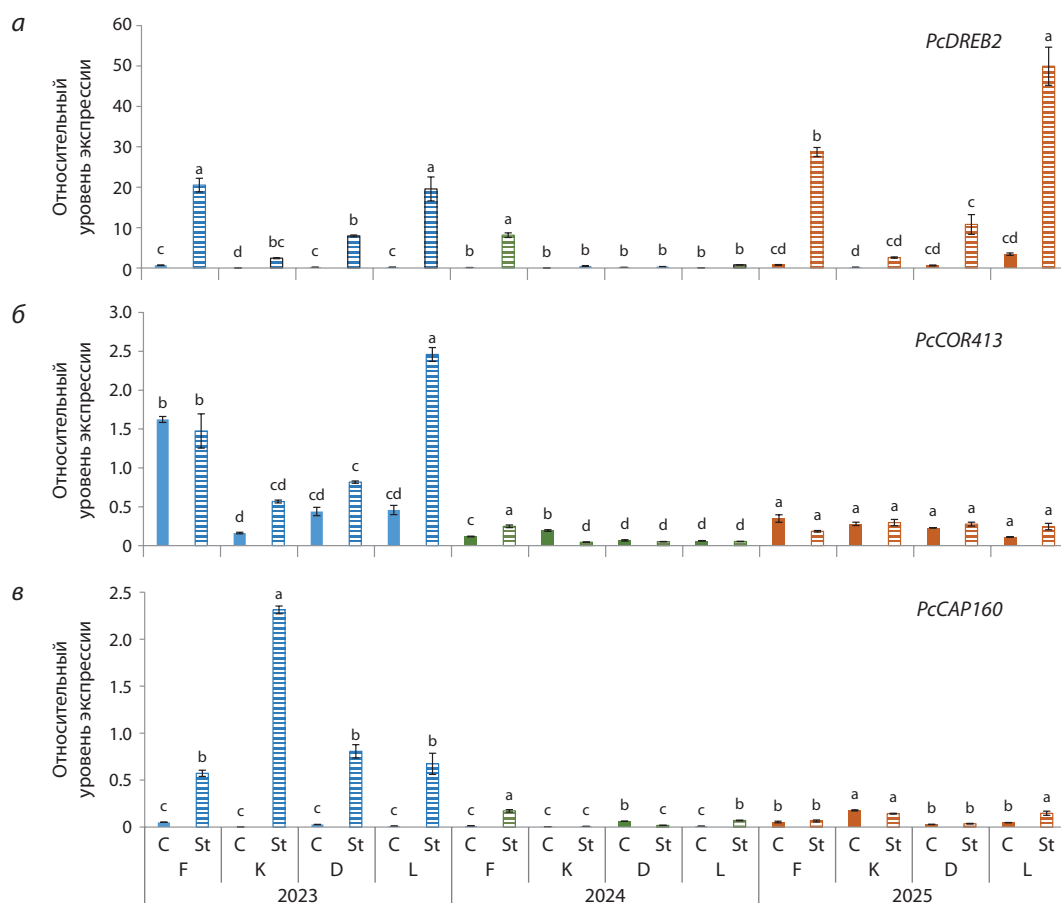


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов *PcDREB2*, *PcCOR413*, *PcCAP160* в генеративных почках груши при низкотемпературном стрессе в 2023–2025 гг.

Усл. обозн. см. на рис. 2.

PcCOR413, *PcCAP160* (см. рис. 5, б, в). В контрольных условиях сортовых отличий не обнаружено за весь период исследования, за исключением показателей *PcCOR413* сорта Фламенко в 2023 г., которые на 78 % превышали значения остальных.

Воздействие низких температур на генеративные почки груши у всех изученных сортов вызвало значительное повышение (в 2–5 раз) относительного уровня экспрессии гена *PcCOR413* только в 2023 г. У сорта Фламенко выявили рост стрессовых значений этого гена в 2 раза в 2024 г., поскольку в первый год исследования, как отмечено ранее, контрольные показатели были достаточно высокими. Что касается уровня относительной экспрессии гена *PcCAP160*, то его значения в стрессовых условиях резко увеличились в 2023 г., особенно у сорта Киффер, а также в 2024 г. у сортов Фламенко и Левен (в 8–14 раз) и в 2025 г. у последнего из них (в 3 раза). Изменения показателей *PcDREB2* носили еще более динамичный характер. В 2023 г. превышение контрольных значений в 30–46 раз отмечено для сортов Фламенко и Джанкойская поздняя, в 109 раз – для сорта Левен, в 122 раза – для сорта Киффер с минимальными значениями. В следующий год рост показателей *PcDREB2* был не таким значительным – в 2–17 раз, но у сорта Фламенко уровень экспрессии увеличился в 68 раз. Максимальные значения *PcDREB2* были выявлены

после стресса в 2025 г. у сортов Фламенко и Левен. Менее значительное повышение экспрессии зафиксировано у сортов Киффер и Джанкойская поздняя.

Обсуждение

Полученные данные позволяют утверждать, что от стадии развития генеративной почки зависят ее физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности. Так, на этапе «распускание почек» характерны наличие высокой активности ферментов ПОХ и РРО и накопление флавоноидов. В более холодных условиях весеннего периода 2025 г. на этом же этапе развития генеративных структур была отмечена более резкая ответная реакция на стресс в виде усиления активности пероксидазы, супероксиддисмутазы, увеличения накопления общих фенолов, флавоноидов, MDA и высокой экспрессии гена *PcDREB2*. Схожие результаты по увеличению активности антиоксидантных ферментов при распускании почек груши *P. pyrifolia* были представлены в работе (Hussain et al., 2015).

Для стадии «обособление бутонов» можно отметить максимальное накопление общих фенолов и MDA, наибольшую активность SOD и высокий уровень экспрессии *PcCOR413*. При стрессе наблюдали увеличение активности ПОХ и резкий рост экспрессии генов *PcPPO1*, *PcDREB2*, *PcCOR413* и *PcCAP160*. Стадия развития

генеративных почек груши «начало цветения», которая была зафиксирована только у сорта Киффер в 2023 г., характеризуется более интенсивным ответом на стресс: усилением синтеза флавоноидов, активности PPO и показателей уровня экспрессии всех исследованных генов. Повышение активности SOD и доли транскриптов генов, связанных с биосинтезом флавоноидов, было отмечено китайскими исследователями при изучении ответной реакции цветков разных генотипов азиатских груш, подверженных низкотемпературному стрессу от +2 до –4 °C в течение 4 ч (Li et al., 2023; Lin et al., 2023). В другой работе воздействие низкими температурами на культуру клеток яблони приводило к активации экспрессии генов *DREB/CBF* (Du et al., 2015).

Как представлено выше, уровень экспрессии гена *PcDREB2* в генеративных почках груши после стресса отличался максимальным ростом (почти в 100 раз), что соответствует данным груши уссурийской (*P. ussuriensis* Maxim. ex Rupr.) – с наибольшей экспрессией генов *DREB1* и *DREB2* в первые 12 ч в условиях гипотермии (Yang, Huang, 2018). В то же время в плодах сорта Вильямс при действии низких температур группа ученых не выявила увеличения экспрессии генов *CBF1*, *CBF4*, *DREB2*, *COR413*, за исключением гена *CAP160* (Nham et al., 2017).

По результатам проведенного сравнительного анализа изученных сортов груши можно заключить, что осенний сорт Киффер обладает способностью к быстрому выходу из состояния глубокого покоя, что определяет его более ранние сроки распускания цветочных почек. Это связано с происхождением сорта, одной из родительских форм которого является вид *P. pyrifolia*, не требующий низких температур для вступления в фазу глубокого покоя и быстро выходящий из него после теплых зим (Gabay, Flaishman, 2024). Достаточно высокие стрессовые показатели MDA, скорее всего, обуславливают повышенную восприимчивость сорта Киффер к низким температурам весеннего периода на фоне быстрой ответной реакции. Для сорта Джанкойская поздняя зимнего срока созревания было характерно, так же как и для сорта Киффер: высокое содержание фенольных соединений, рост содержания MDA и активности SOD в стрессовых условиях, но в целом в меньшей степени выраженная антиоксидантная система защиты и экспрессия генов холодовой устойчивости. Сорта Фламенко и Левен имели схожие ответные реакции на низкотемпературный стресс, хотя по срокам созревания первый относится к группе летних сортов, а второй – к зимним. Активность SOD и содержание MDA за весь период исследования в среднем были на уровне контрольных значений или ниже их, при этом значения POX и экспрессии генов *PcPOX1*, *PcDREB2*, *PcCAP160* и *PcCOR413* достигали максимума.

Заключение

Выявлена разница в способах адаптации сортов груши различного срока созревания и происхождения к низкотемпературным стрессам зимне-весеннего периода как на экологическом, так и на физиологическом уровне. Растения груши, для которых характерно более раннее начало цветения, как это было установлено для сорта

Киффер, обладают большей восприимчивостью к низким температурам за счет роста активности SOD на фоне высокого уровня накопления MDA. У сортов более позднего периода цветения (вторая-третья декада апреля) защитные механизмы сдерживания окислительного стресса в растительных клетках срабатывали быстрее: были установлены максимальные показатели экспрессии генов холодовой устойчивости и активности пероксидазы при низких показателях MDA.

Полученные результаты позволят в дальнейшем проводить оценку сортов груши по признакам-маркерам холодовой устойчивости для создания современного перечня перспективных сортов данной культуры и их рационального размещения на территории юга России с целью получения стабильных и качественных урожаев.

Список литературы / References

- Бандурко И.А. Оценка генофонда груши по устойчивости к неблагоприятным факторам зимнего периода в предгорной зоне северо-западного Кавказа. *Science and Innovation*. 2024;21:88-92 [Bandurko I.A. Assessment of the gene pool of the Pear by resistance to adverse factors of the winter period in the foothill zone of the North-West Caucasus. *Science and Innovation*. 2024;21:88-92 (in Russian)]
- Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы. *Биохимия*. 1951;16(4):352-355 [Boyarkin A.N. A fast assay of peroxidase activity. *Biochemistry*. 1951;16(4):352-355 (in Russian)]
- Ефимова М.В., Коломейчук Л.В., Бойко Е.В., Малофий М.К., Видершпан А.Н., Плюснин И.Н., Головацкая И.Ф., Мурган О.К., Кузнецов В.В. Физиологические механизмы устойчивости растений *Solanum tuberosum* L. к хлоридному засолению. *Физиология растений*. 2018;65(3):196-206. doi 10.7868/S001533031803003X [Efimova M.V., Kolomeichuk L.V., Boyko E.V., Malofii M.K., Vider-shpan A.N., Plyusnin I.N. Golovatskaya I.F., Murgan O.K., Kuznetsov V.I.V. Physiological mechanisms of *Solanum tuberosum* L. plants' tolerance to chloride salinity. *Russ J Plant Physiol*. 2018; 65(3):394-403. doi 10.1134/S1021443718030020]
- Клюкина А.В., Драгавцева И.А., Оплачко Р.А. Изучение потребности сортов плодовых культур в температурном режиме прохождения фаз их развития (на примере сортов груши). *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2024;89(5):49-58. doi 10.30679/2219-5335-2024-5-89-49-58 [Klyukina A.V., Dragavtseva I.A., Oplachko R.A. Study of fruit crops varieties' needs in temperature regime of their development phases (on the example of pear varieties). *Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2024;89(5):49-58. doi 10.30679/2219-5335-2024-5-89-49-58 (in Russian)]
- Коломиец И.А. Биологический анализ развития цветочных почек у яблони. *Доклады Академии наук СССР*. 1952;84(4):821-824 [Kolomiys I.A. Biological analysis of flower bud development in an apple tree. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Reports of the USSR Academy of Sciences*. 1952;84(4):821-824 (in Russian)]
- Новые методы радикального повышения урожаев сортов плодовых культур на основе теории эколого-генетической организации количественных признаков в условиях флуктуации климата. Краснодар, 2023 [New Methods for a Quantum Leap in Fruit Crop Yields Based on the Theory of the Environmental and Genetic Organization of Quantitative Traits in the Context of Climate Fluctuation. Krasnodar, 2023 (in Russian)]
- Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел, 1999 [Program and Methodology of Studying Varieties of Fruit, Berry, and Walnut Crops. Orel, 1999 (in Russian)]
- Сотник А.И., Бабина Р.Д., Хоружий П.Г. Сравнительная оценка сортов груши (*Pirus communis* L.) по устойчивости генератив-

- ных органов к низкотемпературным стрессам в условиях Крыма. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2017;3(65):72-74
- [Sotnik A.I., Babina R.D., Khoruzhy P.G. Comparative assessment of resistance of the generative organs of pear varieties (*Pyrus communis* L.) to low-temperature stresses under the conditions of Crimea. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2017;3(65):72-74 (in Russian)]
- Сундырева М.А., Степанов И.В., Супрун И.И., Ушакова Я.В. Модифицированный протокол выделения РНК из зрелых листьев винограда для проведения ОТ-ПЦР. *Научный журнал КубГАУ*. 2018;143:16-30. doi 10.21515/1990-4665-143-012
- [Sundyreva M.A., Stepanov I.V., Suprun I.I., Ushakova Y.V. A modified protocol of RNA isolation from mature leaves of grapes for RT-PCR. *Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2018;143:16-30. doi 10.21515/1990-4665-143-012 (in Russian)]
- Шитт П.Г. Учение о росте и развитии плодовых и ягодных растений. М., 1958
- [Shitt P.G. The Doctrine of the Growth and Development of Fruit and Berry Plants. Moscow, 1958 (in Russian)]
- Ainsworth E.A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*. 2007;2:875-877. doi 10.1038/nprot.2007.102
- Asayesh Z.M., Arzani K., Mokhtassi-Bidgoli A., Abdollahi H. Enzymatic and non-enzymatic response of grafted and ungrafted young European pear (*Pyrus communis* L.) trees to drought stress. *Sci Hortic*. 2023;310:111745. doi 10.1016/j.scienta.2022.111745
- Azarabadi S., Abdollahi H., Torabi M., Salehi Z., Nasiri J. ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L.). *Eur J Plant Pathol*. 2017;147:279-294. doi 10.1007/s10658-016-1000-0
- Bonyanpour A.R., Jamali B. Seasonal enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses in seven Iranian pomegranate cultivars. *Adv Hortic Sci*. 2020;34(3):265-276
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. doi 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Busatto N., Giné-Bordonaba J., Larrigaudière C., Lindo-Garcia V., Farneti B., Biasioli F., Vrhovsek U., Costa F. Molecular and biochemical differences underlying the efficacy of lovastatin in preventing the onset of superficial scald in a susceptible and resistant *Pyrus communis* L. cultivar. *Postharvest Biol Technol*. 2021;173:111435. doi 10.1016/j.postharvbio.2020.111435
- Du F., Xu J.-N., Li D., Wang X.-Y. The identification of novel and differentially expressed apple-tree genes under low-temperature stress using high-throughput Illumina sequencing. *Mol Biol Rep*. 2015;42: 569-580. doi 10.1007/s11033-014-3802-5
- Dumanovic J., Nepovimova E., Natic M., Kuca K., Jacevic V. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. *Front Plant Sci*. 2021;11:552969. doi 10.3389/fpls.2020.552969
- Evers S.M., Knight T.M., Inouye D.W., Miller T.X., Salguero-Gómez R., Iler A.M., Compagnoni A. Lagged and dormant season climate better predict plant vital rates than climate during the growing season. *Glob Chang Biol*. 2021;27(9):1927-1941. doi 10.1111/gcb.15519
- Gabay G., Flaishman M.A. Genetic and molecular regulation of chilling requirements in pear: breeding for climate change resilience. *Front Plant Sci*. 2024;15:1347527. doi 10.3389/fpls.2024.1347527
- Hikmawanti N., Fatmawati S., Asri A.W. The effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) leaves extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;755:012060. doi 10.1088/1755-1315/755/1/012060
- Hussain S., Liu G., Liu D., Ahmed M., Hussain N., Teng Y. Study on the expression of dehydrin genes and activities of antioxidative enzymes in floral buds of two sand pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cultivars requiring different chilling hours for bud break. *Turk J Agric For*. 2015;39(6):930-939. doi 10.3906/tar-1407-164
- Lee J.C., Park Y.S., Jeong H.N., Kim J.H., Heo J.Y. Temperature changes affected spring phenology and fruit quality of apples grown in high-latitude region of South Korea. *Horticultrae*. 2023;9(7): 794. doi 10.3390/horticultrae9070794
- Li Y., Zhang J., Wang S., Zhang H., Liu Y., Yang M. Integrative transcriptomic and metabolomic analyses reveal the flavonoid biosynthesis of *Pyrus hopeiensis* flowers under cold stress. *Hortic Plant J*. 2023;9(3):395-413. doi 10.1016/j.hpj.2022.11.004
- Lin S., Li Y., Zhao J., Guo W., Jiang M., Li X., Liu W., Zhang J., Yang M. Transcriptome analysis of biochemistry responses to low-temperature stress in the flower organs of five pear varieties. *Forests*. 2023;14(3):490. doi 10.3390/f14030490
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi 10.1006/meth.2001.1262
- Nham N.T., Macnish A.J., Zakharov F., Mitcham E.J. ‘Bartlett’ pear fruit (*Pyrus communis* L.) ripening regulation by low temperatures involves genes associated with jasmonic acid, cold response, and transcription factors. *Plant Sci*. 2017;260:8-18. doi 10.1016/j.plantsci.2017.03.008
- Queiroz C., da Silva A.J.R., Lopes M.L.M., Fialho E., Valente-Mesquita V.L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. *Food Chem*. 2011;125(1):128-132. doi 10.1016/j.foodchem.2010.08.048
- Şahin Ö., Dumanoglu H., Sarikamis G., Javadisaber J., Ergül A., Aydemir B.Ç. Tolerance of *Pyrus* spp. and *Cydonia oblonga* as pear rootstocks to iron chlorosis determined by in vitro growth, antioxidant and molecular responses. *Sci Hortic*. 2022;296:110911. doi 10.1016/j.scienta.2022.110911
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*. 2012;35(2):259-270. doi 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x
- Trembl L., Mejkal K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15(4):720-738. doi 10.1111/1541-4337.12204
- Wei Z., Gao T., Liang B., Zhao Q., Ma F., Li C. Effects of exogenous melatonin on methyl viologen-mediated oxidative stress in apple leaf. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):316. doi 10.3390/ijms19010316
- Xiao L.J., Asseng S., Wang X.T., Xia J.X., Zhang P., Liu L.L., Tang L., Cao W., Zhu Y., Liu B. Simulating the effects of low-temperature stress on wheat biomass growth and yield. *Agric For Meteorol*. 2022;326:109191. doi 10.1016/j.agrformet.2022.109191
- Yang T., Huang X.-S. Deep sequencing-based characterization of transcriptome of *Pyrus ussuriensis* in response to cold stress. *Gene*. 2018;661:109-118. doi 10.1016/j.gene.2018.03.067
- Zhai R., Liu J., Liu F., Zhao Y., Liu L., Fang C., Wang H., Li X., Wang Z., Ma F., Xu L. Melatonin limited ethylene production, softening and reduced physiology disorder in pear (*Pyrus communis* L.) fruit during senescence. *Postharvest Biol Technol*. 2018;139:38-46. doi 10.1016/j.postharvbio.2018.01.017
- Zhang S. Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules*. 2023;28(5):2158. doi 10.3390/molecules28052158
- Zhang Y., Wu L., Liu L., Jia B., Ye Z., Tang X., Heng W., Liu L. Functional analysis of *PbbZIP11* transcription factor in response to cold stress in Arabidopsis and pear. *Plants*. 2023;13(1):24. doi 10.3390/plants13010024
- Zhao Y., Hu M.Y., Wang Q., Yan X.K., Lu M.Y., Wu C.H., Li H.Y., Zhang M.J. Climate variation and its influence on the cold tolerance and phenology periods of pear cultivars in Jilin, China. *Int J Fruit Sci*. 2023;23(1):165-180. doi 10.1080/15538362.2023.2249995

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.07.2025. После доработки 25.09.2025. Принята к публикации 11.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-45

Характеристика генов галактуронатредуктаз (*GalUR*) чеснока (*Allium sativum* L.) и изменение их экспрессии в ответ на абиотические стрессоры

М.А. Филюшин , Т.М. Середин, А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия michel7753@mail.ru

Аннотация. Помимо основного L-галактозного пути синтеза L-аскорбиновой кислоты (АсК) в растениях, известно три альтернативных пути. Один из них, D-галактуроновый, считается специфичным для тканей с избытком D-галактуроната – субстрата D-галактуронатредуктазы (*GalUR*), относящейся к семейству альдегидкеторедуктаз (*AKR*). В настоящей работе идентифицировано семейство генов *AKR* чеснока *Allium sativum* L. и определено семь генов, *AsGalUR1–7*, предположительно кодирующих ферменты *GalUR*. Охарактеризованы структура и филогения генов *AsGalUR1–7* и кодируемых ими белков, а также профиль экспрессии генов *AsGalUR* в различных органах растения чеснока (*in silico* и ПЦР-РБ). На основе полученных данных гены условно разделены на корневую (*AsGalUR1–4*) и листовую (*AsGalUR5–7*) группы по признаку наибольшей экспрессии в подземной и надземной частях растения соответственно. Проведен анализ экспрессии генов *AsGalUR* в листьях и корнях в ответ на воздействие засухи, солевого и холодового стрессоров, а также экзогенных фитогормонов (абсцизовая кислота, метилжасмонат), вкупе с измерением содержания АсК. Показано, что обработка гормонами подавляет экспрессию всех анализируемых генов в обоих типах органов. Холодовые условия в корнях стимулируют экспрессию корневых генов и подавляют – листовых и оказывают противоположный эффект в листьях. Осмотические стрессоры (NaCl, PEG) подавляют транскрипцию всех генов в листьях, но не меняют (NaCl) или стимулируют (PEG) ее в корнях, что сопровождается ростом накопления АсК. В листьях в стрессовых условиях выявлена положительная корреляция между экспрессией генов *AsGalUR1* и 4 и содержанием АсК. Полученные данные могут стать основой для дальнейшего изучения механизмов регуляции синтеза АсК у чеснока и других видов *Allium*.

Ключевые слова: чеснок; *Allium sativum* L.; биосинтез L-аскорбиновой кислоты; D-галактуроновый путь; D-галактуронатредуктаза; *GalUR*

Для цитирования: Филюшин М.А., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Характеристика генов галактуронатредуктаз (*GalUR*) чеснока (*Allium sativum* L.) и изменение их экспрессии в ответ на абиотические стрессоры. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(3):412-423. doi 10.18699/vjgb-26-45

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-76-10005; характеристика и анализ генов, экспрессионный анализ) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (анализ экспрессии на основе данных транскриптомного анализа).

Characteristics of galacturonate reductase (*GalUR*) genes in garlic (*Allium sativum* L.) and changes in their expression in response to abiotic stressors

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

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

 michel7753@mail.ru

Abstract. In plants, the synthesis of L-ascorbic acid (Aa), in addition to the main L-galactose pathway, is carried out by three known alternative pathways. One of them, the D-galacturonic acid pathway, is thought to be specific for tissues with excess D-galacturonate, the substrate of D-galacturonate reductase (*GalUR*), which belongs to the Aldo-Keto Reductase (*AKR*) superfamily. In this study, the *AKR* gene family of garlic *Allium sativum* L. was identified and seven genes, *AsGalUR1–7*, presumably encoding *GalUR* enzymes, were determined. The structure and phylogeny of the *AsGalUR1–7* genes and the proteins they encode, as well as the *AsGalUR1–7* expression pattern in different organs of the garlic plant (*in silico* and qRT-PCR), were characterized. Based on the obtained data, the genes were conditionally divided into root (*AsGalUR1–4*) and leaf (*AsGalUR5–7*) groups depending on the highest expression level in the underground and aboveground parts of the plant, respectively. The *AsGalUR* expression in leaves and roots was analyzed in response to drought, salt and cold stresses, as well as exogenous phytohormones (abscisic acid, methyl jasmonate), accompanied by

the AsA content measurement. It was shown that hormone treatment suppresses the expression of all analyzed genes in both organ types. Cold conditions stimulate the expression of root group genes and suppress that of leaf group genes in roots, and have the opposite effect in leaves. Osmotic stressors (NaCl, PEG) suppress the transcription of all genes in leaves, but do not change (NaCl) or stimulate (PEG) it in roots, which is accompanied by an increase in AsA accumulation in organs of both types. A positive correlation between the expression of the *AsGalUR1* and 4 genes and the AsA content is found in leaves under stress conditions. The data obtained can form the basis for further study of the mechanisms regulating AsA synthesis in garlic and other *Allium* species.

Key words: garlic; *Allium sativum* L.; L-ascorbic acid biosynthesis; D-galacturonic pathway; D-galacturonate reductase; GalUR

For citation: Filyushin M.A., Seredin T.M., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Characteristics of galacturonate reductase (*GalUR*) genes in garlic (*Allium sativum* L.) and changes in their expression in response to abiotic stressors. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):412-423. doi 10.18699/vjgb-26-45

Введение

L-аскорбиновая кислота (АсК, аскорбат) является одним из основных компонентов неферментативной антиоксидантной системы растений (Smirnoff, Wheeler, 2024). Необходимое количество аскорбата в клетках поддерживается путем баланса между биосинтезом, деградацией и рециклингом (восстановлением окисленных форм) АсК (Smirnoff, 2018), а также транспортом аскорбата. АсК синтезируется преимущественно в листьях (Franceschi, Tarlyn, 2002; Badejo et al., 2012) и доставляется по флоэме в различные части растения в виде стабильных и защищенных от окисления аскорбилгликозидов (Richardson et al., 2021; Huang et al., 2025).

У растений биосинтез АсК идет в основном по L-галактозному пути Смирнова–Уиллера. Однако имеются три альтернативных пути, D-галактурононовый, L-гулозный и мио-инозитоловый (Broad et al., 2020; Smirnoff, Wheeler, 2024), которые также вносят существенный вклад в накопление аскорбата в некоторых органах или на определенных стадиях развития растения. Например, для листьев земляники *Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier характерен L-галактозный путь, а для спелых ягод – D-галактурононовый (Agius et al., 2003; Cruz-Rus et al., 2011; Liu et al., 2022). Похожим образом листья и растущие плоды томата *Solanum lycopersicum* L. синтезируют АсК по L-галактозному пути, а спелые плоды – по D-галактурононовому пути (Badejo et al., 2012). Переход в спелых плодах от основного пути биосинтеза АсК к альтернативному варианту связывают с активной деградацией пектина клеточных стенок, образованного главным образом остатками галактурононовой кислоты и конвертацией его основного мономера, D-галактуроната, в АсК (Peltonen, Richard, 2022).

Среди альтернативных путей D-галактурононовый путь наиболее хорошо изучен. Он начинается, как говорилось выше, с разложения пектина, в результате которого образуется D-галактурононовая кислота, переходящая в D-галактуронат (D-GalUA) с последующим восстановлением до L-галактоната, катализируемым D-галактуронатредуктазой. L-галактонат с помощью альдонолактоназы превращается в L-галактоно-1,4-лактон, под действием L-галактозолактондегидрогеназы окисляющийся до АсК (Ishikawa et al., 2008; Peltonen, Richard, 2022).

Галактуронатредуктазы (EC 1.1.1.365; GalUR) структурно относятся к семейству альдегидкеторедуктаз (AKR)

(Duan et al., 2020), одно из 16 подсемейств которого, AKR4, включает белки AKR растительного происхождения (Penning, 2015). Количество генов *AKR*, идентифицированных у высших растений (Sengupta et al., 2015), значительно варьирует в зависимости от вида. Например, геном *Arabidopsis thaliana* L. содержит 22 гена *AKR*, *S. lycopersicum* – 25, а *F. × ananassa* – 80 генов (Duan et al., 2020; Liu et al., 2022), и функции их белковых продуктов не ограничиваются участием в синтезе АсК. AKR контролируют образование также других вторичных метаболитов и осмолитов растений, включая витамин B6, сорбитол, изофлавоны, фитоэстрогены и др. (Sengupta et al., 2015; Ha et al., 2019). Считается, что такая функциональная дифференциация белков AKR способна повысить эффективность адаптации растений к различным условиям окружающей среды, в том числе стрессовым воздействиям. Говоря о синтезе АсК, интересно отметить, что к семейству AKR относятся не только ферменты GalUR D-галактурононового пути, но и L-галактозодегидрогеназа (L-GalDH) основного L-галактозного пути (Vargas et al., 2022).

Чеснок (*Allium sativum* L.) – экономически значимая овощная культура с ежегодным производством около 30 млн т (FAO; <http://www.fao.org>). Содержание аскорбата в листьях и луковице активно изучается на различных сортах и образцах чеснока (Skoczylas et al., 2023; Šnirc et al., 2023; Pora et al., 2024; Yenealem et al., 2024). Однако данные о молекулярной регуляции метаболизма АсК в растениях *A. sativum* и не менее экономически ценных родственных видов *Allium* представлены результатами наших исследований. Так, в геноме *A. sativum* идентифицированы и охарактеризованы отдельные гены монодегидроаскорбатредуктаз (*MDHAR*) пути рециклинга аскорбата (Анисимова и др., 2022) и установлен характер изменения экспрессии генов биосинтеза и рециклинга АсК в ответ на заражение растений чеснока патогенным грибом *Fusarium proliferatum* (Щенникова и др., 2025). У лука-поррея (*Allium porrum* L.) определена вариабельность гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы *GGPI* L-галактозного пути (Анисимова и др., 2021a) и изучены возможные корреляции между содержанием АсК и уровнем экспрессии генов *MDHAR* (Анисимова и др., 2021b; Филюшин и др., 2021), а также некоторых других генов L-галактозного пути и рециклинга АсК (Филюшин и др., 2025).

Целью настоящей работы стали идентификация и характеристика генов D-галактуронатредуктаз (*GalUR*) в

геноме чеснока *A. sativum* и определение профилей их экспрессии в различных органах растения, а также в ответ на воздействие абиотических стрессовых факторов и экзогенную обработку фитогормонами.

Материалы и методы

Идентификация и структурная характеристика генов *AsGalUR* чеснока. Поиск последовательностей генов галактуронатредуктаз проводили в геномных и транскриптомных данных чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao (PRJNA606385, сборка Garlic.V2.fa), доступных в базе данных AlliumDB (<https://allium.qau.edu.cn/>). В качестве референса использовали последовательности галактуронатредуктаз томата (LOC101256763 и LOC101250974 (=SLAKR4B)) (Suekawa et al., 2016) и земляники (*FaGalUR*; AF039182.1) (Agius et al., 2003).

Выравнивание и анализ последовательностей выполняли в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для белковых последовательностей *AsGalUR* определяли: консервативные домены и мотивы (NCBI-CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; MEME 5.5.7, <http://meme-suite.org/tools/meme>), молекулярный вес (Mw) и изоэлектрическую точку (pI) (ExPASy, <https://web.expasy.org/protparam/>), молекулярную функцию и клеточную локализацию в терминах Gene Ontology (GO, PANNZER, <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/sanspanz/>). Филогенетический анализ выполняли с использованием последовательностей AKR *A. sativum*, *S. lycopersicum* и *A. thaliana* (MEGA 7.0, метод ближайших соседей (Neighbor-Joining), бутстрэп на основе 1000 повторений).

Анализ профиля экспрессии генов *AsGalUR* в различных органах растения чеснока. Профиль экспрессии идентифицированных генов *AsGalUR* в органах чеснока определяли двумя способами – *in silico* и методом ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени (ПЦР-РВ).

In silico анализ экспрессии генов *AsGalUR* осуществляли на основе секвенированных транскриптомов различных органов растения чеснока сорта Ershuizao (корни, листья, стебли, проростки, бутоны, цветки, луковичы на стадиях развития 1–8) (Sun et al., 2020). Данные визуализировали в виде тепловой карты (Heatmapper, <http://www.heatmapper.ca/expression/>), где уровень экспрессии выражали в значениях FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads – фрагменты на килобазу транскриптов на миллион картированных прочтений).

С помощью ПЦР-РВ определяли экспрессию генов *AsGalUR* в корнях, донце, луковиче, ложном стебле и листьях растений чеснока сорта Скорпион, выращенных в почве в условиях теплицы (ЭУИК, ФИЦ биотехнологии РАН; фотопериод 16 ч (световая фаза с 8:00); день/ночь – 22/16 °C; освещенность 190 мкМ/(м²с)). Растительный материал растирали в жидком азоте и применяли для выделения суммарной РНК с очисткой от примесей ДНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; QIAGEN, Германия) и синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США).

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения ПЦР-РВ

Ген	Последовательность праймеров (5'→3')
<i>AsGalUR1</i>	TGCCATCCGAAGGAGTCTTGT AGCATTTGGCACTCCTCCATC
<i>AsGalUR2</i>	TGCCATCCGAAGGAGTCTTGT AGCATTTGGCACTCCTCCATC
<i>AsGalUR3</i>	GAGGAGTGCCAAATGCTTGGAT CGTCCACCCAAAGGAGAGTG
<i>AsGalUR4</i>	GTGTAACGATGCCATCCTGAT CTACTGGAAATGGGTGTGATCC
<i>AsGalUR5</i>	CTGCTGTTAATCAGGTGGAGT ACACTTCCCCACGGAGCTC
<i>AsGalUR6</i>	CTGCTGTTAATCAGGTGGAGC ACACTTCCCCACGGAGCTC
<i>AsGalUR7</i>	TCGGTGTGAGCAATTCTCATC ACACTTCCCCACGGAGCTC
<i>GAPDH</i>	CCATGTTTGTGTTGGTGTGAATGAG TGGTGCAGCTAGCGTTGGAGAC
<i>UBQ</i>	AAGCCAAGATACAGGACAAG GCATACCACCTCTCAATCTC

На основе идентифицированных последовательностей *AsGalUR* были разработаны специфичные праймеры для ПЦР-РВ (табл. 1). В качестве референсных генов были гены *GAPDH* (MZ171220.1) и *UBQ* (MZ171222.1). Реакционная смесь включала 3 нг кДНК и набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX» (ООО «Синтол», Россия). Реакцию проводили в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) в двух биологических и шести технических повторах в следующих условиях: 95 °C – 5 мин; 40 циклов (95 °C – 15 с; 62 °C – 50 с). Данные статистически обрабатывали, используя односторонний дисперсионный анализ (One-Way ANOVA) с поправкой Бонферрони (multiple comparisons, corrected with Bonferroni test) и визуализировали в программе GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

Анализ динамики экспрессии генов *AsGalUR* в проростках чеснока при воздействии различных стрессоров (засуха, засоление, холод) и экзогенных фитогормонов. Растения чеснока сорта Скорпион выращивали до получения 15-дневных проростков в прозрачных стеклянных стаканах в воде; зубки чеснока закрепляли в пористой полиэтиленовой подложке так, чтобы только нижняя часть зубка (зона корней) находилась в воде. В 9:00 и 15:00 световой фазы роста собирали пробы листьев и корней (хранили при –80 °C) для последующего анализа (ПЦР-РВ) экспрессии генов *AsGalUR*.

Для создания стрессовых условий опытные растения на 24 ч перемещали в соответствующие водные растворы (100 мМ NaCl – засоление; 10 % PEG-6000 – засуха; 100 мкМ абсцизовой кислоты (АБК); 100 мкМ метил-

жасмоната (MeJA)). Контрольные растения оставляли в воде. Для холодового воздействия опытные растения помещали в климатическую камеру (4 °C, без освещения), параллельно выдерживая контроль в темноте при 22 °C. Через 6 и 24 ч воздействия стрессора/гормона у растений опытной и контрольной групп отбирали корни и листья (хранили при –80 °C).

Собранный растительный материал растирали в жидком азоте и применяли для получения препаратов РНК/кДНК и проведения ПЦР-РВ, как описано выше.

Определение содержания аскорбата в тканях растения. Содержание (мг/г сырого веса) АсК измеряли в корнях и листьях растений чеснока, подвергнутых стрессовым воздействиям и обработке фитогормонами. Анализ выполняли с помощью набора “L-Ascorbic acid” (R-Biopharm AG, Германия) с регистрацией спектров поглощения на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия). С использованием программы GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>) осуществляли регрессионный анализ данных (поиск корреляций между уровнем экспрессии генов галактуронатредуктаз и содержанием аскорбата).

Результаты

Идентификация и структурная характеристика генов галактуронатредуктаз чеснока

В геноме *A. sativum* было идентифицировано 27 генов, кодирующих белки семейства AKR, из которых 7 гомологичны GalUR *S. lycopersicum* (LOC101256763 и LOC101250974) и *F. × ananassa* (AF039182.1) и аннотировались в AlliumDB как “KEGG pathway: D-galacturonate reductase”. Эти семь генов чеснока были пронумерованы *AsGalUR1–7* в порядке их локализации на хромосомах 5, 6 и 7. Гены различались количеством экзонов – 3 (*AsGalUR5–7*) или 4 (*AsGalUR1–4*) и размерами – от 1105 п. н. (*AsGalUR5*) до 4085 п. н. (*AsGalUR7*). По длине кодирующей последовательности (CDS) и предсказанным физико-химическим свойствам кодируемых белков гены были сходными (табл. 2).

Для построения филогенетической дендрограммы были использованы аминокислотные последовательно-

сти всех 27 идентифицированных AKR *A. sativum* в сравнении с гомологами AKR *S. lycopersicum* и *A. thaliana*. На полученной дендрограмме белки разделились на два подсемейства, AKR4A и AKR4B (рис. 1). Последовательности *AsGalUR1–7* формировали отдельную кладу внутри AKR4A, разделившись на субклады I (*AsGalUR1–4*) и II (*AsGalUR5–7*). Первые (I) оказались гомологами галактуронатредуктаз *A. thaliana* (AT1G59950 и AT1G59960 (Duan et al., 2020)), *S. lycopersicum* SLAKR4B (LOC101250974 (Suekawa et al., 2016)) и неохарактеризованного белка *S. lycopersicum* AKR (LOC101254364). Вторые (II) объединились с *S. lycopersicum* GalUR (LOC101256763 (Suekawa et al., 2016)) (см. рис. 1). Гомология последовательностей *AsGalUR* внутри субклад достигала 86–99 % (I) и 89–95 % (II), а между субкладами I и II – 48–52 %.

В белковых последовательностях *AsGalUR1–7* (в сравнении с гомологами из *S. lycopersicum*, *Vitis vinifera* L., *F. × ananassa* и *A. thaliana*) было определено положение консервативного AKR-домена PF00248.18, а также в соответствии с (Suekawa et al., 2016) идентифицировано 10 функционально важных остатков аминокислот (ао), включая сайты связывания растительных AKR с кофакторами (рис. 2).

В тех же белках установлены консервативные мотивы (рис. 3). Состав и положение мотивов были сходными внутри группы анализируемых белков, за исключением несколько различающихся С-концевых консенсусов, что связано с вариабельностью внедоменной области. Так, у отдельных белков отсутствовали мотивы 7 (AT1G59950 и AT1G59960), 8 (SL_LOC101256763, FaGalUR и VvGalUR) или оба мотива (*AsGalUR2*).

Проведенный анализ последовательностей *AsGalUR1–7* в PANNZER предсказал, что все семь белков обладают оксидоредуктазной активностью (GO:0016616) и локализованы в цитозоле (GO:0005829).

Определение профиля экспрессии генов *AsGalUR1–7* в растениях чеснока

На основе данных транскриптомного анализа *A. sativum* сорта Ershuizao (Sun et al., 2020) были определены профили экспрессии генов *AsGalUR1–7* в различных органах чеснока (включая стадии 1–8 роста и развития луковицы)

Таблица 2. Характеристика генов *AsGalUR*

Ген	ID гена/ID транскрипта	Локализация в геноме	Длина гена, п. н.	Кол-во экзонов	CDS, п. н.	Белок, ао	Mw, кДа	pI
<i>AsGalUR1</i>	Asa5G02985/ Asa3G05397.1	chr5: 764719171..764720824	1654	4	945	314	35.0	5.73
<i>AsGalUR2</i>	Asa5G05896/ Asa5G00222.1	chr5: 1607364860..1607366708	1849	4	969	322	36.2	5.48
<i>AsGalUR3</i>	Asa6G06508/ Asa1G06086.1	chr6: 1808233236..1808234881	1646	4	945	314	35.1	5.73
<i>AsGalUR4</i>	Asa6G06509/ Asa1G06085.1	chr6: 1808295357..1808297099	1743	4	951	316	35.5	5.21
<i>AsGalUR5</i>	Asa7G05242.1/ Asa5G04903.1	chr7: 1457744393..1457745497	1105	3	963	320	36.1	6.39
<i>AsGalUR6</i>	Asa7G05243.1/ Asa5G04902.1	chr7: 1457746950..1457748486	1537	3	975	324	36.7	5.96
<i>AsGalUR7</i>	Asa7G05244.1/ Asa4G05086.1	chr7: 1458214446..1458218530	4085	3	963	320	36.1	6.18

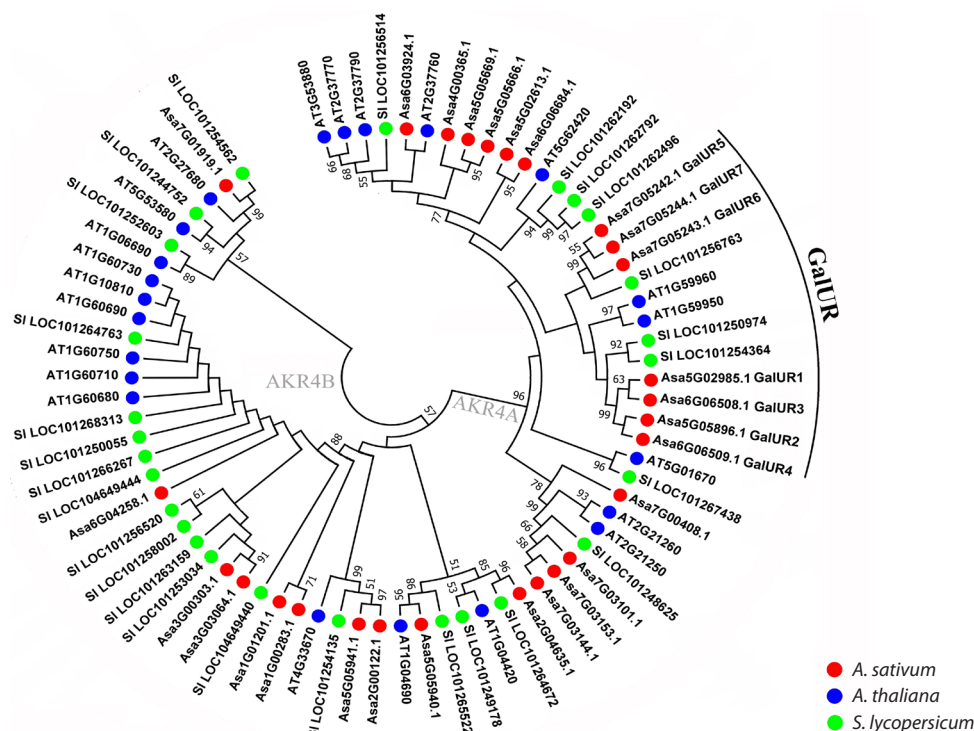


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей белков семейства AKR из геномов чеснока (*A. sativum*), резуховидки Тяля (*A. thaliana*) и томата (*S. lycopersicum*) (MEGA 7.0, метод Neighbor-Joining, 1000 бутстрэп-реплик, значимые значения бутстрэп (%) указаны в основании ветвей).

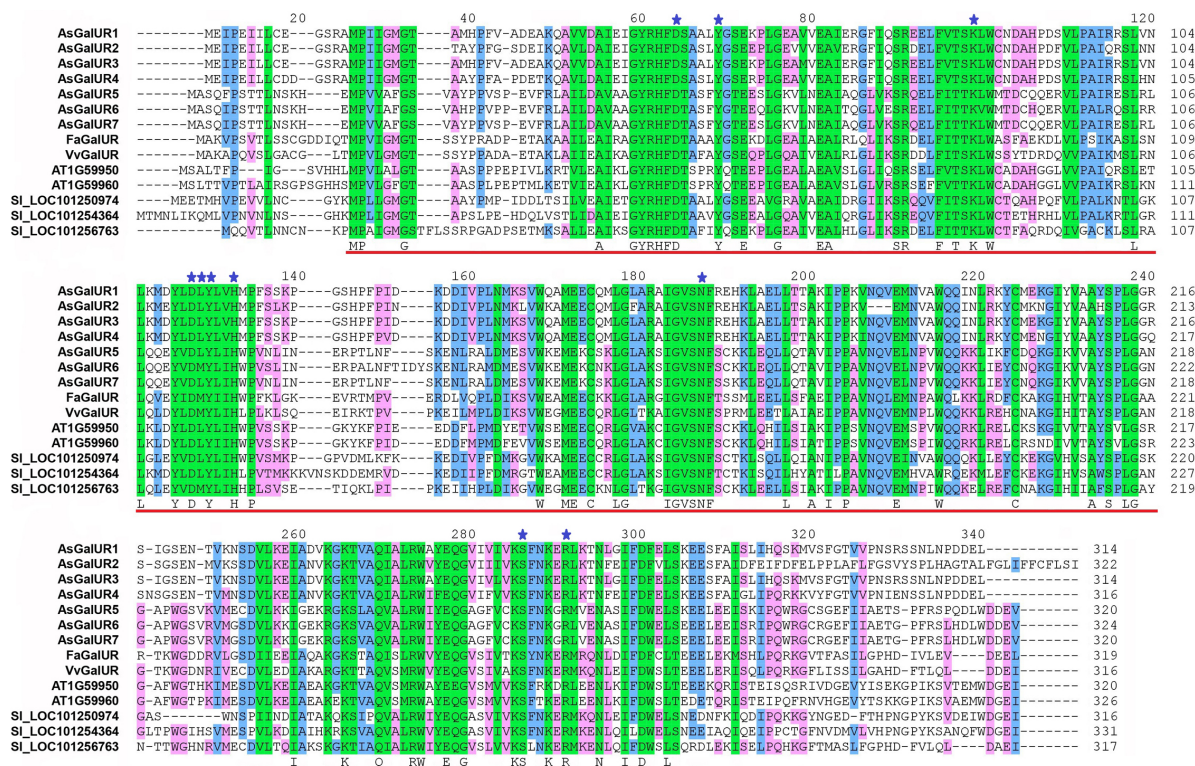


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей галактуронатредуктаз *A. sativum* (As), *F. x ananassa* (Fa), *V. vinifera* (Vv), *A. thaliana* (AT) и *S. lycopersicum* (Sl).

Цвет фона соответствует уровню консервативности аминокислот у анализируемых белков (зеленый – 100 %, голубой – 80 %, розовый – 60 %). Красным подчеркиванием отмечено положение AKR-домена PF00248.18. Синими звездочками обозначены активные сайты и сайты связывания растительных AKR с кофакторами, в соответствии с (Suekawa et al., 2016).

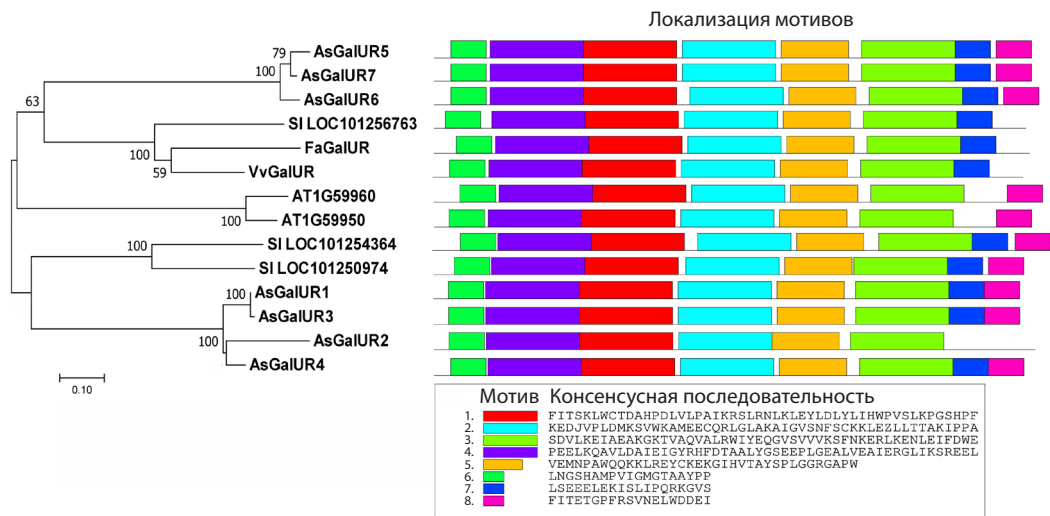


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения и сравнительное профилирование консервативных мотивов галактуронатредуктаз *A. sativum* (As), *F. × ananassa* (Fa), *V. vinifera* (Vv), *A. thaliana* (AT) и *S. lycopersicum* (SI).



Рис. 4. Тепловая карта экспрессии *AsGalUR1–7* в различных органах чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao на основе транскриптомных данных (Sun et al., 2020). Цифрами в прямоугольниках указаны средние значения FPKM по трем биологическим повторам. Для луковиц приведены стадии развития 1–8, соответствующие возрасту 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дней.

(рис. 4). Выявлено, что гены *AsGalUR1*, 3 и 4 (субклада I) экспрессируются во всех анализируемых органах с наиболее высокими уровнями в корнях (все три гена), листьях (*AsGalUR3* и 4), стеблях (*AsGalUR1* и 3) и бутонах (*AsGalUR1*). Транскрипты четвертого гена субклады I – *AsGalUR2* в анализируемых органах отсутствовали.

Транскрипты генов субклады II *AsGalUR5–7* присутствовали преимущественно в надземных органах (кроме цветков) с максимумом в проростках (все три гена). *AsGalUR5* и 7 (но не *AsGalUR6*) также высоко экспрессировались в листьях, стеблях и бутонах. В луковицах и корнях уровень экспрессии генов *AsGalUR5–7* был низким относительно надземной части растения.

В целом по предпочтительному профилю экспрессии (см. рис. 4) гены были условно отнесены к корневой (*AsGalUR1*, 3 и 4, несмотря на значимое количество транскриптов, в том числе в листьях/стеблях) и листовой (*AsGalUR5–7*) группам, что соответствовало их распределению по филогенетическим субкладам I и II (см. рис. 1).

Исключение составил ген *AsGalUR2* субклады I (см. рис. 1), для которого не выявлена экспрессия в органах чеснока (см. рис. 4).

В органах растений чеснока сорта Скорпион профили экспрессии генов *AsGalUR1–7* определены методом ПЦР-ПВ (рис. 5). В отличие от транскриптомных данных (см. рис. 4), везде были детектированы транскрипты гена *AsGalUR2*, тогда как *AsGalUR6*, напротив, не экспрессировался. Гены субклады I (*AsGalUR1–4*) экспрессировались во всех анализируемых органах, с максимумом в корнях и донце. Транскрипты генов субклады II (*AsGalUR5* и *AsGalUR7*) выявлены только в листьях (максимум) и ложном стебле (см. рис. 5).

Таким образом, результаты ПЦР-ПВ (см. рис. 5) внесли коррективы в *in silico* профиль экспрессии генов *AsGalUR2* и 6 (см. рис. 4) и подтвердили возможность разделения генов субклад I и II на гены с преимущественной экспрессией в подземной (I) и надземной (II) частях растения.

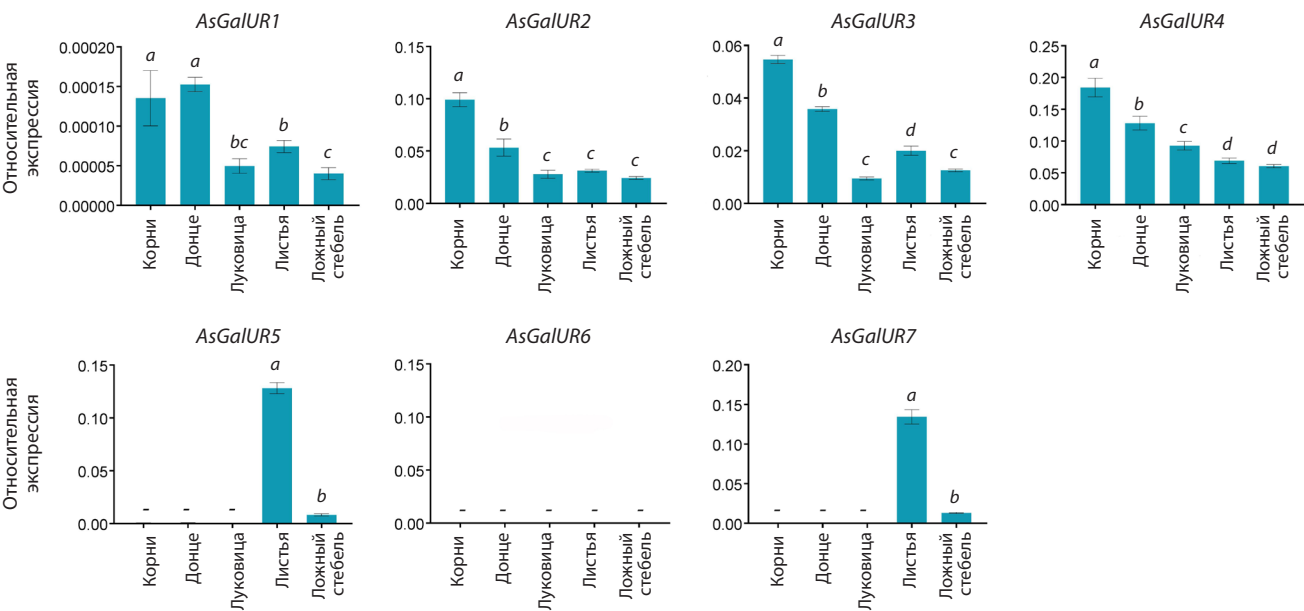


Рис. 5. Профиль экспрессии (ПЦР-PB) генов *AsGalUR1–7* в растениях чеснока сорта Скорпион. Значимые различия уровня экспрессии гена между разными органами при $a-d$ $p < 0.05$.

Определение профиля экспрессии генов *AsGalUR1–7* в проростках чеснока: 6-часовая динамика в световой фазе роста растения и реакция на стрессовые воздействия и экзогенные фитогормоны

Профиль экспрессии генов *AsGalUR1–5* и 7 был определен в корнях и листьях 15-дневных проростков чеснока сорта Скорпион в двух временных точках (9:00 и 15:00) световой фазы роста (рис. 6). Подтверждено, что гены корневой субклады I (*AsGalUR1–4*) наиболее активны в корнях, а гены листовой субклады II (*AsGalUR5* и 7) – в листьях. Причем в течение 6 ч световой фазы роста растений уровень экспрессии генов менялся незначительно, сохраняя органоспецифичность. Интересно, что транскрипты «листных» генов *AsGalUR5* и *AsGalUR7*, которые у взрослых растений присутствовали только в надземных органах (см. рис. 5), в проростках обнаружены также в корнях, хотя и с существенно более низким (в 20–25 раз) уровнем экспрессии, чем в листьях (см. рис. 6).

Для определения вовлеченности галактуронатредуктаз в стрессовый ответ растений чеснока 15-дневные проростки сорта Скорпион были подвергнуты воздействию различных стрессоров: засоление, засуха, похолодание, экзогенные фитогормоны АБК и MeJA. Через 6 и 24 ч воздействия в корнях и листьях растений была проанализирована экспрессия генов *AsGalUR1–5* и 7 (рис. 7).

В случае корней показано, что избыток NaCl не меняет (*AsGalUR1*, 3–5 и 7) или подавляет (*AsGalUR2*, 6 ч в стрессовых условиях) экспрессию генов. Обезвоживание (PEG) значительно стимулировало (в 1.5–9.3 раза) экспрессию генов в обеих временных точках, за исключением *AsGalUR7*, уровень транскриптов которого через 24 ч приблизился к контрольным значениям. Шесть часов холодового воздействия повлияли на отдельные гены, снизив (*AsGalUR3*, 4 и 5) или повысив (*AsGalUR7*) их экс-

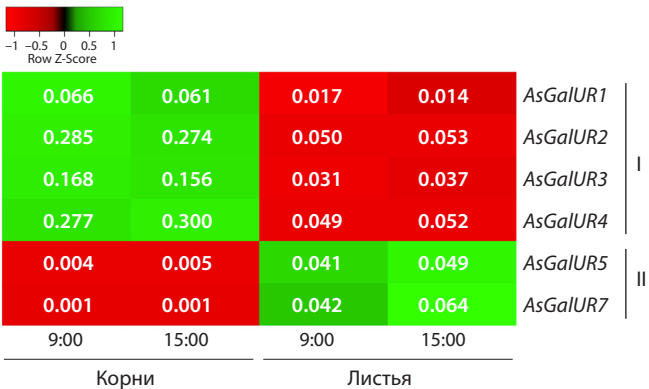


Рис. 6. Тепловая карта экспрессии (по результатам ПЦР-PB) генов *AsGalUR1–5* и 7 в корнях и листьях 15-дневных растений чеснока сорта Скорпион в двух временных точках световой фазы роста растения: 9:00 и 15:00. Цифрами указаны средние значения уровней экспрессии генов *AsGalUR*, нормированные на экспрессию референсных генов *GAPDH* и *UBQ*.

прессию. Однако спустя 24 ч изменилась экспрессия уже всех генов, причем специфичным для субклад образом: она стала выше (*AsGalUR1–4*, субклада I) или ниже (*AsGalUR5* и 7, субклада II) контрольного уровня. Обработка фитогормонами значительно снизила экспрессию всех генов, в случае *AsGalUR5* и 7 – до нулевых значений (см. рис. 7, а).

В листьях 6 ч воздействия солевого стрессора стимулировали экспрессию *AsGalUR7* (в 1.5 раза), а 24 ч – подавляли активность всех генов, кроме *AsGalUR2*. Шесть часов засухи не меняли экспрессию генов (*AsGalUR5* и 7) или приводили к снижению (*AsGalUR1–4*); через 24 ч уровень транскриптов *AsGalUR1–5* и 7 снизился в 2.5–3.4 раза. В ответ на 6 ч холодовых условий экспрессия генов по-

а	1.00	0.86	1.21	1.64	2.33	0.92	2.61	0.84	0.58	0.49	0.51	<i>AsGalUR1</i>
	1.00	0.75	1.04	1.52	2.02	0.79	1.66	0.57	0.60	0.53	0.40	<i>AsGalUR2</i>
	1.00	0.85	1.24	1.48	2.01	0.78	1.31	0.46	0.54	0.53	0.41	<i>AsGalUR3</i>
	1.00	0.93	1.07	2.42	2.43	0.81	1.30	0.66	0.74	0.64	0.44	<i>AsGalUR4</i>
	1.00	0.86	0.87	9.30	2.76	0.38	0.53	0.26	0.00	0.15	0.34	<i>AsGalUR5</i>
	1.00	0.95	0.81	2.48	1.15	2.10	0.80	0.46	0.00	0.00	0.41	<i>AsGalUR7</i>
б	1.00	1.03	0.85	0.65	0.38	1.12	2.09	0.86	0.51	0.83	0.49	<i>AsGalUR1</i>
	1.00	1.09	0.97	0.75	0.38	1.25	1.05	0.94	0.61	1.05	0.67	<i>AsGalUR2</i>
	1.00	1.01	0.76	0.63	0.29	0.45	1.57	0.83	0.47	0.86	0.41	<i>AsGalUR3</i>
	1.00	0.90	0.80	0.60	0.40	1.06	0.78	0.82	0.52	0.78	0.61	<i>AsGalUR4</i>
	1.00	1.21	0.72	1.23	0.48	4.17	1.27	0.91	0.54	0.76	0.82	<i>AsGalUR5</i>
	1.00	1.46	0.65	1.01	0.39	3.64	1.10	0.94	0.48	0.69	0.63	<i>AsGalUR7</i>
в	1.00	0.94	0.91	1.48	1.31	1.21	1.16	1.17	0.89	1.18	1.09	Корни
	1.00	1.27	0.88	1.46	0.96	1.36	1.13	1.02	0.97	1.02	0.91	Листья
Контроль 6 ч 24 ч 6 ч 24 ч 6 ч 24 ч 6 ч 24 ч 6 ч 24 ч NaCl PEG Холод ABA MeJA												

Рис. 7. Динамика экспрессии генов *AsGalUR* в корнях (а) и листьях (б) проростков чеснока в ответ на абиотические стрессоры (засоление, 100 мМ NaCl; засуха, 10 % PEG-6000; холодовой стресс, 4 °C) и экзогенные фитогормоны (100 мкМ АБК; 100 мкМ MeJA). Изменение содержания АсК (в) в корнях и листьях тех же проростков чеснока в ответ на абиотические стрессоры и фитогормоны.

Значимо ($p < 0.05$) отличающиеся от контроля значения выделены полужирным шрифтом. Градиентная окраска ячеек от красного к зеленому соответствует изменению уровня экспрессии гена в сторону снижения (оттенки красного) или повышения (оттенки зеленого) по отношению к контролю (желтый цвет).

высилась (*AsGalUR5* и 7), снизилась (*AsGalUR3*) или не изменилась (*AsGalUR1*, 2 и 4); 24 ч воздействия привели к увеличению экспрессии *AsGalUR1*, 3 и 5. Обработка АБК и MeJA так же, как и в корнях, негативно повлияла на экспрессию генов *AsGalUR1–5* и 7 (см. рис. 7, б).

В проростках чеснока, подвергнутых воздействиям стрессовых факторов и экзогенных фитогормонов, было определено содержание аскорбата, которое в корнях и листьях составило 1.4–2.2 и 12.1–24.3 мг/100 г соответственно (см. рис. 7, в). В ответ на засуху (PEG) в корнях обнаружено увеличение содержания АсК в обеих временных точках (6 и 24 ч стресса), тогда как другие стрессоры и фитогормоны не повлияли на количество аскорбата. В листьях наблюдалось повышенное накопление аскорбата через 6 ч воздействия NaCl, засухи и холодового стрессора, однако через 24 ч содержание АсК вернулось к контрольным значениям (см. рис. 7, в).

Проведенный корреляционный анализ выявил значимую ($p < 0.05$) взаимосвязь между содержанием аскорбата в листьях проростков чеснока и уровнем экспрессии генов *AsGalUR1* (коэффициент корреляции $r = 0.63$) и *AsGalUR4* ($r = 0.66$) в стрессовых условиях.

Обсуждение

D-галактуроновый путь биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях впервые открыт в 1950-х годах, и тогда же обнаружен фермент D-галактуронатредуктаза,

катализирующий восстановление метилового эфира D-галактуроновой кислоты до L-галактоновой кислоты (Ishewood, Mapson, 1956), преобразуемой в несколько этапов в АсК (Ishikawa et al., 2008; Peltonen, Richard, 2022). В 2003 г. клонирован первый ген семейства *GalUR*, кодирующий D-галактуронатредуктазу, у земляники *F. × ananassa* (*FaGalUR*), в спелых ягодах которой аскорбат синтезируется преимущественно по D-галактуроновому пути (Agius et al., 2003; Cruz-Rus et al., 2011).

В данной работе в геноме чеснока *A. sativum* впервые идентифицировано генное семейство *AKR4* (см. рис. 1), подсемейство *AKR4A* которого включает гены *GalUR* растений. Семнадцать из 27 обнаруженных генов *AsAKR* входило в подсемейство *AKR4A*, что согласовалось с более высоким количеством генов *AKR4A* в сравнении с *AKR4B* у высших растений (Duan et al., 2020). Семь генов группы *AKR4A*, *AsGalUR1–7* (см. рис. 1 и табл. 2), кодировали гомологи известных белков GalUR *S. lycopersicum* (Suekawa et al., 2016), *A. thaliana* (Duan et al., 2020) и *F. × ananassa* (Agius et al., 2003).

На основании структурной гомологии сделано предположение, что *AsGalUR1–7* могут выполнять функции D-галактуронатредуктаз в растениях чеснока. Присутствие в последовательностях всех белков *AsGalUR1–7*, характерных для AKR функционально важных сайтов и консервативного домена (см. рис. 2), в совокупности с результатами GO-анализа также свидетельствовало о

наличии у *AsGalUR1–7* свойственной АКР оксидоредуктазной активности при локализации в цитозоле клетки. Предсказанная локализация *AsGalUR1–7* согласовалась с тем, что двухстадийный переход D-галактуроната в L-галактоно-1,4-лактон с участием *GalUR* происходит именно в цитозоле (Smirnov et al., 2001).

Уже по количеству экзонов гены разделились на две группы: *AsGalUR1–4* (4 экзона) и *AsGalUR5–7* (3 экзона) (см. табл. 2), что позволило предположить существование функциональных различий между ними, связанных, возможно, со специфичностью экспрессии для отдельных органов/тканей/стадий развития и/или с адаптивными реакциями растения чеснока. Разделение подтвердилось при филогенетическом анализе. На дендрограмме *AsGalUR1–7* сформировали две субклады – I (*AsGalUR1–4*) и II (*AsGalUR5–7*) (см. рис. 1), хотя набор консервативных мотивов у белков выглядел одинаково, за исключением С-концевой части *AsGalUR2* (см. рис. 3). Особенности С-концевой последовательности *AsGalUR2* могут свидетельствовать о наличии у данного белка индивидуальных функциональных особенностей, но не отменяют его участия в синтезе АсК. Разное количество генов *GalUR* субклад I и II у *A. sativum* и, к примеру, *S. lycopersicum*, *A. thaliana* или *Brassica rapa* L. (Duan et al., 2020) (см. рис. 1) предполагает появление предшественников данных генов до разделения классов однодольных и двудольных и дальнейшую видоспецифичную дупликационную эволюцию соответствующих генных семейств.

Как упоминалось выше, активация D-галактуроновой синтеза АсК как альтернативы основному L-галактозному пути происходит в спелых сочных плодах, что связывают с деградацией пектина клеточной стенки в мякоти с высвобождением D-галактуроната (субстрат для *GalUR*) (Cruz-Rus et al., 2011; Badejo et al., 2012). Растущие и зреющие плоды получают необходимое количество аскорбата за счет внутреннего синтеза по основному пути и транслокации АсК из листьев (Badejo et al., 2012). Размягчение созревших плодов сопровождается разрушением клеточных стенок. Также распадается пектин, который составляет ~35 % первичных стенок у двудольных и незлаковых однодольных (в том числе у чеснока) (Mohnen, 2008) и на ~70 % состоит из остатков галактуроновой кислоты (Mølhøj et al., 2004; Cruz-Rus et al., 2011; Badejo et al., 2012). Происходит значительное повышение количества субстрата для *GalUR*, что стимулирует в плодах переключение на альтернативный путь синтеза АсК (Peltonen, Richard, 2022).

Таким образом, для включения D-галактуроновой пути растению необходим D-галактуронат как субстрат для *GalUR* (Peltonen, Richard, 2022). Однако в вегетативных тканях, как и в растущих запасающих органах, данное соединение строго необходимо для синтеза пектина клеточной стенки, поскольку рост и развитие растения сопровождаются активным делением клеток (Mohnen, 2008). Тем не менее постоянное присутствие больших концентраций D-галактуроната в цитозоле клеток вегетативных тканей говорит о том, что и там может идти D-галактуроновый синтез АсК как минорное, малозаметное дополнение к

основному L-галактозному пути. Это косвенно подтверждается положительной корреляцией между содержанием АсК и уровнем экспрессии генов галактуронатредуктаз, обнаруженной в листьях *B. rapa* (Duan et al., 2020) и чайного куста (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) (Li et al., 2017).

В данной работе проанализирована экспрессия генов *AsGalUR1–7* в различных органах растения *A. sativum* сорта Ershuizao (*in silico*, по транскриптомам (Sun et al., 2020)) (см. рис. 4), а также в листьях и корнях (ПЦР-РВ) чеснока сорта Скорпион, в том числе в ответ на абиотические стрессоры и обработку экзогенными фитогормонами (см. рис. 5–7). Кроме вегетативных органов, в анализ *in silico* были включены образцы луковиц (как запасающего органа) на нескольких стадиях роста и созревания (Sun et al., 2020).

Проведенный анализ подтвердил, что группы генов *AsGalUR*, относящихся к субкладам I и II, различаются особенностями профиля экспрессии и, предположительно, функциональной специализацией. Так, уровень транскриптов генов *AsGalUR1–4* (I) оказался значительно выше в подземной части растения чеснока в сравнении с надземными органами; обратная картина наблюдалась для генов *AsGalUR5–7* (II) (см. рис. 4–6). Это предполагает органоспецифичное участие данных генов в D-галактуроновом пути; и гены субклад получили условное название корневых (*AsGalUR1–4*) и листовых (*AsGalUR5–7*). Некоторые вопросы остаются касательно генов *AsGalUR2* и 6, показавших разные результаты в зависимости от вида анализа, но в совокупности (см. рис. 4 и 5) они соответствуют особенностям своих групп, хотя и требуют дополнительного исследования. Далее мы опирались на результаты ПЦР-РВ, т. е. исключили из работы *AsGalUR6*.

Ожидается члены корневой группы *AsGalUR1–4* в луковице экспрессировались значительно выше листовых генов, однако каких-либо выраженных тенденций изменения уровня транскриптов в процессе приближения к стадии созревания не наблюдалось (см. рис. 4). Возможно, это связано с тем, что у сочных плодов и подземных корнеплодов по-разному определяется состояние полного созревания. Если у плодов биологическая спелость сопровождается размягчением мякоти (Badejo et al., 2012), то у корнеплодов она означает увеличение и вакуолизацию клеток с целью накопления питательных веществ и наступление физиологического покоя (Teper-Bamnolker et al., 2012). Размягчение тканей корнеплодов может быть признаком их выхода из покоя, увядания или гниения.

В согласии с тем, что 12 генов *GalUR* *B. rapa* демонстрируют очевидную дивергенцию экспрессии при различных стрессовых воздействиях (Duan et al., 2020), гены *AsGalUR1–5* и 7 в нашем исследовании также реагировали разнообразно и органозависимо как на абиотические стрессоры, так и на экзогенные фитогормоны АБК и MeJA (см. рис. 7, а, б). Несмотря на условное разделение генов на корневую и листовую группы, их экспрессия в ответ на воздействия в большинстве случаев менялась и в корнях, и в листьях (см. рис. 7, а, б). Это указывает на вовлеченность всех генов *AsGalUR1–5* и 7 в синтез АсК

по альтернативному пути при стрессовых воздействиях во всем растении, но с преимущественной специфичностью в подземной или надземной части.

Экзогенные фитогормоны подавляли экспрессию и тех, и других генов в обоих типах ткани (см. рис. 7, а, б), что согласуется с ролью АБК и MeJA как регуляторов роста растения и стимуляторов клеточного деления (Fattorini et al., 2009; Xie et al., 2020). К примеру, обработка гормонами ускоряет деление клеток, что требует повышенного синтеза пектина, уменьшает количество возможного субстрата для *GalUR* и, как следствие, снижает экспрессию генов *AsGalUR*. С другой стороны, показано, что экзогенная АБК стимулирует синтез АсК (Xu et al., 2022), однако это, скорее всего, относится к основному пути синтеза аскорбата. К тому же мы не наблюдали увеличения содержания аскорбата в ответ на фитогормоны (см. рис. 7, в), что может предполагать отсутствие влияния или отложенный стимулирующий эффект АБК на синтез АсК.

Ответ на абиотические стрессоры был более разнообразен (см. рис. 7, а, б). Основным отличием реакции условно корневых генов (*AsGalUR1–4*) от условно листовых генов (*AsGalUR5, 7*) стала противоположная динамика экспрессии при воздействии пониженной температуры. В корнях спустя 24 ч воздействия экспрессия корневых генов увеличивалась, а листовых – снижалась (см. рис. 7, а). В листьях, напротив, через 6 ч воздействия резко выросла экспрессия листовых *AsGalUR5, 7* и снизилась или не изменилась экспрессия корневых генов *AsGalUR1–4* (см. рис. 7, в). Это согласуется с положительной зависимостью холодостойкости растения от содержания АсК (Fu et al., 2023) и подчеркивает органоспецифичность увеличения активности генов *AsGalUR* в ответ на холод, приведшего к существенному (листья) или более слабому (корни) повышению содержания аскорбата (см. рис. 7, в).

Аскорбиновая кислота способствует устойчивости растений к засолению и засухе (Younis et al., 2010). В соответствии с этим экспрессия генов *AsGalUR* менялась в ответ на осмотические/ионные стрессоры (PEG, NaCl), и больший эффект наблюдался в корнях, что связано с особенностями создания стрессовых условий (корни погружены в раствор PEG или NaCl). Однако функциональных различий между листовыми и корневыми генами *AsGalUR* не обнаружено; в листьях уровень экспрессии всех генов снизился, а в корнях не изменился (NaCl) или повысился (PEG) (см. рис. 7, а, б), что сопровождалось ростом накопления АсК в тканях (см. рис. 7, в). Здесь же отметим, что корреляция между экспрессией гена и содержанием аскорбата в стрессовых условиях обнаружена только в листьях и только для генов *AsGalUR1* и *4*, отнесенных нами к корневой группе, что подтверждает условность функционального разделения генов *AsGalUR* при адаптационных ответах растения чеснока.

Полученные данные полностью согласуются с тем, что в стрессовых условиях в растении могут активироваться альтернативные пути синтеза аскорбата (Xu et al., 2012; Ruggieri et al., 2016). В частности, это может быть связано со снижением в ответ на стрессоры потока основного

L-галактозного пути синтеза (из-за активного вовлечения предшественника пути – D-глюкозы, в стрессовые реакции растения), что продемонстрировано при анализе мутантов *vtc1* и *vtc2* *A. thaliana* (Quiñones et al., 2024).

Заключение

В настоящей работе идентифицировано семейство генов *AKRA. sativum* и определено семь генов, *AsGalUR1–7*, предположительно кодирующих D-галактуронатредуктазы – ключевые ферменты альтернативного D-галактуронового пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты. Охарактеризованы структура и филогения генов и кодируемых белков, а также органоспецифичный профиль экспрессии генов *AsGalUR1–7*, на основе чего гены были условно разделены на корневую (*AsGalUR1–4*) и листовую (*AsGalUR5–7*) группы. Проведен анализ экспрессии генов в ответ на воздействие абиотических стрессовых факторов (засоление, засуха, холод) и экзогенных фитогормонов (АБК, MeJA), который выявил дополнительные функциональные особенности генов в определении стрессоустойчивости растения чеснока.

Список литературы / References

- Анисимова О.К., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филюшин М.А. Идентификация и полиморфизм гена ГДФ-Л-галактозофосфорилазы (*ApGGPI*) у сортов лука-порей. *Генетика*. 2021а;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*. 2021a;57(3): 311-318. doi 10.1134/S1022795421030030]
- Анисимова О.К., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филюшин М.А. Оценка содержания витамина С и экспрессии гена ГДФ-Л-галактозофосфорилазы (*VTCT*) у сортов лука-порей (*Allium porrum* L.). *Физиология растений*. 2021б;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 (*VTCT*) expression level in leek (*Allium porrum* L.) cultivars. *Russ J Plant Physiol*. 2021b;68(1):85-93. doi 10.1134/S1021443720060023]
- Анисимова О.К., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филюшин М.А. Идентификация генов монодегидроаскорбатредуктаз (*MDHAR*) чеснока (*Allium sativum* L.) и их участие в ответе на заражение *Fusarium proliferatum*. *Генетика*. 2022;58(7):754-764. doi 10.31857/S0016675822070037
- [Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Identification of monodehydroascorbate reductase (*MDHAR*) genes in garlic (*Allium sativum* L.) and their role in the response to *Fusarium proliferatum* infection. *Russ J Genet*. 2022;58(7):773-782. doi 10.1134/S1022795422070031]
- Филюшин 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]
- 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-порея (*Allium porrum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(2):200-209. doi 10.18699/vjgb-25-23
- [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 Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(2):200-209. doi 10.18699/vjgb-25-23]
- Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филлюшин М.А. Гены биосинтеза и рециклинга аскорбата вовлечены в ответные реакции растений чеснока *Allium sativum* L. на заражение *Fusarium proliferatum*. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2025; 520(1):117-121. doi 10.31857/S2686738925010191
- [Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Ascorbate biosynthesis and recycling genes are involved in the responses of garlic *Allium sativum* L. plants to *Fusarium proliferatum* infection. *Dokl Biochem Biophys*. 2025;520(1):49-52. doi 10.1134/S1607672924601057]
- Agües F., González-Lamothe R., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol*. 2003;21(2):177-181. doi 10.1038/nbt777
- Badejo A.A., Wada K., Gao Y., Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J Exp Bot*. 2012;63(1):229-239. doi 10.1093/jxb/err275
- 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(5):1790. doi 10.3390/ijms21051790
- Cruz-Rus E., Amaya I., Sánchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Valpuesta V. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *J Exp Bot*. 2011;62(12):4191-4201. doi 10.1093/jxb/err122
- Duan W., Huang Z., Li Y., Song X., Sun X., Jin C., Wang Y., Wang J. Molecular evolutionary and expression pattern analysis of *AKR* genes shed new light on *GalUR* functional characteristics in *Brassica rapa*. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):5987. doi 10.3390/ijms21175987
- Fattorini L., Falasca G., Kevers C., Rocca L.M., Zadra C., Altamura M.M. Adventitious rooting is enhanced by methyl jasmonate in tobacco thin cell layers. *Planta*. 2009;231(1):155-168. doi 10.1007/s00425-009-1035-y
- Franceschi V.R., Tarlyn N.M. L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol*. 2002;130(2):649-656. doi 10.1104/pp.007062
- Fu Q., Cao H., Wang L., Lei L., Di T., Ye Y., Ding C., Li N., Hao X., Zeng J., Yang Y., Wang X., Ye M., Huang J. Transcriptome analysis reveals that ascorbic acid treatment enhances the cold tolerance of tea plants through cell wall remodeling. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(12):10059. doi 10.3390/ijms241210059
- Ha J., Kang Y.G., Lee T., Kim M., Yoon M.Y., Lee E., Yang X., Kim D., Kim Y.J., Lee T.R., Kim M.Y., Lee S.H. Comprehensive RNA sequencing and co-expression network analysis to complete the biosynthetic pathway of coumestrol, a phytoestrogen. *Sci Rep*. 2019; 9(1):1934. doi 10.1038/s41598-018-38219-6
- Huang J., Wu H., Gao R., Wu L., Wang M., Chu Y., Shi Y., Xiang L., Yin Q. Integrated multi-omics analysis reveals glycosylation involving 2-O-β-D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid biosynthesis in *Lycium barbarum*. *Int J Mol Sci*. 2025;26(4):1558. doi 10.3390/ijms26041558
- Isherwood F.A., Mapson L.W. Biological synthesis of ascorbic acid: the conversion of derivatives of D-galacturonic acid into L-ascorbic acid by plant extracts. *Biochem J*. 1956;64(1):13-22. doi 10.1042/bj0640013
- Ishikawa T., Nishikawa H., Gao Y., Sawa Y., Shibata H., Yabuta Y., Maruta T., Shigeoka S. The pathway via D-galacturonate/L-galactonate is significant for ascorbate biosynthesis in *Euglena gracilis*: identification and functional characterization of aldonolactonase. *J Biol Chem*. 2008;283(45):31133-31141. doi 10.1074/jbc.M803930200
- Li H., Huang W., Wang G.L., Wang W.L., Cui X., Zhuang J. Transcriptomic analysis of the biosynthesis, recycling, and distribution of ascorbic acid during leaf development in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Sci Rep*. 2017;7:46212. doi 10.1038/srep46212
- Liu H., Wei L., Ni Y., Chang L., Dong J., Zhong C., Sun R., Li S., Xiong R., Wang G., Sun J., Zhang Y., Gao Y. Genome-wide analysis of ascorbic acid metabolism related genes in *Fragaria × ananassa* and its expression pattern analysis in strawberry fruits. *Front Plant Sci*. 2022;13:954505. doi 10.3389/fpls.2022.954505
- Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 2008;11(3):266-277. doi 10.1016/j.pbi.2008.03.006
- Møhlhøj M., Verma R., Reiter W.D. The biosynthesis of D-Galacturonate in plants. functional cloning and characterization of a membrane-anchored UDP-D-Glucuronate 4-epimerase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2004;135(3):1221-1230. doi 10.1104/pp.104.043745
- Peltonen K.E., Richard P. Identification of a D-galacturonate reductase efficiently using NADH as a cofactor. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2022; 35:e00744. doi 10.1016/j.btre.2022.e00744
- Penning T.M. The aldo-keto reductases (AKRs): overview. *Chem Biol Interact*. 2015;234:236-246. doi 10.1016/j.cbi.2014.09.024
- Popa P.-M., Băbeanu C., Cosmulescu S.-N. Evaluation of chemical compounds in local garlic genotypes from southwestern Romania. *Appl Sci*. 2024;14(16):6899. doi 10.3390/app14166899
- Quiñones C.O., Gesto-Borroto R., Wilson R.V., Hernández-Madrigal S.V., Lorence A. Alternative pathways leading to ascorbate biosynthesis in plants: lessons from the last 25 years. *J Exp Bot*. 2024;75(9):2644-2663. doi 10.1093/jxb/erae120
- Richardson A.T., McGhie T.K., Cordiner S.B., Stephens T.T.H., Larsen D.S., Laing W.A., Perry N.B. 2-O-β-d-Glucopyranosyl l-ascorbic acid, a stable form of vitamin C, is widespread in crop plants. *J Agric Food Chem*. 2021;69(3):966-973. doi 10.1021/acs.jafc.0c06330
- Ruggieri V., Bostan H., Barone A., Frusciante L., Chiusano M.L. Integrated bioinformatics to decipher the ascorbic acid metabolic network in tomato. *Plant Mol Biol*. 2016;91(4-5):397-412. doi 10.1007/s11103-016-0469-4
- Sengupta D., Naik D., Reddy A.R. Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: a structure-function update. *J Plant Physiol*. 2015;179:40-55. doi 10.1016/j.jplph.2015.03.004
- Skoczylas J., Jędrszczyk E., Dziadek K., Dacewicz E., Kopeć A. Basic chemical composition, antioxidant activity and selected polyphenolic compounds profile in garlic leaves and bulbs collected at various stages of development. *Molecules*. 2023;28(18):6653. doi 10.3390/molecules28186653
- Smirnov N. Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med*. 2018;22:116-129. doi 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033
- Smirnov N., Wheeler G.L. The ascorbate biosynthesis pathway in plants is known, but there is a way to go with understanding control and functions. *J Exp Bot*. 2024;75(9):2604-2630. doi 10.1093/jxb/era505
- Smirnov N., Conklin P.L., Loewus F.A. biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001; 52:437-467. doi 10.1146/annurev.arplant.52.1.437
- Šnirc M., Lidiková J., Čeryová N., Pintér E., Ivanišová E., Musilová J., Vollmannová A., Rybníkář S. Mineral and phytochemical profiles of selected garlic (*Allium sativum* L.) cultivars. *South Afr J Bot*. 2023;158:319-325. doi 10.1016/j.sajb.2023.05.024
- Suekawa M., Fujikawa Y., Inada S., Murano A., Esaka M. Gene expression and promoter analysis of a novel tomato aldo-keto reductase in response to environmental stresses. *J Plant Physiol*. 2016;200:35-44. doi 10.1016/j.jplph.2016.05.015

- Sun X., Zhu S., Li N., Cheng Y., Zhao J., Qiao X., Lu L., ... Zhao X., Tian S., Su J., Cheng Z., Liu T. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and allicin biosynthesis. *Mol Plant*. 2020;13(9):1328-1339. doi 10.1016/j.molp.2020.07.019
- Teper-Bamnolker P., Buskila Y., Lopesco Y., Ben-Dor S., Saad I., Holdengreber V., Belausov E., Zemach H., Ori N., Lers A., Eshel D. Release of apical dominance in potato tuber is accompanied by programmed cell death in the apical bud meristem. *Plant Physiol*. 2012;158(4):2053-2067. doi 10.1104/pp.112.194076
- Vargas J.A., Leonardo D.A., D'Muniz Pereira H., Lopes A.R., Rodriguez H.N., Cobos M., Marapara J.L., Castro J.C., Garratt R.C. Structural characterization of L-galactose dehydrogenase: an essential enzyme for vitamin C biosynthesis. *Plant Cell Physiol*. 2022;63(8):1140-1155. doi 10.1093/pcp/pcac090
- Xie Q., Essemine J., Pang X., Chen H., Cai W. Exogenous application of abscisic acid to shoots promotes primary root cell division and elongation. *Plant Sci*. 2020;292:110385. doi 10.1016/j.plantsci.2019.110385
- Xu X., Zhang Q., Gao X., Wu G., Wu M., Yuan Y., Zheng X., ... Qi T., Li H., Luo Z., Li Z., Deng W. Auxin and abscisic acid antagonistically regulate ascorbic acid production via the SIMAPK8-SIARF4-SIMYB11 module in tomato. *Plant Cell*. 2022;34(11):4409-4427. doi 10.1093/plcell/koac262
- Yenealem D., Eyayu D., Tibebe D., Mulugeta M., Kassa Y., Moges Z., Kerebih F., Fentie T., Amare A., Ayalew M. Electrochemical characterization and detection of ascorbic acid in garlic using activated glassy carbon electrode: a comprehensive study. *Food Anal Methods*. 2024;17:1473-1483. doi 10.1007/s12161-024-02660-3
- Younis M.E., Hasaneen M.N., Kazamel A.M. Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. *Protoplasma*. 2010;239(1-4):39-48. doi 10.1007/s00709-009-0080-5

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.09.2025. После доработки 13.01.2026. Принята к публикации 13.01.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-46

Изменение транскрипции генов аквапоринов в листьях люцерны хмелевидной в результате микоризации грибом арбускулярной микоризы в условиях дефицита воды

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

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

 rainniar@rambler.ru

Аннотация. Одним из актуальных направлений исследований растительно-микробных взаимодействий является изучение механизмов адаптации растений к стресс-факторам среды за счет развития симбиозов с различными микроорганизмами. Хорошо известна роль грибов арбускулярной микоризы в адаптации растений к засухе, но механизмы данных процессов до сих пор раскрыты не полностью, особенно в тканях листьев. Предполагается, что некоторые из генов аквапоринов могут играть важную роль как в адаптации растений к недостатку влаги, так и в развитии эффективного симбиоза с грибами арбускулярной микоризы. Таким образом, важной задачей в изучении растительно-микробных симбиозов является оценка влияния инокуляции грибом арбускулярной микоризы на экспрессию генов аквапоринов в листьях растений в высокоэффективной модельной растительно-микробной системе "*Medicago lupulina* + *Rhizophagus irregularis*" в условиях засухи. Сравнительная оценка транскрипции генов выполнена методом 2-ΔΔCT по результатам количественной ПЦР в реальном времени: нормализация проведена по отношению к референсному гену – актину, контролем выступал вариант без инокуляции грибом. Исследование проведено как в начальную фазу развития – фазу развития 2-го листа, так и в фазу активного растительно-микробного взаимодействия – фазу цветения. В результате выявлены гены, имеющие достоверную дифференциальную экспрессию в условиях засухи при сравнении микоризованных и немикоризованных растений люцерны хмелевидной: *NIP3;1*, *NIP4;2*, специфический *NIP7;1*, *TIP5;1* – в фазу развития 2-го листа; *NIP3;1*, *NIP5;1*, *NIP6;4*, *NIP7;1* (специфический), *PIP1;4*, *TIP2;3* и *XIP1;1* (специфический) – в фазу цветения. Ранее в подобном эксперименте, но в условиях нормального полива эти же гены не имели дифференциальной экспрессии в сравнении микоризованных и немикоризованных растений. Вероятно, перечисленные гены принимают участие в адаптации изученных растений к условиям засухи. Полученные сведения могут быть использованы в разработке высокопродуктивных растительно-микробных систем с участием грибов арбускулярной микоризы с целью перехода к биологическому земледелию, минимизации негативного влияния на окружающую среду и повышению устойчивости растений к недостатку влаги.

Ключевые слова: аквапорины; AQP; арбускулярная микориза; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; засуха

Для цитирования: Юрков А.П., Кудряшова Т.Р., Беляева А.И., Крюков А.А. Изменение транскрипции генов аквапоринов в листьях люцерны хмелевидной в результате микоризации грибом арбускулярной микоризы в условиях дефицита воды. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(3):424-434. doi 10.18699/vjgb-26-46

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РНФ № 24-26-00181.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИСХМ.

Transcriptional changes of aquaporin genes in leaves of black medic induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation under water deficit

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

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

 rainniar@rambler.ru

Abstract. One of the current research directions in plant-microbe interactions focuses on the mechanisms of plant adaptation to environmental stress through symbioses with various microorganisms. While the role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant adaptation to drought is well-known, the underlying mechanisms of these processes remain poorly understood, particularly in leaf tissues. It is suggested that certain genes from the aquaporin family play a critical role both in adaptation to water deficit and in the development of an effective arbuscular mycorrhizal symbiosis. Thus, the important task in this study of plant-microbe symbioses is to assess the effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on the expression of aquaporin genes in leaves. This study utilizes the highly effective plant-microbe model

system "*Medicago lupulina* + *Rhizophagus irregularis*" under drought stress conditions. A comparative assessment of gene transcription was carried out using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method based on real-time quantitative PCR results: normalization was performed relative to the actin reference gene with non-inoculated plants serving as the control. The study was conducted both at the initial development stage (the 2nd leaf stage), and at the stage of active plant-microbe interaction (the flowering stage). The study revealed genes with significant differential expression under drought conditions when comparing mycorrhizal and non-mycorrhizal *Medicago lupulina* plants: *NIP3;1*, *NIP4;2*, specific *NIP7;1*, *TIP5;1* at the 2nd leaf stage; genes *NIP3;1*, *NIP5;1*, *NIP6;4*, *NIP7;1* (specific), *PIP1;4*, *TIP2;3* and specific *XIP1;1* at the flowering stage. Previously, in a similar experiment, under well-watering conditions, the same genes did not have differential expression between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. Thus, the listed genes likely participate in the adaptation of the studied plants to drought conditions. The obtained information can be used to develop highly productive plant-microbe systems involving arbuscular mycorrhizal fungi, aimed at transitioning to organic farming, minimizing negative environmental impact, and enhancing plant resistance to water deficit.

Key words: aquaporins; AQP; arbuscular mycorrhiza; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; drought

For citation: Yurkov A.P., Kudriashova T.R., Belyaeva A.I., Kryukov A.A. Transcriptional changes of aquaporin genes in leaves of black medic induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation under water deficit. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):424-434. doi 10.18699/vjgb-26-46

Введение

В результате нарушения природных экосистем под влиянием интенсивного сельского хозяйства, водозабором и погодными особенностями ряда регионов проблема дефицита влаги при выращивании сельскохозяйственных культур стоит наиболее остро. Для решения проблемы засухи применяется ряд мер, включающих не только орошение, введение новых методов нулевой обработки почвы, севооборот, но и биологические методы усиления адаптации растений к стресс-факторам среды с использованием микроорганизмов – симбионтов. Хорошо известна роль грибов арбускулярной микоризы (АМ), сыгравших, вероятно, лидирующую роль в завоевании растениями суши 400 млн лет назад (Remy et al., 1994), когда они выполняли часть функций корневой системы, активно обеспечивая растения водой и минеральными веществами. Грибы АМ поддерживают ионный гомеостаз растения-хозяина, обеспечивают осмозащиту и повышенную эффективность использования воды (Mammadov et al., 2018; Luo et al., 2022). По настоящее время более 80 % видов наземных растений образуют АМ с грибами класса *Glomeromycetes* (Smith, Read, 2008). В связи с этим актуальным направлением исследований стало выявление механизмов, контролирующих адаптацию растений к недостатку влаги в почве и роль грибов АМ в этом процессе.

Следует полагать, что адаптация растений к засухе тесно связана с регуляцией транспортеров воды в тканях растений, среди которых наиболее представленная группа – аквапорины, небольшие мембранные белки семейства Major Intrinsic Proteins (MIP), формирующие каналы для переноса молекул через биологические мембраны (Maurel et al., 2015). У растений они играют ключевую роль в адаптации к засухе, засолению, а также в регуляции роста (Данелия и др., 2024; Кудряшова и др., 2025). Наибольшее разнообразие аквапоринов характерно для покрытосеменных растений, что связано с дупликацией генов в результате полиплоидизации (Singh et al., 2020), свойственной почти всем покрытосеменным. Полиплоидизация приводит к дупликации генов с появлением новых изоформ. В частности, у арабидопсиса обнаружено 35 генов аквапоринов, у люцерны – 46, у рапса – 120 (Min et al., 2019; Данелия и др., 2024). Аквапорины имеют консервативную структуру.

Важной особенностью в структуре является то, что они образуют тетрамеры, где каждый мономер функционирует как независимый канал (Kudoyarova et al., 2022). Активность аквапоринов может регулироваться фосфорилированием, pH, окислительно-восстановительными реакциями.

Не все аквапорины одинаково эффективно принимают участие в транспорте воды. Так, аквапорины покрытосеменных растений делят на следующие пять подсемейств: 1) NIP (nodulin 26-like intrinsic proteins) с низкой проницаемостью для воды, принимают участие в обмене метаболитами с микросимбионтами (Kruse et al., 2006), локализованы в плазматической мембране и мембранах эндоплазматической сети (Ma et al., 2006; Mizutani et al., 2006; Lopez et al., 2016); 2) PIP (plasma membrane intrinsic proteins), проницаемые для воды, перекиси водорода, углекислого газа, локализованы в плазматической мембране, внутренней мембране хлоропластов, мембранах тилакоидов, мембране эндоплазматической сети (Zhou et al., 2024); 3) SIP (small basic intrinsic proteins) с низкой проницаемостью для воды, локализованы на мембране эндоплазматической сети, изучены слабо (Hussain et al., 2020; Zhou et al., 2024); 4) TIP (tonoplast intrinsic proteins), проницаемые для воды, перекиси водорода, аммония, мочевины, локализованы в тонопласте вакуолей (Maurel et al., 2008; Zhou et al., 2024); 5) XIP (uncharacterized/X intrinsic proteins) с низкой проницаемостью для воды, локализованы на плазматической мембране, исследованы слабо (Lopez et al., 2016; Noronha et al., 2016).

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что функции аквапоринов в значительной степени требуют дальнейшего изучения. Некоторые исследования указывают на то, что микоризация повышает устойчивость растений к засухе, но механизмы регуляции аквапоринов необходимо рассматривать с учетом видоспецифичности и специфичности их функций в различных тканях, в том числе слабо изучена их регуляция экспрессии в листьях (Данелия и др., 2024; Кудряшова и др., 2025). Изменения регуляции аквапоринов, опосредованные микоризацией, по-прежнему остаются загадкой (Sharma et al., 2021). Перспективными направлениями считаются: выявление генов-маркеров развития эффективных симбиозов (в том числе АМ-симбиоза), обеспечивающих адаптацию растений к

недостатку воды в субстрате; анализ экспрессии генов аквапоринов при водном стрессе; изучение посттрансляционных модификаций. С практической точки зрения развитие таких исследований позволит разработать симбиотически высокоэффективные и высокопродуктивные растительно-микробные системы (PMC), необходимые для реализации концепции почвозащитного ресурсосберегающего земледелия и, как следствие, получения экологически чистой сельскохозяйственной продукции.

На основании вышесказанного целью настоящего исследования был поиск генов-маркеров эффективного симбиоза среди генов аквапоринов в листьях при инокуляции грибом АМ люцерны хмелевидной в высокоэффективной модельной PMC "*Medicago lupulina* + *Rhizophagus irregularis*" в условиях дефицита влаги в субстрате на раннем и позднем этапах развития симбиоза. В качестве наиболее подходящего объекта для этой цели авторами селектирована высокоотзывчивая на микоризацию линия MIS-1 *Medicago lupulina*, на которой по результатам транскриптомного анализа с применением метода массового анализа концов кДНК (MACE-Seq) было выявлено более 4500 генов с дифференциальной экспрессией ($p_{adj} < 0.01$) в листьях при микоризации высокоэффективным штаммом гриба АМ *Rhizophagus irregularis* RCAM00320 (Yurkov et al., 2023).

Материалы и методы

Растительный и грибной материалы. В качестве модельного растения использовали люцерну хмелевидную (*Medicago lupulina* L.) – широко распространенный вид рода *Medicago*, диплоид, самоопылитель. Объектом исследования выбрана селектированная из сортопопуляции ВИК32 линия MIS-1, которая отличается высокой чувствительностью к микоризации (Yurkov et al., 2015). Растения этой линии проявляют признаки карликовости в отсутствие инокуляции грибом АМ в условиях низкого уровня доступного для питания растений фосфора в субстрате (Yurkov et al., 2020). Для инокуляции использовали штамм RCAM00320 *Rhizophagus irregularis* из коллекции ВНИИСХМ, обладающий высокой симбиотической эффективностью.

Вегетационный метод. Методика проведения эксперимента основана на протоколе, описанном А.П. Юрковым с коллегами (Yurkov et al., 2015). Для предотвращения спонтанного заражения клубеньковыми бактериями и другими микроорганизмами почво-песчаную смесь (соотношение субстратов 2:1) стерилизовали автоклавированием дважды при 134 °C и 2 атм в течение 1 ч с интервалом в 2 сут. После обработки смеси токсичность субстрата не выявлялась. Растения люцерны высаживали по два проростка в каждый сосуд, наполненный 210 г почво-песчаной смеси. Половину сосудов инокулировали корнями *Plectranthus verticillatus*, микоризованными *R. irregularis*, а в другой половине (контроль) инокуляция не проводилась. Агрохимические параметры использованной почвы представлены в работе (Yurkov et al., 2020): содержание P_2O_5 – 23 мг/кг, рН – 6.44. Условия увлажнения выбраны на основании предварительно отобранного варианта засухи. Схема опы-

та включала варианты с разным увлажнением растений с инокуляцией и без инокуляции грибом АМ *R. irregularis*: – «норма» – полив, исходя из расчета 0.6 полной влагоемкости субстрата (ПВ);

– «засуха, вариант 1» – смена нормального полива в первые 8 сут на полив, исходя из расчета 0.4 ПВ, в течение 16 сут (до фазы развития 2-го листа) и в течение 40 дней (до фазы цветения);

– «засуха, вариант 2» – смена нормального полива на полив, исходя из расчета 0.4 ПВ, в течение 7 сут перед съемом в фазу развития 2-го листа и в фазу цветения (отдельно; т. е. режим засухи поддерживается для одного растения в течение 7 сут до уборки).

Третий вариант засухи с поливом, исходя из 0.4 ПВ в течение всего периода выращивания растений, не рассматривался в связи с высокой долей гибели растений при проверке режима. В данном предварительном эксперименте (табл. S1 Приложения)¹ определили показатели сырого веса надземных частей, симбиотической эффективности по этому показателю, долю погибших растений, встречаемость микоризной инфекции в корне и отобрали вариант 2 засухи со сменой нормального полива на полив из расчета 0.4 ПВ за неделю до фиксации результатов в эксперименте по оценке относительного уровня экспрессии генов аквапоринов в листьях.

В основном эксперименте, включающем анализ относительного уровня экспрессии генов аквапоринов, первый учет проводили через 24 сут после посадки и инокуляции, в фазу развития 2-го настоящего листа, второй учет – на 48-е сутки, в фазу цветения. Оценивали параметры продуктивности (сухой вес надземных частей и корней) и эффективность симбиоза согласно ранее описанным методикам (Yurkov et al., 2015). Для окраски корней использовали трипановый синий согласно (Phillips, Nayman, 1970). Расчет показателей микоризации, интенсивности микоризной инфекции в корне (M , %) и обилия арбускул в микоризованной части корня (a , %) проводили согласно (Trouvelot et al., 1986), с применением разработанной авторами компьютерной программы (Воробьев и др., 2016). Для анализа уровней экспрессии генов растительный материал сразу после сбора замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °C до выделения РНК.

Выделение РНК и анализ экспрессии генов. Подбор генов и праймеров для их амплификации (табл. S2) осуществляли на основе данных *M. truncatula* из базы генетических последовательностей Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) и транскриптомного анализа *M. lupulina* (Yurkov et al., 2023). В исследование было включено 30 генов из 46 известных ортологов у *M. truncatula*, представленных в статье (Min et al., 2019). В эксперименте в результате полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) 16 генов во всех вариантах опыта имели очень низкие уровни экспрессии, на три-шесть порядков ниже (цикл выхода более чем на 10 циклов позднее) уровня референсного гена. Такие уровни экспрессии в анализе имеют значительную ошибку и не должны приниматься в

¹ Табл. S1 и S2 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx23.pdf>

расчет, поэтому данные гены были исключены из работы и дальнейшего анализа. Отсутствие нецелевых продуктов ПЦР контролировали посредством гель-электрофореза и анализа кривых плавления по результатам ПЦР-РВ. Эффективность праймеров рассчитывали на основе серийных разведений кДНК, в работу были включены праймеры с эффективностью близкой к 100 % (>95 %). Тестирование праймеров проводили на обоих сроках учета.

Тотальную РНК из растительного материала выделяли с использованием тризола (Thermo Fisher Scientific, США) с модификациями (MacRae, 2007). Перед синтезом кДНК качество обработки РНК ДНКазой проверяли в ПЦР. Синтез кДНК осуществляли из ~1 мкг тотальной РНК на пробу с помощью набора “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase” в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Качество полученной кДНК проверяли с помощью амплификации гена убиквитина. Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР-РВ с использованием термоциклера C1000 с CFX-96 (BioRad, США) и набора реагентов, включая краситель SYBR Green I («Синтол», Россия). Условия амплификации: начальная денатурация – 95 °C, 5 мин; 40 циклов – 95 °C, 15 с; 60 °C, 30 с; 72 °C, 30 с; оценка кривых плавления. Для сравнения уровней экспрессии анализируемых генов аквапоринов использовали $2^{-\Delta\Delta CT}$ метод – сравнивали уровень экспрессии в варианте с микоризацией против контроля без АМ. Нормализацию проводили относительно референсного гена – актина, согласно (Yurkov et al., 2020). ПЦР-микс (объем 10 мкл) включал: 1 мкл 10х буфера В + SYBR Green, 1 мкл 2.5 mM dNTP, 1 мкл MgCl₂ (25 mM), 0.3 мкл каждого праймера (10 mM), 0.125 мкл (0.625 ед.) SynTaq ДНК-полимеразы («Синтол», Россия), 4.275 мкл деионизированной воды и 2 мкл кДНК. Анализ проводили для каждого образца (как с АМ, так и без АМ) с тремя биологическими и четырьмя техническими повторами.

Статистическую обработку данных выполняли с применением ANOVA и последующего теста Тьюки с определением значимых различий при $p < 0.05$. Для сравнения уровней экспрессии между группами «+АМ» и «без АМ» использовали t -критерий Стьюдента ($p < 0.05$).

Результаты

Проведена оценка показателей микоризации люцерны хмелевидной и влияния инокуляции грибом АМ на рост, развитие растения-хозяина, экспрессию генов аквапоринов в листьях в условиях засухи. Для моделирования водного стресса был подобран режим засухи (на основании предварительного эксперимента; см. табл. S1), включающий полив из расчета 0.4 от полной влагоемкости субстрата в течение одной недели перед каждым съемом эксперимента, выполняемым на 24-е и 48-е сутки от посадки и инокуляции.

Анализ продуктивности люцерны (рис. 1, А, Б) показал, что у растений линии MIS-1 *M. lupulina*, инокулированных грибом *R. irregularis*, наблюдалось значительное увеличение сухой биомассы надземных частей как на 24-е сутки (в фазу 2-го листа), так и на 48-е сутки. Прибавка при микоризации сухого веса корней наблюдалась лишь на

позднем этапе развития (на 48-е сутки). Отметим тот факт, что симбиотическая эффективность АМ (MGR, mycorrhizal growth response) была достоверной и высокой (более 100 %) как по сухому весу корней, так и по сухому весу надземных частей именно в фазу цветения (см. рис. 1, В, Г).

Результаты микроскопии корней люцерны показали активное развитие микоризы и арбускул в микоризованной части корня в частности (см. рис. 1, Д, Е). Интенсивность АМ в корне (М) возрастала с 24-х суток на 48-е, а обилие арбускул в микоризованной части корня (а) было высоким уже начиная с фазы развития 2-го настоящего листа. Это свидетельствовало о высокой активности АМ-симбиоза в смоделированных условиях засухи и позволило провести тонкую оценку влияния микоризации на экспрессию генов семейства аквапоринов в листьях. Водный стресс был достаточным для индукции механизмов адаптации к засухе, но не критичным для выживаемости растений люцерны с сохранением высокого уровня микоризации.

Следует полагать, что показатели эффективности и активности АМ в условиях недостатка влаги (полив, исходя из расчета 0.4 ПВ субстрата) не уступали результатам, полученным ранее при стандартном увлажнении, исходя из расчета 0.6 ПВ субстрата, в модельной РМС «линия MIS-1 *M. lupulina* + штамм RCAM00320 *R. irregularis*» (Yurkov et al., 2021). Это подтверждает, что даже в условиях засухи возможно поддержание высокофункционального микоризного симбиоза; при этом умеренный стресс от засухи стимулировал изменение транскрипции генов аквапоринов без подавления эффективности АМ-симбиоза.

Для решения задач исследования были проведены подбор и тестирование праймеров (см. табл. S2). В ходе анализа часть из 30 генов аквапоринов показала дифференциальную экспрессию в листьях *M. lupulina* в ответ на микоризацию в условиях засухи (рис. 2 и 3). Среди прочих выявлены гены со специфической экспрессией (отмечены на рис. 2 и 3 знаками «+» и «n. d.» – наличие и отсутствие экспрессии (not detected) соответственно).

В результате оценки экспрессии на 24-е сутки, в фазу развития 2-го настоящего листа, в листьях микоризованных растений (светлые столбцы) по сравнению с контролем (темно-серые столбцы) наблюдались следующие изменения:

- достоверная позитивная регуляция при микоризации (экспрессия при микоризации была достоверно, $p < 0.05$, выше таковой в контроле без инокуляции грибом АМ) для генов *NIP3;1*, *NIP4;2*, *TIP2;2*, а также специфическая экспрессия *NIP7;1*;
- достоверная негативная регуляция при микоризации (экспрессия при микоризации была достоверно, $p < 0.05$, ниже таковой в контроле без инокуляции грибом АМ) для генов *PIP2;3*, *TIP1;1*, *TIP1;4*, *TIP2;3*, *TIP4;1*.

При оценке экспрессии на 48-е сутки, в фазу цветения, в листьях растений с инокуляцией грибом АМ были выявлены:

- достоверная позитивная регуляция при микоризации генов *NIP3;1*, *NIP5;1*, *NIP6;4*, *PIP1;2*, *PIP1;4*, *PIP2;1*, *TIP2;3*, а также специфическая экспрессия *NIP7;1*, *XIP1;1*;

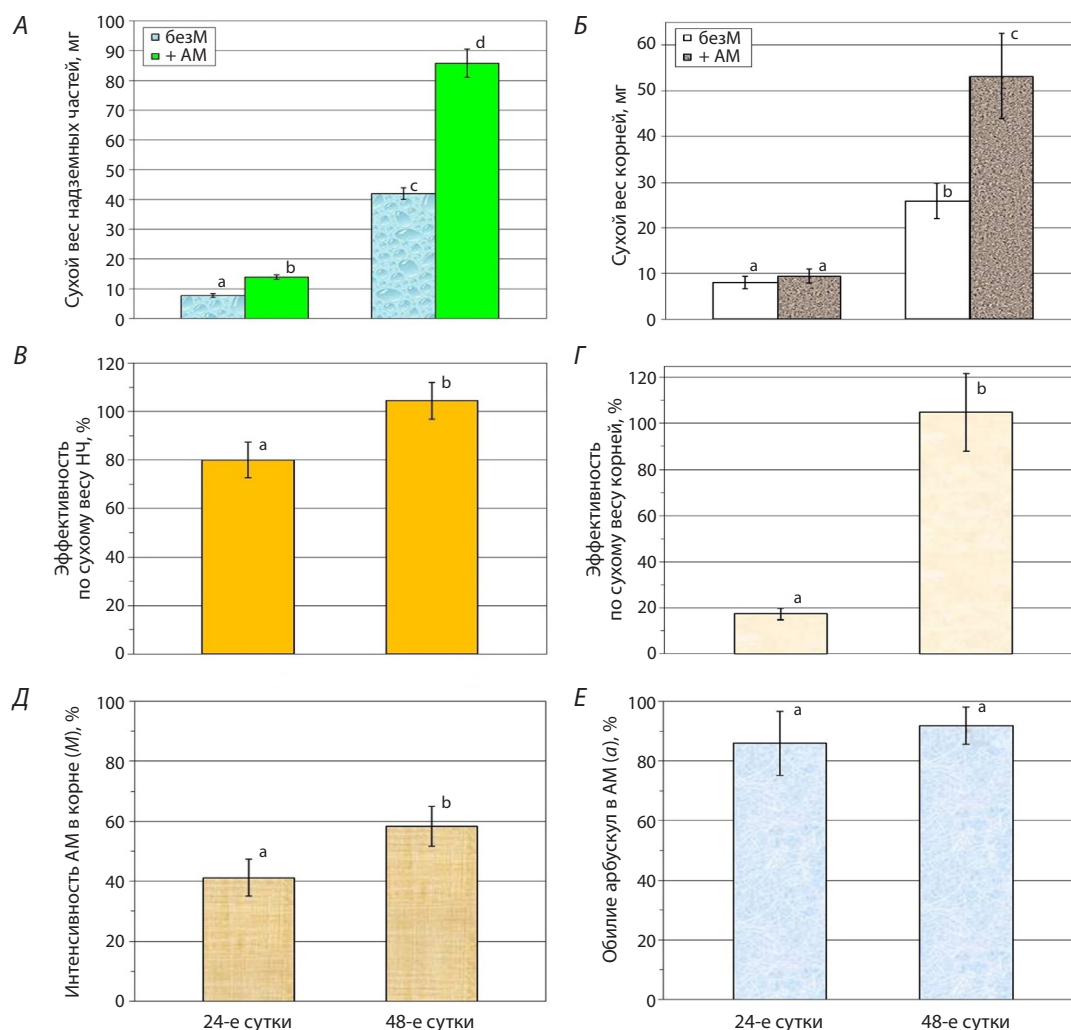


Рис. 1. Показатели продуктивности (А – сухой вес надземных частей, Б – сухой вес корней), симбиотической эффективности, рассчитанной по весу надземных частей (В) и корней (Г), и показатели микоризации: Д – интенсивность микоризной инфекции в корне (М), Е – обилие арбускул в микоризованной части корня (а) на 24-е и 48-е сутки от посадки и инокуляции.

Буквы над столбцами (a, b, c) указывают на достоверные ($p < 0.05$) различия показателей.

– достоверная негативная регуляция при микоризации генов *NIP1;2*, *NIP1;5*, *NIP2;1*, *NIP4;2*, *PIP2;3*, *SIP1;3*, *TIP1;1*, *TIP2;2*, *TIP4;1*.

Таким образом, в работе определены наиболее значимые гены аквапоринов, участвующие в развитии эффективного АМ-симбиоза в условиях недостатка влаги. В частности, таким геном является *NIP7;1* со специфической или индуцированной экспрессией при микоризации как в вегетативную, так и в репродуктивную фазы развития растения-хозяина. Особое внимание также следует уделить гену *XIP1;1* со специфической экспрессией в фазу цветения.

Гены подсемейства NIP обладали, как правило, позитивной регуляцией (повышенным уровнем экспрессии, $p < 0.05$, относительно уровня в контроле без инокуляции АМ-грибом) в раннюю фазу развития АМ-симбиоза, но к поздней фазе развития (фазе цветения) наблюдались как позитивная, так и негативная регуляция для генов этого семейства. Это свидетельствует о сложной регуляции ак-

вапоринов в зависимости от вегетативной/репродуктивной фазы развития растения-хозяина с перестройкой водного обмена в условиях засухи при микоризации.

Обсуждение

Результаты показали, что активное участие в развитии АМ симбиоза в условиях засухи принимают аквапорины подсемейств NIP и TIP. Однако только аквапорины TIP существенно влияют на транспорт воды через мембраны (Zhou et al., 2024). В то же время аквапорины NIP переносят разнообразные субстраты, включая металлоиды, но обладают низкой проницаемостью для воды. Предполагается, что белки NIP задействованы в обмене метаболитами между растением-хозяином и симбиотическими микроорганизмами (Kruse et al., 2006). Известно также, что при засухе растения могут снижать экспрессию генов аквапоринов для сохранения воды, поэтому особое внимание стоит уделить генам, экспрессия которых подавляется в условиях

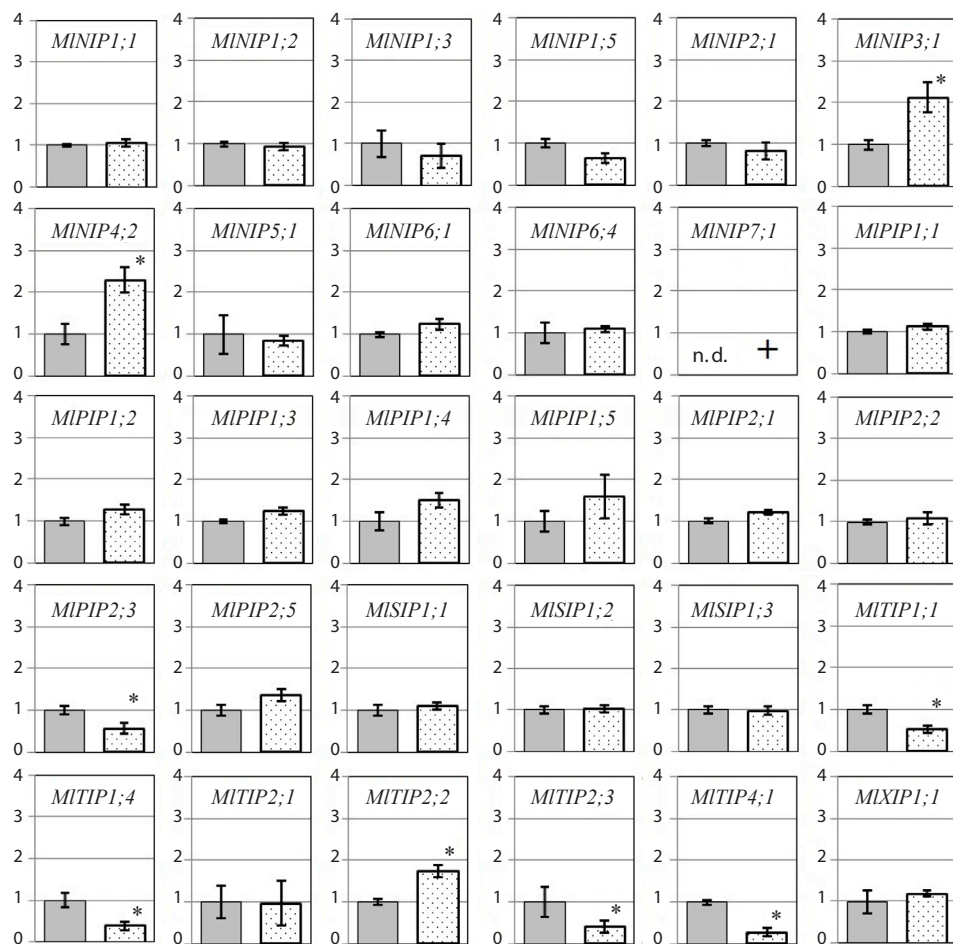


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов (нормализованное значение $2^{-\Delta\Delta CT}$) в листьях *M. lupulina* на 24-е сутки от посадки и инокуляции АМ-грибом *R. irregularis* (в фазу развития 2-го листа) после засухи.

Серые столбцы (слева) – значения уровня транскриптов в контрольном варианте «безМ», песочные столбцы (справа) – значения уровня транскриптов в варианте «+АМ».

* Достоверные ($p < 0.05$) различия в вариантах «+АМ» и «безМ». n.d. и «+» – отсутствие экспрессии в варианте «безМ» при наличии специфической экспрессии в варианте «+АМ».

дефицита воды (Quiroga et al., 2019). По другим данным, дефицит влаги может служить триггером для активации некоторых генов аквапоринов, играющих ключевую роль в устойчивости растений к засухе (Jia, Liu, 2020; Zhou et al., 2024). Таким образом, взаимосвязи между экспрессией этих генов, эффективностью симбиоза растения с грибами АМ и устойчивостью к засухе остаются малоизученными (Sharma et al., 2021). Их исследование могло бы пролить свет на механизмы адаптации АМ-растений к водному стрессу.

По результатам настоящей работы подобранный режим полива, исходя из 0.4 ПВ в течение 7 дней до съема, был достаточным для развития симбиоза, что можно видеть по существенному отклику на микоризацию и высокой встречаемости АМ-гриба в корне растения-хозяина («засуха, вариант 2», см. табл. S1). Между тем показатели продуктивности были снижены в сравнении с таковыми в условиях нормального полива, исходя из 0.6 ПВ (Yurkov et al., 2020). Выявлена высокая эффективность симбиоза в модельной системе «*M. lupulina* + *R. irregularis*» в усло-

виях дефицита воды (0.4 ПВ) на ранних и поздних этапах развития растения-хозяина: на 24-е сутки, в фазу развития 2-го листа, когда наблюдалось значительное увеличение биомассы надземной части за счет микоризации, и на 48-е сутки, в фазу цветения, характеризуемую более высокой симбиотической эффективностью по сухому весу как надземных частей, так и корней, а также более высокой активностью развития АМ, что отразилось в повышении интенсивности микоризации в корне (M , %). С другой стороны, показатель обилия арбускул в микоризованной части корня (a , %) был высоким уже с ранней фазы развития симбиоза.

Ранее было показано, что в условиях нормального увлажнения (0.6 ПВ) (Yurkov et al., 2021) параметры эффективности и активности АМ тоже были высокими. Таким образом, выбранный режим засухи вызвал стресс, достаточный для изменения экспрессии ряда генов, но не критичный для функционирования самого АМ-симбиоза. Вместе с тем роль аквапоринов в развитии эффективных РМС в условиях дефицита воды, как и их регуляция при

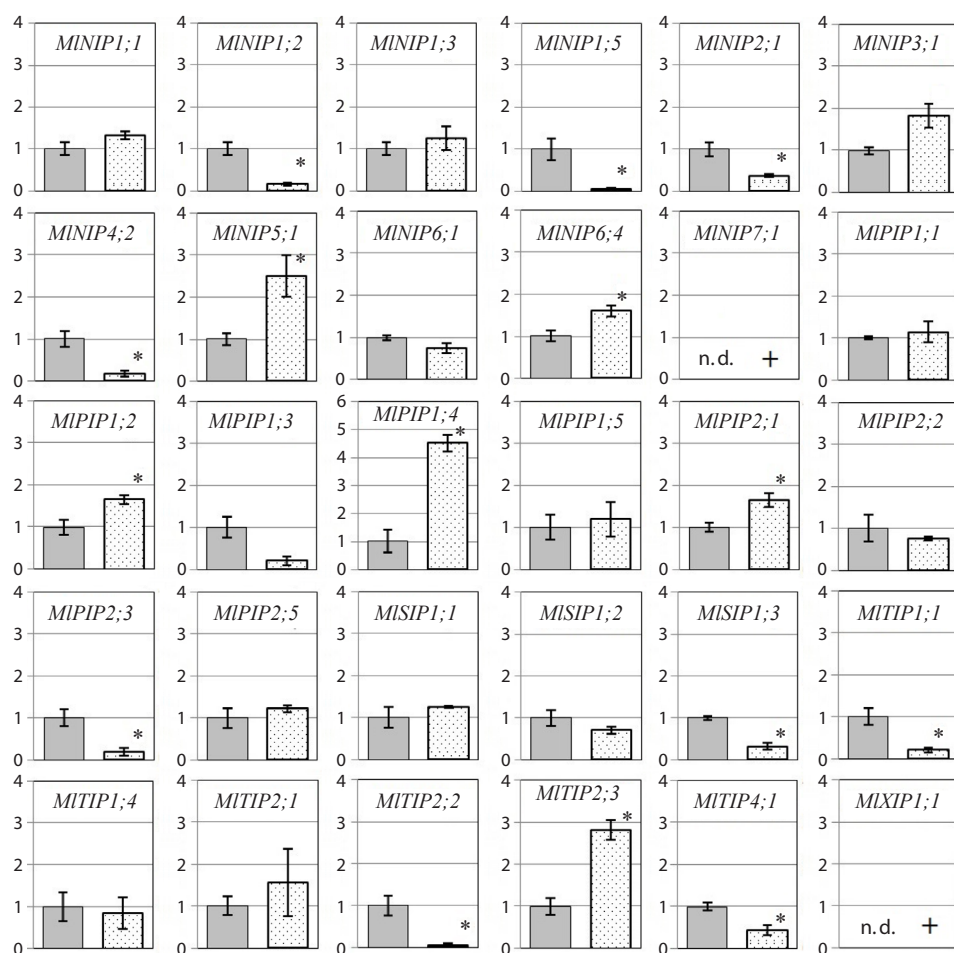


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов (нормализованное значение $2^{-\Delta\Delta CT}$) в листьях *M. lupulina* на 48-е сутки от посадки и инокуляции АМ-грибом *R. irregularis* (в фазу цветения) после засухи. Усл. обозн. см. на рис. 2.

микоризации в целом, изучены недостаточно. Это связано с широким спектром субстратов у этих транспортеров, а также с их различной функцией в зависимости от типа ткани и субклеточной локализации (Данелия и др., 2024; Кудряшова и др., 2025). Полученные в нашем исследовании данные выявили разнонаправленные изменения экспрессии генов в зависимости от подсемейства и фазы развития: на ранней фазе (24-е сутки) наблюдалась позитивная регуляция генов подсемейства NIP (*NIP3;1*, *NIP4;2*, а также специфическая экспрессия *NIP7;1*) на фоне, как правило, негативной регуляции генов подсемейства TIP (*TIP1;1*, *TIP1;4*, *TIP2;3*, *TIP4;1*); в позднюю фазу (48-е сутки) обнаружен паритет позитивной и негативной регуляции в подсемействе NIP (по четыре гена, среди которых один ген со специфической экспрессией при микоризации – *NIP7;1*). Для подсемейства TIP, как и на ранней фазе, было характерно преобладание негативной регуляции (три гена). Также был определен ген со специфической экспрессией при микоризации в фазу цветения – *XIP1;1* из подсемейства XIP. Следует отметить малую изученность генов этого подсемейства. Известно, что белки XIP локализованы на плазматической мембране (Lopez et al., 2016; Noronha et al., 2016).

Представляет интерес сравнение данных, полученных в настоящем исследовании в условиях засухи (при 0.4 ПВ), с результатами анализа транскриптома микоризованных и немикоризованных растений люцерны хмелевидной в нормальных условиях увлажнения (при 0.6 ПВ; Yurkov et al., 2023). Из четырех генов с позитивной регуляцией в условиях засухи только ген *TIP2;2* обладал также позитивной регуляцией в нормальных условиях увлажнения в фазу развития 2-го листа, а также *PIP1;2* и *PIP2;1* (два из восьми) – в фазу цветения (Yurkov et al., 2023). Среди генов, характеризующихся снижением уровня экспрессии при засухе, лишь ген *NIP1;5* (один из девяти) тоже обладал снижением уровня транскрипции в условиях нормального увлажнения (Yurkov et al., 2023). Таким образом, остальные гены, имевшие дифференциальную экспрессию в условиях засухи в настоящем эксперименте, но не имеющие таковой в условиях нормального полива в эксперименте 2023 г., вероятно, могут считаться генами адаптации растений люцерны хмелевидной к условиям засухи. В их число вошли: *NIP3;1*, *NIP4;2*, специфический *NIP7;1*, *TIP5;1* – в фазу развития 2-го листа; гены *NIP3;1*, *NIP5;1*, *NIP6;4*, *NIP7;1* (специфический), *PIP1;4*, *TIP2;3* и *XIP1;1* (специфический) – в фазу цветения.

Сравнительный анализ с другими РМС выявил ряд аналогий (Asadollahi et al., 2023; Данелия и др., 2024; Wang et al., 2024; Кудряшова и др., 2025). В РМС “*Zea mays* + *R. irregularis*” ген *ZmTIP2;3* также подвергался позитивной регуляции при микоризации и предположительно играл важную роль в повышении устойчивости кукурузы к стрессу от засухи при микоризации. При этом данная РМС характеризовалась меньшей отзывчивостью на инокуляцию грибом АМ, поскольку лишь у немногих генов кукурузы (*ZmPIP1;6*, *ZmPIP2;2*, *ZmTIP2;3*, *ZmTIP4;1*) экспрессия существенно изменилась в ответ на микоризацию. С другой стороны, показана негативная регуляция при микоризации в фазы развития 2-го и 13-го листа для некоторых генов подсемейства TIP (*ZmTIP3;1*, *ZmTIP4;4* – в обе фазы; *ZmTIP4;3* – только в фазу 13-го листа) в листьях кукурузы (Wang et al., 2024). Негативная регуляция в условиях засухи некоторых генов подсемейства TIP (*PtTIP2;1* и *PtTIP5;1*) показана и в корнях в РМС “*Poncirus trifoliata* + *F. mosseae*” (He J.-D. et al., 2019). Таким образом, несмотря на то, что результаты в РМС “*Z. mays* + *R. irregularis*” (на 56-е сутки) согласуются с результатами в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*” (на 48-е сутки) по гену *TIP2;3*, надо отметить фазозависимый характер эффекта (зависимость от фазы развития растения), видоспецифические и тканеспецифические особенности в динамике экспрессии аквапоринов.

В пользу предположения о высокой тканеспецифичности свидетельствует более ранняя оценка относительного уровня экспрессии в корнях в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*” (Крюков и др., 2025), показавшая, что в фазу развития 2-го листа (вегетативную фазу) микоризация приводила к повышенной экспрессии генов *NIP1;2*, *NIP1;5*, *TIP2;1*, специфической экспрессии *NIP4;2* и сниженной экспрессии *NIP2;1*, *NIP3;1*, *PIP1;4*, *TIP3;1*, *XIP1;1*. В то же время в фазу цветения (генеративную фазу) было выявлено два гена со специфической экспрессией – *NIP4;1*, *NIP7;1*, при негативной регуляции целой группы – 14 генов подсемейств NIP, PIP, SIP, TIP и XIP (Крюков и др., 2025). Вместе все это свидетельствует о том, что в исследовании установлена высокая тканеспецифическая экспрессия генов семейства аквапоринов: лишь ген *NIP4;2* обладал позитивной регуляцией как в корнях, так и в листьях в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*” в вегетативную фазу; лишь ген *NIP7;1* имел специфическую экспрессию при микоризации в генеративную фазу, хотя общий спектр генов с негативной регуляцией в листьях и корнях при микоризации в фазу цветения был шире – *NIP2;1*, *SIP1;3*, *TIP2;2*, *TIP4;1*. Фазозависимый эффект у генов-маркеров развития эффективного АМ-симбиоза был показан и на иных семействах генов, например в SWEET семействе транспортеров сахаров (Крюков и др., 2023; Кудряшова и др., 2024, 2025). В частности, именно ген *TIP2;3* единственный в подсемействе TIP обладает сменой регуляции с негативной на позитивную при переходе от ранней (24-е сутки) фазы микоризации к поздней фазе (48-е сутки). Возможно, функционально его компенсирует ген *TIP2;2* в фазу 2-го листа, поскольку последний имел обратную смену регуляции, с позитивной на негативную. Подобное

предположение о компенсаторном механизме транскрипции других аквапоринов было выдвинуто R. Porcel с коллегами (Porcel et al., 2005; Sharma et al., 2021). Что касается тканеспецифичности экспрессии аквапоринов TIP и PIP, то ее связывают с усилением водообмена и, как следствие, с усилением роста растений (He F. et al., 2016). Так, уровни экспрессии *RpTIP2;1* и *RpPIP2;1* под действием микоризации при засухе последовательно повышались в разных тканях – листьях, стебле и корнях, тем самым направляя потоки воды к тканям растений. Но *RpTIP1;3*, *RpPIP1;3* имели негативную регуляцию в листьях в РМС “*Robinia pseudoacacia* + *R. irregularis*” (He F. et al., 2016).

В результате настоящего исследования в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*” показана негативная регуляция в подсемействе PIP (ген *PIP2;3*) как на ранней (фаза развития 2-го листа), так и на поздней (фаза цветения) стадиях развития. Интересно, что, согласно литературным данным, более высокая активность белков PIP должна была бы обусловить большую проводимость воды в тканях растений в условиях засухи. Однако эта гипотеза была опровергнута в ходе экспериментов в РМС “*Glycine max* + *F. mosseae*” и “*Lactuca sativa* + *F. mosseae*”, в которых наблюдали негативную регуляцию генов PIP (*GmPIP1*, *GmPIP2*, *LsPIP1*, *LsPIP2*) (Porcel et al., 2006). Такой эффект АМ-симбиоза представляет собой регулирующий механизм, который позволяет растению-хозяину экономить метаболические ресурсы и потери воды в условиях стресса. Согласно предположению J.M. Ruiz-Lozano, R. Aroca (2010), гриб АМ помогает растению удерживать поглощенную воду, снижая водопроницаемость мембран путем подавления экспрессии генов аквапоринов подсемейства PIP. С другой стороны, поскольку гифы гриба сами могут снабжать растение-хозяина водой, это может быть стратегией, позволяющей АМ-растениям меньше зависеть от интенсивной экспрессии собственных аквапоринов и таким образом экономить энергию (Sharma et al., 2021). Основываясь на исследованиях функциональной значимости аквапоринов, можно сделать вывод, что именно подсемейство TIP включает основные переносчики воды через вакуолярную мембрану (тонопласт) (Zhou et al., 2024). Вероятно, их подавление на поздних этапах развития симбиоза способствует минимизации потерь воды и оптимизации клеточного гомеостаза (Quiroga et al., 2019). Иными словами, негативная регуляция генов TIP на этапе цветения может отражать стратегию сохранения воды в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*”.

Аквапорины подсемейства NIP принимают участие в транспорте множества субстратов, включая токсичные металлоиды, способны переносить растительный глицерин (Dean et al., 1999), играют важную роль в развитии взаимодействия между партнерами симбиоза растений с микроорганизмами (Kruse et al., 2006). Собственно исследование аквапоринов началось именно с изучения белка NLM подсемейства NIP, обнаруженного в перибактероидной мембране симбиотических корневых клубеньков сои (Sandal, Marcker, 1988). Аквапорины подсемейства NIP встречаются и у небобовых растений (Kruse et al., 2006). Таким образом, аквапорины подсемейства NIP

могут иметь важное значение в адаптации к засухе при развитии эффективного симбиоза с грибом АМ в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*”. Известно, что аквапорины NIP ближе по структуре к бактериальному AqpZ, чем к глицериновым переносчикам из подсемейства GLP (Heymann, Engel, 1999). Это указывает на то, что предковый аквапорин у растений, вероятно, не обладал способностью транспортировать глицерин и данная функция возникла позднее в процессе эволюции, как компенсация отсутствия GLP у растений (Murata et al., 2000). Возможно, в процессе адаптации к засухе именно транспорт глицерина в листьях растения-хозяина в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*” играет важную роль.

Повышенная экспрессия *NIP3;1*, *NIP4;2*, а также специфическая экспрессия *NIP7;1* предполагают их роль в ранних этапах симбиоза “*M. lupulina* + *R. irregularis*”. Паритет позитивной и негативной регуляции в листьях растения-хозяина в подсемействе NIP на позднем этапе симбиоза “*M. lupulina* + *R. irregularis*” свидетельствует о фазозависимом эффекте микоризации на экспрессию аквапоринов, которые участвуют в развитии эффективного АМ-симбиоза. При этом гены аквапоринов *NIP3;1* и специфический *NIP7;1* сохранили позитивную регуляцию при смене фазы развития. Таким образом, микоризация грибом АМ *R. irregularis* модулирует экспрессию аквапоринов, причем характер изменений зависит от фазы развития растения. Можно полагать, что гены *NIP3;1* и специфический *NIP7;1* могут выступать в качестве позитивных маркеров развития эффективной АМ в условиях засухи. Такая активация NIP, вероятно, связана с активным метаболическим обменом в АМ-симбиозе. Доля аквапоринов, имеющих подавленную экспрессию в условиях засухи при микоризации, может зависеть от ее длительности. Так, например, согласно экспериментам G. Bárzana с коллегами (2014), в РМС “*Zea mays* + *R. intraradices*” при кратковременной засухе (4 сут) наблюдалась негативная регуляция лишь *ZmNIP2;1*, *ZmNIP2;2*, но увеличение длительности засухи до 12 сут приводило к переходу значительной части генов аквапоринов к негативной регуляции (*ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;2*, *ZmPIP1;3*, *ZmPIP1;4*, *ZmPIP2;2*, *ZmPIP2;4*, *ZmNIP2;1*, *ZmNIP2;2*, *ZmTIP1;1*, *ZmTIP1;2*). Последующее увеличение длительности засухи (до 42 сут) в РМС “*Poncirus trifoliata* + *F. mosseae*” показало, что экспрессия всех изученных генов аквапоринов подавлялась в корнях при микоризации (Zou et al., 2019). Другими причинами изменения экспрессии одних и тех же изоформ генов аквапоринов могут быть не только тип анализируемой растительной ткани, но и специфические особенности взаимодействия растений с разными видами грибов АМ (Bárzana et al., 2014; Sharma et al., 2021).

По-видимому, существуют и иные механизмы формирования устойчивости микоризованных растений к засухе в связи с повышением уровня экспрессии генов подсемейств PIP и TIP (в настоящем исследовании наблюдалась позитивная регуляция *PIP1;2*, *PIP1;4*, *PIP2;1*, *TIP2;3* в фазу цветения). Так, согласно (Sharma et al., 2021), повышенная активность белков PIP и TIP непосредственно связана с устойчивостью растений к засухе и проявляет-

ся: 1) в повышении эффективности водного транспорта (гидравлической проводимости корней); 2) интенсификации обмена питательными веществами, в частности поглощения азота; 3) усилении фотосинтеза (благодаря участию аквапоринов в диффузии CO₂) и увеличении производства фотосинтетических веществ (Uehlein et al., 2003; Bárzana et al., 2012); 4) поддержании осмотического давления и тургора, в том числе за счет регуляции работы устьиц, улучшения водного статуса растений благодаря повышению эффективности использования воды (Sharma et al., 2021). Надо отметить, что исследования, разъясняющие причины негативной регуляции аквапоринов при засухе в условиях микоризации, являются единичными (Asadollahi et al., 2023). Это подчеркивает актуальность проведенного анализа.

Таким образом, можно заключить, что микоризный симбиоз существенно повлиял на водный статус растения-хозяина в РМС “*M. lupulina* + *R. irregularis*” посредством регуляции аквапоринов в условиях засухи.

Заключение

Данное исследование показало, что, несмотря на условия дефицита водного питания, растительно-микробная система “*M. lupulina* + *R. irregularis*” продемонстрировала высокие показатели микоризации и симбиотической эффективности. В раннюю фазу (24-е сутки, 2-й лист) наблюдалась разнонаправленная регуляция: активация генов *NIP3;1*, *NIP4;2*, *TIP2;2*, специфическая экспрессия *NIP7;1* и подавление генов *PIP2;3*, *TIP1;1*, *TIP1;4*, *TIP2;3*, *TIP4;1*. Подсемейство SIP не проявляло значимых изменений. В позднюю фазу (48-е сутки, цветение) обнаружено более выраженное подавление экспрессии большинства генов (*NIP1;2*, *NIP1;5*, *NIP2;1*, *NIP4;2*, *PIP2;3*, *SIP1;3*, *TIP1;1*, *TIP2;2*, *TIP4;1*). Позитивную регуляцию среди основных переносчиков воды сохраняли *PIP1;2*, *PIP1;4*, *PIP2;1*, *TIP2;3*. Два гена (*NIP7;1*, *XIP1;1*) сохраняли активность, что может указывать на их специфическую роль в симбиозе. Среди представленных генов маркерами развития эффективной АМ в условиях засухи не могут быть гены *TIP2;2*, *PIP1;2*, *PIP2;1* и *NIP1;5* в связи с тем, что они обладают той же регуляцией в условиях нормального увлажнения по результатам сравнительного анализа с опубликованными ранее данными транскриптомных профилей листьев *M. lupulina*.

В функциональном плане гены подсемейства TIP, кодирующие белки, которые регулируют транспорт воды через вакуолярную мембрану, показали наиболее значимое подавление как на раннем, так и на позднем этапе. Вероятно, именно они принимают участие в осморегуляции при водном стрессе. Гены NIP, предположительно, вовлечены в процессы взаимодействия с грибом-симбионтом, что подтверждается их избирательной активацией. Роль генов подсемейства XIP в реакции на засуху при микоризации еще предстоит изучить. Полученные данные расширяют понимание механизмов адаптации микоризованных растений к засухе, в частности: 1) подтверждают ключевую роль аквапоринов подсемейства TIP в регуляции водного баланса; 2) указывают на возможную специфичность

PIP-генов для микоризного симбиоза; 3) демонстрируют фазозависимый характер регуляции экспрессии аквапоринов, что подчеркивает сложность их взаимодействия с грибом-симбионтом. Таким образом, исследование вносит вклад в изучение молекулярных основ засухоустойчивости микоризованных растений и открывает перспективы для дальнейшего анализа роли отдельных генов аквапоринов в симбиотических системах.

Список литературы / References

- Воробьев Н.И., Юрков А.П., Проворов Н.А. Свидетельство N2010612112 о регистрации компьютерной программы «Программа для расчета показателей микоризации корней растений» (от 2 декабря 2016 г.). М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2016
[Vorobyev N.I., Yurkov A.P., Provorov N.A. Certificate N2010612112 about the Registration of the Computer Program "Program for Calculating the Mycorrhization Indices of Plant Roots" (Dated December 2, 2016). Moscow: The Federal Service for Intellectual Property, 2016 (in Russian)]
- Данелия Г.В., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. Роль транспортирующих воду аквапоринов подсемейств PIP и TIP в онтогенезе растений и адаптации к стрессовым факторам. *Экологическая генетика*. 2024;22(4):343-368. doi 10.17816/ecogen637037
[Daneliia G.V., Yemelyanov V.V., Shishova M.F. The role of water-transporting aquaporins of the PIP and TIP subfamilies in plant development and adaptation to stress factors. *Ecological Genetics*. 2024;22(4):343-368. doi 10.17816/ecogen637037]
- Крюков А.А., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Иванченко О.Б., Шишова М.Ф., Юрков А.П. SWEET транспортеры *Medicago lupulina* в арбускулярно-микоризной системе в условиях среднего уровня доступного фосфора. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):189-196. doi 10.18699/VJGB-23-25
[Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Ivanchenko O.B., Shishova M.F., Yurkov A.P. SWEET transporters of *Medicago lupulina* in the arbuscular-mycorrhizal system in the presence of medium level of available phosphorus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(3):189-196. doi 10.18699/VJGB-23-25]
- Крюков А.А., Кудряшова Т.Р., Беляева А.И., Горенкова А.И., Юрков А.П. Влияние инокуляции грибом *Rhizophagus irregularis* на экспрессию генов аквапоринов в корнях *Medicago lupulina* в условиях засухи. *Экологическая генетика*. 2025;23(3):263-275. doi 10.17816/ecogen643544
[Kryukov A.A., Kudriashova T.R., Belyaeva A.I., Gorenkova A.I., Yurkov A.P. Effect of *Rhizophagus irregularis* inoculation on aquaporin gene expression in the roots of *Medicago lupulina* in drought conditions. *Ecological Genetics*. 2025;23(3):263-275. doi 10.17816/ecogen643544 (in Russian)]
- Кудряшова Т.Р., Крюков А.А., Горбунова А.О., Иванченко О.Б., Юрков А.П. SWEET гены *Medicago lupulina* при развитии симбиоза с арбускулярной микоризой в условиях низкого уровня фосфора. *Бутлеровские сообщения*. 2024;78(5):119-127. doi 10.37952/ROIjbc-01/24-78-5-119/ROI-jbc-C/24-7-2-8
[Kudriashova T.R., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Ivanchenko O.B., Yurkov A.P. SWEET genes of *Medicago lupulina* during the development of symbiosis with arbuscular mycorrhiza under conditions of low phosphorus levels. *Butlerov Communications*. 2024;78(5):119-127. doi 10.37952/ROIjbc-01/24-78-5-119/ROI-jbc-C/24-7-2-8 (in Russian)]
- 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
[Kudriashova T.R., Kryukov A.A., Gorenkova A.I., Yurkov A.P. Aquaporins and their role in plant-microbial systems. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(2):238-247. doi 10.18699/vjgb-25-27]
- 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
- Bárcana G., Aroca R., Paz J.A., Chaumont F., Martínez-Ballesta M.C., Carvajal M., Ruiz-Lozano J.M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Ann Bot*. 2012;109(5):1009-1017. doi 10.1093/aob/mcs007
- Bárcana G., Aroca R., Bienert G.P., Chaumont F., Ruiz-Lozano J.M. New insights into the regulation of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize plants under drought stress and possible implications for plant performance. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(4):349-363. doi 10.1094/MPMI-09-13-0268-R
- Dean R.M., Rivers R.L., Zeidel M.L., Roberts D.M. Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry*. 1999;38(1):347-353. doi 10.1021/bi982110c
- He F., Zhang H., Tang M. Aquaporin gene expression and physiological responses of *Robinia pseudoacacia* L. to the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* and drought stress. *Mycorrhiza*. 2016;26(4):311-323. doi 10.1007/s00572-015-0670-3
- He J.-D., Dong T., Wu H.-H., Zou Y.-N., Wu Q.-S., Kuča K. Mycorrhizas induce diverse responses of root TIP aquaporin gene expression to drought stress in trifoliate orange. *Sci Hortic*. 2019;243:64-69. doi 10.1016/j.scienta.2018.08.010
- Heymann J.B., Engel A. Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of water channels. *News Physiol Sci*. 1999;14:187-193. doi 10.1152/physiologyonline.1999.14.5.187
- 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
- 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
- Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R. The aquaporins. *Genome Biol*. 2006;7(2):206. doi 10.1186/gb-2006-7-2-206
- Kudoyarova G., Veselov D., Yemelyanov V., Shishova M. The role of aquaporins in plant growth under conditions of oxygen deficiency. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):10159. doi 10.3390/ijms231710159
- Lopez D., Amira M.B., Brown D., Muries B., Brunel-Michac N., Bourgerie S., Porcheron B., ... Fumanal 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
- 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
- MacRae E. Extraction of plant RNA. In: Hilario E., Mackay J. (Eds) *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Methods in Molecular Biology*. Vol. 353. Humana Press, 2007; 15-24. doi 10.1385/1-59745-229-7:15
- Mammadov J., Buyyarapu R., Guttikonda S., Parliament K., Abdurakhmonov I.Y., Kumpatla S.P. Wild relatives of maize, rice, cotton, and soybean: treasure troves for tolerance to biotic and abiotic stresses. *Front Plant Sci*. 2018;9:886. doi 10.3389/fpls.2018.00886

- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59(1):595-624. doi 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734
- 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/pcl004
- Murata K., Mitsuka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature.* 2000;407(6804):599-605. doi 10.1038/35036519
- 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
- Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc.* 1970;55(1):158-161. doi 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Porcel R., Gómez M., Kaldenhoff R., Ruiz-Lozano J.M. Impairment of *NtAQPI* gene expression in tobacco plants does not affect root colonization pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decreases their symbiotic efficiency under drought. *Mycorrhiza.* 2005;15:417-423. doi 10.1007/s00572-005-0346-5
- Porcel R., Aroca R., Azcon R., Ruiz-Lozano J.M. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Mol Biol.* 2006;60:389-404. doi 10.1007/s11103-005-4210-y
- Quiroga G., Erice G., Aroca R., Chaumont F., Ruiz-Lozano J.M. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to the regulation of radial root water transport in maize plants under water deficit. *Environ Exp Bot.* 2019;167:103821. doi 10.1016/j.envexpbot.2019.103821
- Remy W., Taylor T.N., Hass H., Kerp H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(25):11841-11843. doi 10.1073/pnas.91.25.11841
- Ruiz-Lozano J.M., Aroca R. Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. In: Koltai H., Kapulnik Y. (Eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Dordrecht: Springer, 2010;239-256. doi 10.1007/978-90-481-9489-6_11
- Sandal N.N., Marcker K.A. Soybean nodulin 26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:9347-9348. doi 10.1093/nar/16.19.9347
- Sharma K., Gupta S., Thokchom S.D., Jangir P., Kapoor R. Arbuscular mycorrhiza-mediated regulation of polyamines and aquaporins during abiotic stress: deep insights on the recondite players. *Front Plant Sci.* 2021;12:642101. doi 10.3389/fpls.2021.642101
- Singh S., Bhatt V., Kumar V., Kumawat S., Khatri P., Singla P., Shivaraj S.M., Nadaf A., Deshmukh R., Sharma T.R., Sonah H. Evolutionary understanding of aquaporin transport system in the basal eudicot model species *Aquilegia coerulea*. *Plants.* 2020;9(6):799. doi 10.3390/plants9060799
- Smith S.E., Read D.J. (Eds) *Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego, CA: Academic Press, 2008. doi 10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi S. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (Eds) *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Paris: INRA, 1986;217-221
- Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., Kaldenhoff R. The tobacco aquaporin NtAQPI is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature.* 2003;425(6959):734-737. doi 10.1038/nature02027
- 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
- Yurkov A.P., Jacobi L.M., Gapeeva N.E., Stepanova G.V., Shishova M.F. Development of arbuscular mycorrhiza in highly responsive and mycotrophic host plant – black medick (*Medicago lupulina* L.). *Russ J Dev Biol.* 2015;46(5):263-275. doi 10.1134/S1062360415050082
- Yurkov A., Kryukov A., Gorbunova A., Sherbakov A., Dobryakova K., Mikhaylova Y., Afonin A., Shishova M. AM-induced alteration in the expression of genes, encoding phosphorus transporters and enzymes of carbohydrate metabolism in *Medicago lupulina*. *Plants.* 2020; 9(4):486. doi 10.3390/plants9040486
- Yurkov A., Puzanskiy R., Avdeeva G., Jacobi L., Gorbunova A., Kryukov A., Kozhemyakov A., ... Yemelyanov V., Shavarda A., Kirpichnikova A., Smolikova G., Shishova M. Mycorrhiza-induced alterations in metabolome of *Medicago lupulina* leaves during symbiosis development. *Plants.* 2021;10(11):2506. doi 10.3390/plants10112506
- Yurkov A.P., Afonin A.M., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudryashova T.R., Kovalchuk A.I., Gorenkova A.I., ... Zhukov V.A., Puzanskiy R.K., Mikhailova Y.V., Yemelyanov V.V., Shishova M.F. The effects of *Rhizophagus irregularis* inoculation on transcriptome of *Medicago lupulina* leaves at early vegetative and flowering stages of plant development. *Plants.* 2023;12:3580. doi 10.3390/plants12203580
- 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
- Zou Y.N., Wu H.H., Giri B., Wu Q.S., Kuča K. Mycorrhizal symbiosis down-regulates or does not change root aquaporin expression in trifoliate orange under drought stress. *Plant Physiol Biochem.* 2019; 144:292-299. doi 10.1016/j.plaphy.2019

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.08.2025. После доработки 27.11.2025. Принята к публикации 03.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-47

Производственный штамм клубеньковых бактерий сои RZ300 *Bradyrhizobium japonicum*, устойчивый к высушиванию на поверхности семян: культуральные свойства и специфические особенности генома

Ю.В. Косульников , А.А. Крюков , К.Н. Бердышева , А.И. Ковальчук , А.П. Юрков , Ю.В. Лактионов  

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

 laktionov@arriam.ru

Аннотация. Предпосевная обработка семян возделываемых бобовых культур препаратами клубеньковых бактерий является стандартной агрономической практикой, активно используемой при выращивании сои, эффективные микросимбионты которой часто отсутствуют в почве. В то же время, как показали многие исследования, эффект от применения биопрепарата во многом зависит от выживаемости ризобийных клеток на семенах при высушивании. В настоящей работе проведен анализ жизнеспособности у трех производственных штаммов *Bradyrhizobium japonicum*, 6436, 640 и RZ300, на семенах сои *Glycine max* L. разного происхождения (сорта ЭН Аргента, Бара и Пруденс) в опытах, различающихся по разным параметрам: концентрации инокулянта (10 и 100 %), температурам высушивания (5, 15, 25 °C) и составам защитных полимерно-углеводных композиций. В результате экспериментов обнаружено, что сорт сои не оказывал заметного влияния на жизнеспособность изучаемых штаммов ризобий, в то время как штаммы существенно различались по этому признаку. Наибольшую устойчивость к высушиванию на семенах сои показал штамм RZ300. Сравнительный анализ генома этого штамма с геномом слабо устойчивого к высушиванию штамма *B. japonicum* 6346 позволил выявить наличие у штамма RZ300 гена *orgC* (кодирует белок OrgC, участвующий в биосинтезе осморегулируемых периплазматических гликоканов (OPGs)), который отсутствует у штамма 6346 и, возможно, может определять повышенную устойчивость клубеньковых бактерий к высушиванию на семенах. При изучении эффекта различных защитных композиций было отмечено, что лучшими защитными свойствами обладают составы на основе 50 % раствора сахарозы, а наибольшая устойчивость ризобий к высушиванию проявляется при температуре +5 °C. Полученные в этой работе результаты могут быть использованы как в селекции эффективных штаммов-инокулянтов, так и в технологическом сопровождении при создании биопрепаратов. Данные, полученные при изучении геномов штаммов, представляют интерес как для разработки систем генетического скрининга при поиске перспективных штаммов, так и для изучения возможности введения генетических конструкций с геном *orgC* в перспективные штаммы ризобий для улучшения их технологичности, т.е. обеспечения возможности эффективной заблаговременной инокуляции семян.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии; соя *Glycine max* L.; *Bradyrhizobium japonicum*; микробные биопрепараты; осмотический стресс; полногеномное секвенирование; гены устойчивости к осмотическому стрессу

Для цитирования: Косульников Ю.В., Крюков А.А., Бердышева К.Н., Ковальчук А.И., Юрков А.П., Лактионов Ю.В. Производственный штамм клубеньковых бактерий сои RZ300 *Bradyrhizobium japonicum*, устойчивый к высушиванию на поверхности семян: культуральные свойства и специфические особенности генома. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):435-443. doi 10.18699/vjgb-26-47

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 25-26-00242.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИСХМ.

A production strain of soybean nodule bacteria RZ300 *Bradyrhizobium japonicum* resistant to drying on the seed surface: cultural properties and genomic features

Yu.V. Kosulnikov , A.A. Kryukov , K.N. Berdysheva , A.I. Kovalchuk , A.P. Yurkov , Yu.V. Laktionov  

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

 laktionov@arriam.ru

Abstract. Pre-sowing treatment of cultivated legume seeds with nodule bacteria preparations is a standard agronomic practice. This is particularly important in soybean cultivation, as effective microsymbionts of soybeans are often absent from the soil. However, as many studies have shown, the efficacy of biopreparations depends largely on

the survival of rhizobial cells on seeds during drying. In this study, we analyzed the viability of three production strains of *Bradyrhizobium japonicum* Kirchner (634b, 640 and RZ300) on soybean (*Glycine max* L.) seeds of various origins (varieties: EN Argenta, Bara and Prudence). The experiments evaluated several parameters: inoculant concentrations (10 and 100 %), drying temperatures (5, 15, and 25 °C), and protective polymer-carbohydrate formulations. The experiments revealed that the soybean variety had no noticeable effect on the viability of the studied rhizobial strains, while the strains themselves differed significantly in this regard. The RZ300 strain demonstrated the highest resistance to drying on soybean seeds. A comparative genomic analysis of this strain and the less resistant *B. japonicum* strain 634b revealed the presence of the *opgC* gene in the RZ300 strain (encodes the OpgC protein involved in the biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs)). This gene is absent in strain 634b and may potentially determine the increased resistance of nodule bacteria to drying on seeds. An evaluation of various protective formulations demonstrated that formulations based on 50 % sucrose provide the best protection, with rhizobia showing the highest resistance to drying at +5 °C. The results obtained in this study can be used both in the selection of effective inoculant strains and for providing technological support in the development of biological products. The genomic data support the development of genetic screening systems to identify promising strains and the potential introduction of the *opgC* gene into promising rhizobial strains to improve their manufacturability, i.e. to enable effective early seed inoculation.

Key words: nodule bacteria; soy *Glycine max* L.; *Bradyrhizobium japonicum*; microbial biologics; osmotic stress; genome-wide sequencing; osmotic stress resistance genes

For citation: Kosulnikov Yu.V., Kryukov A.A., Berdysheva K.N., Kovalchuk A.I., Yurkov A.P., Laktionov Yu.V. A production strain of soybean nodule bacteria RZ300 *Bradyrhizobium japonicum* resistant to drying on the seed surface: cultural properties and genomic features. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):435-443. doi 10.18699/vjgb-26-47

Введение

Важная агробиологическая особенность сои заключается в способности к формированию азотфиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза с клубеньковыми бактериями (Вавилов, Посыпанов, 1983; Regar et al., 2017). При этом эффективный симбиоз образуется только при наличии в почве активных вирулентных бактерий-симбионтов сои в достаточном количестве, что редко встречается в полевых условиях и, таким образом, снижает урожайность бобовой культуры (Lampthey et al., 2014). Соответственно, для наиболее полной реализации потенциала бобово-ризобияльного симбиоза необходимо искусственное внесение симбиотически эффективных штаммов клубеньковых бактерий в ризосферу бобовой агрокультуры, что в сельскохозяйственной практике осуществляется посредством предпосевной инокуляции семян сои биопрепаратами, созданными на основе клубеньковых бактерий-инокулянтов (Bashan et al., 2014). В отечественном сельском хозяйстве активно применяется биопрепарат на основе штамма *Bradyrhizobium japonicum* 634b под торговой маркой Ризоторфин, обеспечивающий высокие прибавки урожайности на различных сортах сои (Васильчиков, Гурьев, 2018; Volobueva et al., 2023). Во многих работах по изучению эффективности новых штаммов он выступает в качестве референсного штамма, в частности при оценке эффективности штамма 640 (Магомедов и др., 2011).

При анализе эффективности ризобияльных штаммов инокуляцию семян осуществляют в день посева, так как известно, что клубеньковые бактерии чувствительны к высушиванию. Однако в сельскохозяйственной практике по технологическим и экономическим причинам предпосевную обработку семян проводят заблаговременно, что может приводить к гибели нанесенных ризобий еще до момента заделки семени. Обзор этой проблемы осуществлен J. Vriezen с коллегами (2007). Еще в 1932 г. E.B. Fred с коллегами сообщили о снижении численности жизне-

способных клеток клубеньковых бактерий на семенах и предположили, что состав питательной среды, pH и температура являются факторами, определяющими устойчивость клеток к высушиванию.

Позже J.M. Vincent с коллегами (1961) изучали культуру *Rhizobium trifolii* во время ее сушки на стеклянных шариках и предположили, что снижение числа жизнеспособных ризобий обусловлено «факторами семян» и фактором собственно высушивания. В их работе показано, что отрицательный эффект сушки может быть частично компенсирован добавлением сахаридов, в частности мальтозы, что указывает на то, что доступность питательных веществ, а возможно, и других растворенных веществ, влияет на выживаемость бактериальных клеток.

В ряде исследовательских работ продемонстрировано различие динамик жизнеспособности клубеньковых бактерий на матриксах разного состава (стеклянные шарики, семена, почва, нитроцеллюлозные фильтры и т. д.) (Vriezen et al., 2006). Одна из возможных причин наблюдаемых различий – сухие инокулированные семена имеют активность воды от 0.45 до 0.6 (Smith, 1992) и, таким образом, все еще содержат относительно большое ее количество, в отличие от абсолютно сухих поверхностей стеклянных бусин или нитроцеллюлозных фильтров.

С практической точки зрения, учитывая высокую чувствительность клубеньковых бактерий к высушиванию, важно либо обеспечить высева семян в день обработки (Васильчиков, Гурьев, 2018), либо использовать специальные полимерные и углеводные протекторы, повышающие устойчивость бактерий к осмотическому стрессу (Skorupska et al., 2006; Deaker et al., 2007; Reina-Bueno et al., 2012). В частности, нами ранее показано, что водорастворимый полимер поливинилпирролидон в композиции с активированным углем существенно повышает выживаемость ризобий на инокулированных семенах. Эффективность такой композиции выше, чем при использовании

поливинилпирролидона без угля, и на 20–30 % уменьшает гибель бактерий на инокулированных семенах после первых 5–7 суток хранения семян (Лактионов и др., 2019).

Наконец, следует отметить, что исследования выживаемости ризобий при предпосевной инокуляции должны стать важным элементом селекции эффективных штаммов-инокулянтов. Ключевой элемент при этом – изучение механизмов устойчивости ризобий к высушиванию. В мировой литературе ряд работ посвящен исследованию молекулярно-генетических аспектов осмотической устойчивости клубеньковых бактерий (Vriezen et al., 2007), особенно в рамках проблемы изменения климата (Zhang et al., 2024). Но относительно мало исследований по оценке жизнеспособности коллекционных штаммов микроорганизмов на семенах зернобобовых культур, а также по способам, с помощью которых можно повысить устойчивость клеток к осмотическому стрессу (Лактионов и др., 2019).

Цель нашей работы заключалась в оценке устойчивости трех производственных штаммов клубеньковых бактерий сои: штамма 6346 (используется для получения инокулянтов марки Ризоторфин), штамма 640 (в ряде работ определен как более эффективный по сравнению со штаммом 6346) и нового перспективного штамма RZ300 на семенах сои различных сортов, при различных температурных режимах хранения и использовании протекторных полимерно-угольных композиций различного состава, а также в выяснении механизмов устойчивости штаммов к высушиванию с применением методов сравнительной геномики.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы 6346, 640 и RZ300 *B. japonicum* из сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства.

Штамм 6346 выделен из клубеньков сои сорта Колхида 4 в Грузии на Цхакайской станции. Он применяется для производства инокулянта под сою под торговой маркой Ризоторфин (Васильчиков, Гурьев, 2018; Volobueva et al., 2023). Штамм 640 получен из клубеньков сои сорта Смена на лугово-черноземной почве Амурской области в 1976 г. во Всероссийском НИИ сои. В ряде работ штамм определен как более эффективный по сравнению со штаммом 6346 (Магомедов и др., 2011). Штамм RZ300 выделен в Краснодарском крае из клубеньков сои сорта Бара в 2022 г. и до настоящего времени почти не изучен. Этот штамм отличается стабильностью образования клубеньков в вегетационных и полевых опытах при нормальных и экстремальных условиях (наличие химических пестицидов, недостаток влаги). По штамму RZ300 получен патент № 2806593 «Способ культивирования клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* RZ300».

Выращивание штаммов 6346, 640 и RZ300 *B. japonicum* для инокуляции осуществляли в жидкой полусинтетической среде следующего состава (Yadav et al., 2011): маннит – 10.0 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; K_2HPO_4 – 0.5 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2 г/л; NaCl – 0.1 г/л; $CaCO_3$ – следы, в течение 7 суток при 28 °C в стеклянных колбах с ватной

пробкой объемом 250 мл на орбитальном шейкере при 180 об./мин. По окончании культивирования колбы снимали с качалки и помещали в холодильник на хранение при +5 °C. Для получения опытных жидких культур посевной материал из колб асептически переносили в лабораторный ферментер BIORUS. Объем инокулята составлял 2 % от объема среды. Состав питательной среды инокулята соответствовал ранее указанному (Yadav et al., 2011).

Культивирование микроорганизмов производили до стационарной фазы, в которой клетки наиболее устойчивы к осмотическому стрессу (Soria et al., 2006), в периодическом режиме в течение 7 суток при +28 °C при скорости механического перемешивания 150 об./мин и интенсивности аэрации 1 л возд./1 л среды в мин. Полученные опытные препараты асептически разливали по предварительно простерилизованным стеклянным колбам с ватной пробкой и помещали в холодильник на хранение. Для определения титра полученных бактериальных суспензий готовили серию их последовательных 10-кратных разведений с последующим посевом на чашки Петри с агаризованной питательной средой указанного ранее состава (Yadav et al., 2011), инкубировали в течение 10 суток при +28 °C и подсчитывали число образовавшихся колоний.

Для изучения устойчивости штаммов к высушиванию использовали стеклянные шарики и семена сои *Glycine max* L. трех перспективных сортов: ЭН Аргента (Дериглазова, Морозов, 2022), Бара (Парахин и др., 2017), Пруденс (Бобкова, 2020), различающихся по происхождению.

Динамику жизнеспособности клубеньковых бактерий при высушивании изучали при обработке семян и стеклянных шариков сходного размера (для определения влияния «фактора семян») препаратами ризобий в течение 24 ч после инокуляции. Препараты наносили в концентрациях: 10 % (водный раствор) и 100 % (неразведенный инокулянт) из расчета 10 л на 1 т семян, принятых в сельскохозяйственной практике возделывания полевых культур (Кинчарова, Матвиенко, 2021). Избыток инокулянта в виде неразведенного препарата наносили для оценки влияния вносимых с ним экзополисахаридов и остатков среды, а также более высокой плотности клеток на их устойчивость к высушиванию на семенах. Обработку семян и шариков вариантами баковых растворов с последующей оценкой динамики жизнеспособности бактерий с течением времени проводили по авторской методике (Лактионов и др., 2019), повторность опыта – трехкратная.

Для оценки эффективности полимерно-углеводных композиций в качестве протекторов бактерий на семенах, высушающихся при различных температурах, готовили следующие составы: 1 % раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ); 50 % раствор сахарозы; смесь 1 % раствора КМЦ, 50 % раствора сахарозы; смесь 1 % раствора КМЦ, 50 % раствора сахарозы и 1 % активированного угля.

Чистоту микробных культур в процессе работы определяли как по морфологическим признакам (морфология колоний на чашках и клеток ризобий в фиксированном мазке), так и с помощью молекулярно-генетической идентификации (анализ последовательностей гена 16S рРНК).

ДНК ризобий выделяли методом СТАВ (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987, 1990). Секвенирование общей ДНК штаммов RZ300 (BioProject PRJNA1266151) и 6346 (BioProject PRJNA1334995) осуществляли методом 3-го поколения (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Сборку и аннотацию полногеномных данных выполняли с применением современных биоинформатических методов: flye, SPAdes, mauveAligner, GeneMark, Prokka, EggNOG-mapper. По результатам биоинформатического анализа произвели аннотирование в Генбанк полногеномных последовательностей штаммов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием библиотеки SciPy, а визуализацию результатов — с помощью библиотеки matplotlib языка Python.

Результаты

На первом этапе исследований был определен титр клеток изучаемых штаммов в соответствующих бактериальных суспензиях на момент приготовления рабочих растворов. Он составлял: 1.8 ± 0.24 млрд КОЕ/мл для штамма 6346; 1.77 ± 0.29 млрд КОЕ/мл для штамма 640; 2.0 ± 0.19 млрд КОЕ/мл для штамма RZ300.

Для демонстрации специфического влияния на выживаемость изучаемых штаммов в процессе их высыхания проведена оценка жизнеспособности ризобий на семенах сои сорта ЭН Аргента и на стеклянных шариках (результаты представлены на рис. 1). Показано, что на стеклянных шариках жизнеспособные клетки сохраняются в количестве нескольких тысяч КОЕ на один шарик лишь в течение 3 ч после инокуляции и почти полностью погибают уже через сутки после обработки. В то же время на семенах сохраняются десятки тысяч жизнеспособных клеток спустя сутки после обработки. При этом разница в жизнеспособности клеток разных штаммов не является статистически значимой; рассчитанная F-статистика ($2.67 < \text{критического значения } F(3.89)$ при 5 % уровне значимости).

На втором этапе исследований изучали возможное влияние семян трех сортов сои на динамику жизнеспособности клубеньковых бактерий без добавления защитных композиций (рис. 2). При обработке семян 10 % раствором инокулянта в норме 10 л/т спустя 168 ч после инокуляции клетки штамма RZ300 сохраняются на семенах сои сортов ЭН Аргента, Бара и Пруденс в количестве 16, 14 и 21 тыс. КОЕ на одно семя соответственно. В то же время для штаммов 6346 и 640 этот показатель не превышал (соответственно) 3, 6 и 2 тыс. КОЕ на одно семя.

Анализ жизнеспособности трех штаммов *B. japonicum* на разных сортах сои через 168 ч после обработки показал, что для сорта ЭН Аргента количество жизнеспособных клеток штамма RZ300 ($\bar{X} = 15.67$ тыс. КОЕ/семя) статистически значимо превышает ($HSP = 5.19$; $p < 0.05$) таковое у штаммов 6346 ($\bar{X} = 2.00$ тыс. КОЕ/семя) и 640 ($\bar{X} = 2.67$ тыс. КОЕ/семя). Аналогичные закономерности наблюдались для сортов Бара и Пруденс. Штамм RZ300 продемонстрировал статистически значимо более высокую жизнеспособность клеток на сортах Бара ($\bar{X} = 14.00$ тыс. КОЕ/семя; $HSP = 4.85$) и Пруденс ($\bar{X} = 21.33$ тыс. КОЕ/семя; $HSP = 3.20$) по сравнению со штаммами 6346 и 640, между которыми существенных различий не обнаружено. Через 336 ч число бактерий штамма RZ300 на семенах всех сортов исчислялось тысячами КОЕ/семя, в то время как жизнеспособные клетки штаммов 6346 и 640 выделить с семян не удавалось. Схожая закономерность наблюдалась и для 100 % растворов инокулянтов изучаемых штаммов, с поправкой на изначально большее количество нанесенных клеток.

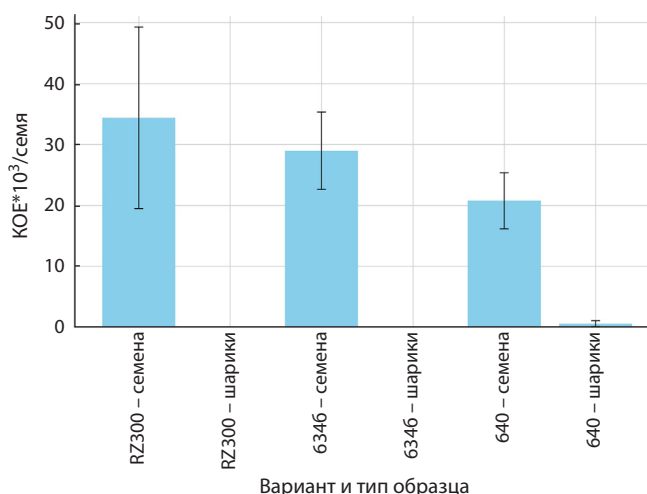


Рис. 1. Жизнеспособность клеток изучаемых штаммов на семенах сои сорта ЭН Аргента и стеклянных шариках спустя 24 ч после инокуляции.

семя; $HSP = 3.20$) по сравнению со штаммами 6346 и 640, между которыми существенных различий не обнаружено. Через 336 ч число бактерий штамма RZ300 на семенах всех сортов исчислялось тысячами КОЕ/семя, в то время как жизнеспособные клетки штаммов 6346 и 640 выделить с семян не удавалось. Схожая закономерность наблюдалась и для 100 % растворов инокулянтов изучаемых штаммов, с поправкой на изначально большее количество нанесенных клеток.

На третьем этапе исследования было изучено влияние различных защитных композиций и температурного режима на жизнеспособность клеток штамма RZ300, продемонстрировавшего лучшие показатели выживаемости на инокулированных семенах. На рис. 3 показано, что с ростом температуры увеличивается скорость гибели клеток. При этом карбоксиметилцеллюлоза является относительно малоэффективным протектором клеток, в то время как сахароза и композиции на ее основе существенно увеличивают устойчивость бактерий к высыханию на семенах. Для температуры +5 °C, демонстрирующей наименьший контраст между средними значениями по вариантам протектора, показано, что варианты с сахарозой обеспечивают жизнеспособность клеток достоверно выше (при 5 % уровне значимости) по сравнению с 1 % карбоксиметилцеллюлозой, при этом разница между различными вариантами с сахарозой была незначима. Таким образом, можно предположить, что именно сахароза оказывает наибольший защитный эффект в отношении бактерий, подвергающихся высыханию на семенах. Соответственно, посредством композиций на основе сахарозы можно еще больше повысить устойчивость штамма RZ300 к высыханию на семенах.

Наконец, с целью выявления особенностей генома штамма RZ300, которые могут быть ответственны за его устойчивость к высыханию, был выполнен сравнительный

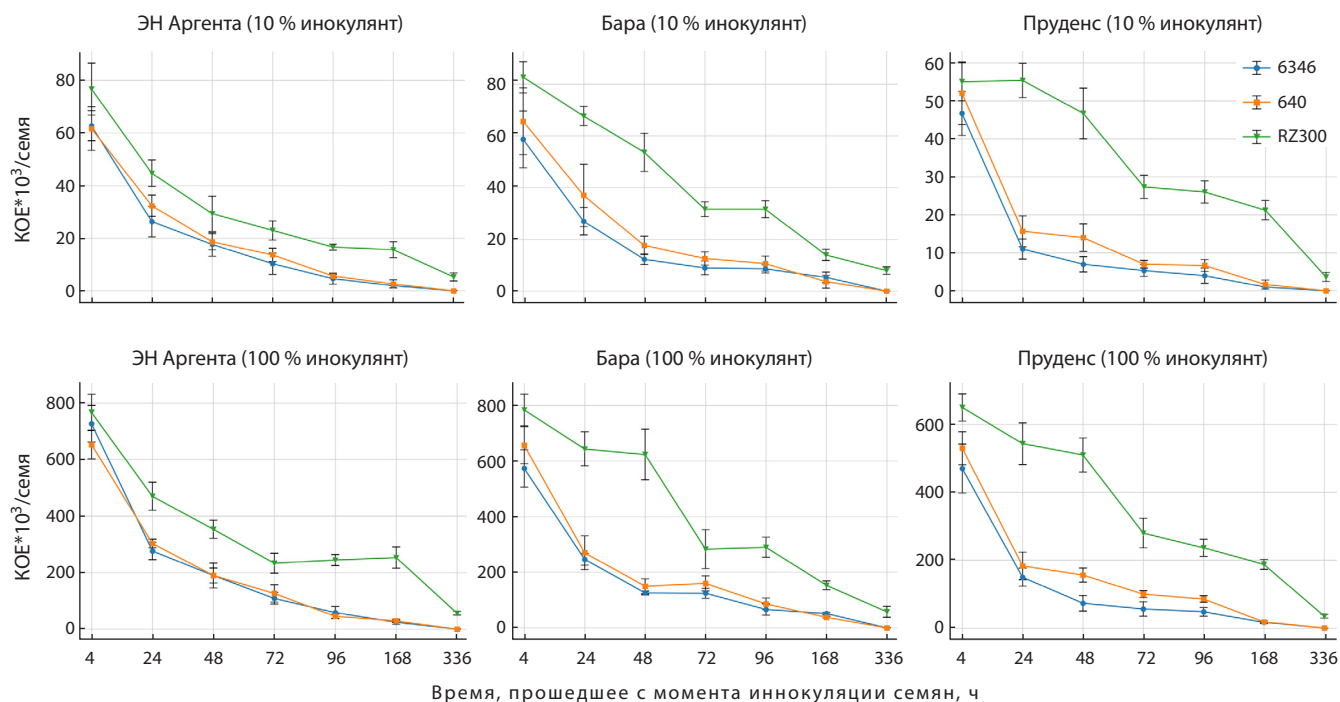


Рис. 2. Динамика жизнеспособных клеток на семенах сои сортов ЭН Аргента, Бара, Пруденс, инокулированных 10 и 100 % растворами препаратов без добавления защитных композиций.

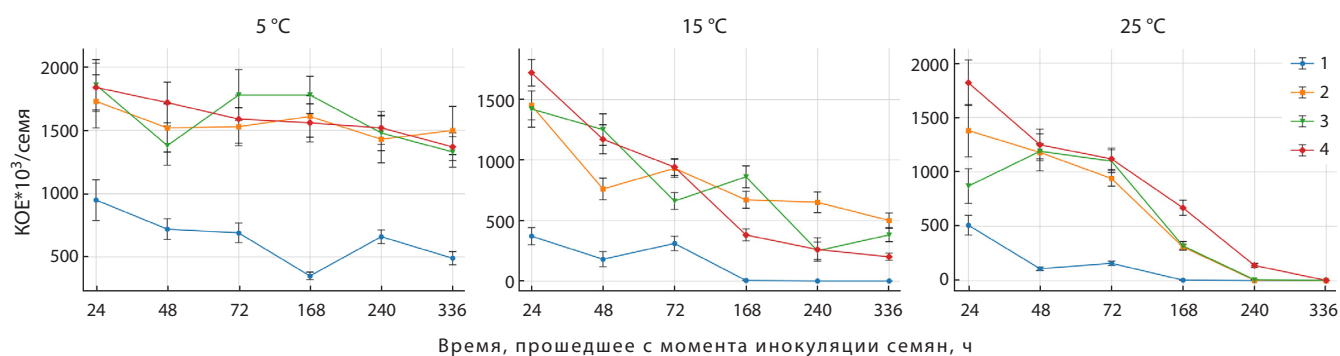


Рис. 3. Динамика жизнеспособности клеток RZ300 на семенах сорта ЭН Аргента в течение двух недель хранения при разных температурных режимах (5, 15, 25 °C) и составе полимерных протекторов (1 – 1 % КМЦ; 2 – 50 % сахара; 3 – 1 % КМЦ + 50 % сахара; 4 – 1 % КМЦ + 50 % сахара + 0.5 % активированный уголь).

анализ его полного генома с геномом менее устойчивого штамма 6346.

Результаты полногеномного секвенирования штамма RZ300 депонированы в NCBI (BioProject PRJNA1266151). Размер кольцевой хромосомы – 9199961 п. о. Общее число генов равно 9643, из них кодирующие – 5736, значительная часть – 3842 – относится к псевдогенам. Результаты полногеномного секвенирования штамма 6346 также депонированы NCBI (BioProject PRJNA1334995). Сравнение геномов штаммов RZ300 и 6346 было выполнено с помощью программного обеспечения – RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) server. В таблице приведены дифференциально представленные гены, специфические для изученных штаммов.

Обсуждение

В сельскохозяйственной практике потенциал продуктивности бобово-ризобияльного симбиоза возможно реализовать только при обеспечении высокой выживаемости бактерий на инокулированных семенах до их высева в почву. При этом, несмотря на высокую прикладную значимость вопроса устойчивости клубеньковых бактерий к высушиванию на семенах, это направление исследований остается малоизученным как в отечественной, так и в зарубежной научной литературе.

При использовании стеклянных шариков выявлено, что поверхность семян – более благоприятная среда для клубеньковых бактерий, чем инертная поверхность стекла. Это свидетельствует о том, что эволюционная история

Сравнительный анализ генов по функциональным группам у устойчивого и чувствительного к высушиванию штаммов RZ300 и 6346 *B. japonicum*

Функциональная группа генов	Имеются только	
	у штамма RZ300	у штамма 6346
Реакция на стресс	<i>opgC, opgG2, bphP, hflX</i>	<i>LTC4S, katA, tehA</i>
Углеводы	<i>nagE, nagB, nagA, hatA, livK, malF, thiH, hbd, bdh, ribB, gadh, gcdC, gcd, deoC</i>	<i>bkdA, bkdB, bkdC, bkdD, actP, hpr, ppsA, malK, fixX, xylR</i>
Подсистемы на основе кластеризации	<i>tseT, rny, fixO, trmE, dgkA</i>	<i>aepA, rtxC, minE, rad50, mre11</i>
Метаболизм ДНК	<i>vsr</i>	<i>yieH, yrrC, rep, pcrA, hup</i>
Метаболизм РНК	<i>rpoE, mucD</i>	<i>rpoH3, rnpA, mbl</i>
Азотный обмен	<i>narB, narK, ntrC, norB</i>	<i>nosD, nosF, nosR, nosL, nosY, nosZ, cynD, cynB, cynA</i>
Метаболизм белков	<i>lgt, trnV</i>	<i>hypC, ere</i>
Мембранный транспорт	<i>oppF, oppD, oppA, dppC, livH, livM, livG, livF, nhaA</i>	<i>mgtA, trbB, trbC, trbD, trbE, trbJ, lapB, lapC, lapE, flpA, hrcU</i>
Аминокислоты и производные	<i>potA, potI, urtA, ureJ, tdh</i>	<i>prpA, atzA, arcA, arcD, odc, antA, hmg</i>
Дыхание	<i>cydA, resA</i>	<i>hupV, hupU, hoxX, hoxT, hoxA, hoxJ</i>
Жирные кислоты, липиды, изопреноиды	<i>hbd</i>	–
Метаболизм ароматических соединений	<i>mucl, estA, hbaP, maoA</i>	<i>bkdA</i>
Вирулентность, болезнь и защита	<i>lodB, lodA, czcD, cusA, czcA, nccB, merR, cueO</i>	–
Метаболизм серы	<i>gshT, trkA</i>	–
Метаболизм железа	<i>tonB, fhuA</i>	–
Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты	<i>pdhA, btuB</i>	<i>bcd</i>
Фаги, профаги	<i>terL</i>	–
Подвижность и хемотаксис	<i>cheA</i>	<i>fliS</i>
Разное	<i>cdhA, gpmA</i>	–

Примечание. Жирным шрифтом выделены гены, предположительно имеющие отношение к повышенной устойчивости штамма RZ300 к стрессам.

симбиоза, кроме широко известных функций, связанных с вирулентностью и азотфиксацией, возможно, включала и развитие специфических функций, связанных с сохранением жизнеспособности ризобий на поверхности семян, что, очевидно, имеет большое значение для обеспечения стабильности симбиоза.

Интересно отметить, что по данным, полученным в настоящем исследовании, сорт семян не влияет на динамику снижения числа клеток, тогда как штаммы бактерий значительно различаются по устойчивости к высушиванию. Это указывает, во-первых, на консервативность механизмов (со стороны растения), обеспечивающих сохранность ризобий на поверхности семян, а во-вторых, – на перспективность селекции штаммов инокулянтов по признаку устойчивости к высушиванию как способа повышения их технологичности, т. е. интеграции с существующими агротехнологическими схемами, на что до настоящего времени обращали очень мало внимания.

В настоящем исследовании мы показали, что в обеспечение выживаемости ризобий на инокулированных семенах значительный вклад может внести подбор эффектив-

ных защитных композиций и методов обработки семян. Так, повышение нормы расхода инокулянта в 10 раз приводило к пропорциональному увеличению числа жизнеспособных клеток на семенах на всем протяжении исследуемого периода. Однако общая динамика гибели клеток оставалась схожей с таковой при использовании 10 % растворов. Это позволяет предположить отсутствие выраженного защитного эффекта экзополисахаридов, вносимых с увеличенным объемом инокулянта, на осмотическую устойчивость штаммов.

Обнаружено, что динамика сокращения числа жизнеспособных бактерий на семенах замедляется со снижением температуры, а также при условии добавления защитных полимерно-углеводных композиций, в частности на основе 50 % сахарозы. Таким образом, понижением температуры и добавлением сахарозы при обработке семян сои можно добиться увеличения числа жизнеспособных клеток на семени к моменту его заделки в почву.

При сравнительном анализе геномов штаммов RZ300 и 6346 выявлены следующие различия. По группе генов «реакции на стресс» устойчивый к высушиванию RZ300

обладает генами *opgC* и *opgG2*, отвечающими за синтез осморегулируемых периплазматических глюкозидов, что напрямую объясняет его способность противостоять осмотическому стрессу, в то время как осмочувствительный 6346 лишен этих генов. *OpnC* – белок, участвующий в биосинтезе осморегулируемых периплазматических глюкозидов (OPGs), характерных для ряда бактерий. Эти глюкозиды играют важную роль в адаптации к осмотическому стрессу, а также участвуют в поддержании целостности клеточной оболочки, формировании биопленок и патогенности. Возможно, именно роль этого гена в формировании биопленок и определяет устойчивость бактерий к высушиванию на семенах. Мутации в гене *opnC* могут приводить к изменениям в синтезе *OpnC*, что, в свою очередь, влияет на выживаемость бактерий в условиях осмотического стресса (Bontemps-Gallo, Lacroix, 2015).

Среди других генов, которые потенциально могли бы быть вовлечены в контроль устойчивости к стрессу, у штамма RZ300 присутствует ген, кодирующий ГТФ-связывающий белок, родственник HflX. Результаты последних исследований указывают на роль HflX в определении устойчивости бактерий к макролидам и линкозамидам (Rudra et al., 2020). Обращает на себя внимание наличие у штамма RZ300 гена *dgkA*. Известно, что экспрессия гена *dgkA* связана с ускорением роста и выживаемости бактерий в ответ на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды (Baker et al., 2021). В контексте мембранного транспорта, устойчивый к высушиванию штамм RZ300 демонстрирует более развитые системы импорта, включая транспортеры для олигопептидов (гены *oppA*, *oppD*, *oppF*), дипептидов (ген *dppC*) и аминокислот (*livH*, *livM*, *livG*, *livF*), а также имеет ген *nhaA* для регуляции Na^+/H^+ -антипорта. Примечательно, что регуляция гена *nhaA* кишечной палочки *Escherichia coli* используется для получения трансгенных растений риса (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) с повышенной устойчивостью к засолению, но пониженной – к засухе (Wu et al., 2005).

Заметной особенностью RZ300 является наличие гена *lgt*, кодирующего фермент, участвующий в биосинтезе липопротеинов, что критически важно для поддержания целостности клеточной оболочки, а следовательно, и для устойчивости к стрессовым факторам. Показано, что снижение уровня Lgt в клиническом штамме уропатогенной кишечной палочки приводит к повышению проницаемости внешней мембраны и увеличению чувствительности к сыворотке и антибиотикам (Diao et al., 2021). Наконец, у штамма RZ300 обнаружены ген *cdhA*, кодирующий холиндегидрогеназу, и ген *gpmA*, отвечающий за фосфолипидатмутаза, которые указывают на его способность поддерживать целостность клеточных мембран.

В ряде исследований выявлено, что патогенные бактерии, мутантные по гену *cdhA*, обладают пониженной вирулентностью и устойчивостью к антибиотикам, воздействующим на клеточную стенку (Pancholi et al., 2010). Известно, что делеция в гене *gpmA* у *E. coli* приводит к специфической гиперчувствительности к H_2O_2 , сравнимой с делецией основного гена-поглопителя H_2O_2 *katG*. При воздействии H_2O_2 транскрипция *gpmA* усиливается, что

подчеркивает его роль в защите от окислительного стресса. В соответствии с этим, ген *gpmA* можно определить как элемент механизма защиты бактерий от окислительного стресса (Roth et al., 2022).

Таким образом, по результатам проведенного анализа генетических различий между осмоустойчивым штаммом RZ300 и осмочувствительным 6346 было показано, что среди дифференциально представленных генов можно выделить большую группу, которая предположительно могла бы быть связана с контролем устойчивости. Из этих генов наибольший интерес представляют *opnC* и *opgG2*, отвечающие за синтез осморегулируемых периплазматических глюкозидов, которые могут играть важную роль в определении устойчивости клубеньковых бактерий к высушиванию на инокулированных семенах. Эти данные не только открывают перспективу в исследовании механизмов устойчивости ризобий к высушиванию, но и дают направления для экспериментов с переносом генетических конструкций, содержащих эти гены, в симбиотически эффективные штаммы ризобий для обеспечения их соответствия требованиям современных агротехнологий.

Заключение

В настоящем исследовании детально изучена проблема обеспечения устойчивости ризобияльных штаммов-инокулянтов к высушиванию на поверхности инокулированных семян сои. Показано, что выживаемость штаммов ризобий на семенах сои, во-первых, существенно выше, чем на нейтральном носителе (стеклянных шариках), а во-вторых, не зависит от сорта сои. Выявлено, что главные различия по выживаемости связаны с самими штаммами, что указывает на важность селекции перспективных штаммов-инокулянтов именно по этому признаку. Разработаны оптимальные технологии применения защитных композиций, повышающих устойчивость штаммов к высушиванию на семенах. Для выяснения механизмов устойчивости штаммов к высушиванию проведен сравнительный анализ полных геномов устойчивого и менее устойчивого штаммов. Обнаружены гены-кандидаты, которые потенциально могут быть вовлечены в контроль данного признака.

Особый интерес представляет наличие у устойчивого штамма RZ300 гена *opnC*, который отсутствует у менее устойчивого штамма 6346 и, вероятно, играет роль в формировании устойчивости бактерий к высушиванию на семенах. Предполагается, что ген *opnC* может служить молекулярным маркером устойчивости к высушиванию бактерий на семенах и быть использован в будущем для целенаправленной селекции или генной модификации ризобияльных штаммов, применяемых в составе микробных препаратов.

Список литературы / References

- Бобкова Ю.А. Реакция сои сорта ОАК Пруденс на некорневую подкормку макро- и микроудобрениями в условиях Орловской области. *Вестник аграрной науки*. 2020;5(86):11-18. doi 10.17238/issn2587-666X.2020.5.11
[Bobkova Yu.A. Reaction of OAK Prudence soybeans to foliar fertilization with macro- and micro fertilizers in the conditions of the

- Orel region. *Vestnik Agrarnoy Nauki = Bulletin of Agrarian Science*. 2020;5(86):11-18. doi 10.17238/issn2587-666X.2020.5.11 (in Russian)]
- Вавилов П.П., Посыпанов Г.С. Бобовые культуры и проблема растительного белка. М., 1983
[Vavilov P.P., Posypanov G.S. Legumes and the Issue of Vegetable Protein. Moscow, 1983 (in Russian)]
- Васильчиков А.Г., Гурьев Г.П. Адаптация сортов сои с разным вегетационным периодом к почвенно-климатическим условиям Орловской области. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018; 4(28):49-53. doi 10.24411/2309-348X-2018-00001
[Vasilchikov A.G., Gurev G.P. Adaptation of soybean varieties with different growing seasons to the soil and climatic conditions of the Oryol region. *Zernobobovye i Krupnyanye Kultury = Legumes Groat Crops*. 2018;4(28):49-53. doi 10.24411/2309-348X-2018-00001 (in Russian)]
- Дериглазова Г.М., Морозов А.Н. Конкурентоспособность отечественного сорта сои ЭН Аргента по сравнению с сортом канадской селекции ОАК Пруденс в условиях Центрального Черноземья. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2022;4(44):49-57. doi 10.24412/2309-348X-2022-4-49-57
[Deriglazova G.M., Morozov A.N. Competitiveness of the domestic soybean variety EN Argenta compared with the Canadian breeding variety of OAK Prudence in the conditions of the Central Black Earth region. *Zernobobovye i Krupnyanye Kultury = Legumes Groat Crops*. 2022;4(44):49-57. doi 10.24412/2309-348X-2022-4-49-57 (in Russian)]
- Кинчарова М.Н., Матвиенко Е.В. Эффективность предпосевной обработки семян в борьбе с болезнями зернового сорго. *Аграрный вестник Урала*. 2021;9(212):2-10. doi 10.32417/1997-4868-2021-212-09-2-10
[Kincharova M.N., Matvienko E.V. The effectiveness of pre-sowing seed treatment in the fight against diseases of grain sorghum. *Agrarnyy Vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2021; 9(212):2-10. doi 10.32417/1997-4868-2021-212-09-2-10 (in Russian)]
- Лактионов Ю.В., Косулников Ю.В., Дудникова Д.В., Яхно В.В., Кожемяков А.П. Протекторные свойства водорастворимых полимерных композиций и их твердофазной модификации при предпосевной обработке инокулированных семян сои *Glycine max* (L.) Merr. *Сельскохозяйственная биология*. 2019;54(5):1052-1059. doi 10.15389/agrobiology.2019.5.1052rus
[Laktionov Yu.V., Kosulnikov Yu.V., Dudnikova D.V., Yahno V.V., Kojemyakov A.P. Pre-sowing protection of inoculated soybean *Glycine max* (L.) Merr. seeds by water-soluble polymer compositions and their solid-phase modification. *Sel'skokhozyajstvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(5):1052-1059. doi 10.15389/agrobiology.2019.5.1052rus (in Russian)]
- Магомедов Р.Д., Цехмейструк Н.Г., Шелякин В.А., Рябуха С.С., Дидович С.В. Влияние различных штаммов *Rhizobium japonicum* (Kircher) Buchanan на урожайность сои. *Масличные культуры*. 2011;2(148-149):159-162
[Magomedov R.D., Tsekhmeistruk N.G., Shelyakin V.A., Ryabukha S.S., Didovich S.V. The influence of various strains *Rhizobium japonicum* (Kircher) Buchanan on soybean yield. *Maslichnyye Kultury = Oil Crops*. 2011;2(148-149):159-162 (in Russian)]
- Парахин Н.В., Лысенко Н.Н., Петрова С.Н., Кузмичева Ю.В., Рыжов И.А. Оценка эффективности систем гербицидов в агроценозах различных сортов сои в зависимости от способа основной обработки почвы. *Земледелие*. 2017;2:39-43
[Parakhin N.V., Lysenko N.N., Petrova S.N., Kuzmicheva Yu.V., Ryzhov I.A. Evaluation of herbicide system efficacy in agroecosis of different soybean varieties depending on tillage method. *Zemledeliye*. 2017;2:39-43 (in Russian)]
- Baker B.R., Ives C.M., Bray A., Caffrey M., Cochrane S.A. Undecaprenol kinase: function, mechanism and substrate specificity of a potential antibiotic target. *Eur J Med Chem*. 2021;210:113062. doi 10.1016/j.ejmech.2020.113062
- Bashan Y., de-Bashan L., Prabhu S.R., Hernandez J. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 2014;378:1-33. doi 10.1007/s11104-013-1956-x
- Bontemps-Gallo S., Lacroix J.M. New insights into the biological role of the osmoregulated periplasmic glucans in pathogenic and symbiotic bacteria. *Environ Microbiol Rep*. 2015;7(5):690-697. doi 10.1111/1758-2229.12325
- Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. *Soil Biol Biochem*. 2007; 39(2):573-580. doi 10.1016/j.soilbio.2006.09.005
- Diao J., Komura R., Sano T., Pantua H., Storek K.M., Inaba H., Oga-wa H., ... Yanagida H., Nishikawa J., Reid P.C., Cunningham C.N., Kapadia S.B. Inhibition of *Escherichia coli* lipoprotein diacylglycerol transferase is insensitive to resistance caused by deletion of Braun's lipoprotein. *J Bacteriol*. 2021;203(13):e00149-21. doi 10.1128/JB.00149-21
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987;19(1):11-15
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12(1):13-15
- Fred E.B. Some factors which influence the growth and longevity of the nodule bacteria. In: Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (Eds) *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. Madison; Wisconsin: University of Wisconsin, 1932;104-117
- Lamprey S., Ahiabor B.D.K., Yeboah S., Asamoah C. Response of soybean (*Glycine max*) to rhizobial inoculation and phosphorus application. *J Exp Biol Agric Sci*. 2014;2(1):72-77
- Pancholi V., Boël G., Jin H. *Streptococcus pyogenes* Ser/Thr kinase-regulated cell wall hydrolase is a cell division plane-recognizing and chain-forming virulence factor. *J Biol Chem*. 2010;285(40):30861-30874. doi 10.1074/jbc.M110.153825
- Regar M.K., Meena R.H., Jat G., Mundra S.L. Effect of different rhizobial strains on growth and yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2017;6(11):3653-3659. doi 10.20546/ijcmas.2017.6.11.427
- Reina-Bueno M., Argandoña M., Nieto J.J., Hidalgo-García A., Iglesias-Guerra F., Delgado M.J., Vargas C. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):207. doi 10.1186/1471-2180-12-207
- Roth M., Goodall E.C.A., Pullera K., Jaquet V., François P., Henderson I.R., Krause K.-H. Transposon-directed insertion-site sequencing reveals glycolysis gene *gpmA* as part of the H₂O₂ defense mechanisms in *Escherichia coli*. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10):2053. doi 10.3390/antiox11102053
- Rudra P., Hurst-Hess K.R., Cotten K.L., Partida-Miranda A., Ghosh P. Mycobacterial HflX is a ribosome splitting factor that mediates antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(1):629-634. doi 10.1073/pnas.1906748117
- Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact*. 2006;5(1):7. doi 10.1186/1475-2859-5-7
- Smith R.S. Legume inoculant formulation and application. *Can J Microbiol*. 1992;38(6):485-492. doi 10.1139/m92-080
- Soria M.A., Pagliero F.E., Correa O.S., Kerber N.L., Garcia A.F. Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* E109 to osmotic stress and the stability of liquid inoculants depend on growth phase. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006;22(1):1235-1241. doi 10.1007/s11274-006-9166-9
- Vincent J.M., Thompson J.A., Donovan K.O. Death of root nodule bacteria on drying. *Aust J Agric Res*. 1961;13(2):258-270. doi 10.1071/AR9620258
- Volobueva O.G., Trukhachev S., Belopukhov C., Seregina I. Comparative study of symbiotic activity of legumes when using Risotorphin

- and Epin-extra. *Braz J Biol.* 2023;83(3):e264218. doi 10.1590/1519-6984.264218
- Vriezen J.A., de Bruijn F.J., Nüsslein K. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Lett Appl Microbiol.* 2006;42(2):172-178. doi 10.1111/j.1472-765X.2005.01808.x
- Vriezen J., Bruijn F., Nüsslein K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(11):3451-3459. doi 10.1128/AEM.02991-06
- Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Chen Z., Qu L. Over-expression of the bacterial *nhaA* gene in rice enhances salt and drought tolerance. *Plant Sci.* 2005;168(2):297-302. doi 10.1016/j.plantsci.2004.05.033
- Yadav J., Verma J.P., Rajak V.K., Tiwari K.N. Selection of effective indigenous *Rhizobium* strain for seed inoculation of chickpea (*Cicer aritenium* L.) production. *Bacteriol J.* 2011;1(1):24-30. doi 10.3923/bj.2011.24.30
- Zhang Y., Ku Y.S., Cheung T.Y., Cheng S.S., Xin D., Gombeau K., Cai Y., Lam H.M., Chan T.F. Challenges to rhizobial adaptability in a changing climate: genetic engineering solutions for stress tolerance. *Microbiol Res.* 2024;288:127886. doi 10.1016/j.micres.2024.127886

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.07.2025. После доработки 04.12.2025. Принята к публикации 04.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-48

Сравнительный цитогенетический анализ хромосомы, ограниченной клетками зародышевой линии, у вьюрковых птиц (Passeriformes, Aves)

Л.П. Малиновская ^{1, 2}, К.В. Тишакова ^{1, 3}, П.М. Бородин ² 

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 borodin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Добавочная хромосома, ограниченная клетками зародышевой линии (germline-restricted chromosome, GRC), обнаружена у всех исследованных воробьинообразных птиц. Она элиминируется из клеток соматической линии в раннем эмбриогенезе и из сперматоцитов после первого или второго деления мейоза. GRC передается в ряду поколений преимущественно по материнской линии, содержит амплифицированные и перестроенные копии последовательностей хромосом основного набора. Некоторые из них экспрессируются в гонадах самцов и самок. Однако функция и эволюционная динамика GRC остаются неизвестными. Мы провели сравнительный цитогенетический анализ GRC пяти видов птиц семейства Вьюрковые – обыкновенного снегиря *Pyrrhula pyrrhula*, обыкновенной зеленушки *Chloris chloris*, обыкновенного щегла *Carduelis carduelis*, обыкновенной чечётки *Acanthis flammea* и обыкновенного щура *Pinicola enucleator* – с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* ДНК-зонда к целой GRC обыкновенного снегиря с материалом ядер распластанных сперматоцитов данных видов и иммулолокализации белков синаптомембранного комплекса и центромеры. Мы впервые описали кариотип синаптомембранных комплексов обыкновенного щура ($2n = 82 + \text{GRC}$). Биваленты основного набора состоят из девяти субметацентрических (семь макро- и два микробивалента) и 32 акроцентрических микробивалентов. Все акроцентрические микробиваленты основного набора содержат центромеры, состоящие из нескольких центромерных доменов (метаполицентромеры). GRC щура представляет собой крупный акроцентрический макроунивалент. Перекрестная гибридизация *in situ* ДНК-зонда к GRC снегиря показала только слабые сигналы на GRC щура и чечётки, тогда как на GRC зеленушки и щегла сигналы отсутствовали. Эти данные согласуются с опубликованными результатами, полученными для двух других представителей этого семейства, и свидетельствуют о высокой видовой специфичности последовательностей GRC в пределах семейства Вьюрковые. Мы также обнаружили межвидовые различия в локализации последовательностей, сходных с последовательностями GRC снегиря, на бивалентах основного набора исследуемых видов. Таким образом, наши данные указывают на быструю эволюцию генетического состава GRC и видоспецифичную динамику увеличения и сокращения копийности выявленных последовательностей на хромосомах основного набора в ходе эволюции певчих птиц.

Ключевые слова: germline-restricted chromosome; GRC; хромосомная эволюция; флуоресцентная гибридизация *in situ*; центромера; вьюрки

Для цитирования: Малиновская Л.П., Тишакова К.В., Бородин П.М. Сравнительный цитогенетический анализ хромосомы, ограниченной клетками зародышевой линии, у вьюрковых птиц (Passeriformes, Aves). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):444-450. doi 10.18699/vjgb-26-48

Финансирование. Исследование поддержано Российским научным фондом, грант № 23-14-00182.

Благодарности. Благодарим Центр микроскопии биологических объектов Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия (регламент № 3054), поддержанный грантами Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FSUS-2024-0018 и FWN-2026-0024.

Comparative cytogenetic analysis of the germline-restricted chromosome in Fringillidae species (Passeriformes, Aves)

L.P. Malinovskaya ^{1, 2}, K.V. Tishakova ^{1, 3}, P.M. Borodin ² 

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

³ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 borodin@bionet.nsc.ru

Abstract. An additional germline-restricted chromosome (GRC) has been found in the germline cells of all studied passerine bird species. It is eliminated from somatic cells during early embryogenesis and from spermatocytes after the first or second division of male meiosis. The GRC is transmitted across generations predominantly via the maternal line. It contains amplified and rearranged copies of genomic regions from the standard chromosome set. Some of these genes are expressed in the gonads of both males and females. However, the function and evolutionary dynamics of the GRC remain unknown. We conducted a comparative cytogenetic analysis of the GRC in five closely related finch species – the Eurasian bullfinch *Pyrrhula pyrrhula*, the common greenfinch *Chloris chloris*, the European goldfinch *Carduelis carduelis*, the common redpoll *Acanthis flammea*, and the pine grosbeak *Pinicola enucleator* – using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with a whole-chromosome DNA probe derived from the bullfinch GRC on spread spermatocytes of these species and immunolocalization of synaptonemal complex (SC) and centromere proteins. We described for the first time the SC karyotype of the pine grosbeak ($2n = 82 + \text{GRC}$). The standard chromosome set consists of nine submetacentric bivalents (seven macro- and two microbivalents) and 32 acrocentric microbivalents. All acrocentric microbivalents contain centromeres composed of multiple centromeric domains (metapolycentromeres). The grosbeak GRC is a large acrocentric macrounivalent. Cross-species *in situ* hybridization of the bullfinch GRC DNA probe showed only weak signals on the GRC of the grosbeak and redpoll, whereas no signal was detected on the greenfinch and goldfinch GRCs. These data are consistent with published results for two other representatives of this family and indicate rapid divergence and high species specificity of GRC sequences within the family Fringillidae. We also detected interspecies differences in the localization of sequences homologous to the bullfinch GRC on the bivalents of the standard set of these species. Thus, our data indicate rapid evolution of the GRC's genetic composition and reveal species-specific dynamics of increase and decrease in the copy number of detected sequences in the standard chromosome set during the evolution of songbird species.

Key words: germline-restricted chromosome; GRC; chromosome evolution; fluorescent *in situ* hybridization; centromere; finches

For citation: Malinovskaya L.P., Tishakova K.V., Borodin P.M. Comparative cytogenetic analysis of the germline-restricted chromosome in Fringillidae species (Passeriformes, Aves). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):444-450. doi 10.18699/vjgb-26-48

Введение

Добавочная хромосома, ограниченная клетками зародышевой линии (germline-restricted chromosome, GRC), обнаружена у всех исследованных воробьинообразных птиц, что свидетельствует о ее монофилетическом происхождении (Torgasheva et al., 2019). GRC всех изученных видов содержит амплифицированные и перестроенные копии последовательностей хромосом основного набора. Некоторые из них экспрессируются в гонадах самцов и самок (Biederman et al., 2018; Kinsella et al., 2019). GRC элиминируется из клеток соматической линии в раннем эмбриогенезе и из сперматоцитов после первого или второго деления мейоза (Pigozzi, Solari, 2005). GRC передается потомкам преимущественно по материнской линии (Pei et al., 2022).

Элиминация GRC из соматических клеток позволяет генам, локализованным на ней, избегать отбора, характерного для генов, локализованных на хромосомах основного набора. Это должно вести к быстрому изменению генетического состава GRC. Действительно, размер и генетический состав GRC широко варьируют между видами. У одних видов GRC – одна из самых крупных макрохромосом (макро-GRC), у других – одна из самых маленьких микрохромосом (микро-GRC) (Borodin et al., 2022).

Результаты перекрестной флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) с использованием полнохромосомных ДНК-зондов к GRC зебровой амадины *Taeniopygia guttata*, ласточки береговушки *Riparia riparia*, чижа *Spinus spinus* и большой синицы *Parus major* продемонстрировали очень низкий уровень сходства между GRC разных видов (время дивергенции между самыми далекими видами составляет ~25–30 млн

лет) (Torgasheva et al., 2019, 2021), что свидетельствует о крайне быстрой эволюции генетического содержания этой хромосомы. Этот вывод подтверждается данными сравнительного секвенирования микро-GRC у близкородственных видов, таких как обыкновенный соловей *Luscinia luscinia* и западный соловей *L. megarhynchos*, которые показали существенные различия в генетическом составе GRC, несмотря на их относительно недавнее расхождение (около 1.8 млн лет назад) (Schlebusch et al., 2023).

Многие гены на GRC представлены в фрагментированном, вероятно, нефункциональном, состоянии, за исключением небольшого числа высококонсервативных и, по всей видимости, жизненно важных генов. Такое быстрое изменение генетического состава и обилие дупликаций, делеций и псевдогенов резко выделяется на фоне консервативного кариотипа птиц, делая GRC самой быстроэволюционирующей хромосомой в геноме певчих птиц (Borodin et al., 2022; Ruiz-Ruano et al., 2025).

Быстрое изменение размера и генетического состава GRC и, как следствие, разнообразие ее генного состава, включающего гены, связанные с развитием репродуктивной системы, привело к формулировке гипотез, согласно которым GRC либо разрешает конфликт между зародышевой и соматической линиями клеток, изолируя гены с взаимно противоречивыми эффектами, либо выступает в роли геномного паразита, либо способствует видообразованию благодаря быстрой дивергенции генетического состава, либо участвует во всех этих процессах одновременно (Borodin et al., 2022; Бородин, 2023; Vontzou et al., 2023).

Масштабы и закономерности изменчивости GRC на цитогенетическом уровне внутри узких таксономических групп, таких как семейство, остаются недостаточно изу-

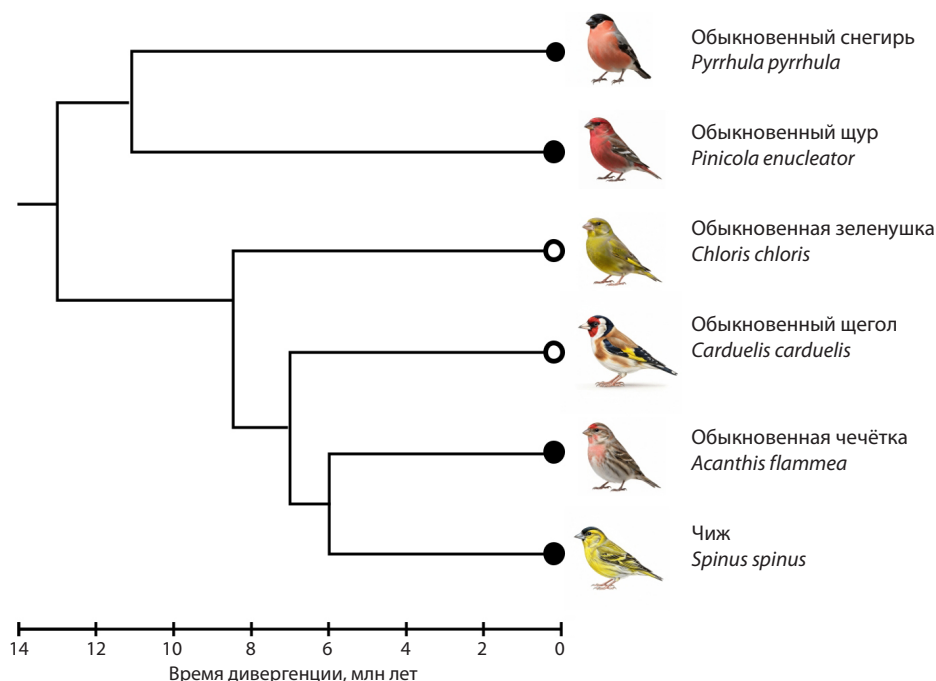


Рис. 1. Кладограмма видов птиц семейства Вьюрковые, использованных для сравнительного анализа GRC.

Черный кружок обозначает макро-GRC, белый – микро-GRC. Кладограмма построена с использованием ресурса Timetree.org (Kumar et al., 2017) (последний доступ – 3 декабря 2025 г.).

ченными. Эксперименты по перекрестной FISH, в том числе единичные случаи сравнения генетического содержания GRC внутри одного семейства, охватывали лишь два-три вида (Torgasheva et al., 2019). Более систематический сравнительный анализ GRC у нескольких представителей одной клады ранее не проводился.

Целью настоящей работы были сравнительный цитогенетический анализ GRC пяти видов семейства Вьюрковые и оценка паттерна гибридизации ДНК-зонда к целой макро-GRC обыкновенного снегиря *Pyrrhula pyrrhula* с материалом ядер распластанных сперматоцитов у видов с разной степенью филогенетической близости и разной морфологией GRC. Для этого мы выбрали четыре вида, относящихся к разным родам в этом семействе (рис. 1): обыкновенную зеленушку *Chloris chloris* (микро-GRC), обыкновенного щегла *Carduelis carduelis* (микро-GRC), обыкновенную чечётку *Acanthis flammea* (макро-GRC) и обыкновенного шура *Pinicola enucleator*, кариотип и морфология GRC которого до сих пор не описаны.

Выбранные виды представляют разные эволюционные линии в пределах семейства: время дивергенции между снегирем и шуром составляет около 11 млн лет, а между снегирем и зеленушкой с щеглом и чечёткой – около 13 млн лет (Price et al., 2014; Hooper, Price, 2017). Объединение результатов такого эксперимента с данными, полученными ранее при анализе двух других видов этого семейства, чижа *Spinus spinus* (макро-GRC) и обыкновенного щегла *Carduelis carduelis* (микро-GRC) (Torgasheva et al., 2019), которые дивергировали около 8.5 млн лет назад (Price et al., 2014; Hooper, Price, 2017), позволит более детально оценить изменчивость GRC внутри одного семейства.

Материалы и методы

Биологический материал получен от птиц, доставленных с тяжелыми травмами в Центр реабилитации диких животных (г. Новосибирск) в период с апреля по май 2022–2023 гг. В настоящей работе исследовано по одному самцу снегиря, шура, зеленушки, щегла и чечётки. Эвтаназия осуществлялась передозировкой изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Барселона, Испания). Работа с птицами и эвтаназия проводились в соответствии с национальными нормативами по уходу и использованию лабораторных животных. Протокол эксперимента рассмотрен и одобрен Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протоколы № 114 от 17.12.2021 и № 199 от 21.11.2024).

Препараты синаптонемных комплексов (СК) готовили по методу А.Н. Peters с коллегами (1997). Иммуноцитохимическое выявление белков СК и центромеры проводили по протоколу L.K. Anderson с коллегами (1999) с использованием следующих первичных антител: поликлональные антитела кролика к SYCP3 (разведение 1:500; Abcam, Великобритания; кат. номер ab15093), антицентромерные антитела из сыворотки пациентов с CREST-синдромом (разведение 1:100; Antibodies Inc., США; кат. номер 15-234). Были использованы вторичные антитела: антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с Cy3 (разведение 1:500; Jackson ImmunoResearch, США; кат. номер 111-165-144), и антитела осла к IgG человека, конъюгированные с AMCA (разведение 1:100; Jackson ImmunoResearch, США; кат. номер 709-155-149).

Препараты инкубировали в течение ночи при +4 °C с первичными антителами и один час при +37 °C со вто-

ричными антителами во влажной камере. Для предотвращения выгорания на препараты наносили среду Vectashield (Vector Laboratories, США; кат. номер H-1000-10).

ДНК-зонд к целой GRC снегиря получали путем микродиссекции пяти копий микроядер с мейотических хромосомных препаратов, как описано у А.А. Торгашевой с коллегами (Torgasheva et al., 2019). Предварительно препараты окрашивали 0.1 % раствором Гимзы (Sigma, США) в течение 3–5 мин при комнатной температуре. ДНК из микродиссектированных микроядер амплифицировали и метили биотином-11-dUTP (Sigma) с помощью набора GenomePlex Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich, США; кат. номер WGA1).

FISH с использованием зонда к ДНК GRC снегиря проводили по стандартному протоколу (Liehr et al., 2017) с некоторыми модификациями. Гибридизационная смесь (32 мкл) содержала гибридизационный буфер (50 % формамид, 2×SSC), 0.2 % Tween 20 и 40 нг меченого зонда. Обработанные РНКазой А препараты денатурировали в 70 % формамиде с 2×SSC при +72 °C 3 мин. Зонд денатурировали при +95 °C 5 мин. Гибридизацию проводили в течение ночи при +39 °C во влажной камере. Меченный биотином зонд выявляли с помощью авидина-FITC (разведение 1:400) и анти-авидина-FITC (разведение 1:200) (Vector Laboratories, США). На препараты наносили среду Vectashield с DAPI (Vector Laboratories, кат. номер H-1200-10).

Изображения СК после иммунолокализации белков и FISH фиксировали с помощью CCD-камеры, установленной на микроскопе Axioplan 2 (Carl Zeiss, Германия), с фильтрами № 49 (DAPI), 10 (FITC) и 15 (TRITC) (Zeiss) и программным обеспечением ISIS4 (METASystems GmbH, Германия). Яркость и контрастность изображений корректировали с помощью Corel PaintShop Photo Pro X6 (Alludo, Канада).

Для построения идиограммы СК кариотипа щура было измерено 28 клеток. Длину СК и положение центромера определяли в микрометрах с помощью программы MicroMeasure 3.3 (Reeves, 2001). Все исходные данные приведены в Приложении¹. В каждой клетке ранжировали СК по относительной длине и центромерному индексу и рассчитывали средние показатели по всем клеткам.

Описательные статистики получали с использованием Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Талса, ОК, США). В тексте приводятся значения среднего ± стандартное отклонение.

Результаты

Ни соматический, ни СК кариотип обыкновенного щура *Pinicola enucleator* L. не известны до сих пор. Мы обнаружили, что СК кариотип этого вида включает 41 пару бивалентов основного набора и GRC ($2n = 82 + \text{GRC}$; число плеч (FN) = 50) (рис. 2). Общая длина СК составила 334 ± 47 мкм. Макробиваленты 1–7, а также микробиваленты 9 и 16 являются субметацентрическими; микробиваленты 8 и все остальные микробиваленты – акроцентри-

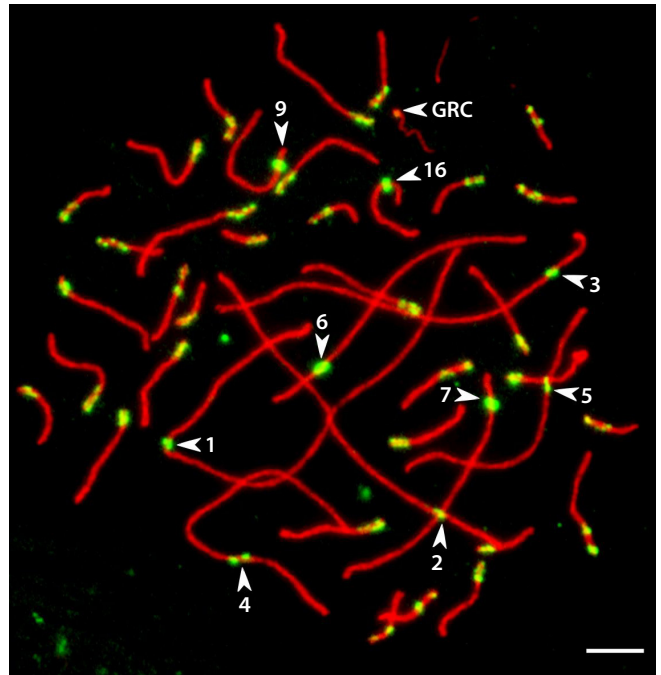


Рис. 2. Фотография препарата СК из пахитенного сперматоцита щура после иммунолокализации белка SYCP3 (красный цвет) и белков центромеры (зеленый).

Головки стрелок указывают на субметацентрические биваленты 1–7, 9, 16 и GRC. Масштабная линейка 5 мкм.

ческими (рис. 3). Все акроцентрические микробиваленты основного набора содержат центромеры, состоящие из нескольких центромерных доменов. Такие центромеры принято называть метаполицентромерами (Grishko, Borodin, 2024). GRC щура представляет собой крупную акроцентрическую макрохромосому. На стадии пахитены она формирует акроцентрический унивалент, который распознают антитела к белку SYCP3, формирующему латеральный элемент СК (см. рис. 2).

Для оценки сходства между последовательностями GRC снегиря и GRC других видов выюровых проведена перекрестная FISH с использованием ДНК-зонда к GRC снегиря, полученным ранее (Grishko et al., 2025). Зонд слабо гибридизовался с макро-GRC щура и чечётки и не гибридизовался с микро-GRC зеленушки и щегла (см. таблицу).

У всех четырех видов зонд метил несколько областей бивалентов основного набора. На препаратах СК щура сигналы гибридизации наблюдались на коротком плече макробивалента 4 и в области длинного плеча макробивалента 5 (рис. 4, а). Зонд также давал слабые сигналы на многих других бивалентах. На препаратах СК зеленушки и чечётки зонд гибридизовался с перичентромерными районами нескольких микробивалентов и всех макробивалентов, за исключением единственного метацентрического макробивалента (вероятно, ZZ) (см. рис. 4, б, в). На препаратах СК щегла гибридизационный сигнал выявляли в перичентромерном районе макробивалента 1 и коротком плече макробивалента 6 (см. рис. 4, в).

¹ Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx24.xlsx>

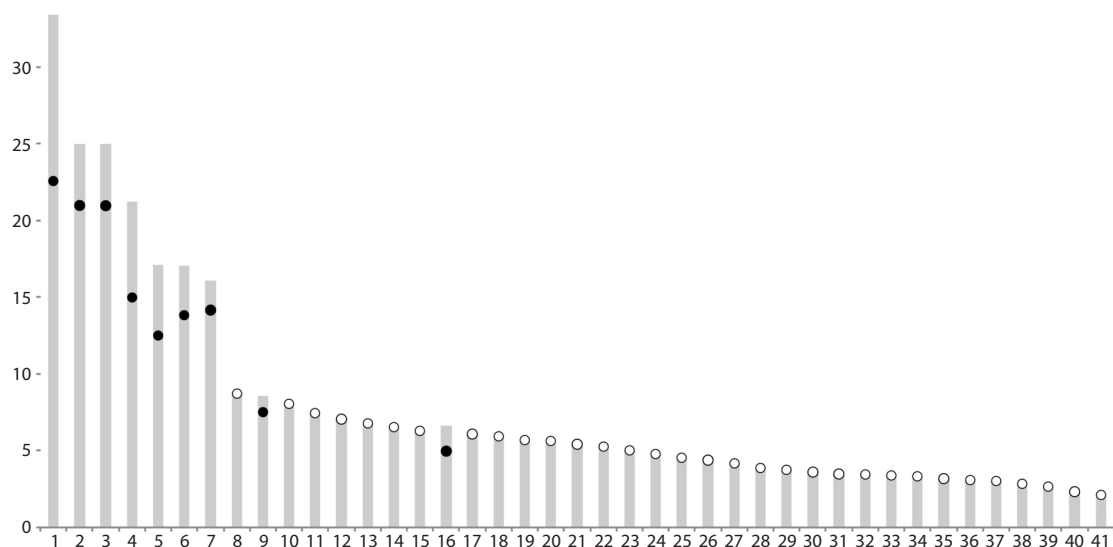


Рис. 3. Идиограмма СК кариотипа щура без учета GRC.

По оси Y указана средняя длина СК в мкм; по оси X – биваленты, упорядоченные по убыванию размера. Черные кружки отмечают расположение моноцентромер, белые – метаполицентромер.

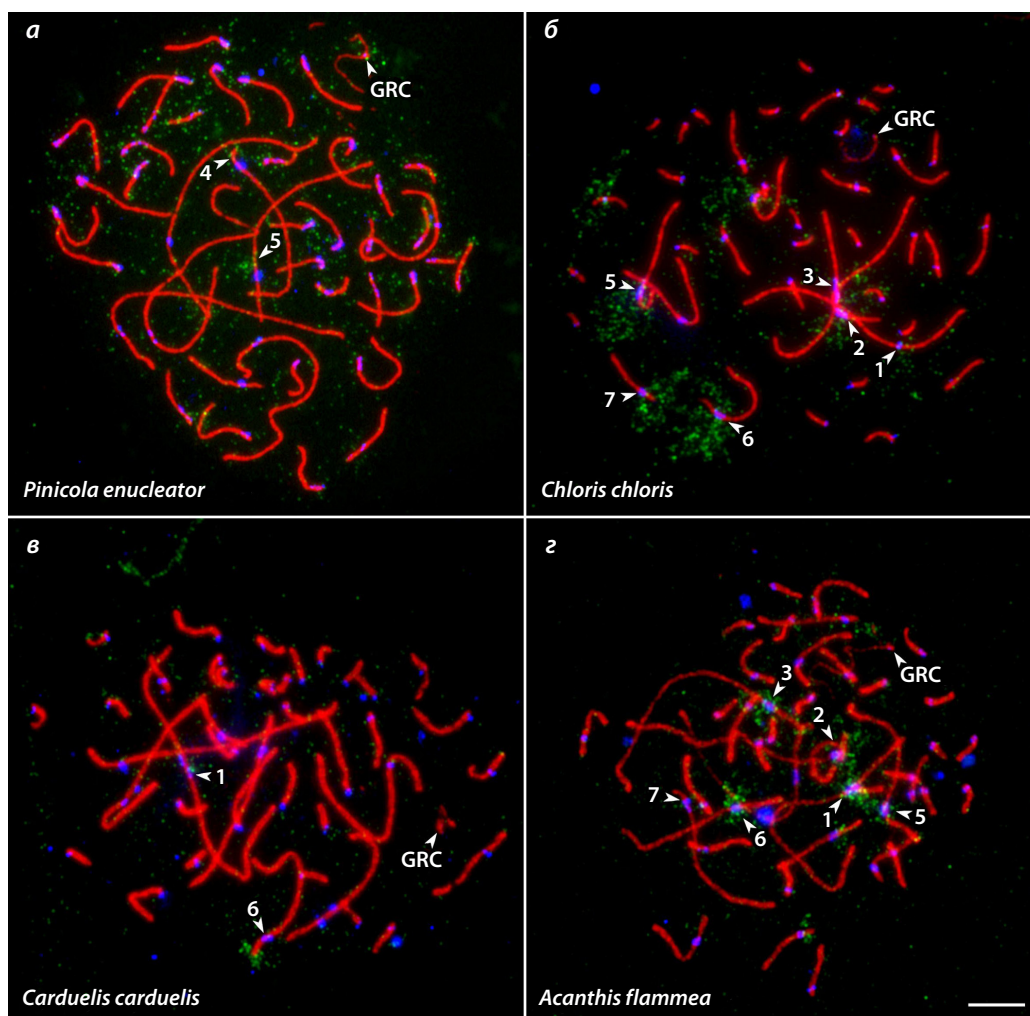


Рис. 4. Фотографии препаратов СК из пахитенных сперматоцитов щура (а), зеленушки (б), щегла (в) и чечётки (г) после FISH с зондом к ДНК GRC снегиря (зеленый цвет), иммунолокализации белка SYCP3 (красный) и белков центромеры (синий).

Головки стрелок указывают на GRC и биваленты основного набора, меченные зондом к ДНК GRC снегиря. Масштаб 5 мкм.

Выявление гибридизационного сигнала после FISH с зондом к ДНК GRC снегирия на препаратах СК вьюрковых птиц

Вид	Сигнал	
	на GRC	на макробиваленте ^а
Снегирь <i>Pyrrhula pyrrhula</i> ^б	Сильный	c1, 6
Щур <i>Pinicola enucleator</i>	Слабый	p4, q5
Зеленушка <i>Chloris chloris</i>	Отсутствует	c1-3, 5-7
Щегол <i>Carduelis carduelis</i>	Отсутствует	c1, p6
Чечётка <i>Acanthis flammea</i>	Слабый	c1-3, 5-7

^а c – центромера; p – короткое плечо бивалента; q – длинное плечо бивалента.

^б (Grishko et al., 2025).

Обсуждение

В настоящем исследовании мы впервые описали СК кариотип обыкновенного щура, показав, что он, как и кариотипы половины исследованных вьюрковых птиц (Borodin et al., 2022; Malinovskaya et al., 2022), содержит макро-GRC. Мы установили, что многие биваленты данного вида имеют метаполицентромеры. Ранее наличие метаполицентромер было показано для снегирия и коноплянки *Linaria cannabina* из того же семейства Вьюрковые (Grishko et al., 2023).

Основным результатом данного исследования стало выявление высокой межвидовой вариабельности генетического состава GRC между представителями семейства Вьюрковые. Несмотря на относительно близкое родство между вьюрками (время дивергенции между снегирем и другими исследованными видами – около 11–13 млн лет (Price et al., 2014; Hooper, Price, 2017)), зонд к ДНК макро-GRC снегирия давал слабый гибридизационный сигнал на макро-GRC щура и чечётки и не давал сигнала на микро-GRC зеленушки и щегла.

Отсутствие детектируемого сигнала на микро-GRC зеленушки и щегла, в отличие от слабого сигнала на макро-GRC щура и чечётки, позволяет предположить, что размер GRC может быть одним из факторов, влияющих на степень выявляемого сходства как минимум в пределах одного семейства. Полученные данные согласуются с данными литературы: так, при меньшем времени дивергенции (~9 млн лет) ДНК-зонд к микро-GRC чижа давал слабый гибридизационный сигнал на макро-GRC щегла (Torgasheva et al., 2019). Вероятно, за ~9–13 млн лет дивергенции микро-GRC успевают утратить большинство сходных последовательностей, что приводит к отсутствию гибридизационного сигнала, тогда как макро-GRC сохраняют их в достаточном количестве для выявления слабого сигнала.

В экспериментах по перекрестной FISH мы обнаружили различия в паттернах гибридизации зонда к ДНК GRC снегирия с бивалентами основного набора у разных видов вьюрковых. Ранее было показано, что зонд к ДНК GRC снегирия гибридизовался с перичентромерными районами определенных макробивалентов и рядом микробивалентов снегирия (Grishko et al., 2025). В наших экспериментах по перекрестной FISH этот зонд демонстрировал иной пат-

терн гибридизации. Полученные межвидовые различия в паттернах гибридизации свидетельствуют о быстрой эволюции повторенных последовательностей, локализованных на хромосомах основного набора, протекающей на фоне общей консервативности геномов птиц.

Гибридизация зонда к ДНК GRC снегирия с перичентромерными районами всех макробивалентов, за исключением макробивалента 4 у зеленушки и чечётки, может свидетельствовать о консервативности этих последовательностей у данных двух видов. Эта картина контрастирует с паттерном, обнаруженным у щура и щегла: зонд специфично гибридизовался только с отдельными участками макробивалентов, что указывает на более ограниченное и видоспецифичное распределение выявляемых последовательностей по бивалентам основного набора у этих видов. Слабые диффузные сигналы, обнаруженные на большинстве бивалентов у щура, могут представлять собой «призрачные» последовательности, когда-то более широко распространенные, но впоследствии деградировавшие или замененные в большинстве районов.

Таким образом, GRC – это быстро эволюционирующий элемент генома певчих птиц, который показывает небольшую степень сходства даже между видами внутри одного семейства Вьюрковые. Различия в паттерне гибридизации зонда к ДНК GRC снегирия с материалом ядер распластаных сперматоцитов разных видов вьюрковых указывают на видоспецифичную динамику увеличения и сокращения копийности выявляемых последовательностей в бивалентах основного набора в ходе эволюции.

Заключение

Наше исследование продемонстрировало, что генетический состав GRC отдельных представителей семейства Вьюрковые в высокой степени видоспецифичен, что указывает на быструю эволюцию GRC. Наличие сходных последовательностей между GRC снегирия и бивалентами основного набора разных видов вьюрковых, а также видоспецифичные паттерны их локализации согласуются с аналогичными результатами перекрестных FISH, полученными с использованием зондов к ДНК GRC других видов птиц.

Список литературы / References

- Бородин П.М. Хромосомы певчих птиц, ограниченные зародышевой линией. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023; 27(6):641-650. doi 10.18699/VJGB-23-75
- [Borodin P.M. Germline-restricted chromosomes of songbirds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2023; 27(6):641-650. doi 10.18699/VJGB-23-75]
- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics*. 1999;151(4):1569-1579. doi 10.1093/genetics/151.4.1569
- Biederman M.K., Nelson M.M., Asalone K.C., Pedersen A.L., Saldanha C.J., Bracht J.R. Discovery of the first germline-restricted gene by subtractive transcriptomic analysis in the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *Curr Biol*. 2018;28(10):1620-1627. doi 10.1016/j.cub.2018.03.067
- Borodin P., Chen A., Forstmeier W., Fouché S., Malinovskaya L., Pei Y., Reifová R., Ruiz-Ruano F.J., Schlebusch S.A., Sotelo-Muñoz M., Torgasheva A., Vontzou N., Suh A. Mendelian nightmares:

- the germline-restricted chromosome of songbirds. *Chromosome Res.* 2022;30(2-3):255-272. doi 10.1007/s10577-022-09688-3
- Grishko E.O., Borodin P.M. Structure and evolution of metapolycentromeres. *Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(6):592-601. doi 10.18699/vjgb-24-66
- Grishko E., Malinovskaya L., Slobodchikova A., Kotelnikov A., Torgasheva A., Borodin P. Cytological analysis of crossover frequency and distribution in male meiosis of cardueline finches (Fringillidae, Aves). *Animals.* 2023;13(23):3624. doi 10.3390/ani13233624
- Grishko E., Malinovskaya L., Tishakova K., Borodin P. Germline restricted chromosome (GRC) in diploid and polyploid spermatocytes of the Eurasian bullfinch, *Pyrrhula pyrrhula* (Fringillidae, Passeriformes, Aves). *Animals.* 2025;15(23):3394. doi 10.3390/ani15233394
- Hooper D.M., Price T.D. Chromosomal inversion differences correlate with range overlap in passerine birds. *Nat Ecol Evol.* 2017;1(10):1526-1534. doi 10.1038/s41559-017-0284-6
- Kinsella C.M., Ruiz-Ruano F.J., Dion-Côté A.-M., Charles A.J., Gossmann T.I., Cabrero J., Kappei D., Hemmings N., Simons M.J.P., Camacho J.P.M., Forstmeier W., Suh A. Programmed DNA elimination of germline development genes in songbirds. *Nat Commun.* 2019;10(1):5468. doi 10.1038/s41467-019-13427-4
- Kumar S., Stecher G., Suleski M., Hedges S.B. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol Biol Evol.* 2017;34(7):1812-1819. doi 10.1093/molbev/msx116
- Liehr T., Kreskowski K., Ziegler M., Piaszinski K., Rittscher K. The standard FISH procedure. In: Liehr T. (Ed.) Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Springer Protocols Handbooks. Springer, 2017; 109-118. doi 10.1007/978-3-662-52959-1_9
- Malinovskaya L.P., Slobodchikova A.Y., Grishko E.O., Pristiyazhnyuk I.E., Torgasheva A.A., Borodin P.M. Germline-restricted chromosomes and autosomal variants revealed by pachytene karyotyping of 17 avian species. *Cytogenet Genome Res.* 2022;162(3):148-160. doi 10.1159/000524681
- Pei Y., Forstmeier W., Ruiz-Ruano F.J., Mueller J.C., Cabrero J., Camacho J.P.M., Alché J.D., ... Hertel M., Teltscher K., Knief U., Suh A., Kempnaers B. Occasional paternal inheritance of the germline-restricted chromosome in songbirds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2022;119(4):e2103960119. doi 10.1073/pnas.2103960119
- Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J., de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 1997;5(1):66-68. doi 10.1023/a:1018445520117
- Pigozzi M.I., Solari A.J. The germ-line-restricted chromosome in the zebra finch: recombination in females and elimination in males. *Chromosoma.* 2005;114(6):403-409. doi 10.1007/s00412-005-0025-5
- Price T.D., Hooper D.M., Buchanan C.D., Johansson U.S., Tietze D.T., Alström P., Olsson U., Ghosh-Harihar M., Ishtiaq F., Gupta S.K., Martens J., Harr B., Singh P., Mohan D. Niche filling slows the diversification of Himalayan songbirds. *Nature.* 2014;509(7499):222-225. doi 10.1038/nature13272
- Reeves A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome.* 2001;44(3):439-443. doi 10.1139/g01-037
- Ruiz-Ruano F.J., Schlebusch S.A., Vontzou N., Moreno H., Biegler M.T., Kutschera V.E., Ekman D., ... Segami J.C., Tan D.J.X., Torgasheva A., Whibley A., Suh A. Programmed DNA elimination drives rapid genomic innovation in two thirds of all bird species. *bioRxiv.* 2025. doi 10.1101/2025.07.16.664580
- Schlebusch S.A., Ridl J., Poignet M., Ruiz-Ruano F.J., Reif J., Pajer P., Pačes J., Albrecht T., Suh A., Reifová R. Rapid gene content turnover on the germline-restricted chromosome in songbirds. *Nat Commun.* 2023;14(1):4579. doi 10.1038/s41467-023-40308-8
- Torgasheva A.A., Malinovskaya L.P., Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Kizilova E.A., Akberdina E.A., Pristiyazhnyuk I.E., Shnaider E.P., Volodkina V.A., Saifitdinova A.F., Galkina S.A., Larkin D.M., Rubtsov N.B., Borodin P.M. Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(24):11845-11850. doi 10.1073/pnas.1817373116
- Torgasheva A., Malinovskaya L., Zadesenets K., Shnaider E., Rubtsov N., Borodin P. Germline-restricted chromosome (GRC) in female and male meiosis of the great tit (*Parus major*, Linnaeus, 1758). *Front Genet.* 2021;12:768056. doi 10.3389/fgene.2021.768056
- Vontzou N., Pei Y., Mueller J.C., Reifová R., Ruiz-Ruano F.J., Schlebusch S.A., Suh A. Songbird germline-restricted chromosome as a potential arena of genetic conflicts. *Curr Opin Genet Dev.* 2023;83:102113. doi 10.1016/j.gde.2023.102113

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.11.2025. После доработки 23.12.2025. Принята к публикации 24.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-49

Genetic diversity of horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures of the Ob-Irtysh region of Western Siberia and their genetic proximity to modern horses of indigenous breeds

M.A. Kusliy ¹, A.A. Yurlova ¹ , N.V. Vorobyeva ¹, A.A. Proskuryakova ¹, M.A. Demin ²,
S.M. Sitnikov ³, V.N. Zharonkin⁴, S.S. Onishchenko ⁵, A.K. Kasparov ⁶, A.E. Tupikin ⁷,
A.S. Graphodatsky ¹, A.S. Molodtseva ¹, A.A. Tishkin ⁸

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Altai State Pedagogical University, Barnaul, Russia

³ Autonomous non-profit organization "Altai Archaeological Society", Barnaul, Russia

⁴ Department of Roskomnadzor for the Kemerovo Oblast, Kemerovo, Russia

⁵ Committee for the Protection of Cultural Heritage of Kuzbass, Kemerovo, Russia

⁶ Institute for the History of Material Culture of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

⁷ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁸ Altai State University, Barnaul, Russia

 annush@mcb.nsc.ru

Abstract. The multidisciplinary approach is in increasing use in modern science for solving complicated problems. Molecular genetics not only helps us understand biological processes, such as evolution and speciation, but also sheds light on numerous historical questions as to the directions of peoples' migrations, the degree of interpenetration of contemporaneous cultures, and their continuity. In particular, investigation of phylogenetic relationships of domestic animals allows us to detail the interactions between bearers of different archaeological cultures. In the Bronze Age, Inner Asia and adjacent territories were characterized by intense human migrations and rapid spread of productive economies, including livestock farming. Here we examine the phylogenetic patterns of horses from two important Bronze Age Ob-Irtysh cultures in Western Siberia, the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen ones, and the degree of their genetic proximity to horses from earlier (Andronovo and Eluninskaya) and later (Khreksur and "Deer Stone", Biykenskaya, Bystryanskaya and Pazyryk) cultures in the region and adjacent territories. Data obtained from sequencing and analysis of mitochondrial genomes reveal differences in the mitochondrial gene pool of horses from the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures of the south of Western Siberia, highlighting the unique mitochondrial genetic diversity of the original horse herds of these cultures and the lack of close breeding contacts between them. We demonstrate an overlap between the mitochondrial gene pools of horses from the Khreksur and "Deer Stone" cultures of Mongolia and the Andronovo culture. We also established continuity between many of the obtained haplotypes of horses from the Early, Developed, Late Bronze Age, and Early Iron Age in southern Western Siberia, indicating the preservation of a significant part of the maternal gene pool diversity of domestic horses in the region across several historical and cultural periods. The similarity of mitochondrial haplotypes among horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture, modern horses of the Akhal-Teke breed of Central Asia, and indigenous breeds of East Asia and Southern Europe, as well as between horses of the Irmen culture and modern horses of local breeds in Northern Europe, may reflect the migration routes of bearers of these cultures after their disintegration in the region under study. It also characterizes features of the formation of these breeds in ancient times. However, nuclear genetic markers should also be investigated to corroborate these hypotheses.

Key words: ancient DNA; mitochondrial genome; phylogenetics; domestic horse; Bronze Age; Sargarinsko-Alexeevskaya culture; Irmen culture

For citation: Kusliy M.A., Yurlova A.A., Vorobyeva N.V., Proskuryakova A.A., Demin M.A., Sitnikov S.M., Zharonkin V.N., Onishchenko S.S., Kasparov A.K., Tupikin A.E., Graphodatsky A.S., Molodtseva A.S., Tishkin A.A. Genetic diversity of horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures of the Ob-Irtysh region of Western Siberia and their genetic proximity to modern horses of indigenous breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(3):451-460. doi 10.18699/vjgb-26-49

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation, project 22-18-00470-П "The World of Ancient Nomads of Inner Asia: Interdisciplinary Research on Material Culture, Sculptures and Economy", <https://rscf.ru/project/22-18-00470/>.

Генетическое разнообразие лошадей саргаринско-алексеевской и ирменской культур Западной Сибири и их генетическое родство с современными лошадьми аборигенных пород

М.А. Куслий ¹, А.А. Юрлова ¹ ✉, Н.В. Воробьева ¹, А.А. Проскурякова ¹, М.А. Демин ²,
С.М. Ситников ³, В.Н. Жаронкин ⁴, С.С. Онищенко ⁵, А.К. Каспаров ⁶, А.Е. Тупикин ⁷,
А.С. Графодатский ¹, А.С. Молодцева ¹, А.А. Тишкин ⁸

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Алтайский государственный педагогический университет, Барнаул, Россия

³ Автономная некоммерческая организация «Алтайское археологическое общество», Барнаул, Россия

⁴ Управление Роскомнадзора по Кемеровской области Кемерово, Россия

⁵ Комитет по охране объектов культурного наследия Кузбасса, Кемерово, Россия

⁶ Институт истории материальной культуры Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

⁷ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁸ Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

✉ annush@mcb.nsc.ru

Аннотация. В современной науке для решения сложных задач всё чаще используется мультидисциплинарный подход. Так, молекулярная генетика помогает нам понять не только такие биологические процессы, как эволюция и видообразование, но и проясняет многочисленные исторические вопросы о направлениях миграций народов, степени взаимопроникновения синхронных культур и их преемственности. В частности, изучение филогенетических взаимоотношений домашних животных позволяет детализировать картину взаимодействия носителей разных археологических культур. Внутренняя Азия и сопредельные территории в бронзовом веке характеризовались активными миграциями людей и быстрым распространением производящего хозяйства, в том числе животноводства. В нашей работе были изучены филогенетические паттерны лошадей двух важных культур Обь-Иртышья Западной Сибири эпохи бронзы: саргаринско-алексеевской и ирменской, а также степень их генетической близости с лошадьми более ранних (андроновской, елуниной) и более поздних культур (херексуров и «оленных» камней, бийкенской, быстринской и пазырыкской) региона и сопредельных территорий. Данные, полученные после секвенирования и анализа митохондриальных геномов, свидетельствуют о различиях в митохондриальном генофонде лошадей саргаринско-алексеевской и ирменской культур юга Западной Сибири, что подчеркивает своеобразие митохондриального генетического разнообразия исходных табунов лошадей вышеперечисленных культур и отсутствие между ними тесных контактов в сфере разведения лошадей. Было показано пересечение митохондриальных генофондов лошадей культуры херексуров и «оленных» камней Монголии и андроновской культуры. Также нами установлена преемственность между многими полученными гаплотипами лошадей раннего, развитого, позднего бронзового века, раннего железного века с территории юга Западной Сибири, что свидетельствует о сохранении большей части разнообразия материнского генофонда домашних лошадей в регионе на протяжении нескольких историко-культурных периодов. Близость митохондриальных гаплотипов между лошадьми саргаринско-алексеевской культуры и современными лошадьми ахалтекинской породы Центральной Азии и аборигенных пород Восточной Азии и Южной Европы, а также между лошадьми ирменской культуры и современными лошадьми местных пород Северной Европы может указывать на пути миграции носителей этих культур после их распада на территории рассматриваемого региона, а также характеризовать особенности формирования этих пород в древности. Однако для подтверждения этих гипотез необходимо исследовать ядерные генетические маркеры.

Ключевые слова: древняя ДНК; митохондриальный геном; филогенетика; домашняя лошадь; бронзовый век; саргаринско-алексеевская культура; ирменская культура

Introduction

In the context of equine genetic research, the Bronze Age (BA) has been less studied than the Iron Age (Keyser-Tracqui et al., 2005; Dawei et al., 2007; Cai et al., 2009; Lei et al., 2009; Cieslak et al., 2010; Benecke et al., 2017; Fages et al., 2019; Vorobieva et al., 2020; Kusliy et al., 2021; Librado et al., 2021; Kusliy, 2023). However, some important data have already been obtained. Regarding the territory of Inner Asia, it has been found that horses of the Sintashta culture, which is associated with the first ritual burials of horses together with parts of chariots with spokes, made a significant contribution to the equine gene pool of many subsequent Central Asian cultures, including the Khareksur and «Deer Stone» culture

of Mongolia (Fages et al., 2019) and the Altai Biykenkaya culture (Librado et al., 2021). It should be noted that the Sintashta culture was the earliest stage in the development of the Andronovo cultural and historical community, which spread across the territory of the Southern Urals, the south of Western Siberia, Kazakhstan, and the western part of Central Asia (Zubova et al., 2014).

In this study, we examined the mitogenome diversity in horses of the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures, widespread in the Ob-Irtysh region of Western Siberia in the Late Bronze Age (Grushin, 2020). Bone materials for genetic analysis had been obtained from the sites of Chekanovsky Log-I (Demin, Sitnikov, 1998), Barsuchikha-IV of the

Sargarinsko-Alexeevskaya culture, Kaltyshtino V (Kovtun, 2022), Barsuchikha-IV, Gusinaya Lyaga-1 (Demin, 2015) of the Irmen culture. Researchers of some of these sites had noted the important role of horses in various spheres of life of the inhabitants of these sites; for example, the majority of bone remains of domestic animals found at the Gusinaya Lyaga-1 site belonged to horses (Demin, 2015). Materials from both cultures studied were identified at the archaeological sites of Barsuchikha-IV and Gusinaya Lyaga-1, so the researchers classified these complexes as mixed-type sites (Sitnikov, Gel'mel', 2017). The results of our study highlight differences in the horse maternal genetic lineages of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures, which allows us to hypothesize different maternal origins of horses of these cultures and the absence of intensive exchange of horses between them. It is also shown that the horses of mixed sites on the border between these cultures are closer in mitogenomes to the Sargarinsko-Alexeevskaya culture horses. However, this hypothesis requires confirmation based on more sample sets from each culture.

Thus, according to archaeological data (Grigor'ev, 2018; Kovalevsky, 2020), the Andronovo culture made a great contribution to the formation of the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures. We included samples from Altai and Kazakhstan sites of this culture in our study in order to trace possible continuity. Archaeological data provide no comprehensive answer to questions about other ancestral cultures or the continuity of the cultures under consideration in relation to later cultures of the region (Sitnikov, 2013; Papin et al., 2018; Popova, 2019). In order to strengthen the evidentiary base for resolving these issues, we supplemented our materials with samples of the Early BA Eluninskaya culture, formed in the Forest-Steppe Altai as a result of the migrations of Indo-European tribes to the eastern and southern regions of Eurasia (Kiryushin, 2002; Grushin, 2019), and from synchronous and later sites of the Altai and Mongolia (Tishkin, 2007).

Materials and methods

Materials studied. Our material included two bone samples of the Eluninskaya culture from Altai (Berezovaya Luka site), two bone samples of the Andronovo culture from Altai and Kazakhstan (Chekanovsky Log-2 site (Altai), Tasty-Bulak site (Kazakhstan)), six bone samples from Altai mixed sites of the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures (Barsuchikha-IV and Gusinaya Lyaga-1 sites), two bone samples of the Irmen culture from southern Western Siberia (Kaltyshtino V sites), four bone samples of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture of Altai (Chekanovsky Log-I site), and one bone sample of the Bystryanskaya culture (Manzhikha-2 site (Altai)). Detailed information about the samples studied is given in Supplement 1¹. Supplement also provides information on radiocarbon dates of samples whose archaeological dating was ambiguous. Radiocarbon dating was performed at the AMS Golden Valley (Novosibirsk, Russia). Accurate dating of a sample is necessary to prevent errors in the cultural assignment of samples.

¹ Supplements 1–3 are available at:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx25.zip>

Ancient mitogenome sequencing. All experiments were performed at the Institute of Molecular and Cellular Biology (IMCB SB RAS), Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, in a special ancient DNA laboratory, in accordance with the basic authenticity criteria for ancient DNA research (Willerslev, Cooper, 2005), which presently remain relevant: (1) The work areas for ancient DNA experiments before the PCR stage and after it were separated. (2) Laboratory rooms for experiments with ancient DNA before the PCR stage were equipped with a ventilation system that created elevated pressure; experimenters wore special laboratory suits and two pairs of gloves, the outer one of which was constantly changed; the gloves and all work surfaces were constantly wiped with decontaminants (DNArid (Biomedical Innovations), Dezomax (Maxima LLC)) before, during, and after work; ultraviolet lamps (30 W) and an air sterilizer (recirculator ORB-2N (POZIS)) were also used to decontaminate work surfaces; tubes with samples and reagents were opened only inside laminar-flow cabinets (BAVnp-01-“Laminar-S”-1.5 LORICA (LANSYSTEMS)) with the ventilation turned on. (3) We added negative controls at the stages of isolating ancient DNA and preparing genomic libraries, which we conducted through all processes of the experiment to verify the absence of cross-contamination and foreign contamination in the samples. (4) At the stage of sequencing data analysis, the sizes and base deamination profiles of ancient DNA fragments were evaluated (subsection Statistics and authenticity of sequencing data of the Results and Discussion section). (5) The ancient origin of the samples was proven based on the archaeological context of related materials and direct and indirect radiocarbon dating (Supplement 1).

The preparation of bone samples for DNA extraction and the DNA extraction process itself, as well as the method used to prepare double-stranded, dual-index libraries for sequencing, are described in detail in (Kusliy et al., 2021).

Two rounds of library enrichment were performed using hybridization with biotinylated modern mtDNA of *Equus caballus*, immobilized on Dynabeads M-280 Streptavidin magnetic particles (Life Technologies, USA). The method reported in (Maricic et al., 2010) was modified as follows: (1) When preparing biotinylated samples, we ligated a double-stranded adapter with a 3' single 'T' nucleotide overhang (5'-CCTGCCTCGGATGTCCTTGAT-3') to modern horse DNA fragments using a TruSeq Nano DNA Sample Preparation Kit (Illumina) according to manufacturer's recommendations. (2) Modern horse mitogenome fragment libraries were amplified using biotinylated primers (Biotin-5'-CCTGCC TCGGATGTCCTTGAT-3'). (3) Biotinylated probes were immobilized onto magnetic beads with streptavidin according to the Dynabeads™ Streptavidin Trial protocol using sodium citrate saline (SSC) as binding and washing buffer. (4) The final purification of magnetic particles after the enrichment procedure was carried out in SSC (3 times with 100 µL of 2× SSC at 65 °C for 5 min, 2 times with 100 µL of 0.2× SSC at room temperature). (5) At the final stage of the procedure, 20 cycles of amplification of enriched libraries were conducted. Amplification of the enriched libraries was performed in a volume of 50 µL containing 1x Phusion HF Buffer, 0.2 mM of each

The GenBank accession numbers
of the obtained nucleotide sequences

Sample name	GenBank accession numbers
Bar4-1	PV926031
BerL-3-2	PV926032
BerL-4	PV926033
Chek1-1	PV926035
Chek1-2	PV926036
Chek1-3	PV926037
Chek1-4	PV926038
Chek1-6	PV926039
Gus1-2	PV926040
Gus1-3	PV926041
Gus1-4	PV926042
Gus1-5	PV926043
Gus1-6	PV926044
Kalt5-2	PV926045
Kalt5-3	PV926046
Man2-1	PV926047
Tas-1	PV926048

dNTP, 1 μ M of each primer for library fragment adapters (SuD Nano DNA Library Prep Kit for Illumina), and 1 U of Phusion DNA polymerase. The PCR program was as follows: 30 s initial denaturation at 95 °C; 20 cycles, each of which included 20 s denaturation at 98 °C, 20 s primer annealing at 65 °C, 20 s elongation at 72 °C; and final 5 min elongation at 72 °C.

Quantification of the obtained libraries was performed using a Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) and a Qubit dsDNA HS Assay Kit, according to manufacturer’s recommendations. To check for contamination at the stages of DNA isolation, library preparation, and amplification, blanks were used that showed the absence of target DNA during final data analysis. Paired-end sequencing of the enriched libraries was carried out on the MiSeq platform (Illumina, USA) using a MiSeq v2 Reagent Kit (300-cycles, 2x150bp). Library sequencing was performed at Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS, Novosibirsk).

Sequence data analysis. Secondary data analysis performed in PALEOMIX BAM Pipeline v1.3.2 (Schubert et al., 2014) is described in detail in (Kusliy et al., 2021).

Phylogenetic analysis. Multiple alignment of the mitogenome consensus sequences was conducted using the MAFFT v1.4.0 multiple sequence alignment program (Katoh et al., 2002) (plugin MAFFT in Geneious Prime v2024.0.4). PartitionFinder v2.1.1 (Lanfear et al., 2012) was used to select the best-fit partitioning schemes and models of molecular evolution for phylogenetic analyses. In the alignment of horse mitochondrial genome sequences, five partitions were identified with the following evolutionary models of nucleotide substitutions: HKY+I for the second codons of protein-coding

genes; HKY+G+I for RNA coding genes, first and third codons of protein-coding genes; GTR+G+I for hypervariable regions. The Bayesian phylogenetic tree was constructed with the MrBayes v.3.2.6 program (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) using the above partitioning schemes and evolutionary models and the following parameter values: 8 million generations of Markov chain Monte Carlo, sampling frequency 800; the first 25% of trees discarded. The tree visualization was performed with the FigTree v1.4.4. program ([“http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/”](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)).

Haplotype diversity analysis. The haplotype median joining network and haplogroup map were generated in the PopART population genetics software version 1.7 (Bandelt et al., 1999; Leigh, Bryant, 2015) with standard parameter values.

Analysis of genetic differentiation of populations. The F_{ST} values, reflecting the measure of population differentiation (10,000 permutations), as well as nucleotide diversity values, were obtained with the Arlequin v3.5.2.2 integrated software package (Excoffier, Lischer, 2010).

Data availability. All bone samples were obtained from the collection in the repository of the Institute of History and International Relations of Altai State University (Barnaul, Russia) (collection manager Dr. Alexey A. Tishkin). The described study complies with all relevant regulations. The GenBank accession numbers of the mitogenome consensus sequences are given in Table.

Results and discussion

Statistics and authenticity of sequencing data. The ancient origin of the obtained sequences is proven by the profiles of nucleotide misincorporation in DNA fragments of the sequencing libraries obtained in the MapDamage v2.2.0 computational framework (Jónsson et al., 2013). The percentage of nucleotide substitutions therein increases towards the ends of the fragments due to the presence of protruding ends in the fragments of ancient DNA (Green et al., 2006; Sawyer et al., 2012). The distribution graphs of the sizes of the sequenced libraries also confirm the data authenticity, since the average fragment size of each library is extremely small (less than 100 bp), which is typical for degraded ancient DNA (Sawyer et al., 2012). The graphs of postmortem damage and fragmentation patterns are shown in Supplement 2. The statistical parameter values of the obtained sequencing data are given in Supplement 3. The frequency of deamination at the ends of DNA fragments, which is on the average 2–3 times higher than in the middle of the fragment (Supplement 3), also points to the ancient origin of the DNA under study.

Haplotyping and haplogroup diversity assessment among the ancient horses studied. We compared the consensus sequences of the mitogenomes of the ancient horses studied here and in previous works (Vorobieva et al., 2020; Kusliy et al., 2021) with each other, determined their characteristic nucleotide variants relative to the reference sequence and assigned them to previously determined haplogroups (Achilli et al., 2012). Based on this data, a map of the geographical distribution of these mitochondrial haplogroups in Inner and Central Asia in ancient times was constructed. The map is shown in Figure 1.

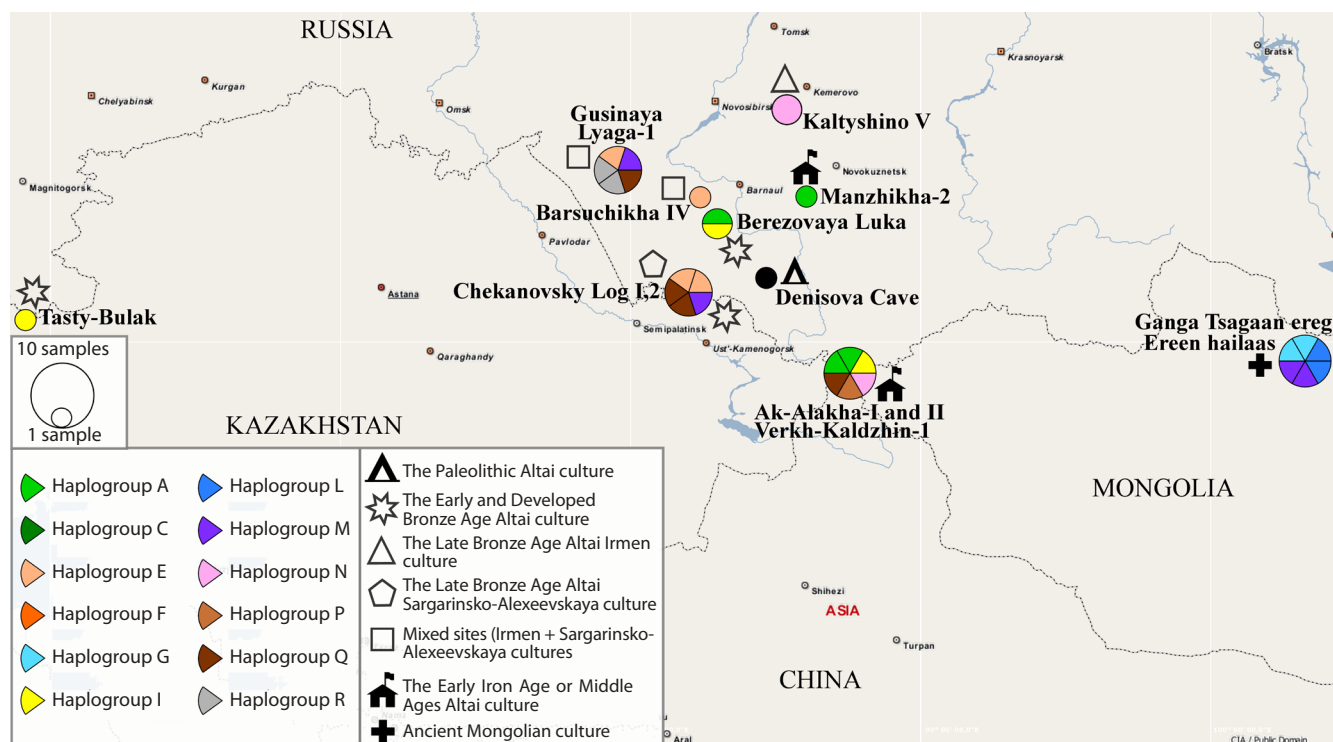


Fig. 1. Map of the geographical distribution of haplogroups of ancient and medieval horses in Inner Asia and adjacent territories studied here and earlier. The circle size is proportional to the number of haplotypes obtained. The sector colors highlight different haplogroups. The symbols show the belonging of the sites to a time range or archaeological culture. The legend is shown in the inset.

As can be seen from the figure, the haplotype of the Paleolithic Altai horse is not found among the studied ancient or medieval horses in Inner Asia and adjacent territories.

The most ancient haplotypes of domestic horses, namely those of the Early and Developed Bronze Age (Andronovo culture (Chekanovsky Log-2, purple sector; and Tasty-Bulak sites) and Eluninskaya culture (Berezovaya Luka site)), belong to haplogroups A, I, and M. These ancient haplogroups were also found in the Altai Krai (Irmen + Sargarinsko-Alexeevskaya cultures) and Mongolia horse groups in the Late Bronze Age, and in the mountain and steppe Altai in the Early Iron Age, which may point to a certain genetic continuity of horses of the corresponding cultures.

The figure also shows significant differences in the composition of haplogroups between the ancient horses of Altai and Mongolia, which share only haplogroup M, present in the Andronovo group. In contrast to the small overlap in mitochondrial genetic diversity shown between ancient horses of the Mongolia and Altai regions, modern horses of these regions show a much greater degree of genetic closeness (Kusliy et al., 2023). This observation is most likely indicative of a common origin and the absence of close contacts between horses associated with the cultures of these territories after the Developed Bronze Age.

Turning attention to the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures of the Late Bronze Age, which are in the focus of this study, we note that the mixed-type sites in the northern Altai Krai are close in haplogroup diversity to the sites of the

Sargarinsko-Alexeevskaya culture of the southern Altai Krai, and they both differ greatly in these indicators from the sites of the Irmen culture, located in the north-eastern direction. As can be seen from the map, the mitochondrial haplogroups of horses from the Irmen sites coincide only with the haplogroups of horses from the Pazyryk (Verkh-Kaldzhin-1) sites of Early Iron Age, located in the south of the Altai Republic. Since, according to archaeological data, the Irmen culture did not contribute to the formation of the Pazyryk culture, this closeness of haplogroups most likely traces the common origin of the horses of these cultures but not continuity between them. In order to determine the differences between the mitogenome haplotypes of the studied ancient and medieval horses of Inner Asia and the adjacent territories from each other, we built a median joining haplotype network (Fig. 2).

As can be seen from the network, the most ancient haplotypes of domestic horses in the sample (Early and Developed Bronze Age, brown) are closest to the haplotypes of Mongolian horses of the Late Bronze Age (blue) and haplotypes of Altai horses of Early Iron Age (green). The constructed network shows the proximity of horse haplotypes of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture and mixed sites of this and Irmen cultures (pink and red, respectively) and their remoteness from horse haplotypes of the Irmen culture, which cluster together with haplotypes of Early Iron Age Pazyryk horses from the territory of the Altai Mountains. The resulting haplotype network also visualizes the differences between the haplotypes of the ancient Mongolian horses under study and most of the

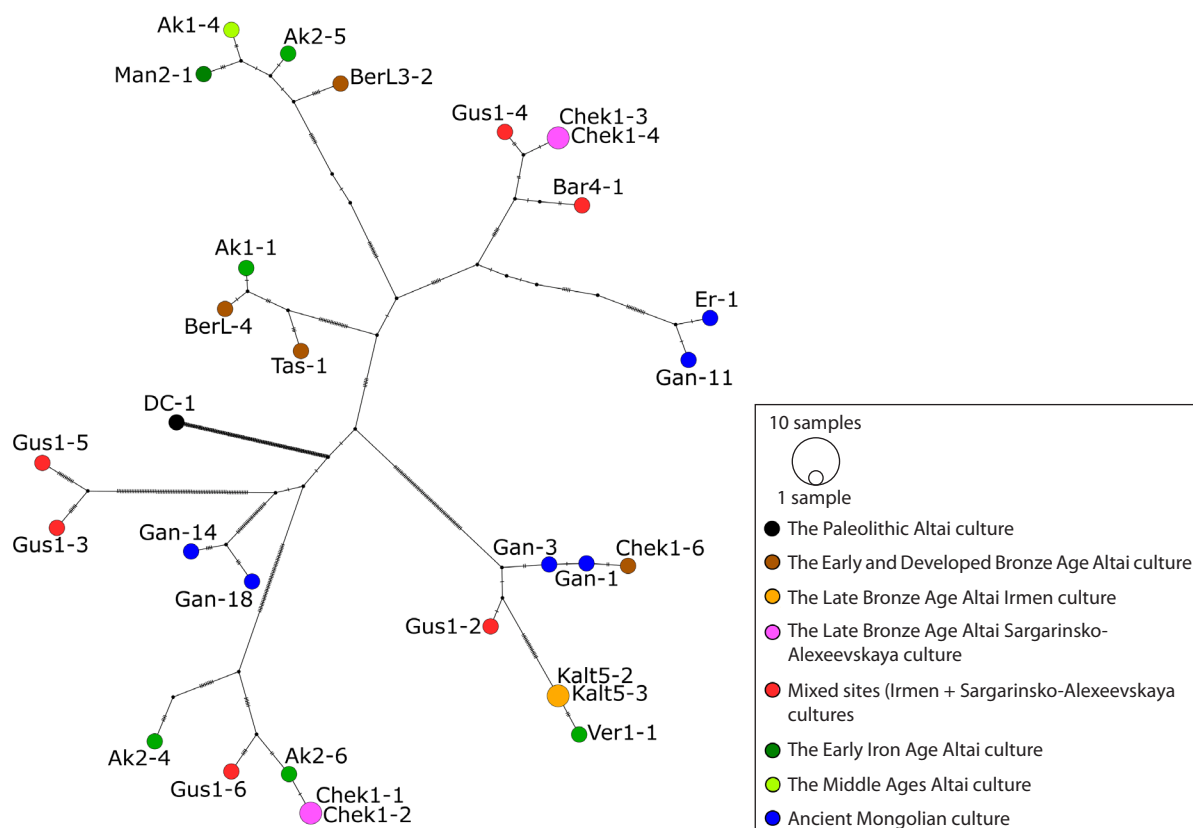


Fig. 2. Median joining haplotype network of studied ancient and medieval horses in Inner Asia and adjacent territories. The colors of the circles are associated with different semantic groups of horses (according to historical and cultural periods, belonging to a specific culture or region). The legend is shown in the inset. Lines on the branches of the network represent genetic variants that distinguish the ancestral haplotype from younger ones.

other haplotypes of the sample and the similarity of the Bronze Age Mongolian horses to the Andronovo horse, which is most likely related to their origin. The described figure shows a more detailed history of the studied ancient horse haplotypes, whose key features are outlined above.

Our analysis of population differentiation in the culture groups of Sargarinsko-Alexeevskaya (samples Chek1-1, Chek1-2, Chek1-3, Chek1-4) and Irmen (samples Kalt5-2, Kalt5-3) and in the group of mixed sites of these two cultures (samples Bar4-1, Gus1-2, Gus1-3, Gus1-4, Gus1-5, Gus1-6) revealed a high degree of differentiation between the Mixed and Irmen groups ($F_{ST} = 0.24$, p -value > 0.05) and a very high degree of differentiation ($F_{ST} = 0.52$, p -value > 0.05) between the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen groups. Their F_{ST} analysis also showed an insignificant degree of differentiation between the Mixed and Sargarinsko-Alexeevskaya groups. However, since the sample sizes were small, and the p -values were unreliable (p -value > 0.05), this can only be considered an additional evidence.

Phylogeographic reconstructions. In order to see a more detailed picture of the relationships between haplotypes within haplogroups and to trace phylogenetic relationships to the present, we constructed a Bayesian phylogenetic tree based on mitogenome sequences of ancient, medieval, and modern horses from different regions of the world, including our

samples and previously published ones (GenBank sequence database). The constructed tree is shown in Figure 3.

In the above discussion of phylogeographic reconstructions, only clades with high Bayesian posterior node probabilities are considered in the analysis of reliable phylogenetic relationships.

The constructed phylogenetic tree shows that haplogroup I represents the intersection of haplogroups of the Eluninskaya and Andronovo cultures of the Bronze Age. One of the Eluninskaya horses we studied is located basal to the clade of all other domestic horses of haplogroup A, which supports the origin of horses of this haplogroup from horses of this culture. However, since the Andronovo horses not included into our study could also occupy a basal position within this haplogroup, we cannot rule out the Andronovo origin. The Eluninskaya culture is known to form earlier (Early Bronze Age) than the Andronovo one (Developed Bronze Age). Most of the animal bones found in the Berezovaya Luka settlement (samples BerL-3.2, BerL-4) belong to domestic species (Kiryushin et al., 2011), but it has not been shown whether the horses of Berezovaya Luka site were domesticated or wild (hunted). Our data (Fig. 3, haplogroup I) clearly indicate that some horses of this settlement were domesticated, because the corresponding haplotypes are located within the clade of modern domestic horses. Since the development of animal



husbandry in the Altai steppe zone is primarily associated with the bearers of the Eluninskaya culture, who migrated there at the beginning of the Early Bronze Age (Kiryushin et al., 2012), the South Siberian origin of some ancient domestic horses of Asia remains questionable. However, since the Eluninskaya and Andronovo cultures overlapped in time, and horses of the Andronovo culture spread very quickly to adjacent territories (Koryakova, Epimakhov, 2007; Lindner, 2020; Epimakhov, 2020), the question of local domestication or Andronovo origin of the Eluninskaya culture horses will remain relevant until whole genome data on horses of these cultures are obtained. Based on our data, we conclude that some domestic horses from both cultures are genetically very close. It should also be noted that, according to our results, the haplogroups of the Eluninskaya culture horses were found only among horses of Early Iron Age from the south of the Altai Republic (Biykenskaya, Pazyryk, Turkic cultures), and the haplogroups of the Andronovo culture were widespread not only among the Pazyryk horses of Altai, but also among the horses of the Late Bronze Age from the Ob-Irtysh region of Western Siberia (Irmen + Sargarinsko-Alexeevskaya cultures) and Mongolia (the Khereksur and "Deer Stone" culture). The closeness of the haplotypes of horses of the Khereksur and "Deer Stone" culture of Mongolia and the Andronovo culture, detected by us for the first time on the basis of mitogenome data, is most likely associated with continuity between the horses of these cultures. A horse of the mixed site of the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures, which occupied the basal position in clade M, is also quite close to the mitochondrial haplotypes under consideration (samples Gan-1, Gan-3, Chek1-6). The closeness between the haplotypes of domestic horses of the Andronovo culture, from which most domestic horses of Asia originated, and horses of later cultures of Mongolia and Siberia more likely points to their common origin from horses of the Andronovo cultural-historical community. The intersection of the mitogenome gene pools of horses of cultures later than Andronovo in Siberia and Mongolia is more likely to point to close contacts between archaeological cultures of these regions.

Within haplogroup I, the BerL-4 horse of the Eluninskaya culture, one of the most ancient in our sample occupies the closest position to horses of the Kustanai local breed of Kazakhstan and the indigenous Iranian breed. This observation looks consistent with the migration of part of the population of the Eluninskaya culture to the west after the arrival of the Andronovo population to their territory (Grushin, 2018).

Within haplogroup E (Fig. 3), which turned out to be one of the key haplogroups of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture and mixed sites (Irmen+Sargarinsko-Alexeevskaya), the domestic horses of the latter-listed cultures we studied are located next to modern horses of the indigenous breeds of Italy (Maremmano), China (Jinjiang), and historical Yakutian horses. The last of these horse breeds migrated to Yakutia from southward regions together with the Yakut people several centuries ago (Librado et al., 2015). The genetic closeness we identified between the ancient domestic horses of the mixed sites we studied and the Yakut horses is also noticeable

within haplogroup Q. There is evidence that the Maremmano horse breed was formed in the 8th century BCE by Etruscans (Giontella et al., 2020; Vernesi et al., 2004), an ancient people primarily of South European origin (Ghirotto et al., 2013; Vernesi et al., 2004). Previous studies have shown maternal genetic closeness between modern Maremmano horses and domestic horses of the Altai Biykenskaya culture of Early Iron Age (Vorobieva et al., 2020). The Jinjiang horse is a breed indigenous to Central and Southeast China; it formed at the end of the 1st millennium CE and developed with a small genetic infusion from foreign breeds (Ma et al., 2019). The similarity of mitochondrial haplotypes of horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture, mixed sites, and modern domestic horses of indigenous breeds from different regions of China (Yanqi, Yimen, Yili, Sanhe) can also be traced within the Q and R haplogroups. The basal position of one of the horses from the mixed Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya culture site Barsuchikha-IV in relation to the other horses of clade E and clade M indicates that some horses of the Maremmano, Jinjiang, and Yakutian breeds might derive from ancient domestic horses of these cultures, with migration occurring in both the eastern and western directions.

As can be seen from the phylogenetic tree we constructed, the horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture and the mixed sites of the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures are also very close in mitochondrial DNA to modern Akhal-Teke horses (haplogroup Q), one of the most ancient riding breeds of Central Asia (Szontagh et al., 2005).

Horses of the Irmen culture were assigned to clade N, which is mainly represented by modern horses of local breeds of Southern and Northern Europe and breeds formed on their basis. Within this haplogroup, horses of the Irmen culture are located in the subclade that also contains horses of Early Iron Age Pazyryk culture in Altai and modern horses of the English Shire breed and the American Saddlebred breeds. The English Shire breed is native to England (Stephens, Splan, 2013), and the American Saddlebred breed was developed on the basis of many riding and draft horse breeds of English and Spanish origin in North America in the late 18th to early 19th centuries (Regatieri et al., 2016). The described geographical distribution of haplotypes of clade N may reflect the predominant distribution of ancient haplotypes of this haplogroup in the western direction. It should be noted that clade N is not included in the haplogroup diversity of horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture or mixed sites of both of the above-mentioned cultures under study.

The obtained data reflect the proximity of the mixed sites to the Sargarinsko-Alexeevskaya culture at the level of the gene pools of domestic horses, as well as differences in the mitogenome genetic diversity of domestic horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures, but how strong they were can only be understood by expanding the sample of Irmen culture horses. The phylogenetic closeness of the mitogenome haplotypes of the studied ancient and modern horses from different regions of the world most likely points to features in the migration directions of bearers of the Irmen and Sargarinsko-Alexeevskaya cultures after their collapse.

Conclusions

The study of mitochondrial genomes of ancient horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures in the south of Western Siberia, mixed sites of these cultures located on the border between their areas, older cultures (Eluninskaya and Andronovo) in Western Siberia and Kazakhstan, and later cultures of Western Siberia and Mongolia revealed the presence of horse haplogroups of the most ancient of the studied cultures among horses of the Earle Iron Age Mountains and Forest-steppe Altai cultures. Our phylogenetic reconstructions are first to show the closeness of haplotypes of Mongolian horses of the Kherek-sur and "Deer Stone" and Andronovo cultures on the grounds of mitogenome data. They have also identified differences between the horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures. The horses of the mixed sites with ceramics of both of the aforementioned cultures are closer in mitochondrial DNA to the horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya culture, some haplotypes of which, in turn, fell into the haplogroup with the highest content of Akhal-Teke horses. Other haplotypes of this culture turn out to be genetically close to horse haplotypes of ancient indigenous breeds of Southern Europe and China. In contrast, the horses of the Irmen culture show a closer relationship to the horses of the native breeds of Northern Europe. The differences between the mitochondrial gene pool of horses of the Sargarinsko-Alexeevskaya and Irmen cultures may be associated with the origin of the studied horses of these cultures from different stock populations, as well as with the absence of a strong exchange of horses between them, which most likely correlates with the different histories of the cultures under consideration. The close mitochondrial relationship between Bronze Age Mongolian and Siberian Andronovo horses is most likely connected with the origin of the former from the latter. Further study of horses of the cultures under study is required to understand how strong the differences in their mitochondrial gene pools were.

References

- Achilli A., Olivieri A., Soares P., Lancioni H., Kashani B.H., Perego U.A., Nergadze S.G., ... Silvestrelli M., Giulotto E., Pereira L., Bandelt H.-J., Torroni A. Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(7):2449-2454. doi 10.1073/pnas.1111637109
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37-48. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Benecke N., Pruvost M., Weber C. Horse skeletons: archaeozoological and genetic research. In: The Royal Mound of the Scythian Time Arzhan-2 in Tuva. Novosibirsk, 2017;250-256 (in Russian)
- Cai D., Tang Z., Han L., Speller C.F., Yang D.Y., Ma X., Cao J., Zhu H., Zhou H. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *J Archaeol Sci*. 2009;36(3):835-842. doi 10.1016/j.jas.2008.11.006
- Cieslak M., Pruvost M., Benecke N., Hofreiter M., Morales A., Reissmann M., Ludwig A. Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS One*. 2010;5(12):e15311. doi 10.1371/journal.pone.0015311
- Dawei C., Lu H., Chengzhi X., Shengnan L., Hui Z., Hong Z. Mitochondrial DNA analysis of Bronze Age horses recovered from Chifeng region, Inner Mongolia, China. *Prog Nat Sci*. 2007;17(5):544-550. doi 10.1080/10020070708541034
- Demin M.A. Some results of the study and residential complexes on the territory of the Northern Kulunda. *Vestnik Altaiskoy Nauki = Vestnik of Altai Science*. 2015;(1):67-70 (in Russian)
- Demin M.A., Sitnikov S.M. The Chekanovsky Log-I settlement is a new site of the Late Bronze Age in the Southwestern Altai. *Drevnosti Altaya. Izvestiya Laboratorii Arkheologii = Altai Antiquities. News of the Archaeology Laboratory*. 1998;6(3):43-54 (in Russian)
- Epimakhov A.V. Radiocarbon arguments for the Abashevo origin of the Sintashta traditions in the Bronze Age. *Ural Hist J*. 2020;69(4): 51-60. doi 10.30759/1728-9718-2020-4(69)-51-60 (in Russian)
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564-567. doi 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fages A., Hanghøj K., Khan N., Gaunitz C., Seguin-Orlando A., Leonard M., McCrory Constantz C., ... Barrey E., Willerslev E., Outram A.K., Librado P., Orlando L. Tracking five millennia of horse management with extensive ancient genome time series. *Cell*. 2019; 177(6):1419-1435.e31. doi 10.1016/j.cell.2019.03.049
- Ghirotto S., Tassi F., Fumagalli E., Colonna V., Sandionigi A., Lari M., Vai S., Petiti E., Corti G., Rizzi E., De Bellis G., Caramelli D., Barbujani G. Origins and evolution of the Etruscans' mtDNA. *PLoS One*. 2013;8(2):e55519. doi 10.1371/journal.pone.0055519
- Giontella A., Cardinali I., Lancioni H., Giovannini S., Pieramati C., Silvestrelli M., Sarti F.M. Mitochondrial DNA survey reveals the lack of accuracy in Maremmano horse studbook records. *Animals*. 2020;10(5):839. doi 10.3390/ani10050839
- Green R.E., Krause J., Ptak S.E., Briggs A.W., Ronan M.T., Simons J.F., Du L., Egholm M., Rothberg J.M., Paunovic M., Pääbo S. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature*. 2006; 444(7117):330-336. doi 10.1038/nature05336
- Grigor'ev S.A. The settlement of Mochishche in the Southern Trans-Urals and the problems of periodization of the cultures of the Andronovo cultural-historical community. In: Vybornov A.A. (Ed.). XXI Ural Archaeological Meeting. Samara, 2018;100-102 (in Russian)
- Grushin S.P. Cultural Interaction and Migration Processes in the Forest-Steppe Altai Region during the Early Bronze Age (22nd-18th Centuries BC). In: Eurasianism: Theoretical Potential and Practical Applications. Barnaul, 2018;53-57 (in Russian)
- Grushin S.P. Eluninskaya culture and Utkul group of sites. In: Tishkin A.A. (Ed.). History of Altai. V. 1. The most ancient era, antiquity and the Middle Ages. Barnaul, 2019;124-141 (in Russian)
- Grushin S.P. The main stages of metallurgy development in Altai during the Bronze Age. In: Proceedings of the VI (XXII) All-Russian Archaeological Congress in Samara. V. I. Samara State Social and Pedagogical University. 2020;266-267 (in Russian)
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(14):3059-3066. doi 10.1093/nar/gkf436
- Keyser-Tracqui C., Blandin-Frappin P., Francfort H.-P., Ricaut F.-X., Lepetz S., Crubézy E., Samashev Z., Ludes B. Mitochondrial DNA analysis of horses recovered from a frozen tomb (Berel site, Kazakhstan, 3rd Century BC). *Anim Genet*. 2005;36(3):203-209. doi 10.1111/j.1365-2052.2005.01316.x
- Kiryushin Yu.F. The Eneolithic and Early Bronze Age of the South of Western Siberia. Barnaul: Altai State University, 2002 (in Russian)
- Kiryushin Yu.F., Grushin S.P., Tishkin A.A. Berezovaya Luka – The Settlement of Bronze Age Epoch in the Aleiskaya Steppe. V. II. Barnaul: Altai State University, 2011 (in Russian)
- Kiryushin Yu.F., Kosincev P.A., Grushin S.P., Papin D.V. Cattle breeding in Altai during the Bronze Age. *Problems Archaeology, Ethnography, Anthropology Siberia Neighboring Territories*. 2012;18: 180-183 (in Russian)

- Koryakova L., Epimakhov A.V. The Urals and Western Siberia in the Bronze and Iron Ages. Cambridge University Press, 2007. doi 10.1017/CBO9780511618451
- Kovalevsky S.A. The study of Late Bronze Age sites in the south of Western Siberia within the unified Irmen culture (the 1970s – the first half of the 1980s). *Theory Pract Archaeol Res.* 2020;(3):18-32. doi 10.14258/tpai(2020)3(31)-02 (in Russian)
- Kovtun I.V. The period of transition from the Developed to the Late Bronze Age in the Lower Tom Region. *Uchenyye zapiski muzeyazapovednika "Tomskaya Pisanitsa" = Research Notes of the Tomsk Pisanitsa Museum-Reserve.* 2022;(15):5-41. doi 10.24412/2411-7838-2022-15-5-41 (in Russian)
- Kusliy M.A. Genetic diversity of ancient and modern horses of Altai and adjacent territories. Biodiversity and Ecology. Université Paul Sabatier – Toulouse III; Académie des sciences de Russie, 2023. Available: <https://theses.hal.science/tel-04391016v1/file/2023TOU30188b.pdf>
- Kusliy M.A., Vorobieva N.V., Tishkin A.A., Makunin A.I., Druzhkova A.S., Trifonov V.A., Iderkhangai T.-O., Graphodatsky A.S. Traces of Late Bronze and Early Iron Age Mongolian horse mitochondrial lineages in modern populations. *Genes (Basel).* 2021;12(3):412. doi 10.3390/genes12030412
- Kusliy M.A., Yurlova A.A., Neumestova A.I., Vorobieva N.V., Gutorova N.V., Molodtseva A.S., Trifonov V.A., ... Iderkhangai T.-O., Kovalev A.A., Erdenebaatar D., Graphodatsky A.S., Tishkin A.A. Genetic history of the Altai breed horses: From ancient times to modernity. *Genes (Basel).* 2023;14(8):1523. doi 10.3390/genes14081523
- Lanfear R., Calcott B., Ho S.Y.W., Guindon S. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.* 2012;29(6):1695-1701. doi 10.1093/molbev/mss020
- Lei C.Z., Su R., Bower M.A., Edwards C.J., Wang X.B., Weining S., Liu L., Xie W.M., Li F., Liu R.Y., Zhang Y.S., Zhang C.M., Chen H. Multiple maternal origins of native modern and ancient horse populations in China. *Anim Genet.* 2009;40(6):933-944. doi 10.1111/j.1365-2052.2009.01950.x
- Leigh J.W., Bryant D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015;6(9):1110-1116. doi 10.1111/2041-210X.12410
- Librado P., Der Sarkissian C., Ermini L., Schubert M., Jónsson H., Albrechtsen A., Fumagalli M., ... Nielsen R., Willerslev E., Kantanen J., Prokhortchouk E., Orlando L. Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(50):E6889-E6897. doi 10.1073/pnas.1513696112
- Librado P., Khan N., Fages A., Kusliy M.A., Suchan T., Tonasso-Calvière L., Schiavinato S., ... Kroonen G.J., Kristiansen K., Wincker P., Outram A., Orlando L. The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature.* 2021;598(7882):634-640. doi 10.1038/s41586-021-04018-9
- Lindner S. Chariots in the Eurasian Steppe: a Bayesian approach to the emergence of horse-drawn transport in the early second millennium BC. *Antiquity.* 2020;94(374):361-380. doi 10.15184/aqy.2020.37
- Ma H., Wang S., Zeng G., Guo J., Guo M., Dong X., Hua G., Liu Y., Wang M., Ling Y., Ding X., Zhao C., Wu C. The origin of a coastal indigenous horse breed in China revealed by genome-wide SNP data. *Genes (Basel).* 2019;10(3):241. doi 10.3390/genes10030241
- Maricic T., Whitten M., Pääbo S. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS One.* 2010;5(11):e14004. doi 10.1371/journal.pone.0014004
- Papin D.V., Stepanova N.F., Fedoruk A.S. Late Bronze Age ceramics from a steppe region between the Ob and Irtysh rivers as a source for reconstructing ethnocultural interaction processes. *Vestnik Arheologii, Antropologii i Etnografii.* 2018;(3):19-31. doi 10.20874/2071-0437-2018-42-3-019-031 (in Russian)
- Popova B.S. The monuments of the Irmen culture of the Lower Tom river area. The historiographical review. *Tomsk State Univ J Hist.* 2019;57:163-169. doi 10.17223/19988613/57/27 (in Russian)
- Regatieri I.C., Eberth J.E., Sarver F., Lear T.L., Bailey E. Comparison of DMRT3 genotypes among American Saddlebred horses with reference to gait. *Anim Genet.* 2016;47(5):603-605. doi 10.1111/age.12458
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19(12):1572-1574. doi 10.1093/bioinformatics/btg180
- Sawyer S., Krause J., Guschanski K., Savolainen V., Pääbo S. Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS One.* 2012;7(3):e34131. doi 10.1371/journal.pone.0034131
- Schubert M., Jónsson H., Chang D., Der Sarkissian C., Ermini L., Ginolhac A., Albrechtsen A., ... Nielsen R., Excoffier L., Willerslev E., Shapiro B., Orlando L. Prehistoric genomes reveal the genetic foundation and cost of horse domestication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(52):E5661-E5669. doi 10.1073/pnas.1416991111
- Sitnikov S.M. On the origins and the cultural-historical contacts of Sargara-Alexeevo population. In: Beisenov A.Z. (Ed.). Begazy-Dandybai culture of steppe Eurasia. Almaty, 2013;417-425 (in Russian)
- Sitnikov S.M., Gel'mel' Yu.I. Some results of the research into 'Gusinaya Lyaga-1' settlement. *Theory Pract Archaeol Res.* 2017;(1):49-61. doi 10.14258/tpai(2017)1(17)-04 (in Russian)
- Stephens T.D., Splan R.K. Population history and genetic variability of the American Shire horse. *Anim Genet Resour.* 2013;52:31-38. doi 10.1017/S2078633613000052
- Szontagh A., Bán B., Bodó I., Cothran E.G., Hecker W., Józsa C., Major Á. Genetic diversity of the Akhal-Teke horse breed in Turkmenistan based on microsatellite analysis. In: Bodo I., Alderson L., Langlois B. (Eds). Conservation Genetics of Endangered Horse Breeds. Wageningen Academic Publishers, 2005;123-128
- Tishkin A.A. Making of periodizational and cultural and chronological schemes: historical experience and modern conception of study of ancient and medieval nations of Altay. Barnaul: Altai State University, 2007 (in Russian)
- Vernesi C., Caramelli D., Dupanloup I., Bertorelle G., Lari M., Capellini E., Moggi-Cecchi J., Chiarelli B., Castri L., Casoli A., Mallegni F., Lalueza-Fox C., Barbujani G. The Etruscans: A population-genetic study. *Am J Hum Genet.* 2004;74(4):694-704. doi 10.1086/383284
- Vorobieva N.V., Makunin A.I., Druzhkova A.S., Kusliy M.A., Trifonov V.A., Popova K.O., Polosmak N.V., Molodin V.I., Vasiliev S.K., Shunkov M.V., Graphodatsky A.S. High genetic diversity of ancient horses from the Ukok Plateau. *PLoS One.* 2020;15(11):e0241997. doi 10.1371/journal.pone.0241997
- Willerslev E., Cooper A. Ancient DNA. *Proc Biol Sci.* 2005;272(1558):3-16. doi 10.1098/rspb.2004.2813
- Zubova A.V., Chikisheva T.A., Pozdnyakov D.V. Anthropological aspects of the genesis of representatives of the Andronovo cultural and historical community. In: Molodin V.I., Epimakhov A.V. (Eds). The Aryans in the Eurasian Steppes: the Bronze and Early Iron Ages in the Steppes of Eurasia and Contiguous Territories. Barnaul: Altai State University, 2014;541-554 (in Russian)

Conflict of interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Received October 7, 2025. Revised December 28, 2025. Accepted January 1, 2026.

doi 10.18699/vjgb-26-50

Токсичные металлы и генетический полиморфизм у коренного населения Севера Азии и Америки

Б.А. Малярчук , Н.В. Похилук 

Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

 malbor@mail.ru

Аннотация. В настоящей работе у коренного населения Сибири проанализирован полиморфизм генов, кодирующих ферменты метаболизма тяжелых металлов, на основе данных о содержании ртути, свинца и кадмия в крови у канадских эскимосов – носителей различных генотипов; изучен также полиморфизм генетических локусов, связанных с чувствительностью к воздействию мышьяка по данным о содержании неорганического мышьяка в моче у коренного населения Анд, длительное время (в течение тысячелетий) потребляющего питьевую воду с повышенным содержанием мышьяка. Для поиска генетических маркеров воздействия токсичных металлов на организм человека использован популяционно-генетический подход, направленный на анализ генетических различий между популяциями, проживающими в разных условиях природной среды (и в разных условиях загрязнения токсичными элементами). Статистически значимые различия главным образом обнаружены между коренным населением Северо-Восточной Сибири (эскимосы, чукчи и коряки) и выборками из центральной (эвены, эвенки, якуты) и южной (алтайцы, шорцы, буряты) частей Сибири. Максимальные значения статистики *PBS* (population branch statistics), свидетельствующие о вероятном действии отбора на генетические локусы чувствительности к воздействию ртути, выявлены в семи локусах генов *MTHFR* (rs2274976 и rs1801131), *GPX4* (rs713041), *ABCB1* (rs1128503), *AHR* (rs2066853), *TXNRD2* (rs5748469) и *SEPHS2* (rs1133238). К генетическим маркерам воздействия свинца могут быть отнесены локусы rs713041 (*GPX4*), rs7483 (*GSTM3*) и rs2282143 (*SLC22A1*). В отношении распределения кадмия в крови информативны локусы rs2274976 (*MTHFR*) и rs1056836 (*CYP1B1*). Обнаружено, что в популяциях коренного населения Северо-Востока Сибири с высокой частотой (65.8 %) распространены варианты полиморфизма гена *AS3MT*, защищающие от воздействия неорганического мышьяка, хотя сведения о долговременном употреблении коренными жителями побережий Чукотки и Приохотья питьевой воды, загрязненной мышьяком, отсутствуют. Предполагается, что вероятным источником мышьяка, а также других токсичных элементов на Северо-Востоке Сибири могут быть морепродукты, являющиеся основой традиционной «арктической» диеты коренного населения прибрежных районов северных морей. Для прояснения механизмов долговременного воздействия токсичных металлов на генетическую структуру популяций коренного населения Крайнего Севера необходимы дальнейшие молекулярно-генетические, биохимические и токсикологические исследования.

Ключевые слова: генетические маркеры; генетическая дифференциация; популяции человека; Сибирь; ртуть; свинец; кадмий; мышьяк

Для цитирования: Малярчук Б.А., Похилук Н.В. Токсичные металлы и генетический полиморфизм у коренного населения Севера Азии и Америки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):461-469. doi 10.18699/vjgb-26-50

Благодарности. Авторы благодарны А.Н. Литвинову (ИБПС ДВО РАН) за помощь в работе.

Toxic metals and genetic polymorphism in indigenous populations of northern Asia and America

B.A. Malyarchuk , N.V. Pokhilyuk 

Institute of Biological Problems of the North of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

 malbor@mail.ru

Abstract. The polymorphism of genes encoding enzymes involved in heavy metal metabolism was analyzed in indigenous Siberian populations based on the mercury, lead, and cadmium contents in the blood of Canadian Inuit carrying different genotypes. Additionally, we examined the polymorphism of genetic loci associated with sensitivity to arsenic exposure in indigenous Siberian populations using data on inorganic arsenic content in the urine of indigenous Andean populations who had consumed drinking water with elevated arsenic levels for thousands of years. A population genetic approach was used to seek genetic markers of toxic metal exposure in humans by analyzing genetic differences between populations living in different natural environments and under different conditions of toxic element contamination. Statistically significant differences were primarily observed between indigenous populations in Northeast Siberia (Siberian Eskimo (Yupik), Chukchi, and Koryaks) and samples from

the central (Evens, Evenki, and Yakuts) and southern (Altaians, Shors, and Buryats) regions of Siberia. The maximum population branch statistics (PBS) values, which indicate the probable effect of selection on genetic loci sensitive to mercury exposure, were identified in seven gene loci: *MTHFR* (rs2274976 and rs1801131), *GPX4* (rs713041), *ABCB1* (rs1128503), *AHR* (rs2066853), *TXNRD2* (rs5748469), and *SEPHS2* (rs1133238). Loci rs713041 (*GPX4*), rs7483 (*GSTM3*), and rs2282143 (*SLC22A1*) can be considered genetic markers of lead exposure. Loci rs2274976 (*MTHFR*) and rs1056836 (*CYP1B1*) provide information about cadmium distribution in blood. It was found that protective variants of the *AS3MT* gene polymorphism are widespread (65.8 %) in the indigenous populations of Northeast Siberia. This is despite the lack of information regarding the long-term consumption of arsenic-contaminated drinking water by indigenous peoples along the Chukotka and Priokhotye coasts. It is hypothesized that seafood, which constitutes the core of the traditional "Arctic" diet of the indigenous populations inhabiting the coastal regions of the northern seas, may potentially be a significant source of arsenic and other toxic elements in Northeast Siberia. Further molecular, biochemical, and toxicological studies are necessary to elucidate the mechanisms by which toxic metals impact the genetic structure of indigenous populations in the Far North over long periods of time.

Key words: genetic markers; genetic differentiation; human populations; Siberia; mercury; lead; cadmium; arsenic

For citation: Malyarchuk B.A., Pokhilyuk N.V. Toxic metals and genetic polymorphism in indigenous populations of northern Asia and America. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):461-469. doi 10.18699/vjgb-26-50

Введение

Токсичные металлы, такие как ртуть, свинец, кадмий и полуметалл мышьяк, относятся к числу широко распространенных загрязнителей окружающей среды; они токсичны для человека и представляют угрозу здоровью. Особую озабоченность вызывает загрязнение экосистем Крайнего Севера, где, как показано в ряде исследований, аккумулируются различные загрязняющие вещества, попадающие через воду, пищу и воздух в организм людей (Fernandez-Llamazares et al., 2020; Basu et al., 2022; Adlard et al., 2024). Традиционная диета коренного населения Крайнего Севера Азии и Америки, особенно приморских территорий, основана на потреблении продуктов питания (морских млекопитающих, рыбы, моллюсков), содержащих повышенные уровни загрязняющих веществ (Becker, 2000; Гамов и др., 2022). В промышленных регионах Сибири также существует проблема загрязнения тяжелыми металлами, представляющими опасность для здоровья человека.

Несмотря на проводимые мероприятия по биомониторингу загрязняющих веществ в биологических тканях человека (преимущественно это волосы и кровь), сложность интерпретации полученных данных может быть связана с генетическими различиями между популяциями человека, проживающими в различных природно-климатических зонах. Однако популяционно-генетических исследований, направленных на поиск генетических маркеров, указывающих на воздействие загрязняющих веществ на организм, проводится очень мало. Наиболее изученными в этом отношении являются популяции эскимосов Канады и Гренландии (Ayotte et al., 2011; Ghisari et al., 2013; Parajuli et al., 2018, 2021).

Полученные данные позволили предположить, что уровни загрязняющих веществ в крови связаны с полиморфизмом генетических локусов для ряда биологических путей, таких как метаболизм фолиевой кислоты, липидов и ксенобиотиков. Так, у канадских эскимосов выявлены генетические варианты, с которыми ассоциируются повышенные или пониженные концентрации тяжелых металлов (ртути, кадмия, свинца) и органических загрязнителей (4,4'-ДДЕ и ПХБ-153) в крови (Parajuli et al., 2018, 2021). Установлено, что коренное население Анд (Аргентина,

Чили, Боливия), потреблявшее в течение тысячелетий питьевую воду с высокой концентрацией мышьяка, приспособилось генетически к токсичному воздействию этого химического элемента (Engström et al., 2011; Apata et al., 2017; De Loma et al., 2022). В результате в этих популяциях существенно выросла частота протективных вариантов, кодирующих ферменты, способные более эффективно метаболизировать мышьяк и выводить его из организма.

В связи с вышеизложенным представляются актуальными исследования распределения генетических вариантов, связанных с метаболизмом токсичных металлов, в других этнических группах человека. Целью настоящей работы стал анализ распределения частот полиморфных вариантов генов, вовлеченных в метаболизм токсичных элементов и связанных с чувствительностью к воздействию ртути, мышьяка, кадмия и свинца, в региональных выборках коренного населения Сибири.

Материалы и методы

В работе использованы опубликованные ранее результаты генотипирования 200 представителей коренного населения Сибири, полученные с помощью панели маркеров Illumina OmniExpress Bead Chips (Cardona et al., 2014). Выборка коренного населения Северо-Востока Сибири ($N = 58$) сформирована жителями побережий Берингова (эскимосы и чукчи) и Охотского (коряки) морей. В центральносибирскую выборку вошли эвены Магаданской области, эвенки Красноярского края и якуты из различных районов Якутии ($N = 70$). В южносибирской выборке объединены шорцы из Кемеровской области, южные алтайцы из Республики Алтай и Кемеровской области, буряты из различных районов Бурятии ($N = 72$). Несмотря на то что коряки и эвены соседствуют на одной территории Северо-Эвенского района Магаданской области примерно с XVI в., они генетически различаются и поэтому отнесены в разные региональные группы (Cardona et al., 2014).

В популяциях коренного населения Сибири проанализирован полиморфизм 78 локусов, которые предположительно связаны с межиндивидуальными различиями по концентрациям тяжелых металлов (ртути, кадмия и свинца) в крови у канадских эскимосов (Parajuli et al., 2018,

2021) (табл. S1 Приложения)¹. Исследованные локусы находятся в генах, кодирующих ферменты, вовлеченные в следующие ключевые биологические пути: антиоксидантные свойства, метаболизм фолиевой кислоты, метаболизм глутатиона, гемоглобин, транспортеры ионов, окислительный стресс, селенопротеины, метаболизм ксенобиотиков, металлочувствительные механизмы (металлотионеины), липидный обмен и воспалительные процессы.

Распределение аллелей и генотипов, гетерозиготность и генетическую дифференциацию популяций (F_{st} -различия) исследовали с помощью пакета программ Arlequin 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в популяциях и различия по частоте аллелей и генотипов оценивали с помощью точного теста Фишера. Степень неравновесия по сцеплению между аллелями двух разных локусов на хромосоме определяли с помощью статистики r^2 . Для оценки действия отбора на аутосомные локусы использовали статистику PBS (population branch statistics), основанную на F_{st} -различиях между тремя сравниваемыми популяциями (Yi et al., 2010). Высокие значения PBS могут свидетельствовать о сильном селективном воздействии на локус, в результате чего частоты аллелей изменяются быстрее, чем ожидается в результате дрейфа.

Результаты и обсуждение

Генетические маркеры воздействия ртути

Ртуть (Hg) – токсичный химический элемент, представляющий угрозу для здоровья всего населения мира. Высокая токсичность неорганических и органических соединений ртути (особенно метилртути) обусловлена взаимодействием с сульфгидрильными (–SH) группами аминокислотных остатков цистеина. В связи с этим происходят нарушения структуры белков и активных центров ферментов, повреждения клеточных мембран и органелл; возрастает уровень окислительного стресса (Арефьева и др., 2010; Basu et al., 2022).

Анализ полиморфизма локусов, связанных с метаболизмом ртути у канадских эскимосов, согласно данным R.P. Parajuli с коллегами (2018, 2021), показал, что для 47 из 78 локусов наблюдаются статистически значимые различия по распределению аллелей при попарных сравнениях региональных групп Сибири (см. табл. S1). Наиболее высокие значения статистики PBS , свидетельствующие о вероятном селективном воздействии на локус (в диапазоне от 0.266 до 0.043), выявлены в семи локусах, для которых ранее были показаны ассоциации между полиморфными вариантами и содержанием ртути в крови у канадских эскимосов – носителей различных генотипов (табл. 1). Это локусы rs2274976 (ген *MTHFR*), rs713041 (ген *GPX4*), rs1801131 (ген *MTHFR*), rs1128503 (ген *ABCB1*), rs2066853 (ген *AHR*), rs5748469 (ген *TXNRD2*) и rs1133238 (ген *SEPHS2*). Результаты анализа показывают, что для данных локусов наблюдается увеличение частоты аллелей, ассоциирующихся с повышенным содержанием ртути в крови, в направлении с юга на северо-восток Сибири

(табл. S2). Наиболее высокие частоты маркерных аллелей (rs2274976-T, rs713041-C, rs1801131-G, rs1128503-A, rs2066853-G) зарегистрированы как у канадских эскимосов, так и у коренного населения прибрежных районов Северо-Восточной Сибири (у эскимосов, чукчей и коряков).

Кроме этого, варианты rs5748469-A гена *TXNRD2* и rs1133238-A гена *SEPHS2* обнаружены с максимальной частотой только на Северо-Востоке Сибири. Причем аллель rs1133238-A находится в основном в составе гетерозигот, у носителей которых зафиксированы наиболее высокие концентрации ртути в крови, – по частоте GG и GA+AA выборка из Северо-Восточной Сибири статистически значимо отличается от других сибирских выборок ($P < 10^{-4}$, точный тест Фишера).

Выявленные генетические локусы, для которых наблюдалась связь с изменениями в содержании ртути в крови канадских эскимосов, относятся к следующим биологическим путям: метаболизм фолиевой кислоты (ген *MTHFR*) и селенопротеинов (гены *GPX4*, *SEPHS2*), транспорт различных молекул (ген *ABCB1*), метаболизм ксенобиотиков (ген *AHR*), окислительный стресс (ген *TXNRD2*). Согласно данным ClinVar Miner (<https://clinvarminer.genetics.utah.edu/>), полиморфизм локуса rs2274976 (аминокислотная замена Arg594Gln) гена *MTHFR*, кодирующего метилентетрагидрофолатредуктазу, с помощью которой из гомоцистеина образуется биологически активная форма фолиевой кислоты, является нейтральным в функциональном отношении, хотя у гетерозигот наблюдалось небольшое повышение концентрации гомоцистеина в крови (Melo et al., 2006).

Аналогично полиморфизм локуса rs1801131 (Glu429Ala), хотя и приводит к небольшому снижению активности кодируемого фермента, но не влияет на уровень гомоцистеина в плазме крови и также относится к числу нейтральных изменений (Weisberg et al., 2001). В то же время замена Ala222Val в локусе rs1801133 связана с выраженным снижением активности *MTHFR* (Frosst et al., 1995), в результате чего существенно повышается риск развития гипергомоцистеинемии, обусловленной дефицитом метилентетрагидрофолатредуктазы. Необходимо отметить, что коренное население северо-восточной и центральной частей Сибири характеризуется пониженной частотой варианта rs1801133-A, связанного с более низкой активностью фермента, в сравнении с другими регионами мира (см. табл. S1). Для гена *MTHFR* характерна блочная организация (Трифорова и др., 2012), и, в частности, варианты полиморфизма в локусах rs2274976 и rs1801131, расположенные на расстоянии 3.5 тыс. п. н. друг от друга, находятся в состоянии сцепления.

Проведенный нами анализ показал, что у коренного населения Северо-Востока Сибири неравновесие по сцеплению между этими локусами существенно выше (значения r^2 варьируют от 0.6 у чукчей до 1.0 у эскимосов), чем в более южных популяциях (значения r^2 варьируют от 0.2 до 0.3). Таким образом, повышенные частоты вариантов rs2274976-T и rs1801131-G у коренного населения Северо-Востока Сибири и выраженное неравновесие по

¹ Приложение см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx26.xlsx>

Таблица 1. Распределение вариантов полиморфизма, связанных с чувствительностью к воздействию тяжелых металлов, у коренного населения Сибири и канадских эскимосов

Метаболический путь	Ген	Вариант полиморфизма	Частота варианта полиморфизма				<i>P</i> (<i>Fst</i>)	<i>PBS</i>
			Канадские эскимосы	Северо- Восточная Сибирь (1)	Центральная Сибирь (2)	Южная Сибирь (3)		
Hg								
Метаболизм фолатов	<i>MTHFR</i>	rs2274976-C	0.488	0.595	0.871	0.944	(1–2) 0 (1–3) 0 (2–3) 0.039	0.266
Селенопротеин	<i>GPX4</i>	rs713041-T	0.113	0.152	0.321	0.410	(1–2) 0.0019 (1–3) 0 (2–3) 0.137	0.106
Метаболизм фолатов	<i>MTHFR</i>	rs1801131-T	0.425	0.543	0.721	0.674	(1–2) 0.0054 (1–3) 0.04 (2–3) 0.44	0.045
Метаболизм ксенобиотиков	<i>AHR</i>	rs2066853-A	0.119	0.112	0.221	0.264	(1–2) 0.033 (1–3) 0.0028 (2–3) 0.41	0.05
Окислительный стресс	<i>TXNRD2</i>	rs5748469-C	0.192	0.079	0.193	0.187	(1–2) 0.01 (1–3) 0.016 (2–3) 0.99	0.043
Селенопротеин	<i>SEPHS2</i>	rs1133238-A	0.143	0.32	0.13	0.125	(1–2) 0 (1–3) 0 (2–3) 0.99	0.102
Транспортер	<i>ABCB1</i>	rs1128503-G	0.233	0.224	0.336	0.437	(1–2) 0.052 (1–3) 0.0006 (2–3) 0.084	0.051
Pb								
Селенопротеин	<i>GPX4</i>	rs713041-T	0.113	0.152	0.321	0.410	(1–2) 0.0019 (1–3) 0 (2–3) 0.137	0.106
Метаболизм глутатиона	<i>GSTM3</i>	rs7483-C	0.32	0.198	0.421	0.41	(1–2) 0 (1–3) 0.0004 (2–3) 0.908	0.101
Транспортер	<i>SLC22A1</i>	rs2282143-T	0.129	0.129	0.014	0.028	(1–2) 0.0003 (1–3) 0.0016 (2–3) 0.69	0.084
Cd								
Метаболизм фолатов	<i>MTHFR</i>	rs2274976-C	0.488	0.595	0.871	0.944	(1–2) 0 (1–3) 0 (2–3) 0.039	0.266
Метаболизм ксенобиотиков	<i>CYP1B1</i>	rs1056836-C	0.099	0.070	0.207	0.174	(1–2) 0.0021 (1–3) 0.016 (2–3) 0.547	0.054

Примечание. Данные для канадских эскимосов приводятся по работам R.P. Parajuli с коллегами (2018, 2021). *P* (*Fst*) – статистическая значимость *Fst*-различий по частоте аллелей при попарных сравнениях популяций Сибири.

сцеплению могут иметь функциональное значение, возможно, связанное с изменением активности метилентетрагидрофолатредуктазы.

Вариант rs713041-C гена глутатионпероксидазы *GPX4*, частота которого возрастает к северу Азии и Америки до более чем 80 %, по всей видимости, имеет важное значение в защите организма от воздействия пероксидов, образующихся при воздействии различных факторов, включая ртуть. Установлено, что при достаточном уровне селена (как в приморских популяциях) экспрессия *GPx4* была выше для трансгенов, включающих вариант rs713041-C (Gautrey et al., 2011).

Ген *SEPHS2* кодирует селенофосфат синтазу 2, обеспечивающую метаболизм селена, который в свою очередь выполняет большую роль в защите от токсичного воздействия ртути и метилртути (Jorge et al., 2024). Поэтому отмеченная у канадских эскимосов ассоциация варианта rs1133238-A с повышенной концентрацией ртути в крови

может быть связана с протективным значением этого аллеля. Ген *ABCB1* кодирует Р-гликопротеин – транспортер, выводящий из клеток различные вещества, включая, вероятно, и ртуть (Sánchez Rodríguez et al., 2020). Поэтому вариант rs1128503-A, достигающий на Крайнем Севере очень высоких частот (около 80 %), может быть протективным, способствуя снижению токсического воздействия ртути.

Ген *AHR* кодирует рецептор ароматических углеводородов, участвующий в регуляции транскрипции генов ферментов, способствующих метаболизму ксенобиотиков, в том числе ртути, кадмия, мышьяка и никеля (Mohammedi-Bardbori et al., 2015; Alqahtani et al., 2024). Ген *TXNRD2* кодирует митохондриальную тиоредоксин-редуктазу 2, входящую в состав антиоксидантной защиты организма. Полиморфизм в этих генах, по всей видимости, оказывает влияние на восприимчивость к интоксикации ртутью (Crespo-Lopez et al., 2023).

Генетические маркеры воздействия свинца

Основной механизм токсичности свинца (Pb) связан с блокировкой ферментов за счет соединения с сульфгидрильными группами остатков цистеина (Gonzalez-Villalva et al., 2025). Не существует определенного порога безопасности для свинца в крови, поскольку даже низкие концентрации этого химического элемента могут привести к серьезным проблемам: повреждению клеточных мембран, нарушениям синтеза гемоглобина, развитию окислительного стресса. Исследования канадских эскимосов показали, что у них восприимчивость к воздействию свинца обусловлена различными генами, ответственными за метаболизм селенопротеинов (ген *GPX4*), окислительный стресс (ген *TXNRD2*), транспорт различных молекул (гены *SLC22A1*, *SLCO1B1*), метаболизм ксенобиотиков (ген *CYP2C19*) и другие пути (Parajuli et al., 2018, 2021).

У коренного населения Сибири наиболее высокая дифференциация (значения *PBS* от 0.106 до 0.08) обнаружена между выборкой из Северо-Восточной Сибири и остальными группами по локусам rs713041 (ген *GPX4*), rs7483 (ген *GSTM3*) и rs2282143 (ген *SLC22A1*) (табл. S3 и S4). Таким образом, локус rs713041 гена *GPX4*, кодирующего глутатионпероксидазу, вероятно, имеет большое значение в защите организма от воздействия не только ртути, но и свинца (см. табл. 1).

Ген *GSTM3* кодирует глутатион S-трансферазу мю 3, которая играет важную роль в детоксикации ксенобиотиков. Установлено, что вариант rs7483-T, приводящий к аминокислотной замене Val224Ile, значительно увеличивает активность этого фермента, что позволяет эффективнее метаболизировать лекарственные препараты (Tetlow et al., 2004). Повышенная ферментативная активность может влиять и на метаболизм тяжелых металлов, в частности свинца. Поэтому увеличение частоты варианта rs7483-T гена, кодирующего более активную форму *GSTM3*, у коренного населения Северо-Востока Сибири в сравнении с другими региональными группами Сибири и канадскими эскимосами, по всей видимости, связано с протективной ролью этого варианта генетического полиморфизма в отношении токсического воздействия свинца.

Ген *SLC22A1* кодирует транспортер органических катионов 1 (OCT1), который играет важную роль в транспорте различных веществ, включая лекарственные препараты, через клеточные мембраны. Установлено, что вариант rs2282143-T не влияет существенно на экспрессию гена *SLC22A1*, но снижает способность OCT1 транспортировать лекарства в клетку (Chen et al., 2018). Таким образом, увеличение частоты аллеля rs2282143-T в популяциях коренного населения Северо-Востока Сибири и канадских эскимосов может быть связано с протективной ролью этого варианта генетического полиморфизма в условиях воздействия тяжелых металлов.

Наиболее известным геном, характеризующимся повышенной чувствительностью к отравлению свинцом, является ген *ALAD* (Stajniko et al., 2024). Этот ген кодирует дегидратазу δ-аминолевулиновой кислоты (АЛК-дегидратазу), участвующую в синтезе порфириногена – пред-

шественника тетрапирролов (гема и других соединений). Известно, что этот фермент очень чувствителен к ингибированию тяжелыми металлами (Perini et al., 2024). Также показано, что полиморфизм в локусе rs1805313 проявляет сильную ассоциацию с уровнем свинца в крови и оказывает влияние на экспрессию АЛК-дегидратазы в клетках крови (Warrington et al., 2015). У канадских эскимосов не обнаружено различий по распределению концентраций свинца и ртути в крови в различных группах генотипов по локусу rs1805313, однако сравнительный анализ показал, что и канадские эскимосы, и коренные жители Северо-Востока Сибири характеризуются повышенными частотами варианта rs1805313-A (значение *PBS* = 0.143) (см. табл. S4). Это может быть связано с протективной ролью данного полиморфизма гена *ALAD* в отношении свинца.

Генетические маркеры воздействия кадмия

Кадмий (Cd) как один из широко распространенных загрязнителей окружающей среды может оказывать ряд токсических эффектов, включая изменения в экспрессии генов и ингибирование процессов репарации поврежденной ДНК, вмешательство в апоптоз и аутофагию, окислительный стресс и взаимодействие с микроэлементами, необходимыми для каталитической активности ферментов (Qu, Zheng, 2024; Wang et al., 2025). Так, кадмий способен конкурировать за места связывания микроэлементов (Zn, Mn, Fe, Se, Mg) в активных центрах антиоксидантных ферментов, что приводит к их повреждению (Đukić-Čosić et al., 2020).

Основные источники воздействия кадмия для населения арктических регионов – не только потребление традиционных продуктов питания, но и курение (Becker, 2000; Adlard et al., 2024). Например, у канадских эскимосов зарегистрировано 8-кратное превышение концентрации кадмия в крови (Parajuli et al., 2021). У них выявлены также ассоциации между уровнями кадмия и вариантами полиморфизма в генах антиоксидантов (*TXNRD2*, *SELS*), окислительного стресса (*NOS1*), транспортеров (*ABCC1*), семейства цитохрома P450 (*CYP2D6*, *CYP24A1*), метаболизма фолиевой кислоты (ген *MTHFR*). Нами проанализировано распределение частот вариантов полиморфизма в ряде локусов, связанных с метаболизмом кадмия, у коренного населения Сибири. Однако в результате анализа обнаружен только один вариант – rs2274976-T гена *MTHFR*, в распределении которого наблюдается статистически значимое увеличение частоты как на Северо-Востоке Сибири, так и у канадских эскимосов (см. табл. 1 и табл. S5). У последних увеличение частоты аллеля rs2274976-T сопровождается увеличением концентрации кадмия в крови, а также ртути, как отмечено выше.

Статистически значимые различия между выборкой из Северо-Восточной Сибири и остальными сибирскими группами выявлены и по распределению аллелей локуса rs1056836 гена *CYP1B1*, по которому также найдены различия распределения кадмия в крови у канадских эскимосов (см. табл. 1 и табл. S2). Частота варианта rs1056836-G максимальна (более 90 %) у коренных жителей Северо-Вос-

тока Сибири и у канадских эскимосов. При этом вариант rs1056836-G ассоциируется с пониженной концентрацией кадмия в крови.

Вместе с тем в результате исследования нами обнаружены генетические локусы, потенциально связанные с воздействием тяжелых металлов. Для этих локусов, характеризующихся относительно высокими значениями статистики *PBS* (от 0.087 до 0.043), отмечены статистически значимо повышенные частоты аллелей у канадских эскимосов и коренных жителей Северо-Востока Сибири (rs688 гена *LDLR* для кадмия; rs628031 гена *SLC22A1* и rs732774 гена *ATP7B* для ртути) или же только на Северо-Востоке Сибири (rs4895441 гена *HBS1L* для ртути) в сравнении с другими регионами Сибири (табл. S6). Однако по этим локусам у канадских эскимосов не найдены различия по содержанию тяжелых металлов у носителей различных генотипов. Тем не менее они перспективны для дальнейших исследований в области экологической генетики коренного населения Сибири.

Генетические маркеры воздействия мышьяка

К числу потенциально опасных для здоровья элементов относится мышьяк (As). Известно, что в большинстве морепродуктов уровень мышьяка повышен. Однако у морских организмов (китов, тюленей) он находится в основном в виде арсенобетаина, который, по-видимому, нетоксичен и не представляет опасности для людей (Becker, 2000). Вместе с тем в небольших количествах в морепродуктах присутствуют и другие органические формы мышьяка, которые могут быть даже более токсичными, чем его неорганические формы (Багрянцева, Хотимченко, 2021). Отмечено, что в процессе метаболизма органические формы мышьяка могут превращаться в метилированные и неорганические формы, способные повреждать биологические молекулы и индуцировать целый ряд негативных эффектов в метаболических процессах организма (Багрянцева, Хотимченко, 2021).

Прежние исследования показали, что при долговременном употреблении воды, содержащей высокие концентрации мышьяка, у коренного населения Анд произошел отбор генетических вариантов, способствовавших детоксикации мышьяка (Schlāwicke Engström et al., 2009; Eichstaedt et al., 2015; Apata et al., 2017; De Loma et al., 2022). Прежде всего этим изменениям подвергся ген мышьяк-метилтрансферазы *AS3MT*, с помощью которой неорганическая форма мышьяка (iAs) переводится в соли монометиларсоновой (ММА) и менее токсичной диметиларсиновой (ДМА) кислот.

Эффективность метилтрансферазы *AS3MT* определяется процентным соотношением %ДМА и %ММА в моче: чем более активен фермент, тем меньше в ней %ММА и больше %ДМА. Исследования жителей деревни SAC (San Antonio de los Cobres) в Северной Аргентине, потребляющих воду с высокой концентрацией мышьяка (примерно 0.2 мг на литр), показали, что, кроме мышьяк-метилтрансферазы, в детоксикации мышьяка задействованы и другие ферменты, например, участвующие в одноуглеродном метаболизме (гены *MTRR*, *CHDH*) и анти-

оксидантной защите (гены *PRDX2*, *GLRX*) (Schlāwicke Engström et al., 2009).

К настоящему времени описан целый ряд мутаций гена *AS3MT*, определяющих различия в ферментативной эффективности различных форм мышьяк-метилтрансферазы. Нами исследовано популяционное распределение частот вариантов полиморфизма в семи локусах гена *AS3MT*, а также в девяти локусах генов *CYP17A1*, *PRDX2*, *DNMT1a*, *INMT*, *MTRR*, *CNNM2*, *WBP1L*, *N6AMT1* (табл. S7). Статистически значимые различия между выборкой коренного населения Северо-Восточной Сибири и других регионов и максимальные значения статистики *PBS* (от 0.217 до 0.083) обнаружены по локусам rs7085104 и rs10786719 гена *AS3MT* и локусам rs743572 и rs17115100 гена *CYP17A1*.

Ранее было показано, что в результате адаптации к повышенному содержанию мышьяка в питьевой воде у аргентинцев и боливийцев получил широкое распространение протяженный протективный гаплотип, аллельные варианты которого ассоциируются с самыми низкими значениями %ММА в моче (De Loma et al., 2022). Один из маркерных вариантов этого гаплотипа – rs7085104-G, частота которого у аргентинцев составляет 72.9 % (Engström et al., 2011). Проведенный нами анализ полиморфизма генов *AS3MT* и *CYP17A1* у коренного населения Сибири также продемонстрировал тесное сцепление между вариантами полиморфизма в локусах rs743572, rs7085104 и rs10786719, разделенных расстоянием в 40.8 тыс. п. н. (см. рисунок).

Самая высокая частота варианта rs7085104-G (65.8 % и, соответственно, гаплотипа GGG для указанных выше локусов выявлена на Северо-Востоке Сибири (табл. 2). Таким образом, полученные результаты показывают, что в популяциях коренного населения Сибири наблюдается увеличение частоты чувствительных к воздействию мышьяка вариантов полиморфизма в генах *AS3MT* и *CYP17A1* в северо-восточном направлении.

Представляется вероятным, что основная причина такого тренда – особенности традиционной диеты коренного населения приморских районов Северо-Восточной Сибири (эскимосов, чукчей, коряков). Предки этих народов длительное время употребляли продукты, добываемые в море: рыбу, моллюсков, водоросли, морских млекопитающих; и в настоящее время диета коренных народов побережий северных морей также ориентирована на потребление даров моря. Между тем известно, что морепродукты содержат довольно высокие концентрации тяжелых металлов, а также мышьяка (Becker, 2000; Гамов и др., 2022).

Мышьяк в таких продуктах находится в основном в менее токсичной органической форме (например, в виде арсенобетаина и арсенохолина), но и в неорганической форме он также содержится в небольшом количестве (например, в печени и почках животных) (Багрянцева, Хотимченко, 2021). Поэтому постоянное употребление морепродуктов в череде поколений могло стать причиной отбора вариантов мышьяк-метилтрансферазы *AS3MT*, позволяющих более эффективно избавляться от iAs. Интересно, что наиболее оптимальными на Северо-Востоке

Северо-Восточная Сибирь (66 %)	rs743572-G	rs7085104-G	rs10786719-G
	100		82.3
		81.9	
Центральная Сибирь (28 %)	rs743572-G	rs7085104-G	rs10786719-G
	50		42.1
		84.4	
Южная Сибирь (37 %)	rs743572-G	rs7085104-G	rs10786719-G
	74.9		75
		89.5	

Неравновесие по сцеплению (r^2) между вариантами полиморфизма локусов rs743572 гена *CYP17A1* и rs7085104 и rs10786719 гена *AS3MT* у коренного населения Сибири.

Таблица 2. Частоты генотипов и аллелей локуса rs7085104 гена *AS3MT* в популяциях коренного населения Сибири и Аргентины

Популяция (N)	Генотипы			Аллели		H_e	P
	GG	GA	AA	G	A		
Аргентина (170)	0.547	0.365	0.088	0.729	0.271	0.396	0.33
Северо-Восточная Сибирь (58)	0.456	0.404	0.14	0.658	0.342	0.45	0.39
Центральная Сибирь (70)	0.071	0.414	0.515	0.279	0.721	0.405	1.0
Южная Сибирь (72)	0.181	0.375	0.444	0.368	0.632	0.468	0.13
Сибирь в целом (200)	0.221	0.397	0.382	0.42	0.58	0.489	0.009

Примечание. N – размер выборки; H_e – ожидаемая гетерозиготность; P – статистическая значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (достоверно при $P < 0.05$). Данные для аргентинской выборки приводятся по работе (Engström et al., 2011).

Сибири, в соответствии с полученными нами результатами, оказались те же варианты генетического полиморфизма, что и у коренного населения Анд, потребляющих длительное время воду с повышенными концентрациями неорганического мышьяка.

Заключение

В настоящей работе проанализирован полиморфизм генетических локусов, связанных с чувствительностью к воздействию токсичных металлов (ртути, свинца, кадмия и мышьяка), у коренного населения Сибири. Статистически значимые различия главным образом обнаружены между популяцией из Северо-Восточной Сибири (эскимосами, чукчами и коряками) и выборками из центральной и южной частей Сибири. Максимальные значения статистики *PBS*, свидетельствующие о вероятном действии отбора на генетические локусы чувствительности к воздействию ртути, выявлены в семи локусах генов *MTHFR* (rs2274976 и rs1801131), *GPX4* (rs713041), *ABCB1* (rs1128503), *AHR* (rs2066853), *TXNRD2* (rs5748469) и *SEPHS2* (rs1133238). К генетическим маркерам воздействия свинца могут быть отнесены локусы rs713041 (*GPX4*), rs7483 (*GSTM3*) и rs2282143 (*SLC22A1*). В отношении распределения кадмия в крови могут быть информативны локусы rs2274976 (*MTHFR*) и rs1056836 (*CYP1B1*).

Необходимо отметить, что в большинстве случаев у коренного населения Сибири наблюдается увеличение

в северо-восточном направлении частоты генетических вариантов, ассоциирующихся с повышенным содержанием ртути, свинца и кадмия. Причем такой тренд согласуется с данными для канадских эскимосов (Parajuli et al., 2018, 2021). Наиболее вероятной причиной этого нам представляется долговременная (в течение нескольких тысячелетий) адаптация коренных жителей побережий Берингова, Чукотского и Охотского морей к специфическим условиям природной среды, главным образом к высокому потреблению морепродуктов – рыбы, мяса и жира морских млекопитающих, моллюсков и водорослей, богатых не только полезными микроэлементами, омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами и селеном, но и токсичными веществами.

Вполне вероятно, что широкое распространение у эскимосов, чукчей и коряков генетических вариантов, связанных с повышенными уровнями тяжелых металлов в крови, обусловлено формированием относительно безвредных комплексов тяжелых металлов с селеном и другими детоксикантами, например глутатионом и тиоредоксином, что снижает биодоступность металлов и минимизирует их вредное воздействие. Однако для выяснения истинных причин необходимы дополнительные молекулярно-генетические и биохимические исследования коренного населения, поскольку имеющихся в литературе данных о механизмах детоксикации тяжелых металлов из окружающей среды у коренного населения Крайнего Севера

и рисках заболеваний, опосредованных их воздействием, пока недостаточно (Ayotte et al., 2011; Ghisari et al., 2013; Parajuli et al., 2018, 2021).

Более изученным представляется вопрос о генетических последствиях адаптации человека к воздействию неорганических форм мышьяка из окружающей среды (González-Martínez et al., 2024). Результаты исследований популяций коренного населения горных районов Аргентины, Чили, Боливии продемонстрировали, что вследствие длительного употребления питьевой воды с повышенным содержанием мышьяка у них произошел отбор вариантов полиморфизма гена *AS3MT*, позволивших более эффективно метилировать мышьяк и выводить его из организма (Schlebusch et al., 2015).

Проведенное нами исследование показало, что в популяциях коренного населения Северо-Востока Сибири также существенно увеличена распространенность вариантов полиморфизма гена *AS3MT*, защищающих от воздействия неорганического мышьяка, хотя сведениями о длительном употреблении коренными жителями побережий Чукотки и Приохотья питьевой воды, загрязненной мышьяком, мы не располагаем. Вероятным источником мышьяка на Северо-Востоке Сибири являются морепродукты, поскольку содержащийся в них мышьяк представлен в обеих формах – органической и неорганической. В связи с этим необходимы дальнейшие молекулярно-генетические и биохимические исследования популяций коренного населения Крайнего Севера, а также микроэлементного состава грунтовых вод и объектов традиционного питания.

Список литературы / References

- Арефьева А.С., Барыгина В.В., Зацепина О.В. Современные представления о влиянии соединений ртути на клеточном и системном уровне (обзор). *Экология человека*. 2010;8:35-41 [Arefieva A.S., Barigina V.V., Zatschina O.V. The present-day ideas about impact of mercuric compounds at cell and system levels (review). *Ekologiya Cheloveka = Human Ecology*. 2010;8:35-41 (in Russian)]
- Багрянцева О.В., Хотимченко С.А. Токсичность неорганических и органических форм мышьяка. *Вопросы питания*. 2021;90(6): 6-17. doi 10.33029/0042-8833-2021-90-6-6-17 [Bagryantseva O.V., Khotimchenko S.A. Risks associated with the consumption of inorganic and organic arsenic. *Voprosy Pitaniya = Problems of Nutrition*. 2021;90(6):6-17. doi 10.33029/0042-8833-2021-90-6-6-17 (in Russian)]
- Гамов М.К., Иванова А.Е., Миронова Е.К., Цыганков В.Ю. Тяжелые металлы и мышьяк в промысловых рыбах Японского, Охотского и Берингова морей: современное состояние (обзор литературы). *Морской биологический журнал*. 2022;7(4):14-30. doi 10.21072/mbj.2022.07.4.02 [Gamov M.K., Ivanova A.E., Mironova E.K., Tsygankov V.Yu. Heavy metals and arsenic in commercial fish of the Sea of Japan, Sea of Okhotsk, and Bering Sea: current status (literature review). *Morskoy Biologicheskii Zhurnal = Marine Biological Journal*. 2022; 7(4):14-30. doi 10.21072/mbj.2022.07.4.02 (in Russian)]
- Трифонов Е.А., Еремина Е.Р., Урнов Ф.Д., Степанов В.А. Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в популяциях Северной Евразии. *Acta Naturae*. 2012;4(1):55-71 [Trifonova E.A., Eremina E.P., Urnov F.D., Stepanov V.A. The genetic diversity and structure of linkage disequilibrium of the *MTHFR*

- gene in populations of Northern Eurasia. *Acta Naturae*. 2012;4(1): 53-69]
- Adlard B., Bonefeld-Jørgensen E.C., Dudarev A.A., Olafsdottir K., Abass K., Ayotte P., Caron-Beaudoin É., ... Ratelle M., Rautio A., Timmerman A., Weihe P., Wennberg M. Levels and trends of metals in human populations living in the Arctic. *Int J Circumpolar Health*. 2024;83(1):2386140. doi 10.1080/22423982.2024.2386140
- Alqahtani M.A., El-Ghiaty M.A., El-Mahrouk S.R., El-Kadi A.O.S. Differential modulatory effects of methylmercury (MeHg) on *Ahr*-regulated genes in extrahepatic tissues of C57BL/6 mice. *Biol Trace Elem Res*. 2024;202(11):5071-5080. doi 10.1007/s12011-023-04050-y
- Apata M., Arriaza B., Llop E., Moraga M. Human adaptation to arsenic in Andean populations of the Atacama Desert. *Am J Phys Anthropol*. 2017;163(1):192-199. doi 10.1002/ajpa.23193
- Ayotte P., Carrier A., Ouellet N., Boiteau V., Abdous B., Sidi E.A., Château-Degat M.L., Dewailly É. Relation between methylmercury exposure and plasma paraoxonase activity in Inuit adults from Nunavik. *Environ Health Perspect*. 2011;119(8):1077-1083. doi 10.1289/ehp.1003296
- Basu N., Abass K., Dietzd R., Krümmel E., Rautio A., Weihe P. The impact of mercury contamination on human health in the Arctic: a state of the science review. *Sci Total Environ*. 2022;831:154793. doi 10.1016/j.scitotenv.2022.154793
- Becker P.R. Concentration of chlorinated hydrocarbons and heavy metals in Alaska Arctic marine mammals. *Mar Pollut Bull*. 2000; 40(10):819-829. doi 10.1016/S0025-326X(00)00076-X
- Cardona A., Pagani L., Antao T., Lawson D.J., Eichstaedt C.A., Yngvadottir B., Shwe M.T., ... Willerslev E., Tyler-Smith C., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Kivisild T. Genome-wide analysis of cold adaptation in indigenous Siberian populations. *PloS One*. 2014;9(5):e98076. doi 10.1371/journal.pone.0098076
- Chen W., Zhang X., Zhang W., Peng C., Zhu W., Chen X. Polymorphisms of *SLCO1B1* rs4149056 and *SLC22A1* rs2282143 are associated with responsiveness to acitretin in psoriasis patients. *Sci Rep*. 2018;8:13182. doi 10.1038/s41598-018-31352-2
- Crespo-Lopez M.E., Barthelemy J.L., Lopes-Araújo A., Santos-Sacramento L., Leal-Nazaré C.G., Soares-Silva I., Macchi B.M., do Nascimento J.L.M., Arrifano G.P., Augusto-Oliveira M. Revisiting genetic influence on mercury exposure and intoxication in humans: a scoping review. *Toxics*. 2023;11(12):967. doi 10.3390/toxics11120967
- De Loma J., Vicente M., Tirado N., Ascui F., Vahter M., Gardon J., Schlebusch C.M., Broberg K. Human adaptation to arsenic in Bolivians living in the Andes. *Chemosphere*. 2022;301:134764. doi 10.1016/j.chemosphere.2022.134764
- Đukić-Čosić D., Baralić K., Javorac D., Buha Djordjević A., Bulat Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. *Curr Opin Toxicol*. 2020;19:56-62. doi 10.1016/j.cotox.2019.12.002
- Eichstaedt C., Antao T., Cardona A., Pagani L., Kivisild T., Mormina M. Positive selection of *AS3MT* to arsenic water in Andean populations. *Mutat Res*. 2015;780:97-102. doi 10.1016/j.mrfmmm.2015.07.007
- Engström K., Vahter M., Mlakar S.J., Concha G., Nermell B., Raqib R., Cardozo A., Broberg K. Polymorphisms in arsenic(+III oxidation state) methyltransferase (*AS3MT*) predict gene expression of *AS3MT* as well as arsenic metabolism. *Environ Health Perspect*. 2011;119: 182-188. doi 10.1289/ehp.1002471
- Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564-567. doi 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fernandez-Llamazares A., Garteizgogea M., Basu N., Brondizio E.S., Cabeza M., Martínez-Alier J., McElwee P., Reyes-García V. A state-of-the-art review of indigenous peoples and environmental pollution. *Integr Environ Assess Manag*. 2020;16(3):324-341. doi 10.1002/ieam.4239
- Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L.P. A candidate genetic risk factor for vascular disease:

- a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10(1):111-113. doi 10.1038/ng0595-111
- Gautrey H., Nicol F., Sneddon A.A., Hall J., Hesketh J. A T/C polymorphism in the *GPX4* 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810(6):584-591. doi 10.1016/j.bbagen.2011.03.016
- Ghisari M., Long M., Bonefeld-Jørgensen E.C. Genetic polymorphisms in *CYP1A1*, *CYP1B1* and *COMT* genes in Greenlandic Inuit and Europeans. *Int J Circumpolar Health.* 2013;72:21113. doi 10.3402/ijch.v72i0.21113
- González-Martínez F., Johnson-Restrepo B., Quiñones L.A. Arsenic inorganic exposure, metabolism, genetic biomarkers and its impact on human health: a mini-review. *Toxicol Lett.* 2024;398:105-117. doi 10.1016/j.toxlet.2024.06.008
- Gonzalez-Villalva A., Marcela R.L., Nelly L.V., Patricia B.N., Guadalupe M.R., Brenda C.T., Maria Eugenia C.V., Martha U.C., Isabel G.P., Fortoul T.I. Lead systemic toxicity: a persistent problem for health. *Toxicology.* 2025;515:154163. doi 10.1016/j.tox.2025.154163
- Jorge A.O.S., Chamorro F., Carpena M., Echave J., Pereira A.G., Oliveira M.B.P.P., Prieto M.A. Protection of selenium against methylmercury in the human body: a comprehensive review of biomolecular interactions. *Biol Life Sci Forum.* 2024;35(1):8. doi 10.3390/blsf2024035008
- Melo S.S., Persuhn D.C., Meirelles M.S., Jordao A.A., Vannucchi H. G1793A polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate gene: effect of folic acid on homocysteine levels. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(8):769-774. doi 10.1002/mnfr.200600020
- Mohammadi-Bardbori A., Vikstrom Bergander L., Rannug U., Rannug A. NADPH oxidase-dependent mechanism explains how arsenic and other oxidants can activate aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(12):2278-2286. doi 10.1021/acs.chemrestox.5b00415
- Parajuli R.P., Goodrich J.M., Chan L.H.M., Ayotte P., Lemire M., Hegele R.A., Basu N. Genetic polymorphisms are associated with exposure biomarkers for metals and persistent organic pollutants among Inuit from the Inuvialuit settlement region, Canada. *Sci Total Environ.* 2018;634:569-578.
- Parajuli R.P., Goodrich J.M., Chan H.M., Lemire M., Ayotte P., Hegele R.A., Basu N. Variation in biomarker levels of metals, persistent organic pollutants, and omega-3 fatty acids in association with genetic polymorphisms among Inuit in Nunavik, Canada. *Environ Res.* 2021;200:111393. doi 10.1016/j.envres.2021.111393
- Perini J.A., Cardoso J.V., Knesse A.O., Pessoa-Silva F.O., Vasconcelos A.C.S., Machado D.E., Basta P.C. Single-nucleotide polymorphisms associated with mercury levels and neurological symptoms: an overview. *Toxics.* 2024;12(3):226. doi 10.3390/toxics12030226
- Qu F., Zheng W. Cadmium exposure: mechanisms and pathways of toxicity and implications for human health. *Toxics.* 2024;12:388. doi 10.3390/toxics12060388
- Sánchez Rodríguez L.H., Medina Pérez O.M., Rondón González F., Rincón Cruz G., Rocha Muñoz L., Flórez-Vargas O. Genetic polymorphisms in multispecific transporters mitigate mercury nephrotoxicity in an artisanal and small-scale gold mining community in Colombia. *Toxicol Sci.* 2020;178(2):338-346. doi 10.1093/toxsci/kfaa142
- Schläwicke Engström K., Nermell B., Concha G., Strömberg U., Vahter M., Broberg K. Arsenic metabolism is influenced by polymorphisms in genes involved in one-carbon metabolism and reduction reactions. *Mutat Res.* 2009;667(1-2):4-14. doi 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.003
- Schlebusch C.M., Gattepaille L.M., Engström K., Vahter M., Jakobsen M., Broberg K. Human adaptation to arsenic-rich environments. *Mol Biol Evol.* 2015;32(6):1544-1555. doi 10.1093/molbev/msv046
- Stajniko A., Palir N., Snoj Tratnik J., Mazej D., Sešek Briški A., Runkel A.A., Horvat M., Falnoga I. Genetic susceptibility to low-level lead exposure in men: insights from ALAD polymorphisms. *Int J Hyg Environ Health.* 2024;256:114315. doi 10.1016/j.ijheh.2023.114315
- Tetlow N., Robinson A., Mantle T., Board P. Polymorphism of human mu class glutathione transferases. *Pharmacogenetics.* 2004;14(6):359-368. doi 10.1097/00008571-200406000-00005
- Wang H., Gan X., Tang Y. Mechanisms of heavy metal cadmium (Cd)-induced malignancy. *Biol Trace Elem Res.* 2025;203(2):608-623. doi 10.1007/s12011-024-04189-2
- Warrington N.M., Zhu G., Dy V., Heath A.C., Madden P.A., Hemani G., Kemp J.P., ... Montgomery G.W., Martin N.G., Davey Smith G., Evans D.M., Whitfield J.B. Genome-wide association study of blood lead shows multiple associations near ALAD. *Hum Mol Genet.* 2015;24(13):3871-3879. doi 10.1093/hmg/ddv112
- Weisberg I.S., Jacques P.F., Selhub J., Bostom A.G., Chen Z., Curtis Ellison R., Eckfeldt J.H., Rozen R. The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis.* 2001;156(2):409-415. doi 10.1016/s0021-9150(00)00671-7
- Yi X., Liang Y., Huerta-Sanchez E., Jin X., Cuo Z.X., Pool J.E., Xu X., ... Li S., Yang H., Nielsen R., Wang J., Wang J. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science.* 2010;329(5987):75-78. doi 10.1126/science.1190371

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.08.2025. После доработки 27.11.2025. Принята к публикации 27.01.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-51

Исследование ассоциации генетических вариантов с развитием музыкальных способностей человека

А.В. Казанцева ^{1, 2} , А.В. Торопова ³, Э.К. Хуснутдинова ¹, С.Б. Малых ^{4, 5}

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

² Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

³ Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

⁴ Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет психологии, Москва, Россия

 Kazantse@mail.ru

Аннотация. Формирование музыкальных способностей, включающих абсолютный слух, музыкальную память, чувство ритма, музыкальность, в значительной степени определяется наследственной составляющей (до 68 %). Проведенные к настоящему времени работы с использованием полногеномного анализа сцепления и ассоциаций с музыкальной одаренностью позволили выявить более 100 генетических локусов. В этот спектр входят гены транскрипционных факторов, регуляции нейrogenеза и синаптической пластичности; гены, закрепленные в ходе позитивной селекции музыкальности, а также связанные с особенностями формирования внутреннего уха. Поскольку ранее в Российской Федерации исследований по изучению связи музыкального таланта с генетической компонентой не проводилось, настоящая работа направлена на репликацию ассоциации ранее идентифицированных 17 однонуклеотидных вариантов (SNP) с формированием музыкальных способностей у русских. Генотипирование полиморфных локусов в генах *GATA2*, *PCDH7*, *UNC5C*, *ASAP1*, *SBSPON*, *DCBLD2*, *KALRN*, *VLDLR*, *OTOF*, *GRIN2B*, *FoxP1*, *FoxP2*, *BDNF*, *EGR1*, *SNCA* проводилось с помощью конкурентной аллель-специфичной ПЦР в выборке студентов, прошедших строгий конкурсный отбор при поступлении в консерватории, и в соответствующей контрольной группе. Метод логистической регрессии применялся как для оценки основного эффекта отдельных полиморфных вариантов, так и для выявления наилучшей прогностической модели, содержащей различные генетические локусы. Математическая модель, полученная в результате включения только ассоциированных SNP, состояла из генетических локусов *GATA2* rs9854612, *SNCA* rs356168 и rs3910105, *ASAP1* rs3057 и *VLDLR* rs1454626 ($p = 0.0018$, псевдо- $r^2 = 0.188$, AUC = 0.791). Добавление всех изученных генетических локусов в качестве предикторов в регрессионный анализ позволило создать статистически значимую модель, обладающую более высокой прогностической способностью ($p = 0.012$, псевдо- $r^2 = 0.380$, AUC = 0.889). Полученные результаты указывают на потенциальный кумулятивный эффект белковых продуктов изученных генов, подтверждая вовлеченность дофаминергической и ГАМКергической нейротрансмиссии, рилинового пути и роль альфа-синуклеина в формировании музыкальности.

Ключевые слова: музыка; логистическая регрессия; математическая модель; когнитивные способности; α -синуклеин; дофамин; толщина извилины Хешля

Для цитирования: Казанцева А.В., Торопова А.В., Хуснутдинова Э.К., Малых С.Б. Исследование ассоциации генетических вариантов с развитием музыкальных способностей человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):470-481. doi 10.18699/vjgb-26-51

The association study of genetic variants with developing musical aptitude in humans

A.V. Kazantseva ^{1, 2} , A.V. Toropova ³, E.K. Khusnutdinova ¹, S.B. Malykh ^{4, 5}

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

² Ufa State Petroleum Technological University, Russia

³ Moscow Pedagogical State University, Moscow, Russia

⁴ Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow, Russia

⁵ M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Psychology, Moscow, Russia

 Kazantse@mail.ru

Abstract. The development of musical abilities, including absolute pitch, musical memory, rhythm sense, and musicality, at a high degree is determined by a hereditary component (up to 68 %). The studies implementing a genome-wide linkage and association approach to musical aptitude have revealed more than 100 genetic loci. This spectrum is comprised of the genes encoding for transcription factors and those responsible for neurogenesis and synaptic plasticity, genes fixed as a result of positive selection of musicality, and those related to inner ear formation. Since no studies

linking musical aptitude with genes have been previously conducted in Russia, the present study aimed at replicating the association of 17 previously identified genetic variants with developing musical abilities in Russians. Genotyping of SNPs in the *GATA2*, *PCDH7*, *UNC5C*, *ASAP1*, *SBSPON*, *DCBLD2*, *KALRN*, *VLDLR*, *OTOF*, *GRIN2B*, *FoxP1*, *FoxP2*, *BDNF*, *EGR1*, and *SNCA* genes was performed using competitive allele-specific PCR in a sample of students who underwent rigorous contest selection at admission to the conservatory and in the corresponding control group. A series of logistic regression analyses were used both to evaluate the main effect of SNP and to identify the best prognostic model based on various loci. The mathematical model obtained by including only statistically significant SNPs consisted of *GATA2* rs9854612, *SNCA* rs356168, rs3910105, *ASAP1* rs3057, and *VLDLR* rs1454626 ($p = 0.0018$, pseudo $r^2 = 0.188$, AUC = 0.791). The addition of all examined SNPs as predictors enabled the construction of a statistically significant model with a higher predictive ability ($p = 0.012$, pseudo $r^2 = 0.380$, AUC = 0.889). The results revealed indicate a potential cumulative gene effect, confirming the involvement of dopaminergic and GABAergic neurotransmission, the reelin pathway and the role of alpha-synuclein in musicality formation.

Key words: music; logistic regression; mathematical model; cognitive abilities; α -synuclein; dopamine; thickness of Heschl's gyrus

For citation: Kazantseva A.V., Toropova A.V., Khusnutdinova E.K., Malykh S.B. The association study of genetic variants with developing musical aptitude in humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3): 470-481. doi 10.18699/vjgb-26-51

Введение

Музыка – неотъемлемая часть когнитивного и социального взаимодействия между людьми, которая использовалась в качестве важной составляющей при передаче информации еще до становления речи. Предполагается, что музыка существовала более 35 000 лет назад, свидетельства чего обнаруживаются в археологических раскопках пещер Германии, Австрии, Франции (Conard et al., 2009). Несмотря на то что в настоящее время эта функция в основном принадлежит вербальной коммуникации, музыкальные способности тесно связаны с когнитивной и психической деятельностью. Музыкальные способности охватывают значительный диапазон различных индивидуально-психологических характеристик личности, включая абсолютный слух, музыкальную память, чувство ритма, музыкальность (Айкина, 2017), и представляют собой количественные показатели, распределение которых в популяции подчиняется закону нормального распределения.

Предполагается, что способность воспринимать и воспроизводить музыку имеет в своей основе наследственную составляющую, что инициировало проведение исследований, направленных на выявление генов, отвечающих за развитие музыкальных способностей (музыкальной одаренности). Результаты, полученные с помощью метода близнецовых исследований как начального этапа изучения роли генов и среды в формировании особенностей поведения и когнитивных способностей (Казанцева, 2008), свидетельствуют о существенном вкладе наследственного компонента: гены определяют до 68 % вариаций в predisposition к музыкальному таланту (Oikkonen et al., 2015).

Одни из первых исследований генетики музыкальных способностей были сфокусированы на анализе значительных по размеру родословных финского происхождения, характеризующихся аккумуляцией музыкальной одаренности в семьях (Pulli et al., 2008). С использованием метода полногеномного анализа сцепления (genome-wide linkage studies, GWLS) этой и другим научным группам удалось идентифицировать хромосомные регионы 3q21.3 (ген *GATA2*), 4p15.1 (ген *PCDH7*), 4q22 (ген *UNC5C*), 8q24.21

(ген *ASAP1*), 8q21.11 (ген *SBSPON*) как сцепленные с особенностями восприятия музыки (Pulli et al., 2008; Oikkonen et al., 2015) и формированием абсолютного слуха (Theusch et al., 2009).

Существующие полногеномные анализы ассоциаций (genome-wide association study, GWAS) идентифицировали генетические локусы, определяющие индивидуальные вариации толщины извилины Гешля – центральной области слуховой коры, ответственной за восприятие звуков речи и музыки, а именно: rs72932726 в гене *DCBLD2* и rs333332 в гене *KALRN* (Cai et al., 2014). С другой стороны, в GWAS были определены локусы, связанные с позитивной эволюционной селекцией музыкальных способностей (Liu et al., 2016). Так, при изучении лиц из финской популяции, демонстрирующих высокую степень музыкальности, выявлен ряд геномных регионов, включающих гены *VLDLR*, *FOXP1*, *OTOF*, *GRIN2B* и др., определенные гаплотипы которых встречались статистически значимо чаще среди музыкально одаренных лиц. Вовлеченность вышеуказанных генов неудивительна, поскольку изменения нуклеотидной последовательности в них ранее связывались с нарушениями речи у человека (Rappold et al., 2023), вокализацией и изменением экспрессии генов у певчих птиц (Adam et al., 2016; So et al., 2019; Heim et al., 2023).

Известно, что в формирование любого количественного признака вносит вклад огромное число отдельных генетических локусов, что диктует проведение исследований в отношении музыкальной одаренности с использованием информации по большому числу генов и их структурных вариантов. В этом ключе наряду с данными GWAS и GWLS интерес представляют результаты функциональных работ, проведенных на модельных объектах и позволивших оценить уровень экспрессии ассоциированных генов. В частности, дифференциальный характер экспрессии таких генов, как *FoxP2*, *BDNF*, *EGR1*, в ряде отделов головного мозга наблюдался при обучении и вокализации певчих птиц, а также при прослушивании музыки модельными мышами (Li et al., 2010; Drnevich et al., 2012; Shi et al., 2013). Кроме того, изменение паттерна экспрессии у людей при прослушивании классической музыки отмечено в

отношении гена альфа-синуклеина (*SNCA*) (Kanduri et al., 2015), мутации в котором связывают с развитием болезни Паркинсона и других синуклеинопатий (Järvelä, 2018).

В рамках настоящего исследования были выбраны полиморфные локусы в генах, связанных с формированием музыкальных способностей, изменения в экспрессии которых наблюдались при прослушивании музыки. Полиморфные локусы были взяты либо непосредственно из GWAS и GWLS исследований, либо, в случае отсутствия информации о связи конкретных SNP с формированием музыкальных характеристик, из работ по вовлеченности генетических локусов в формирование схожих поведенческих характеристик (Crawford et al., 2008; Hu et al., 2011; Koks et al., 2021). Итоговая информация по генам и локализованным в них генетическим вариантам, выбранным в качестве объектов исследования в настоящей работе, приведена в табл. 1.

Это исследование представляет собой продолжение нашей предыдущей работы, оценивающей вероятность развития музыкальной одаренности на основании 10 генетических вариантов (Kazantseva et al., 2023). Таким образом, наша работа направлена на репликацию вовлеченности расширенной панели генетических вариантов в формирование музыкального таланта у русских из Российской Федерации.

Материалы и методы

Для проведения экспериментальной части исследования были отобраны индивиды, характеризующиеся музыкальной одаренностью, которые были студентами консерваторий (г. Москва) и прошли строгий конкурсный отбор при поступлении, продемонстрировали выдающиеся успехи на вступительных экзаменах по таким испытаниям, как сольфеджио, гармония, полифония, чтение партитур и др., в зависимости от выбранной специальности.

Выборка состояла из индивидов русской этнической принадлежности 18–22 лет ($N = 100$, 66 % женщин, средний возраст 19.36 ± 1.44 года). В контрольную группу вошли студенты высших учебных заведений Москвы и Уфы, русские по этнической принадлежности, соответствующие по возрасту и половому составу выборке музыкантов ($N = 200$, 67 % женщин, средний возраст 19.84 ± 1.85 года). Все испытуемые не наблюдались в психоневрологических учреждениях и отрицали семейную отягощенность психическими расстройствами. Добровольное согласие на участие в исследовании получено от всех респондентов. Исследование одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

Сбор биологического материала (слюны объемом 5 мл) производили в пробирки с консервантом в соответствии с протоколом производителя (Oragene DNA, DNA Genotek, Канада). Последующее выделение ДНК было проведено с использованием наборов (PrepIT, DNA Genotek) с проверкой качества выделенной ДНК на спектрофотометре. Генотипирование изученных SNP осуществлялось методом ПЦР в реальном времени по конечной точке на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с применением наборов KASP (LGC Genomics, Великобритания).

Соответствие изучаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому по закону Харди–Вайнберга наблюдалось в контрольной группе, оно показало отклонение для rs13109270 в гене *PCDH7*, в связи с чем данный локус был исключен из анализа. Статистический анализ включал тестирование различных регрессионных моделей изученных генетических локусов: аддитивной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и кодоминантной (PLINK v.1.09).

Использование аддитивной модели демонстрирует – является ли эффект тестируемого аллеля накопительным; доминантной модели – обнаруживается ли эффект этого аллеля при наличии хотя бы одной копии (т. е. в гетерозиготном состоянии и гомозиготе по тестируемому аллелю); рецессивной модели – обнаруживается ли эффект анализируемого аллеля только при наличии его двух копий. Сверхдоминантная модель оценивает ситуацию, когда наибольший эффект наблюдается при наличии обоих аллелей (т. е. гетерозиготного генотипа) по сравнению с двумя референсными или двумя альтернативными аллелями (т. е. гомозиготными генотипами). Кодоминантная модель предполагает, что любой генотип оказывает значимый эффект на формирование признака неаддитивно, т. е. независимо от остальных генотипов (Кутихин и др., 2017).

Множественный логистический регрессионный анализ был использован для тестирования различных моделей (все SNP) и создания итоговой математической модели, включающей статистически значимые предикторы и объясняющей наибольший процент вариации в формировании музыкальных способностей (*R* v.4.4.2). Для оценки качества моделей использован информационный критерий Акаике (AIC), свидетельствующий о лучшем качестве модели при меньшей величине критерия AIC. Визуализация наилучшей модели представлена в виде ROC-кривой (receiver operating characteristic) с указанием количественного показателя AUC (area under curve).

Результаты

На первом этапе при анализе ассоциаций генетических вариантов с музыкальностью по отдельности нами подтверждена вовлеченность полиморфного варианта rs3057 в гене *ASAP1* ($p = 0.032$) в формирование музыкальных способностей на уровне статистической значимости (табл. 2). В частности, увеличение шансов на развитие музыкальных способностей было характерно для носителей гетерозиготного генотипа rs3057*СТ в гене *ASAP1* по сравнению с гомозиготными носителями (генотипы ТТ и СС) ($OR = 1.94$, 95 % CI 1.05–3.56), что свидетельствует о наибольшем эффекте именно гетерозиготного генотипа по этому локусу в формировании музыкального таланта. Другие генетические варианты не были ассоциированы на уровне отдельных локусов с предрасположенностью к развитию музыкального таланта ни в одной из проанализированных моделей – аддитивной, доминантной, рецессивной, «модели отклонения от доминантности».

Поскольку развитие музыкальных способностей, как и другой комплексный признак, является результатом взаимодействия белковых продуктов различных генов, на

Таблица 1. Полиморфные локусы, ассоциированные с развитием музыкальных способностей

№ п/п	Регион	Ген (белок)	SNP	Связанный признак	Функция белка	Литературный источник
Полногеномные анализы сцепления (GWLA)						
1	3q21.3	<i>GATA2</i> (GATA-связывающий белок 2)	rs9854612	Восприятие музыки (способность различать высоту звука, длительность и звуковые паттерны)	Участвует в развитии клеток внутреннего уха	Oikkonen et al., 2015
2	4p15.1	<i>PCDH7</i> (протокадгерин)	rs13146789			
3			rs13109270			
4	8q24.21	<i>ASAP1</i> (ГТФаза-активирующий белок)	rs3057	Абсолютный слух	Регулирует мембранный транспорт и ремоделирование цитоскелета	Theusch et al., 2009
5	8q21.11	<i>SBSPON</i> (белок, содержащий домены соматомедина В и тромбоспондина)	rs1007750		Компонент внеклеточного матрикса	
6	4q22.3	<i>UNC5C</i> (рецептор нетрина)	rs9307160	Музыкальные способности	Участвует в удлинении аксонов и миграции клеток; взаимодействует с рецепторами семейства ROBO, связанными с развитием дислексии	Pulli et al., 2008
Полногеномные анализы ассоциаций (GWAS)						
7	3q12.1	<i>DCBLD2</i> (дискоидин)	rs72932726	Толщина извилины Хешля – центральной области слуховой коры – определяет способность воспринимать звуки	Регулирует рост клеток; связывают с задержкой развития	Cai et al., 2014
8	3q21.1-q21.2	<i>KALRN</i> (киназа калирина)	rs333332		Взаимодействует с белком НТТ, экспансия которого – причина болезни Паркинсона; мутации связывают с изменением морфологии нейронов	
9	9p24.2	<i>VLDLR</i> (рецептор липопротеинов низкой плотности)	rs1454626 ^a	Позитивная эволюционная селекция музыкальных способностей	Является мишенью для белка FoxP2, вовлеченного в формирование пения и речи	Liu et al., 2016; ASD Working group et al., 2017
10	3p13	<i>FOXP1</i> (член семейства транскрипционных факторов Forkhead Box P1)	rs6803008		Связан с нарушениями речи, РАС; с восприятием музыки и пением у певчих птиц	
11	2p23	<i>OTOF</i> (отоферлин)	rs4416176 ^b		Участвует в экзоцитозе клеток внутреннего уха; мутации в гене связывают с потерей слуха	
12	12p13.1	<i>GRIN2B</i> (субъединица рецептора глутамата [NMDA] эписилон-2)	rs3764030		Участвует в регуляции синаптической пластичности и обучения; связан с восприятием музыки и пением у певчих птиц	
Функциональные исследования (оценка уровня экспрессии)						
13	7q31.1	<i>FoxP2</i> (член семейства транскрипционных факторов Forkhead Box P2)	rs2396753	Снижение экспрессии нарушает обучение пению у певчих птиц; мутации в гене приводят к аутосомно-доминантному нарушению речи	Транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию 300–400 генов, высоко экспрессируется в стриатуме, отвечает за развитие отделов мозга, связанных с речью, во время эмбриогенеза	Shi et al., 2013

Окончание табл. 1

№ п/п	Регион	Ген (белок)	SNP	Связанный признак	Функция белка	Литературный источник
14	11p14.1	<i>BDNF</i> (нейротрофический фактор мозга)	rs6265	Повышение экспрессии в префронтальной коре, миндалине и гиппокампе у трансгенных мышей по гену <i>BDNF</i> (Met/Met) при прослушивании музыки	Участвует в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности	Li et al., 2010
15	4q22.1	<i>SNCA</i> (синуклеин альфа)	rs356168	Повышение экспрессии у людей во время прослушивания классической музыки	Регулируется белком GATA2	Kanduri et al., 2015
16			rs3910105 ^c			
17	5q31.2	<i>EGR1</i> (белок раннего ответа)	rs7729723	Повышение экспрессии при прослушивании и пении у певчих птиц	Транскрипционный регулятор FoxP2	Drnevich et al., 2012

Примечание. Выбраны генетические локусы в генах, ранее продемонстрировавшие связь: ^a с уровнем липопротеидов (Crawford et al., 2008); ^b формированием социальных навыков при расстройствах аутистического спектра (РАС) (Hu et al., 2011); ^c дифференциальной экспрессией гена при различных аллельных вариантах (Koks et al., 2021).

следующем этапе была проведена серия множественных регрессионных анализов, в которую на начальной стадии было включено 16 генетических локусов в качестве предикторов (модель 1 (табл. 3), $\chi^2 = 46.24$, $p = 0.012$). В результате исключения статистически незначимых SNP получена модель, содержащая полиморфные варианты *GATA2* rs9854612, *SNCA* rs356168 и rs3910105, *ASAP1* rs3057 и *VLDLR* rs1454626 (модель 2 (см. табл. 3), $\chi^2 = 24.61$, $p = 0.0018$).

Согласно сконструированной итоговой модели наибольшие шансы развития музыкальных способностей будут реализовываться при одновременном наличии генотипов rs9854612*AG в гене *GATA2* ($p = 0.026$), rs356168*TT ($p = 0.007$) и rs3910105*TT ($p = 0.043$) в гене *SNCA*, rs3057*CT в гене *ASAP1* ($p = 0.027$), rs1454626*AA в гене *VLDLR* ($p = 0.027$).

Таким образом, наибольший генетический эффект, связанный с формированием музыкальных способностей, будет реализовываться при наличии гетерозиготного варианта по сравнению с носителями любого из гомозиготных генотипов (rs3057 в гене *ASAP1*, сверхдоминантная модель) или носителями двух копий альтернативного аллеля (rs9854612 в гене *GATA2*, кодоминантная модель).

Результаты логистической регрессии также указывают на потенциальный положительный накопительный эффект аллеля Т (в обоих локусах rs356168 и rs3910105 гена *SNCA*, рецессивная модель, будет наблюдаться только при наличии двух копий этого аллеля) и отрицательный накопительный эффект аллеля С (rs1454626 в гене *VLDLR*, доминантная модель, будет наблюдаться при наличии хотя бы одной копии аллеля) на развитие музыкальности.

Создание ROC-кривых и подсчет площади под кривой (AUC, area under curve) свидетельствуют, что модель 1, включающая все 16 SNP, обладает наибольшей прогностической способностью (AUC = 0.889) (см. рисунок), хотя не все включенные предикторы демонстрируют связь с развитием музыкального таланта на уровне статистической значимости. Несмотря на более низкую предиктивную

способность итоговой модели (модель 2) (AUC = 0.791) (см. рисунок), она характеризуется лучшим показателем качества (AIC = 131.31 для модели 1, AIC = 123.94 для модели 2).

Обсуждение

В рамках данного исследования проведен репликативный анализ ассоциаций полиморфных локусов генов, ранее продемонстрировавших свою связь с формированием музыкальных способностей и восприятием музыки. Включение всех изученных генетических локусов в качестве предикторов в регрессионный анализ позволило создать статистически значимую модель, обладающую высокой прогностической способностью (площадь под ROC-кривой = 0.889). Однако статистически наиболее значимой и характеризующейся лучшим качеством являлась итоговая модель, созданная на основании пяти полиморфных локусов: *GATA2* rs9854612, *SNCA* rs356168 и rs3910105, *ASAP1* rs3057 и *VLDLR* rs1454626 (площадь под ROC-кривой = 0.791).

Генетические локусы, идентифицированные в GWLA

Одними из изученных в настоящей работе генетических локусов являются rs9854612, rs13146789 и rs13109270, локализованные в близлежащих областях к генам *GATA2* и *PCDH7* и продемонстрировавшие сцепление с особенностями восприятия музыки на полногеномном уровне (Oikkonen et al., 2015). Известно, что GATA-связывающий белок 2, кодируемый одноименным геном, участвует в развитии волосковых клеток внутреннего уха, которые важны для тонотопического картирования (Oikkonen et al., 2015). Кроме того, GATA2 участвует в дофаминергической нейротрансмиссии и регулирует экспрессию гена альфа-синуклеина (*SNCA*), повышение транскрипции которого, наряду с высвобождением дофамина, наблюдается в процессе прослушивания музыки (Järvelä, 2018), указывая на вовлеченность системы вознаграждения мозга в этот процесс.

Таблица 2. Частоты встречаемости аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов среди музыкантов и в контрольной группе и результаты анализа ассоциаций

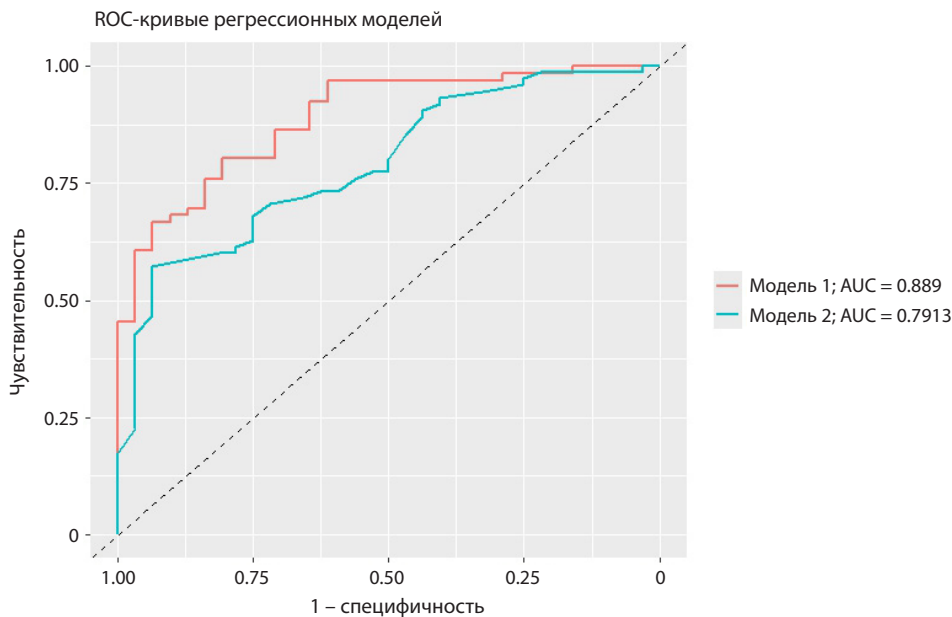
Ген	SNP	Частоты					<i>p</i>	<i>P</i> _{HWE}
		генотипов ^a			аллелей ^b			
<i>OTOF</i>	rs4416176	GG	AG	AA	G	A	0.843	0.977
		0.013	0.253	0.734	0.139	0.861		
		0.010	0.200	0.790	0.110	0.890		
<i>FOXP1</i>	rs6803008	AA	AG	GG	A	G	0.616	0.679
		0.115	0.436	0.449	0.333	0.667		
		0.150	0.510	0.340	0.405	0.595		
<i>DCBLD2</i>	rs72932726	AA	AG	GG	A	G	0.983	0.761
		0.038	0.288	0.674	0.181	0.819		
		0.050	0.317	0.633	0.208	0.792		
<i>KALRN</i>	rs333332	TT	CT	CC	T	C	0.951	0.651
		0.138	0.424	0.438	0.350	0.650		
		0.119	0.416	0.465	0.327	0.673		
<i>GATA2</i>	rs9854612	AA	AG	GG	A	G	0.357	0.631
		0.051	0.449	0.500	0.276	0.724		
		0.057	0.314	0.629	0.214	0.786		
<i>PCDH7</i>	rs13109270	CC	CT	TT	C	T	0.427	< 0.001
		0.324	0.188	0.488	0.419	0.581		
		0.317	0.238	0.445	0.436	0.564		
	rs13146789	TT	TG	GG	T	G	0.816	0.835
		0.202	0.494	0.304	0.449	0.551		
		0.152	0.494	0.354	0.399	0.601		
<i>SNCA</i>	rs356168	CC	CT	TT	C	T	0.897	0.681
		0.175	0.512	0.313	0.431	0.569		
		0.260	0.532	0.208	0.526	0.474		
	rs3910105	CC	CT	TT	C	T	0.110	0.655
		0.291	0.405	0.304	0.494	0.506		
		0.215	0.532	0.253	0.481	0.519		
<i>UNC5C</i>	rs9307160	CC	CT	TT	C	T	0.958	1.000
		0.118	0.448	0.434	0.342	0.658		
		0.079	0.406	0.515	0.282	0.718		
<i>EGR1</i>	rs7729723	GG	AG	AA	G	A	0.441	0.229
		0.227	0.506	0.267	0.480	0.520		
		0.170	0.560	0.270	0.450	0.550		
<i>FoxP2</i>	rs2396753	CC	AC	AA	C	A	0.724	0.410
		0.128	0.487	0.385	0.372	0.628		
		0.152	0.535	0.313	0.419	0.581		
<i>SBSPON</i>	rs1007750	CC	AC	AA	C	A	0.247	0.997
		0.182	0.376	0.442	0.370	0.630		
		0.099	0.426	0.475	0.312	0.688		
<i>ASAP1</i>	rs3057	TT	CT	CC	T	C	0.032	0.842
		0.152	0.645	0.203	0.475	0.525		
		0.228	0.485	0.287	0.470	0.530		
<i>VLDLR</i>	rs1454626	CC	AC	AA	C	A	0.702	0.995
		0.039	0.368	0.593	0.224	0.776		
		0.089	0.426	0.485	0.302	0.698		
<i>BDNF</i>	rs6265	AA	AG	GG	A	G	0.711	0.995
		0.013	0.237	0.750	0.131	0.869		
		0.040	0.313	0.647	0.197	0.803		
<i>GRIN2B</i>	rs3764030	AA	AG	GG	A	G	0.753	0.755
		0.038	0.418	0.544	0.247	0.753		
		0.030	0.343	0.627	0.202	0.798		

Примечание. *P*_{HWE} – уровень значимости при оценке отклонения от равновесия Харди–Вайнберга в контрольной группе; *p* – уровень значимости по данным регрессионного анализа для модели сравнения гетерозиготного генотипа с комбинацией гомозигот (сверхдоминантная модель); указаны частоты генотипов (a) и аллелей (b) для группы музыкантов (верхняя строка) и контрольной группы (нижняя строка) соответственно. Полужирным шрифтом указаны статистически значимые различия.

Таблица 3. Предиктивные модели предрасположенности к развитию музыкальных способностей, выявленные в результате множественного логистического регрессионного анализа

Предиктор	Группа	Референсная группа	Модель 1		Модель 2	
			β	p	β	p
<i>GATA2</i> rs9854612	AG	GG	2.9	0.002	1.2	0.026
<i>SNCA</i> rs356168	TT	CC	3.5	0.004	2.3	0.007
<i>SNCA</i> rs3910105	TT	TC	2.6	0.043	1.5	0.043
<i>ASAP1</i> rs3057	CT	TT+CC	2.2	0.007	1.1	0.027
<i>VLDLR</i> rs1454626	CC+AC	AA	−1.4	0.079	−1.2	0.020
<i>DCBLD2</i> rs72932726	AA+AG	GG	−1.1	0.153	–	–
<i>KALRN</i> rs333332	TT	CC	−1.2	0.238	–	–
<i>FoxP2</i> rs2396753	AC	AA	−1.2	0.149	–	–
<i>PCDH7</i> rs13146789	TG+TT	GG	−0.03	0.970	–	–
<i>UNC5C</i> rs9307160	CT	CC	0.4	0.574	–	–
<i>SBSPO</i> rs1007750	CC	AA	0.9	0.441	–	–
<i>BDNF</i> rs6265	AG	GG	−1.3	0.084	–	–
<i>GRIN2B</i> rs3764030	AG	GG	1.1	0.166	–	–
<i>EGR1</i> rs7729723	AG	AA	0.01	0.983	–	–
<i>FoxP1</i> rs6803008	AG	GG	−1.1	0.110	–	–
<i>OTO</i> rs4416176	AG	AA	1.5	0.158	–	–
Псевдо- r^2			0.380		0.188	
χ^2 модели			46.24		24.61	
AIC			131.31		123.94	
p -value модели			0.012		0.0018	

Примечание. r^2 – процент вариации, объясняющий прогностическую силу модели; β – регрессионный коэффициент; AIC – информационный критерий Акаике. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.



Результаты моделирования ROC-кривых для логистических регрессионных моделей, в которых предикторами выступают различные комбинации изученных генетических локусов (модель 1 включает все 16 локусов, модель 2 – пять наиболее значимых локусов в генах *GATA2*, *SNCA*, *ASAP*, *VLDLR*).

Описание переменных, входящих в модели, подробно приведено в табл. 3. В легенде указаны площади под кривыми (AUC) для каждой модели.

В настоящей работе продемонстрирован положительный эффект одновременного присутствия копий референсного и альтернативного аллелей в локусе rs9854612 гена *GATA2* на повышение шансов развития музыкальных способностей. В свою очередь, протокадгерин регулируют процессы нейрональной миграции, дифференциации и синаптогенеза, участвуют в формировании кохлеарно-ядерного и миндалевидного комплексов (Oikkonen et al., 2015), обуславливая свою роль в развитии музыкальных способностей. Противоположный эффект отмечен при анализе сегрегации делеции кластера генов протокадгерин в геномной области 5q31.1 в больших родословных, что отражалось в снижении способности к музыкальной креативности (Ukkola-Vuoti et al., 2013).

Интересным представляется недавнее открытие о связи уровня гиперметилирования кластера генов, включая *PCDH7*, в плазме беременных женщин с содержанием свинца в крови, предыдущая беременность которых привела к рождению ребенка с РАС (Aung et al., 2022). Согласно анализу геномной онтологии, проведенному М.Т. Аунг с коллегами, концентрация этого токсичного металла связана с такими биологическими процессами, как нейрональное развитие и изменения регуляции иммунной системы, что может приводить к поражению развития нервной системы плода. Поскольку данных о функциональном характере аллельных вариантов изученных локусов в генах *GATA2* и *PCDH7* не опубликовано, невозможно сделать заключение о дифференциальной экспрессии этих генов, сопровождающей развитие музыкального таланта в выборке русских.

При оценке отдельного эффекта генетических локусов мы обнаружили статистически значимое увеличение частоты генотипа rs3057*СТ в гене *ASAP1* у студентов с музыкальными способностями по сравнению с контрольной группой, что позволяет предположить сверхдоминантную модель наследования, характерную для данного локуса, поскольку наибольший положительный эффект наблюдается в случае одновременного наличия референсного и альтернативного аллелей. Изученный полиморфный вариант является регуляторным (Bryzgalov et al., 2013) и ранее был идентифицирован как сцепленный с формированием абсолютного слуха (LOD = 3.46 у европейцев) (Theusch et al., 2009).

Существующие данные указывают на то, что ген *ASAP1* – один из 30 дифференциально экспрессируемых генов в префронтальной коре головного мозга в ответ на лечение синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (de la Peña et al., 2014), таким образом свидетельствуя в пользу его вовлеченности в регуляцию когнитивных процессов. Литературные данные также сообщают о связи других полиморфных вариантов гена *ASAP1* с психоэмоциональными особенностями личности в норме и при патологии, включая развитие шизофрении (Goes et al., 2015), когнитивного дефицита (Mega Vascular Cognitive Impairment and Dementia (MEGAVCID) consortium, 2024), уровня образования (Okbay et al., 2022).

Изученный нами полиморфный локус rs1007750 в гене *SBSPON* ранее был идентифицирован как сцепленный с развитием абсолютного слуха (Theusch et al., 2009) и в то

же время обнаружен в числе дифференциально экспрессирующихся генов в постмортальных образцах передней префронтальной коры головного мозга пациентов с шизофренией (Маусох et al., 2009).

Другим включенным в прогностическую модель музыкального таланта генетическим локусом является rs9307160 в гене рецептора нетрина (*UNC5C*), сцепленный с аккумуляцией музыкального таланта в семьях финского происхождения (Pulli et al., 2008). Рецептор нетрина *UNC5C* экспрессируется в дофаминовых нейронах, участвует в передаче сигнала нетрина при миграции нейронов в процессе развития и аксонального наведения (Treccarichi et al., 2024). Предыдущие работы свидетельствуют о связи некоторых мутаций в гене *UNC5C* с развитием семейной формы болезни Альцгеймера, шизофрении, биполярного и депрессивного расстройства и других психических расстройств (Treccarichi et al., 2024) за счет изменения чувствительности нейронов к апоптозу.

Сохранность когнитивных функций в старческом возрасте связывают как с полиморфными вариантами в гене *UNC5C*, так и с изменениями его метилирования и снижением уровня его экспрессии в дорсолатеральной префронтальной коре, что, предположительно, опосредует изменения в составе пресинаптического терминала (White et al., 2017). Несмотря на то что функциональная значимость полиморфного локуса rs9307160 в отношении регуляции экспрессии гена *UNC5C* неизвестна, представленные выше данные указывают на его потенциальную вовлеченность в формирование как когнитивных, так и поведенческих реакций, опосредованных дофаминергической нейротрансмиссией.

Генетические локусы, идентифицированные в GWAS

Включенные в регрессионную модель генетические локусы в генах *VLDLR*, *FOXPI*, *OTOF* и *GRIN2B* изначально были идентифицированы как связанные с позитивной эволюционной селекцией музыкальных способностей (Liu et al., 2016). Ген *VLDLR* кодирует рецептор липопротеинов низкой плотности, вовлеченный в рилиновый сигнальный каскад, и представляет собой мишень для белка FoxP2. Последний является транскрипционным фактором, играющим важную регуляторную роль в процессах формирования вокализации и речи. В частности, нокаутирование гена *FoxP2* способствует снижению уровня таргетного белка *VLDLR* у модельных животных, в то время как повышение экспрессии гена *VLDLR* обнаружено в специфической области головного мозга певчих птиц при обучении пению и вокализации (Adam et al., 2016), указывая на потенциальное участие рилинового сигнального каскада в когнитивных процессах, связанных с музыкальностью. Кроме того, увеличение экспрессии генов, находящихся под контролем *FoxP2*, наблюдается в периферической крови у людей при прослушивании музыкальных композиций (Kanduri et al., 2015).

Согласно предыдущим исследованиям, выбранный нами полиморфный локус rs1454626 в гене *VLDLR* (аллель С) ассоциирован с высоким уровнем липопротеинов

и индексом массы тела; причем этот эффект усиливался при наличии «рискового» варианта $\epsilon 4$ в гене аполипопротеина E (*APOE*) (Crawford et al., 2008). Полученные нами результаты об ассоциации аллеля rs1454626*С с более низкой вероятностью формирования музыкальных способностей укладываются в представления о связи когнитивного функционирования с соотношением липопротеинов низкой и высокой плотности (Poliakova, Wellington, 2023) и свидетельствуют в пользу доминантной модели наследования отрицательного эффекта аллеля С на развитие музыкальности.

Изученные в рамках настоящей работы гены транскрипционных факторов *FoxP1* (rs6803008) и *FoxP2* (rs2396753) регулируют экспрессию большого количества генов, включая ген рилинового пути (*VLDLR*). *De novo* мутации в гене *FoxP1* лежат в основе этиологии так называемого FoxP1 синдрома – аутосомно-доминантного заболевания, характеризующего нарушениями когнитивной и речевой сфер, коммуникации и поведения, включая PAC, СДВГ, тревожные расстройства, и ороторными дисфункциями (Rappold et al., 2023). Кроме того, белок FoxP1 опосредует вокальные предпочтения и мотивацию к активному запросу на прослушивание вокализации у самок зебровых амадин (Heim et al., 2023), что может указывать на потенциальную роль данного транскрипционного фактора в формировании музыкальности у человека.

Еще одно важное звено процессов когнитивного функционирования и синаптической пластичности – глутаматергическая система, существенным компонентом которой является изученный в рамках настоящего исследования ген *GRIN2B*, кодирующий субъединицу рецептора глутамата. Повышение мРНК этого гена зафиксировано при пении у певчих птиц (в частности, зебровой амадины) (So et al., 2019). Согласно опубликованным данным, проанализированный аллельный вариант rs3764030*А в гене *GRIN2B* также был ассоциирован с улучшением скорости обработки информации вследствие увеличенного уровня экспрессии данного гена (Jiang et al., 2017). По нашим результатам, аллель rs3764030*А при включении в регрессионную модель связан с положительным прогностическим эффектом в отношении развития музыкальных способностей, что подтверждается вышеотмеченными результатами.

Ген отоферлина также был идентифицирован как имеющий селективное преимущество для эволюционного закрепления музыкальных способностей (Liu et al., 2016). Данный ген кодирует трансмембранный белок, участвующий в экзоцитозе внутренних волосковых клеток, указывая на его потенциальную вовлеченность в формирование музыкальности. Поскольку ранее не сообщалось об ассоциации конкретного полиморфного варианта в гене *OTOF* с музыкальными характеристиками, для анализа нами был выбран локус rs4416176, аллельные варианты которого ранее продемонстрировали связь с социализацией у пациентов с PAC (Hu et al., 2011).

Роль гена *OTOF* неоднократно изучалась в контексте его связи с нарушениями слуха, а применение генной терапии в отношении этого гена у больных детей с врожденной

глухотой демонстрировало выраженный положительный эффект на восстановление слуха, улучшение слуховых и речевых способностей и восприятие музыки даже по сравнению с пациентами с кохлеарной имплантацией (Cheng et al., 2025).

Генетические локусы в генах *DCBLD2* (rs72932726) и *KALRN* (rs333332) были выбраны по результатам GWAS как ассоциированные с толщиной извилины Гешля (Cai et al., 2014) – области слуховой коры, участвующей в восприятии звуков и речи, лингвистического тона и регулирующей развитие внутреннего уха. Важно отметить, что для музыкантов характерно увеличение объема серого вещества в правом и левом отделах слуховой коры, в то время как увеличение правой извилины Хешля наблюдается у музыкантов с абсолютным слухом (Wengenroth et al., 2014). Полиморфный локус rs72932726 в гене *DCBLD2*, входящий в итоговую регрессионную модель в нашем исследовании, связан также со структурными изменениями в отделах головного мозга, участвующих в обработке речи и языка (Cai et al., 2014).

Другим изученным геном является *KALRN*, кодирующий киназу калирина, представляющую собой синаптический регулятор, участвующий в морфогенезе дендритов, росте аксонов, коннективности мозга (Parnell et al., 2021). Сообщается о нарушениях регуляции гена *KALRN* при когнитивном дефиците, шизофрении, PAC (Parnell et al., 2021), а аллельный вариант rs333332 в гене *KALRN* демонстрирует ассоциацию с толщиной левой извилины Хешля (Cai et al., 2014).

Полиморфные варианты

в дифференциально экспрессирующихся генах

В итоговую регрессионную модель предрасположенности к музыкальности также были выключены варианты генов, ранее демонстрирующих функциональные изменения на уровне генной экспрессии. В частности, снижение экспрессии гена транскрипционного фактора *FoxP2*, играющего важную роль в процессах дифференцировки нейронов, развитии мозга и речи, наблюдалось при нарушении вокализации певчих птиц (Shi et al., 2013), а структурные изменения в этом гене связывают с клинической симптоматикой при шизофрении (Salmón-Gómez et al., 2025) и восприятием речи (Ocklenburg et al., 2013). При этом аллель rs2396753*С, по данным недавнего систематического обзора (Salmón-Gómez et al., 2025), ассоциирован со снижением плотности серого вещества в мозге и встречается статистически значимо чаще у лиц с вербальными галлюцинациями при шизофрении. В то же время наши данные указывают на ассоциацию аллеля rs2396753*С с отсутствием музыкального таланта.

Транскрипционным регулятором гена *FoxP2* является белок раннего ответа EGR1, участвующий в нейрональной пластичности, действие которого опосредовано дифференциальной экспрессией микроРНК miR-23a, b (Nair et al., 2021). Большое число работ отмечает вовлеченность белка EGR1 в формирование памяти и обучения, а его экспрессия в различных отделах головного мозга демон-

стрирует стресс-индуцибельный характер, сопровождая развитие таких психических заболеваний, как шизофрения, депрессивное расстройство и болезнь Альцгеймера (Gallo et al., 2018).

Одним из наиболее часто изучаемых генов, участвующих в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности, в контексте индивидуальных когнитивных способностей и нарушений, является ген нейротрофического фактора головного мозга (*BDNF*), увеличение экспрессии которого – результат прослушивания музыки (Li et al., 2010). По данным нашей модели 1, генотип A/G (Met/Val) полиморфного варианта rs6265 (Val66Met) характеризуется меньшими шансами к проявлению музыкального таланта, по сравнению с генотипом G/G (Val/Val). Большой пласт исследований свидетельствует о том, что аллельный вариант rs6265*Met (кодируется аллелем A) связан с пониженной экспрессией гена, уменьшением количества серого вещества в отделах мозга, отвечающих за память, самоконтроль и эмоциональную сферу (Kunikullaya et al., 2025).

Ранее также был показан положительный эффект музыкального воспроизведения на увеличение уровня *BDNF*, приводя к снижению депрессивной симптоматики (Yeh et al., 2015). Предполагается, что такого рода зависимость может быть обусловлена вовлеченностью локуса rs6265 в регуляцию нейропластичности в слуховой коре головного мозга. При изучении негативности рассогласования (*mismatch negativity*, MMN) как величины, отражающей процесс автоматической детекции ошибок слуховой корой и процессы предвнимания, при выполнении электроэнцефалографии обнаружено, что наиболее значимые изменения в MMN пиках характерны для музыкантов – носителей генотипа Val/Val, по сравнению с музыкантами, имеющими аллель Met (Bonetti et al., 2023).

В свою очередь, воспроизведение музыки затрагивает на молекулярном уровне изменения в экспрессии гена альфа-синуклеина (*SNCA*) (Kanduri et al., 2015). Кодированный белок вовлечен в регуляцию биосинтеза дофамина посредством изменения его обратного захвата из синапса белком-переносчиком, а также демонстрирует связь с этиопатогенезом болезни Паркинсона (БП). На уровне SNP существующие данные указывают на ассоциацию генотипа CC локуса rs356168 в гене *SNCA* с риском развития БП и увеличением уровня альфа-синуклеина во фракции CD45+ клеток периферической крови пациентов (Emelyanov et al., 2018). Предполагается, что локус rs356168 участвует в регуляции соотношения количества длинных (на основе 3'-региона) и коротких транскриптов альфа-синуклеина, определяя таким образом его способность к олигомеризации и манифестации БП (Rhinn et al., 2012).

В нашей работе продемонстрирована вовлеченность альтернативного генотипа rs356168*T/T и генотипа rs3910105*T/T в развитие музыкального таланта в рамках рецессивной модели наследования, предполагающей, что наличие именно двух копий аллеля Т будет оказывать благоприятный эффект. Полученные данные являются неслучайными, поскольку согласуются с выводами, опубликованными в недавнем систематическом обзоре (Navarro

et al., 2023), указывающем на связь дофаминергической нейротрансмиссии, уровня альфа-синуклеина, положительного эффекта от прослушивания и воспроизведения музыки (Kanduri et al., 2015; Järvelä, 2018) на клиническую симптоматику при нейродегенеративных заболеваниях.

Кроме того, полученные нами свидетельства о важном кумулятивном эффекте изученных генов согласуются с данными метаанализа U.K. Kunikullaya с коллегами (2025), подтвердившими роль нейротрофического фактора головного мозга, альфа-синуклеина и GATA2 белка в изменении нейрогенеза и нейромедиации вследствие прослушивания и воспроизведения музыкальных произведений. Последнее инициирует увеличение уровня нейротрофинов, нейротропекторов, регуляторов синаптической пластичности, улучшает иммунные функции и снижает стресс.

Проведенное нами исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, проанализированная выборка является небольшой по размеру, тем не менее она гомогенна по возрастному и этническому составу, уровню музыкального образования. Во-вторых, количество изученных генетических вариантов ограничено и диктует необходимость его расширения. Кроме того, некоторые генетические локусы взяты на основе литературных данных об их ассоциации со схожими фенотипами без информации об их функциональной значимости. В-третьих, несмотря на многофакторный характер манифестации музыкальных способностей, мы не имели данных для проведения тематического моделирования с учетом потенциальных средовых предикторов, таких как качественная и количественная специфика музыкального образования в детстве, наличие музыкального окружения, социально-экономический статус и др. В-четвертых, необходимо учесть пилотный характер настоящей работы и недостаточную статистическую мощность при анализе предиктивной модели, включающей 16 SNP, что может также отражаться в наличии ошибок I и II рода.

Дальнейшие исследования в этой области следует сфокусировать на расширении панели изучаемых генетических локусов в отношении музыкальных способностей и оценке их функциональной значимости в контексте регуляции экспрессии генов.

Заключение

В рамках проведения репликативного анализа ассоциации ряда генетических локусов, идентифицированных ранее на выборках европейского происхождения, создана прогностическая модель, включающая пять однонуклеотидных вариантов, на достаточном уровне чувствительности и специфичности оценивающая предрасположенность к развитию музыкальности у русских по этнической принадлежности.

Несмотря на то что изначально полиморфные локусы нами были выбраны на основании данных различных методических подходов (GWAS, GWLS, дифференциальная экспрессия), изученные гены зачастую являются пересекющимися, а кодируемые ими белковые продукты включены в одинаковые молекулярные пути. Кроме того, значительная часть из проанализированных генов кодиру-

ет транскрипционные факторы, таким образом указывая на потенциальную вовлеченность различных молекулярных путей, регулируемых данными факторами, в формирование музыкальности.

Полученные нами результаты опосредованно свидетельствуют о взаимодействии анализируемых генов, подтверждая, что формирование музыкальных способностей связано с особенностями дофаминергической и ГАМКергической нейротрансмиссии, регуляцией синаптической пластичности, нейрогенеза и рилинового сигнального каскада. Причем отмечается общность молекулярно-генетических факторов, участвующих в этиопатогенезе шизофрении, когнитивных нарушений, РАС, аффективных расстройств и развитии музыкальной одаренности.

Список литературы / References

- Айкина Л.П. К вопросу о развитии музыкальных способностей школьников. *Мир науки, культуры, образования*. 2017;3(64): 221-223
[Aikina L.P. On the development of children's musical abilities. *Mir Nauki, Kul'tury, Obrazovaniya* = *World Sci Cult Educ*. 2017;3(64): 221-223 (in Russian)]
- Казанцева А.В. Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности: Автореф. дис... канд. биол. наук. Уфа, 2008
[Kazantseva A.V. Molecular grounds of temperament and personal features: Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. Ufa, 2008 (in Russian)]
- Кутихин А.Г., Южалин А.Е., Понасенко А.В. Современные тенденции статистической обработки данных и представления результатов в кандидатных генетико-эпидемиологических исследованиях. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2017;2(2): 77-82. doi 10.23946/2500-0764-2017-2-2-77-82
[Kutikhin A.G., Yuzhalin A.E., Ponasenko A.V. How to analyze and present genetic epidemiology data in candidate studies. *Fundamental'naya i Klinicheskaya Meditsina* = *Fundamental and Clinical Medicine*. 2017;2(2):77-82. doi 10.23946/2500-0764-2017-2-2-77-82 (in Russian)]
- Adam I., Mendoza E., Kobalz U., Wohlgemuth S., Scharff C. FoxP2 directly regulates the reelin receptor *VLDLR* developmentally and by singing. *Mol Cell Neurosci*. 2016;74:96-105. doi 10.1016/j.mcn.2016.04.002
- Aung M.T., Bakulski K.M., Feinberg J.I., F. Dou J., D. Meeker J., Mukherjee B., Loch-Carus R., Ladd-Acosta C., Volk H.E., Croen L.A., Hertz-Picciotto I., Newschaffer C.J., Fallin M.D. Maternal blood metal concentrations and whole blood DNA methylation during pregnancy in the Early Autism Risk Longitudinal Investigation (EARLI). *Epigenetics*. 2022;17(3):253-268. doi 10.1080/15592294.2021.1897059
- Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Mol Autism*. 2017;8:21. doi 10.1186/s13229-017-0137-9
- Bonetti L., Bruzzone S.E.P., Paunio T., Kantojärvi K., Kliuchko M., Vuust P., Palva S., Brattico E. Moderate associations between *BDNF* Val66Met gene polymorphism, musical expertise, and mismatch negativity. *Heliyon*. 2023;9(5):e15600. doi 10.1016/j.heliyon.2023.e15600
- Bryzgalov L.O., Antontseva E.V., Matveeva M.Y., Shilov A.G., Kashina E.V., Mordvinov V.A., Merkulova T.I. Detection of regulatory SNPs in human genome using ChIP-seq ENCODE data. *PLoS One*. 2013;8(10):e78833. doi 10.1371/journal.pone.0078833
- Cai D.C., Fonteijn H., Guadalupe T., Zwiers M., Wittfeld K., Teumer A., Hoogman M., ... Homuth G., Fisher S.E., Grabe H.J., Francks C., Hagoort P. A genome-wide search for quantitative trait loci affecting the cortical surface area and thickness of Heschl's gyrus. *Genes Brain Behav*. 2014;13(7):675-685. doi 10.1111/gbb.12157
- Cheng X., Zhong J., Zhang J., Cui C., Jiang L., Liu Y.W., Chen Y., ... Wang W., Chen B., Chen Z.Y., Li H., Shu Y. Gene therapy vs cochlear implantation in restoring hearing function and speech perception for individuals with congenital deafness. *JAMA Neurol*. 2025;82(9): 941-951. doi 10.1001/jamaneurol.2025.2053
- Conard N.J., Malina M., Münzel S.C. New flutes document the earliest musical tradition in southwestern Germany. *Nature*. 2009; 460(7256):737-740. doi 10.1038/nature08169
- Crawford D.C., Nord A.S., Badzioch M.D., Ranchalis J., McKinstry L.A., Ahearn M., Bertucci C., ... Schellenberg G.D., Nickerson D.A., Heagerty P.J., Wijsman E.M., Jarvik G.P. A common *VLDLR* polymorphism interacts with *APOE* genotype in the prediction of carotid artery disease risk. *J Lipid Res*. 2008;49(3):588-596. doi 10.1194/jlr.M700409-JLR200
- dela Peña I., Kim H.J., Sohn A., Kim B.N., Han D.H., Ryu J.H., Shin C.Y., Noh M., Cheong J.H. Prefrontal cortical and striatal transcriptional responses to the reinforcing effect of repeated methylphenidate treatment in the spontaneously hypertensive rat, animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Behav Brain Funct*. 2014;10:17. doi 10.1186/1744-9081-10-17
- Drnevich J., Replogle K.L., Lovell P., Hahn T.P., Johnson F., Mast T.G., Nordeen E., ... Ball G.F., Brenowitz E.A., Wade J., Mello C.V., Clayton D.F. Impact of experience-dependent and -independent factors on gene expression in songbird brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(Suppl. 2):17245-17252. doi 10.1073/pnas.1200655109
- Emelyanov A., Kulabukhova D., Garaeva L., Senkevich K., Verbitskaya E., Nikolaev M., Andoskin P., ... Timofeeva A., Prakhova L., Ilves A., Vlasova I., Pchelina S. SNCA variants and alpha-synuclein level in CD45+ blood cells in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2018;395:135-140. doi 10.1016/j.jns.2018.10.002
- Gallo F.T., Kathe C., Morici J.F., Medina J.H., Weisstaub N.V. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on *c-fos*, *Egr1* and *arc*. *Front Behav Neurosci*. 2018;12:79. doi 10.3389/fnbeh.2018.00079
- Goes F.S., McGrath J., Avramopoulos D., Wolyniec P., Pirooznia M., Ruczinski I., Nestadt G., ... Lencz T., Darvasi A., Mülle J.G., Warren S.T., Pulver A.E. Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015;168(8):649-659. doi 10.1002/ajmg.b.32349
- Heim F., Fisher S.E., Scharff C., Ten Cate K., Riebel K. Effects of cortical FoxP1 knockdowns on learned song preference in female zebra finches. *eNeuro*. 2023;10(3):ENEURO.0328-22.2023. doi 10.1523/ENEURO.0328-22.2023
- Hu W.W., Addington A., Hyman A. Novel autism subtype-dependent genetic variants are revealed by quantitative trait and subphenotype association analyses of published GWAS data. *PLoS One*. 2011;6(4): e19067. doi 10.1371/journal.pone.0019067
- Järvelä I. Genomics studies on musical aptitude, music perception, and practice. *Ann NY Acad Sci*. 2018. doi 10.1111/nyas.13620
- Jiang Y., Lin M.K., Jicha G.A., Ding X., McIlwraith S.L., Fardo D.W., Broster L.S., Schmitt F.A., Kryscio R., Lipsky R.H. Functional human *GRIN2B* promoter polymorphism and variation of mental processing speed in older adults. *Aging*. 2017;9(4):1293-1306. doi 10.18632/aging.101228
- Kanduri C., Kuusi T., Ahvenainen M., Philips A.K., Lähdesmäki H., Järvelä I. The effect of music performance on the transcriptome of professional musicians. *Sci Rep*. 2015;5:9506. doi 10.1038/srep09506
- Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Toropova A.V., Zakharov I.M., Ismatullina V.I., Khusnutdinova E.K., Malykh S.B. A replication study of genetic variants associated with high-level musical aptitude. *Res Results Biomed*. 2023;9(2):181-190. doi 10.18413/2658-6533-2023-9-2-0-3
- Koks S., Pfaff A.L., Bubbs V.J., Quinn J.P. Transcript variants of genes involved in neurodegeneration are differentially regulated by the

- APOE and MAPT haplotypes. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):423. doi 10.3390/genes12030423
- Kunikullaya U.K., Pranjić M., Rigby A., Pallás-Ferrer I., Anand H., Kunnavil R., Jaschke A.C. The molecular basis of music-induced neuroplasticity in humans: a systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2025;175:106219. doi 10.1016/j.neubiorev.2025.106219
- Li W.J., Yu H., Yang J.M., Gao J., Jiang H., Feng M., Zhao Y.X., Chen Z.Y. Anxiolytic effect of music exposure on BDNF^{Met/Met} transgenic mice. *Brain Res*. 2010;1347:71-79. doi 10.1016/j.brainres.2010.05.080
- Liu X., Kanduri C., Oikkonen J., Karma K., Raijas P., Ukkola-Vuoti L., Teo Y.Y., Järvelä I. Detecting signatures of positive selection associated with musical aptitude in the human genome. *Sci Rep*. 2016; 6:21198. doi 10.1038/srep21198
- Maycox P.R., Kelly F., Taylor A., Bates S., Reid J., Logendra R., Barnes M.R., ... Akbar M.T., Hirsch S., Mortimer A.M., Barnes T.R., de Belleroche J. Analysis of gene expression in two large schizophrenia cohorts identifies multiple changes associated with nerve terminal function. *Mol Psychiatry*. 2009;14(12):1083-1094. doi 10.1038/mp.2009.18
- Mega Vascular Cognitive Impairment and Dementia (MEGAVID) consortium. A genome-wide association meta-analysis of all-cause and vascular dementia. *Alzheimers Dement*. 2024; 20(9):5973-5995. doi 10.1002/alz.14115
- Nair P.S., Raijas P., Ahvenainen M., Philips A.K., Ukkola-Vuoti L., Järvelä I. Music-listening regulates human microRNA expression. *Epigenetics*. 2021;16(5):554-566. doi 10.1080/15592294.2020.1809853
- Navarro L., Gómez-Carballa A., Pischedda S., Montoto-Louzao J., Viz-Lasheras S., Camino-Mera A., Hinault T., Martínón-Torres F., Salas A. Sensogenomics of music and Alzheimer's disease: an interdisciplinary view from neuroscience, transcriptomics, and epigenomics. *Front Aging Neurosci*. 2023;15:1063536. doi 10.3389/fnagi.2023.1063536
- Ocklenburg S., Arning L., Gerding W.M., Epplen J.T., Güntürkün O., Beste C. *FOXP2* variation modulates functional hemispheric asymmetries for speech perception. *Brain Lang*. 2013;126(3):279-284. doi 10.1016/j.bandl.2013.07.001
- Oikkonen J., Huang Y., Onkamo P., Ukkola-Vuoti L., Raijas P., Karma K., Vieland V.J., Järvelä I. A genome-wide linkage and association study of musical aptitude identifies loci containing genes related to inner ear development and neurocognitive functions. *Mol Psychiatry*. 2015;20(2):275-282. doi 10.1038/mp.2014.8
- Okbay A., Wu Y., Wang N., Jayashankar H., Bennett M., Nehzati S.M., Sidorenko J., ... Turley P., Visscher P.M., Beauchamp J.P., Benjamin D.J., Young A.I. Polygenic prediction of educational attainment within and between families from genome-wide association analyses in 3 million individuals. *Nat Genet*. 2022;54(4):437-449. doi 10.1038/s41588-022-01016-z
- Parnell E., Shapiro L.P., Voorn R.A., Forrest M.P., Jalloul H.A., Loizozo D.D., Penzes P. KALRN: a central regulator of synaptic function and synaptopathies. *Gene*. 2021;768:145306. doi 10.1016/j.gene.2020.145306
- Poliakova T., Wellington C.L. Roles of peripheral lipoproteins and cholesterol ester transfer protein in the vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Mol Neurodegener*. 2023;18(1):86. doi 10.1186/s13024-023-00671-y
- Pulli K., Karma K., Norio R., Sistonen P., Göring H.H., Järvelä I. Genome-wide linkage scan for loci of musical aptitude in Finnish families: evidence for a major locus at 4q22. *J Med Genet*. 2008;45(7): 451-456. doi 10.1136/jmg.2007.056366
- Rappold G., Siper P., Kostic A., Braden R., Morgan A., Koene S., Kollevzon A. *FOXP1* syndrome. In: GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, 2023
- Rhinn H., Qiang L., Yamashita T., Rhee D., Zolin A., Vanti W., Abelliovich A. Alternative α -synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology. *Nat Commun*. 2012; 3:1084. doi 10.1038/ncomms2032
- Salmón-Gómez G., Suárez-Pinilla P., Setién-Suero E., Martínez-Asensi C., Ayesa-Arriola R. *FoxP2* and Schizophrenia: a systematic review. *J Psychiatr Res*. 2025;190:205-215. doi 10.1016/j.jpsychires.2025.07.016
- Shi Z., Luo G., Fu L., Fang Z., Wang X., Li X. miR-9 and miR-140-5p target *FoxP2* and are regulated as a function of the social context of singing behavior in zebra finches. *J Neurosci*. 2013;33(42):16510-16521. doi 10.1523/JNEUROSCI.0838-13.2013
- So L.Y., Munger S.J., Miller J.E. Social context-dependent singing alters molecular markers of dopaminergic and glutamatergic signaling in finch basal ganglia Area X. *Behav Brain Res*. 2019;360:103-112. doi 10.1016/j.bbr.2018.12.004
- Theusch E., Basu A., Gitschier J. Genome-wide study of families with absolute pitch reveals linkage to 8q24.21 and locus heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 2009;85(1):112-119. doi 10.1016/j.ajhg.2009.06.010
- Treccarichi S., Failla P., Vinci M., Musumeci A., Gloria A., Vasta A., Calabrese G., Papa C., Federico C., Saccone S., Cali F. *UNC5C*: novel gene associated with psychiatric disorders impacts dysregulation of axon guidance pathways. *Genes*. 2024;15(3):306. doi 10.3390/genes15030306
- Ukkola-Vuoti L., Kanduri C., Oikkonen J., Buck G., Blancher C., Raijas P., Karma K., Lähdesmäki H., Järvelä I. Genome-wide copy number variation analysis in extended families and unrelated individuals characterized for musical aptitude and creativity in music. *PLoS One*. 2013;8(2):e56356. doi 10.1371/journal.pone.0056356
- Wengenroth M., Blatow M., Heinecke A., Reinhardt J., Stippich C., Hofmann E., Schneider P. Increased volume and function of right auditory cortex as a marker for absolute pitch. *Cereb Cortex*. 2014; 24(5):1127-1137. doi 10.1093/cercor/bhs391
- White C.C., Yang H.S., Yu L., Chibnik L.B., Dawe R.J., Yang J., Klein H.U., ... Honer W.G., Sperling R.A., Schneider J.A., Bennett D.A., De Jager P.L. Identification of genes associated with dissociation of cognitive performance and neuropathological burden: multistep analysis of genetic, epigenetic, and transcriptional data. *PLoS Med*. 2017;14(4):e1002287. doi 10.1371/journal.pmed.1002287
- Yeh S.H., Lin L.W., Chuang Y.K., Liu C.L., Tsai L.J., Tsuei F.S., Lee M.T., Hsiao C.Y., Yang K.D. Effects of music aerobic exercise on depression and brain-derived neurotrophic factor levels in community dwelling women. *Biomed Res Int*. 2015;2015:135893. doi 10.1155/2015/135893

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.09.2025. После доработки 06.02.2026. Принята к публикации 25.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-52

Diagnostic efficiency of whole exome sequencing in the search for genetic causes of hereditary diseases in Yugra (West Siberia, Russia)

M.Yu. Donnikov ¹, P.A. Suchko ^{2, 3}, A.V. Morozkina ¹, L.N. Kolbasin ^{1, 4}, E.A. Popova ^{1, 4}, S.I. Papanov ^{1, 4}, Yu.S. Koshevaya ⁵, L.G. Danilov ³, Yu.A. Eismont ⁶, O.S. Glotov ^{2, 6}, L.V. Kovalenko ¹

¹ Medical Institute of Surgut State University, KHAMO-Yugra, Surgut, Russia

² Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

⁴ KHAMO-Yugra Surgut Regional Clinical Center for Maternity and Childhood Protection, Medical Genetic Counseling Service, Surgut, KHAMO-Yugra, Russia

⁵ Saint-Petersburg State Medical Diagnostic Center (Genetic Medical Center), St. Petersburg, Russia

⁶ Federal Scientific and Clinical Center of Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russia

 donnikov@gmail.com

Abstract. Whole-exome sequencing (WES) has revolutionized the diagnostics of hereditary diseases, yet its efficacy varies across populations. Data on the genetic architecture of rare hereditary disorders in many Russian regions, including the ethnically diverse Khanty-Mansi Autonomous Okrug (Yugra) are scarce. The aim of this study was to evaluate the diagnostic yield of WES for identifying genetic variants associated with hereditary disorders in this ethnically heterogeneous population. The study involved 286 probands with suspected hereditary disorders observed by regional geneticists in the years 2021–2024. WES was performed on the DNBSEQ-G50 platform (MGI, China). Bioinformatic analysis included variant calling and annotation using population databases and pathogenicity prediction tools. Identified variants were classified according to ACMG/Russian Medical Genetics Society guidelines and correlated with clinical phenotypes. Molecular genetic diagnoses were categorized as definitive, partial, potential (based on variants of unknown significance), or unknown. The examined cohort was predominantly pediatric, the most common clinical indications were neurological, dysmorphic, and metabolic disorders. Definitive molecular diagnoses were established in 24.8 % of patients. Inclusion of potential diagnoses increased the total yield to 48.6 %. Diagnostic efficacy varied significantly among disease categories ranging from 58.3 % for renal disorders to 0 % for neurodevelopmental disorders. A total of 420 unique variants were analyzed, and missense changes were the most frequent among clinically significant findings. The most commonly implicated genes were *ATP7B*, *GJB2*, *ABCA4*, and *GALT*. The study results indicate that WES is an effective first-tier molecular tool for a wide range of suspected hereditary diseases in the Yugra population, with a diagnostic yield comparable to similar studies abroad. The findings support the utility of WES in diverse populations and highlight the potential for increasing yield through trio-WES and periodic data reanalysis.

Key words: whole exome sequencing; hereditary diseases; new generation sequencing; genetic counseling; diagnostic effectiveness; molecular genetic diagnosis

For citation: Donnikov M.Yu., Suchko P.A., Morozkina A.V., Kolbasin L.N., Popova E.A., Papanov S.I., Koshevaya Yu.S., Danilov L.G., Eismont Yu.A., Glotov O.S., Kovalenko L.V. Diagnostic efficiency of whole exome sequencing in the search for genetic causes of hereditary diseases in Yugra (West Siberia, Russia). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):482-489. doi 10.18699/vjgb-26-52

Funding. The study was supported by the Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra, project 2023-574-05.

Диагностическая эффективность полноэкзомного секвенирования в поиске генетических причин наследственных заболеваний в ХМАО-Югре (Западная Сибирь, Россия)

М.Ю. Донников ¹, П.А. Сучко ^{2, 3}, А.В. Морозкина ¹, Л.Н. Колбасин ^{1, 4}, Е.А. Попова ^{1, 4}, С.И. Папанов ^{1, 4}, Ю.С. Кошечая ⁵, Л.Г. Данилов ³, Ю.А. Эйсмонт ⁶, О.С. Глотов ^{2, 6}, Л.В. Коваленко ¹

¹ Медицинский институт, Сургутский государственный университет, Сургут, ХМАО-Югра, Россия

² Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Сургутский окружной клинический центр охраны материнства и детства, Россия, Сургут, ХМАО-Югра, Россия

⁵ Диагностический центр (медико-генетический), Санкт-Петербург, Россия

⁶ Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

 donnikov@gmail.com

Аннотация. Полноэкзомное секвенирование произвело революцию в диагностике наследственных заболеваний, однако его эффективность варьирует в разных популяциях. Данные о генетической архитектуре редких наследственных заболеваний во многих регионах России, включая этнически разнообразный Ханты-Мансийский автономный округ – Югру, ограничены. Настоящее исследование направлено на оценку диагностической ценности полноэкзомного секвенирования для выявления генетических вариантов, ассоциированных с наследственными заболеваниями в этой этнически неоднородной популяции. В исследование включили 286 пробандов с предполагаемыми наследственными заболеваниями, наблюдаемых генетиками региона в период с 2021 по 2024 г. Полноэкзомное секвенирование выполнено на платформе DNBSEQ-G50 (MGI, Китай). Биоинформатический анализ включал выявление и аннотацию вариантов с использованием популяционных баз данных и инструментов прогнозирования патогенности. Найденные варианты были распределены по категориям в соответствии с рекомендациями ACMG/Российского общества медицинских генетиков и коррелировали с клиническими фенотипами. Молекулярно-генетические диагнозы были классифицированы как полные, частичные, потенциальные (на основании вариантов неизвестной значимости) или отсутствующие. Обследованная когорта преимущественно состояла из детей; наиболее частыми клиническими показаниями были неврологические, дисморфические и метаболические нарушения. Окончательный молекулярно-генетический диагноз был установлен у 24,8 % пациентов. С учетом потенциальных заключений общая значимость исследования увеличилась до 48,6 %. Диагностическая эффективность значительно варьировала в зависимости от категории заболеваний: от 58,3 % для заболеваний почек до 0 % для нарушений нейрогенеза. Проанализировано в общей сложности 420 уникальных вариантов генов, при этом миссенс-варианты были самыми встречающимися среди клинически значимых результатов. Наиболее часто выявлялись гены *ATP7B*, *GJB2*, *ABCA4*, *GALT*. Результаты исследования показали, что полноэкзомное секвенирование – эффективный молекулярный тест первой линии для широкого спектра предполагаемых наследственных заболеваний у жителей Югры с диагностической ценностью, сопоставимой с аналогичными исследованиями за рубежом. Полученные данные подтверждают результативность полноэкзомного секвенирования в гетерогенной популяции и подчеркивают потенциал повышения диагностической ценности за счет формата «трио» и периодического повторного анализа данных.

Ключевые слова: полноэкзомное секвенирование; наследственные заболевания; секвенирование нового поколения; генетическое консультирование; эффективность диагностики; молекулярная диагностика

Introduction

Due to the development of molecular genetic diagnostic methods, especially high-throughput sequencing, significant progress has been made in determining the molecular nature of hereditary diseases over the past 15 years. In particular, the introduction of whole-genome (WGS) and whole-exome (WES) sequencing has enabled both large-scale population projects to describe the frequencies of genetic variants and the analysis of complex clinical cases with unclear disease etiology.

Although technological advances allow for more precise results and cheaper research, the clinical interpretation of genomic data necessary for a specific patient has become a new challenge (Petersen et al., 2017). Given the enormous amount of data obtained from WGS, the main obstacles to implementing this method are the difficulty of interpretation in the context of a specific disease, the high cost, and the burden on laboratory infrastructure with the general diagnostic efficiency of about 40 % (Stranneheim et al., 2021).

In terms of diagnostic efficiency, WES allows focusing on the analysis of protein-coding regions of genes. It is hardly inferior to WGS, and its advantage is less laborious interpretation. However, its key disadvantages are the loss of information outside of exons, the uneven coverage of gene sequences by probes, and limitations in analyzing copy number variations (CNVs) (Wang et al., 2017; Ross et al., 2020).

Since the diagnostic efficiency of WES for hereditary diseases significantly exceeds that of targeted panels, its main niche includes cases with suspected rare genetic diseases, diseases with recently identified or extended genes, a suspected heterogeneous disease in a young child, and negative results from other diagnostic methods (Okuneva et al., 2020).

According to OMIM Morbid Map Scorecard (www.omim.org/statistics/geneMap, accessed September 25, 2025), there are currently 6,619 phenotypes with 4,661 involved genes corresponding to single gene disorders and traits with known molecular basis. Most common forms of monogenic diseases vary significantly not only among different countries but also within distinct regions of a country. Therefore, it is of utmost importance to study the spectrum of genetic variants and monogenic diseases in all regions of Russia (Zinchenko et al., 2019), taking into account the vast diversity of subpopulations that have been practically unexplored by large-scale studies (Barbitoff et al., 2024).

The aim of this study was to identify the genetic causes of the most common hereditary diseases in the West Siberian Russian Khanty-Mansi Autonomous Okrug (Yugra) and to assess the diagnostic efficiency of WES in this population.

Materials and methods

Patient enrollment. Patient selection was carried out from 2021 to 2024 inclusive, as they were admitted for consultation at the regional medical genetic service located in Surgut (Yugra). For the study, 286 probands of various ages and ethnicities were selected according to the following inclusion criteria: the suspected monogenic nature of the disease (early age of manifestation, indications in the family history, inherited nature of the disorder, rare and specific symptoms of multiple organ damage), as well as already diagnosed hereditary diseases with an unspecified molecular cause based on clinical picture and common biochemical tests. For molecular genetic testing, 5 mL of peripheral blood (with EDTA) were taken from patients and transferred for processing to the Yugra biobank laboratory, established at the Surgut State University.

All participants (or their official representatives) provided informed consent for participation in the study and personal data processing. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

DNA extraction, library preparation, and sequencing.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using a MagPure Blood DNA Kit (Magen, China). Whole-exome libraries were prepared using a KAPA HyperPlus Kit and KAPA HyperExome probes (Roche, United States). The libraries were converted with a MGIEasy Universal Library Conversion Kit (MGI, China) and sequenced on a DNBSEQ-G50 system (MGI) in the paired-end mode with the read length of 150 bp, following the manufacturer's recommendations.

Bioinformatics analysis. Samples with an average 70× coverage of target regions and at least 10× coverage width of 98 % were included in further analysis. Samples that did not pass quality control were sent for repeated library preparation and sequencing.

Mapping of obtained reads to the human reference genome (hg19 in 2021–2022 and hg38 in 2023–2024) was performed using BWA (0.7.16) (Li, 2011). Post-processing steps of alignments, variant calling, and filtering were carried out using the Genome Analysis Toolkit (Van der Auwera, O'Connor, 2020).

Variant annotation for all known transcripts of each gene from the RefSeq database was performed using snpEff (v.5.1) (Cingolani et al., 2012), with population frequencies of identified variants from The 1000 Genomes Project and gnomAD samples added to the annotation. Pathogenicity prediction of sequence variants was performed using DANN (Quang et al., 2015), GERP (Davydov et al., 2010), REVEL (Ioannidis et al., 2016), SIFT (Kumar et al., 2009), PolyPhen2 (Adzhubei et al., 2010), PrimateAI (Sundaram et al., 2018). Algorithms AdaBoost (Pashaei et al., 2016) and SpliceAI (Strauch et al., 2022) were also used for assessing the impact of variants on the splice site function.

Clinical data interpretation. To assess the clinical relevance of identified sequence variants the following resources were used: OMIM database, disease-specific databases (if available), and scientific literature data. Reports included only variants that had a possible relationship to the patient's clinical manifestations or met other criteria specified in the physician's referral. Polymorphisms classified as benign or likely benign were excluded from the report.

Identified variants were categorized according to criteria from ACMG guidelines (Richards et al., 2015) and the Russian Society of Medical Genetics (Ryzhkova et al., 2019) as pathogenic (P), likely pathogenic (LP), variants of unknown (clinical) significance (VUS), and asymptomatic carriers (AC). The last category included heterozygous pathogenic and likely pathogenic variants not causing the disease in the proband but strongly associated with other monogenic diseases.

Classification of molecular diagnoses. Based on the number of identified variants in each gene and inheritance type, molecular testing results were categorized as follows:

- complete molecular genetic diagnosis (MGD): at least one heterozygous or hemizygous P/LP variant with a dominant

or X-linked type of inheritance, as well as one homozygous P/LP variant or two (potentially) compound heterozygous P/LP variants with a recessive type of inheritance;

- partial MGD: one heterozygous P/LP variant in a gene associated with an autosomal recessive disease;
- potential MGD: one VUS clearly associated with the phenotype with autosomal dominant or X-linked inheritance, or two VUSes clearly associated with the phenotype with autosomal recessive inheritance;
- no MGD: absence of identified variants, one P/LP variant or VUS in a gene with autosomal recessive inheritance, incomplete relation of VUS associated with autosomal dominant, or X-linked inheritance to clinical presentation;
- incidental findings: only AC variants.

Statistical analysis and graph plotting were performed using the RStudio programming environment. Patient data and genetic variants were imported from a proprietary database (Glotov et al., 2025). They are available upon request.

Results

Characteristics of the examined cohort of patients

From 2021 to 2024 inclusive, 286 probands with suspected genetic diseases were referred from the regional medical genetics counseling service for whole-exome sequencing. The gender, age, and ethnic compositions of the subjects are presented in Table 1. The majority of patients (86.7 %) belong to the child-adolescent age group, the mean age of the cohort being 10.9 years. The most represented ethnic groups are Russians (65.4 %) and Tatars (11.5 %).

Regarding the structure of symptom categories (Table 2), neurological disorders occupy the leading position in Yugra (41.3 %). They are followed by dysmorphic syndromes (12.2 %) and metabolic disorders (11.2 %). It should be noted that psychiatric disorders are the only category not represented in the study group.

Clinical and molecular characteristics

of identified genetic variants related to the phenotype

A total of 420 genetic variants (SNVs, InDels) were identified in patients. These variants were associated either with the observed phenotype or with the asymptomatic heterozygous carrier status (AC) of various monogenic diseases. Although, as shown in Figure 1, most of the identified variants are not of confirmed clinical significance, their potential contribution to disorder manifestation cannot be ignored.

The clinically significant variants detected (194 out of 420) (Fig. 2) belong to the following classes: missense, 43.3 %; stop-gained, 21.6 %; frameshift deletions, 20.1 %; splice donor/acceptor variants, 8.2 %; frameshift insertions, 5.2 %; inframe deletions, 1.5 %. It should be noted that the class of repeat length variation is not represented in our study, as the bioinformatics algorithm used has not undergone strict validation for the analysis of this variation type.

The inheritance patterns of identified clinically significant variants are presented in Figure 3. Gene variants with the autosomal recessive inheritance pattern have a significant

Table 1. Demographic characteristics of the studied cohort (N = 286)

Characteristic	Patients, no. (%)	Characteristic	Patients, no. (%)
Gender		Ethnic structure	
Male	159 (55.6)	Russians	187 (65.4)
Female	127 (44.4)	Tatars	33 (11.5)
Onset age		Azerbaijanis	11 (3.8)
Neonatal	38 (13.3)	Tajiks	10 (3.5)
Infancy	85 (29.7)	Ukrainians	8 (2.8)
Childhood	128 (44.8)	Chechens	8 (2.8)
Adolescent	18 (6.3)	Dagestanis	7 (2.4)
Adult	17 (5.9)	Uzbeks	6 (2.1)
Median onset age [Q1; Q3]	2 [0.5; 4.5]	Kumyks	3 (1.1)
Age at sampling		Armenians	3 (1.1)
Neonatal	1 (0.4)	Belarusians	2 (0.7)
Infancy	4 (1.4)	Germans	2 (0.7)
Childhood	180 (62.9)	Kazakhs	2 (0.7)
Adolescent	64 (22.4)	Moldovans	2 (0.7)
Adult	37 (12.9)	Bashkirs	1 (0.4)
Median age at sample accession [Q1; Q3]	8.4 [3.8; 14.9]	Lezgians	1 (0.4)

Table 2. Categories of clinical symptoms (N = 286)

Symptom category	Patients, no. (%)	Symptom category	Patients, no. (%)
Neurological disorders	118 (4.3)	Autoimmune or rheumatological disorders	8 (2.8)
Dysmorphic and congenital abnormality syndromes	35 (12.2)	Cardiovascular disorders	7 (2.4)
Metabolic disorders	32 (11.2)	Gastrointestinal and hepatic disorders	7 (2.4)
Hearing and ear disorders	16 (5.6)	Endocrine disorders	4 (1.4)
Skeletal disorders	15 (5.2)	Ophthalmological disorders	3 (1.1)
Renal and urinary tract disorders	12 (4.2)	Respiratory disorders	2 (0.7)
Neurodevelopmental disorders	9 (3.1)	Growth disorders	1 (0.4)
Hematological and immunological disorders	8 (2.8)	Tumor syndromes	1 (0.4)
Dermatological disorders	8 (2.8)		

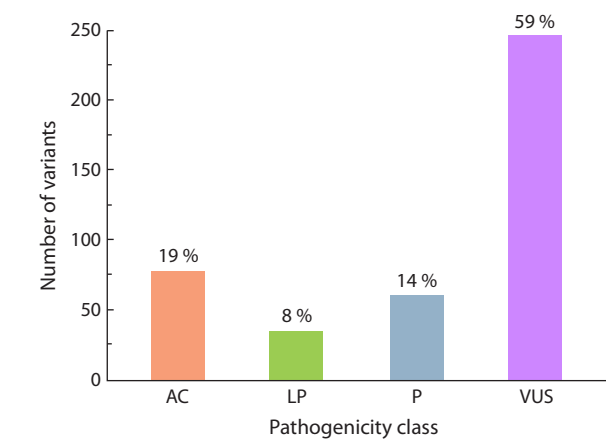


Fig. 1. Pathogenicity classes of the identified variants.
AC – asymptomatic carrier; LP – likely pathogenic; P – pathogenic; VUS – variant of unknown significance.

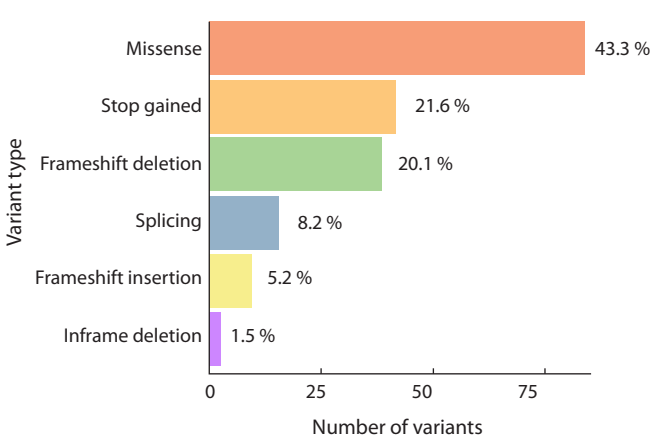


Fig. 2. Molecular classes of clinically significant variants.

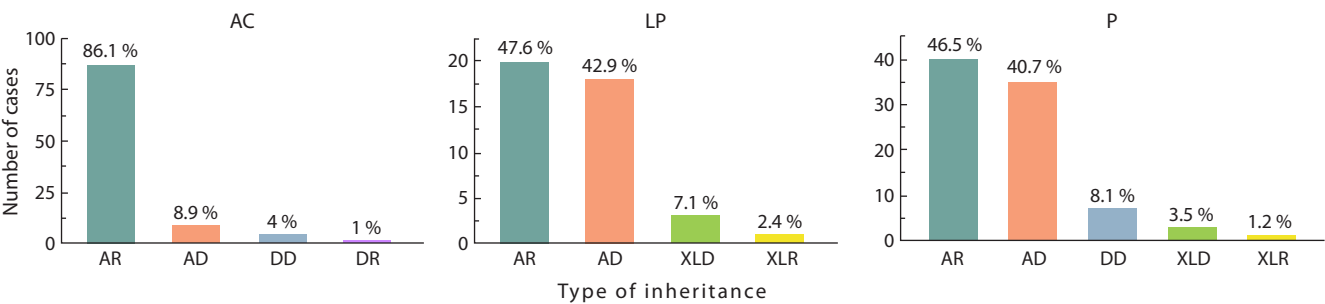


Fig. 3. Distribution of pathogenicity classes by inheritance types.
AR – autosomal recessive; AD – autosomal dominant; DD – digenic dominant; DR – digenic recessive; XLD – X-linked dominant; XLR – X-linked recessive.

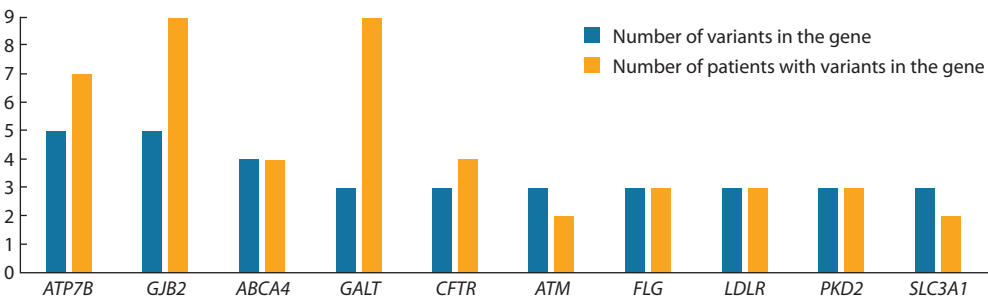


Fig. 4. Human genes with the largest numbers of variants in the studied cohort.

Table 3. The most common clinically significant variants in the studied cohort

cDNA variant	Patho- genicity	Inheritance	Position (hg19)	gnomAD AF, %	Mutation type	No. of patients	Relationship with diseases
ATP7B c.3207C>A	P, AC	AR	chr13:52518281G>T	0.1524	Missense	6	Wilson disease
GJB2 c.109G>A	P, AC	AR, DD	chr13:20763612C>T	0.1392	Missense	4	GJB2-related deafness
GJB2 c.35delG	P, AC	AR, DD	chr13:20763685AC>A	0.9578	Frameshift deletion	4	GJB2-related deafness
PAH c.1222C>T	P, AC	AR	chr12:103234271G>A	0.1719	Missense	4	Phenylketonuria
NEB c.23989C>T	AC	AR	chr2:152357937G>A	0.05838	Stop gained	3	Nemaline myopathy 2
C2 c.841_ 868del	AC	AR	chr6:31902065ATGGTGGACAG GGTCAGGAATCAGGAGTC>A	0.7159	Frameshift deletion	2	C2-complement deficiency
CFTR c.274G>A	AC	AR	chr7:117170953G>A	NA	Missense	2	Cystic fibrosis
KIAA0586 c.392del	AC	AR	chr14:58899156AG>A	0.4773	Frameshift deletion	2	Joubert syndrome
OTOA c.2359G>T	LP	AR	chr16:21747639G>T	0.03104	Stop gained	2	Autosomal recessive deafness 22

weight in the cohort studied (47.6 % for LP and 46.5 % for P). Autosomal dominant inheritance is observed for a substantial number of P/LP variants (40.7 and 42.9 %, respectively). X-linked inheritance has a relatively low prevalence in the cohort, accounting for no more than 10 % of all likely pathogenic variants and no more than 5 % of all pathogenic variants.

Among the genes with the greatest number of detected variants, as shown in Figure 4, the most prominent are *ATP7B*, *GJB2*, *ABCA4*, and *GALT*, which are associated with Wilson’s

disease, GJB2-related deafness, Stargardt disease, and galactosemia, respectively.

The most frequent clinically significant variant, as presented in Table 3, is c.3207C>A in the *ATP7B* gene, associated with Wilson’s disease. However, the majority of the most frequent variants were detected in the AC (asymptomatic carrier) state. All most frequent variants detected are described in the literature as pathogenic, including the *CFTR* c.274G>A (p.Glu92Lys) variant (Chuvash mutation), which is absent from the gnomAD database.

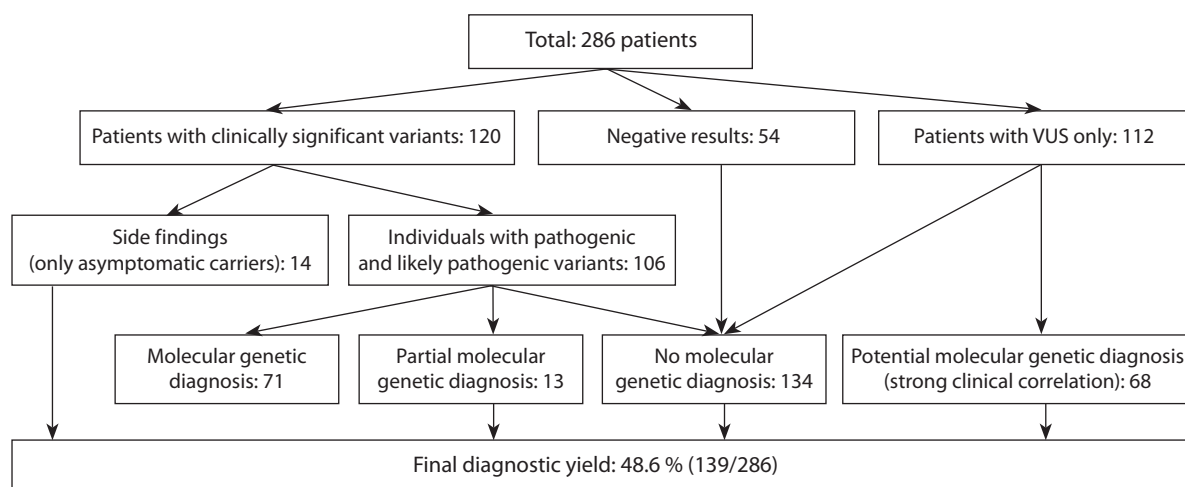


Fig. 5. WES testing summary.

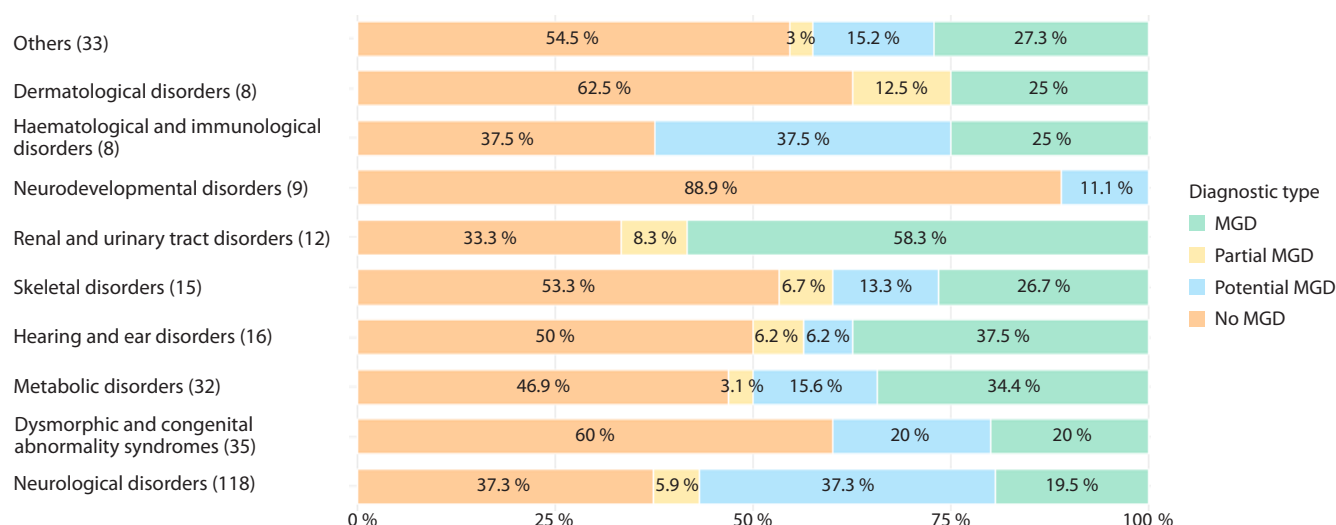


Fig. 6. Types of molecular genetic diagnosis (MGD) in the most common disorder groups.

Clinical effectiveness of WES in the examined cohort

As shown in Figure 5, WES results produced no findings in 54 out of 286 examined patients. Variants of P/LP and AC classes were found in 120 patients, with 14 of them having only AC as a secondary finding. Among 106 patients with phenotype-relevant variants, 71 received a molecular genetic diagnosis, and 13 had only a partial diagnosis. Among the 112 studied samples with only VUS, 68 patients had variants that allowed for a potential molecular genetic diagnosis. Thus, the diagnostic effectiveness of WES in the examined cohort was 48.6 % (139/286).

The distribution of molecular genetic diagnosis types varies significantly across different symptom categories (Fig. 6). The highest percentages of patients with confirmed molecular genetic diagnosis belong to the following categories: *Renal and urinary tract disorders*, 58.3 % (7/12 patients); *Hearing and ear disorders*, 37.5 % (6/16 patients), and *Metabolic disorders*, 34.4 % (11/32 patients). The lowest diagnostic ef-

fectiveness among the most common categories is observed in the *Neurodevelopmental disorders* group, where 88.9 % of patients (8/9) received no molecular genetic diagnosis.

The most ambiguous molecular diagnoses are observed in *Haematological and immunological disorders* – 37.5 % with potential MD (3/8 patients) and *Neurological disorders* – 37.3 % with potential MD (44/118 patients). The presence of a large number of variants of uncertain clinical significance (VUS) explains the ambiguity in these groups.

Discussion

We performed whole-exome sequencing for 286 probands with suspected hereditary diseases to clarify the molecular genetic diagnosis. The majority of patients (86.7 %) belonged to the child-adolescent age group, which is associated with the early manifestation of hereditary diseases. Male subjects were more numerous in the group studied (55.6 %), owing to the presence of X-linked recessive disorders.

The diagnostic effectiveness of the method was 24.8 % for cases with complete molecular genetic diagnosis and increased up to 48.6 % when taking into account variants of uncertain significance that have a close relationship with the observed phenotype. These variants may be reclassified using updated information in the foreseeable future, as with similar findings from studies in other countries (Han et al., 2025).

As long as WES testing was conducted only for probands, the experience of other researchers brought us to the assumption that diagnostic effectiveness could be increased significantly through the implementation of duo- and trio-WES (Lai et al., 2024), mainly due to more reliable identification of compound heterozygous variants and *de novo* variants (Tan et al., 2019). This is particularly relevant for the studied population, where the proportion of autosomal recessive pathogenic or likely pathogenic variants is close to 50 %

Additionally, diagnostic effectiveness could be improved through re-analysis of exome data due to the constant emergence of new data about the relationships between variants and phenotypes (Arteche-López et al., 2022). Finally, since approximately 13 % of genetic variability is associated with copy number variations (CNVs) (Stankiewicz, Lupski, 2010), we conceive that it would be desirable for patients with negative WES results to undergo whole-genome sequencing (WGS) or low-coverage genome sequencing in combination with re-analysis of WES (Moey et al., 2025).

We found that the most common symptom categories of hereditary diseases in Yugra were *Neurological disorders* (118 out of 286 cases), *Dysmorphic and congenital abnormality syndromes* (35/286); and *Metabolic disorders* (32/286).

Our study shows significant differences in WES diagnostic effectiveness among different symptom categories: from zero yield for percentage of confirmed molecular genetic diagnosis cases in the *Neurodevelopmental disorders* group to 58.3 % in the *Renal and urinary tract disorders* group. Thus, the high occurrence of neurological disorders in our cohort presumes that just nervous system disorders pose the greatest challenge to productive WES analysis. Such differences may be related to yet uncharacterized molecular causes of these diseases (Adams, Eng, 2018), and generally they are consistent with results obtained from the analysis of 3,040 WES samples, where a wide range from 4 to 55 % of positive reports (Retterer et al., 2016) was also observed in different disease groups.

It is also important to consider the relevance of applying special molecular genetic methods to specific inherited diseases, such as search for duplications on chromosome 17 in cases of hereditary motor-sensory neuropathies (Shchagina et al., 2020), which was not conducted within the scope of our study. Other studies note the effectiveness of duo- and trio-WES for patients with intellectual disability, developmental delays, and epilepsy due to the high number (up to 80 %) of *de novo* variants in these cases (Lai et al., 2024).

It is particularly important to emphasize the significance of providing sufficient data on clinical picture by referring physicians (mostly by geneticists), as incomplete understanding of the symptoms by the interpreter may lead to false elimination of many genes from the search criteria and produce false-negative results. Additionally, for multiethnic populations deter-

mining the patient's ethnicity (at least based on a questionnaire) is an important aspect, which was considered in our study, involving 16 ethnic groups.

Furthermore, the importance of secondary findings classified in our study as the asymptomatic carrier state (about 20 % of all identified variants) should not be underestimated, as they provide insight into the genetic burden of the population and should be appropriately considered during genetic counseling of families, particularly for planning future pregnancies.

It can be noted that 8.9 % of asymptomatic carrier cases among the examined patients are referred to genes with an autosomal dominant inheritance pattern. However, for these cases no significant effect on the phenotype was observed, which may be due to the different inheritance patterns of the variant depending on its belonging to a particular protein domain, as in the case of *GJB2* (Xiang et al., 2023). Another consideration is the risk of mutation manifestation at an older age, as in the case of mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes (Azzollini et al., 2016).

Conclusions

In our study of 286 residents of the KHAMAO-Yugra region, we accurately established molecular genetic diagnoses in 24.8 % of patients by using the whole-exome sequencing approach and identified the possible genetic nature of inherited diseases in 48.6 % of cases within the ethnically heterogeneous group. We characterized 420 gene variants, excluding benign and likely benign ones. Thus, whole exome sequencing should be considered a sufficiently effective first-tier diagnostic method for unveiling the genetic causes of a broad range of presumably hereditary diseases. However, some specific cases may demand duo- or trio-WES, whole-genome sequencing, or additional specific methods well proven in revealing the molecular background of certain classes of molecular disorders.

References

- Adams D.R., Eng C.M. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N Engl J Med.* 2018;379(14):1353-1362. doi 10.1056/NEJMra1711801
- Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4): 248-249. doi 10.1038/nmeth0410-248
- Arteche-López A., Ávila-Fernández A., Riveiro Álvarez R., Almo-guera B., Bustamante Aragonés A., Martín-Merida I., López Martínez M.A., ... Blanco-Kelly F., Tahsin Swafiri S., Lorda Sánchez I., Trujillo Tiebas M.J., Ayuso C. Five years' experience of the clinical exome sequencing in a Spanish single center. *Sci Rep.* 2022;12(1): 19209. doi 10.1038/s41598-022-23786-6
- Azzollini J., Scuvera G., Bruno E., Pasanisi P., Zaffaroni D., Calvello M., Pasini B., Ripamonti C.B., Colombo M., Pensotti V., Radice P., Peissel B., Manoukian S. Mutation detection rates associated with specific selection criteria for BRCA1/2 testing in 1854 high-risk families: a monocentric Italian study. *Eur J Intern Med.* 2016;32: 65-71. doi 10.1016/j.ejim.2016.03.010
- Barbitoff Y.A., Khmelkova D.N., Pomerantseva E.A., Slepchenkov A.V., Zubashenko N.A., Mironova I.V., Kaimonov V.S., ... Aseev M.V., Shcherbak S.G., Glotov O.S., Isaev A.A., Predeus A.V. Expanding the Russian allele frequency reference via cross-laboratory data integration: insights from 7452 exome samples. *Natl Sci Rev.* 2024; 11(10):nwae326. doi 10.1093/nsr/nwae326

- Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w^{1118} ; *iso-2*; *iso-3*. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80-92. doi 10.4161/fly.19695
- Davydov E.V., Goode D.L., Sirota M., Cooper G.M., Sidow A., Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol*. 2010; 6(12):e1001025. doi 10.1371/journal.pcbi.1001025
- Glotov O.S., Donnikov M.Yu., Glotov A.S., Popova E.A., Suchko P.A., Kolbasin L.N., Belotserkovtseva L.D., Kovalenko L.V. Genetic variants identified in patients with rare and multifactorial diseases in the Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra based on exome sequencing: registered database No. 2025622641. 2025. Available: <https://new.fips.ru/publication-web/publications/document?type=doc&tab=PrEVM&id=60EDD49E-F82F-481E-BFB7-474B01087E34>, accessed on 28.09.2025 (in Russian)
- Han H., Seo G.H., Hyun S.I., Kwon K., Ryu S.W., Khang R., Lee E., ... Yang S., Lee S., Jang S., Lee J., Lee H. Exome sequencing of 18,994 ethnically diverse patients with suspected rare Mendelian disorders. *NPJ Genom Med*. 2025;10(1):6. doi 10.1038/s41525-024-00455-3
- Ioannidis N.M., Rothstein J.H., Pejaver V., Middha S., McDonnell S.K., Baheti S., Musolf A., ... Bailey-Wilson J.E., Radivojac P., Thibodeau S.N., Whittemore A.S., Sieh W. REVEL: an ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):877-885. doi 10.1016/j.ajhg.2016.08.016
- Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081. doi 10.1038/nprot.2009.86
- Lai G., Gu Q., Lai Z., Chen H., Chen J., Huang J. The application of whole-exome sequencing in the early diagnosis of rare genetic diseases in children: a study from Southeastern China. *Front Pediatr*. 2024;12:1448895. doi 10.3389/fped.2024.1448895
- Li H. Exploring single-sample SNP and INDEL calling with whole-genome *de novo* assembly. *Bioinformatics*. 2011;28(14):1838-1844. doi 10.1093/bioinformatics/bts280
- Moey L.H., Seo G.H., Cheah B.E., Keng W.T., Lee H., Ch'ng G.S. A first large study of whole-exome sequencing (WES) in 489 patients with suspected rare genetic disorders at a tertiary centre in Malaysia. *Rare*. 2025;3:100102. doi 10.1016/j.rare.2025.100102
- Okuneva E.G., Kozina A.A., Baryshnikova N.V., Krasnenko A.Yu., Klimchuk O.I., Stetsenko I.F., Plotnikov N.A., Surkova E.I., Ilinsky V.V. The utility of exome sequencing in diagnosis of hereditary diseases. *Med Genet*. 2020;19(12):18-24. doi 10.25557/2073-7998.2020.12.18-24 (in Russian)
- Pashaei E., Yilmaz A., Ozen M., Aydin N. Prediction of splice site using AdaBoost with a new sequence encoding approach. In: IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics (SMC), Budapest, Hungary. IEEE, 2016;003853-003858. doi 10.1109/SMC.2016.7844835
- Petersen B.S., Fredrich B., Hoepfner M.P., Ellinghaus D., Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet*. 2017;18(1):14. doi 10.1186/s12863-017-0479-5
- Quang D., Chen Y., Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2015; 31(5):761-763. doi 10.1093/bioinformatics/btu703
- Retterer K., Juusola J., Cho M.T., Vitazka P., Millan F., Gibellini F., Vertino-Bell A., ... Richard G., Brandt T., Haverfield E., Chung W.K., Bale S. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med*. 2016;18(7):696-704. doi 10.1038/gim.2015.148
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi 10.1038/gim.2015.30
- Ross J.P., Dion P.A., Rouleau G.A. Exome sequencing in genetic disease: recent advances and considerations. *F1000Res*. 2020;9(F1000 Faculty Rev):336. doi 10.12688/f1000research.19444.1
- Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanas'ev A.A., ... Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kucev S.I. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Med Genet*. 2019;18(2):3-24. doi 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23 (in Russian)
- Shchagina O.A., Ryzhkova O.P., Chuhrova A.L., Milovidova T.B., Gundorova P., Mironovich O.L., Orlova A.A., Orlova M.D., Polyakov A.V. Diagnostic utility of exome sequencing for inherited peripheral neuropathies. *Neuromuscular Disord*. 2020;10(4):12-26. doi 10.17650/2222-8721-2020-10-4-12-26 (in Russian)
- Stankiewicz P., Lupski J.R. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:437-455. doi 10.1146/annurev-med-100708-204735
- Stranneheim H., Lagerstedt-Robinson K., Magnusson M., Kvarnang M., Nilsson D., Lesko N., Engvall M., ... Soller M.J., Nordgren A., Wirta V., Lindstrand A., Wedell A. Integration of whole genome sequencing into a healthcare setting: high diagnostic rates across multiple clinical entities in 3219 rare disease patients. *Genome Med*. 2021;13(1):40. doi 10.1186/s13073-021-00855-5
- Strauch Y., Lord J., Niranjan M., Baralle D. CI-SpliceAI-improving machine learning predictions of disease causing splicing variants using curated alternative splice sites. *PLoS One*. 2022;17(6):e0269159. doi 10.1371/journal.pone.0269159
- Sundaram L., Gao H., Padigepati S.R., McRae J.F., Li Y., Kosmicki J.A., Fritzilas N., Hakenberg J., Dutta A., Shon J., Xu J., Batzoglou S., Li X., Farh K.K. Predicting the clinical impact of human mutation with deep neural networks. *Nat Genet*. 2018;50(8):1161-1170. doi 10.1038/s41588-018-0167-z
- Tan T.Y., Lunke S., Chong B., Phelan D., Fanjul-Fernandez M., Marum J.E., Kumar V.S., ... Martyn M., Goranitis I., Thorne N., Gaff C.L., White S.M. A head-to-head evaluation of the diagnostic efficacy and costs of trio versus singleton exome sequencing analysis. *Eur J Hum Genet*. 2019;27(12):1791-1799. doi 10.1038/s41431-019-0471-9
- Van der Auwera G.A., O'Connor B.D. Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra. O'Reilly Media, 2020
- Wang Q., Shashikant C.S., Jensen M., Altman N.S., Girirajan S. Novel metrics to measure coverage in whole exome sequencing datasets reveal local and global non-uniformity. *Sci Rep*. 2017;7(1):885. doi 10.1038/s41598-017-01005-x
- Xiang J., Sun X., Song N., Ramaswamy S., Abou Tayoun A.N., Peng Z. Comprehensive interpretation of single-nucleotide substitutions in *GJB2* reveals the genetic and phenotypic landscape of *GJB2*-related hearing loss. *Hum Genet*. 2023;142(1):33-43. doi 10.1007/s00439-022-02479-0
- Zinchenko R.A., Kutsev S.I., Aleksandrova O.Yu., Ginter E.K. Main methodological approaches to the identification and diagnosis of monogenic hereditary diseases and problems in the organization of medical care and unified preventive programs. *Probl Social Hyg Public Health Hist Med*. 2019;27(5):865-877. doi 10.32687/0869-866X-2019-27-5-865-877 (in Russian)

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

Received September 29, 2025. Revised December 24, 2025. Accepted February 9, 2026.

doi 10.18699/vjgb-26-53

Редкие варианты в генах транспортеров холестерина у пациентов с нарушениями липидного обмена

А.Д. Изюмченко ^{1, 2} , М.Н. Грунина ^{1, 2}, К.В. Драчева ¹, О.А. Чумакова¹, К.О. Танаянц ², К.В. Легостаева ¹, А.Н. Куликов ¹, О.А. Беркович ¹, Е.И. Баранова ¹, С.Н. Пчелина ^{1, 2}, В.В. Мирошникова ^{1, 2}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская область, Россия

 artemiz98@yandex.ru

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти в России и мире. Один из предрасполагающих к развитию сердечно-сосудистых заболеваний факторов – нарушения липидного обмена (дислипидемии), способствующие прогрессированию атеросклероза. На настоящий момент известны гены, ассоциированные с развитием моногенных форм нарушений липидного обмена, характеризующихся выраженным изменением уровня липидов. Однако выявление лиц с повышенным генетическим риском развития дислипидемии остается нерешенной задачей, что связано с полигенной природой большинства случаев. Целью настоящей работы было изучить спектр редких вариантов в генах транспортеров холестерина *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8* и *NPC1L1*, которые встречаются у пациентов с нарушениями липидного обмена в популяции Северо-Западного региона России. Проведен поиск редких вариантов (частота *gnomAD* менее 1 %) в генах *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8* и *NPC1L1* с использованием данных таргетного секвенирования для 169 пациентов с нарушениями липидного обмена. Выявлено 14 вариантов в гене *ABCA1* (17 пациентов), 4 варианта в гене *ABCG1* (5 пациентов), 11 вариантов в гене *ABCG5* (18 пациентов) и 7 вариантов в гене *ABCG8* (11 пациентов). Частота некоторых из них, согласно базе данных RUSeq, была выше, чем в общемировой популяции. 19 пациентов (11 %) были носителями гаплотипа *p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe)* гена *NPC1L1*, который предположительно может быть специфичен для российской популяции, т.е. эти варианты являются не редкими, а полиморфными и встречаются чаще у пациентов с нарушениями липидного обмена. Для варианта *p.(Val177Ile)* гена *NPC1L1* был проведен анализ его вклада в развитие атеросклероза с использованием дополнительных выборок (группа пациентов с атеросклерозом, контрольная группа), который не выявил достоверных различий в частотах генотипов. Таким образом, в настоящее время данных в пользу влияния гаплотипа *p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe)* гена *NPC1L1* на развитие дислипидемии и атеросклероза недостаточно. Проведенное исследование заставляет обратить внимание на популяционную специфичность ряда вариантов в генах транспортеров холестерина, в частности в гене *NPC1L1*, для Северо-Западного региона России. Полученные данные в дальнейшем могут быть учтены в разработке шкал генетического риска развития дислипидемий.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; дислипидемия; таргетное секвенирование; шкала генетического риска; обратный транспорт холестерина

Для цитирования: Изюмченко А.Д., Грунина М.Н., Драчева К.В., Чумакова О.А., Танаянц К.О., Легостаева К.В., Куликов А.Н., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Редкие варианты в генах транспортеров холестерина у пациентов с нарушениями липидного обмена. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3): 490-501. doi 10.18699/vjgb-26-53

Финансирование. Грант РНФ № 25-25-00351: «Влияние патогенных вариантов в генах *LDLR* и *APOB* на транскриптомный профиль макрофагов при семейной гиперхолестеринемии».

Благодарности. Авторы выражают признательность всем докторам (врачам-кардиологам и детским специалистам), которые направляли образцы пациентов на генетическую диагностику нарушений липидного обмена в Отдел молекулярно-генетических и нанобиологических технологий НИЦ ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова и тем самым способствовали накоплению данных.

Rare variants in cholesterol transporter genes in patients with lipid metabolism disorders

A.D. Izyumchenko ^{1, 2} , M.N. Grunina ^{1, 2}, K.V. Dracheva ¹, O.A. Chumakova¹, K.O. Tanayants ², K.V. Legostaeva ¹, A.N. Kulikov ¹, O.A. Berkovich ¹, E.I. Baranova ¹, S.N. Pchelina ^{1, 2}, V.V. Miroshnikova ^{1, 2}

¹ Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

² Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad region, Russia

 artemiz98@yandex.ru

© Изюмченко А.Д., Грунина М.Н., Драчева К.В., Чумакова О.А., Танаянц К.О., Легостаева К.В., Куликов А.Н., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В., 2026

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. Cardiovascular diseases are the leading cause of death both in Russia and in the world. One of the factors predisposing to the development of cardiovascular diseases is lipid metabolism disorders (dyslipidemias), which contribute to the progression of atherosclerosis. Currently, there are known genes associated with the development of monogenic forms of lipid metabolism disorders characterized by marked changes in lipid levels. However, identifying individuals with an increased genetic risk of dyslipidemia remains an unsolved problem, due to the polygenic nature of most cases. The aim of this work was to study the spectrum of rare variants in the cholesterol transporter genes *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8* and *NPC1L1* that occur in patients with lipid metabolism disorders in the population of the Northwestern region of Russia. The search for rare variants (gnomAD frequency less than 1 %) in the *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8* and *NPC1L1* genes was performed using targeted sequencing data for 169 patients with lipid metabolism disorders. 14 variants were identified in the *ABCA1* gene (17 patients); 4 variants, in the *ABCG1* gene (5 patients); 11 variants, in the *ABCG5* gene (18 patients); and 7 variants, in the *ABCG8* gene (11 patients). The frequency of some of them, according to the RUSeq database, is higher than in the global population. 19 patients (11 %) were carriers of the p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) haplotype in the *NPC1L1* gene, which may be specific to the Russian population, meaning that these variants are not rare, but polymorphic, and occur more frequently in patients with impaired lipid metabolism. Influence of the p.(Val177Ile) variant of the *NPC1L1* gene on the development of atherosclerosis was assessed using additional sample sets (a group of patients with atherosclerosis, a control group), but no significant differences in genotype frequencies were revealed. Thus, at present, there are insufficient data to support the role of the p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) haplotype of the *NPC1L1* gene in the development of dyslipidemia and atherosclerosis. The study draws attention to the population specificity of a number of variants in cholesterol transporter genes, in particular in the *NPC1L1* gene, for the Northwestern region of Russia. The data can be further used for design and calculation of genetic risk scores for dyslipidemia.

Key words: familial hypercholesterolemia; dyslipidemia; targeted sequencing; genetic risk scale; reverse cholesterol transport

For citation: Iziumchenko A.D., Grunina M.N., Dracheva K.V., Chumakova O.A., Tanayants K.O., Legostaeva K.V., Kulikov A.N., Berkovich O.A., Baranova E.I., Pchelina S.N., Miroshnikova V.V. Rare variants in cholesterol transporter genes in patients with lipid metabolism disorders. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(3):490-501. doi 10.18699/vjgb-26-53

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти в России и мире (Danilova et al., 2021; Heron, 2021). Многофакторная природа ССЗ определяет важность изучения новых маркеров начала патологического процесса, в том числе генетических. Вклад генетической составляющей в развитие заболеваний сердца и сосудов оценивается как 40–50 % (McPherson, Tybjaerg-Hansen, 2016; Roberts et al., 2021). Гиперхолестеринемия, которая часто имеет наследственный характер, способствует формированию атеросклеротических бляшек коронарных сосудов, что в свою очередь приводит к развитию ишемической болезни сердца (ИБС) и острого инфаркта миокарда (ОИМ) (Prasad, Mishra, 2022). Особое место среди наследственных нарушений липидного обмена отводится семейной гиперхолестеринемии (СГХС), которая многократно повышает риск развития ССЗ (Tokgozoglu, Kayikcioglu, 2021). Нами и другими авторами показано, что в большинстве случаев причиной СГХС выступают патогенные варианты в генах *LDLR* и *APOB*, однако в зависимости от тяжести гиперхолестеринемии в 40–60 % случаев установить генетическую причину заболевания не удастся (Shakhtshneider et al., 2021; Мирошникова и др., 2023, 2025). Таким образом, остается актуальным поиск редких генетических вариантов, имеющих кумулятивный эффект в развитии полигенных случаев гиперхолестеринемии и сопутствующих ССЗ.

В исследовании А.Н. Мешкова с коллегами (2022) было продемонстрировано увеличение риска развития ИБС у носителей редких и низкочастотных вариантов в генах, ассоциированных с нарушениями липидного обмена. Редкие функциональные генетические варианты, связанные с метаболизмом холестерина, встречаются у 60 % пациентов

с ОИМ (Pan-Lizcano et al., 2022). Было показано, что 25 % локусов, ассоциированных с ОИМ, относятся к генам липидного обмена (Musunuru, Kathiresan, 2016). Редкие генетические варианты имеют популяционную распространенность <1 % и статистически могут быть не связаны с представляющими интерес заболеваниями в больших выборках, но даже небольшое увеличение встречаемости аллеля (1–5 %) у пациентов может свидетельствовать о его влиянии на сложные заболевания и признаки (Cross et al., 2022; Li et al., 2024). Кроме того, такие генетические варианты могут быть популяционно-специфичными и должны учитываться при разработке шкал генетического риска для конкретной популяции.

Атерогенный дисбаланс липидных фракций плазмы крови проявляется в повышении концентрации общего холестерина (ОХС), холестерина в составе липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП) и снижении холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛВП). Трансмембранные транспортеры холестерина играют важную роль в регуляции уровня клеточного холестерина, в процессах формирования липопротеиновых частиц, абсорбции холестерина в кишечнике и выведения холестерина из организма (Yu, Tang, 2022). АТФ-связывающие транспортеры семейства ABC – *ABCA1* и *ABCG1* – переносят холестерин на антиатерогенные липопротеины высокой плотности (ЛВП) (Yu, Tang, 2022). Мутации в гене *ABCA1* приводят к развитию аутосомно-рецессивного заболевания – болезни острова Танжер, характеризующейся практически полным отсутствием в плазме крови ЛВП и преждевременным развитием атеросклероза (Koseki et al., 2021). Транспортеры *ABCG5* и *ABCG8* в кишечнике регулируют абсорбцию холестерина и растительных стеролов. Мутации в этих генах являются причиной развития сито-

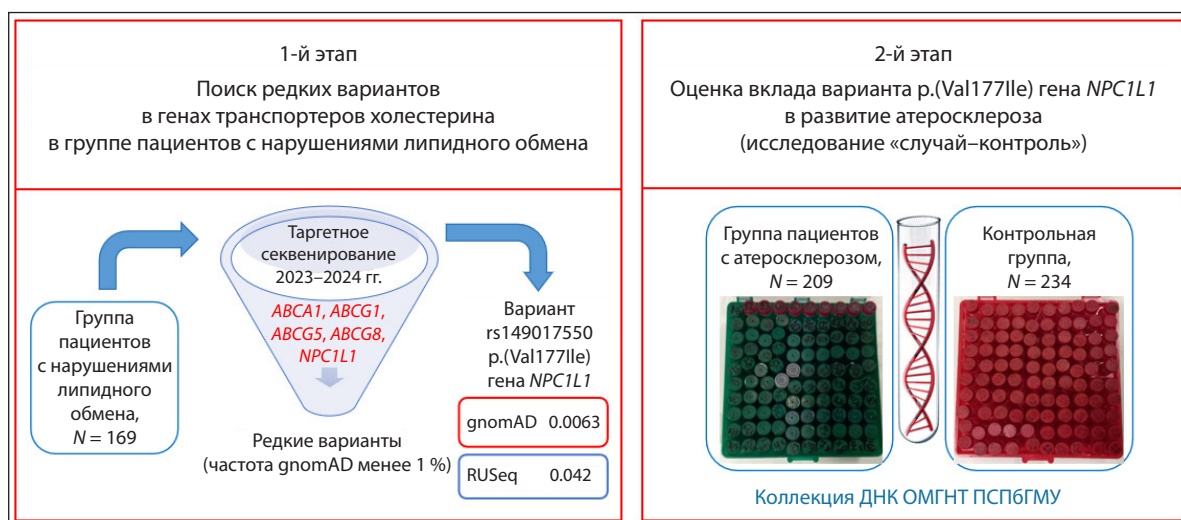


Рис. 1. Дизайн исследования.

стеролемии, имеющей схожие клинические проявления с СГХС (Tada et al., 2022). Транспортёр NPC1L1, известный как С1-подобный белок Ниманна-Пика 1, также задействован в абсорбции холестерина в кишечнике и представляет собой мишень для гиполипидемического препарата эзетимиб (Zhang et al., 2022). Можно предположить, что сочетание редких вариантов в генах транспортеров холестерина обуславливает развитие дислипидемий и ССЗ (Мешков и др., 2022; Ghaleb et al., 2022).

Целью настоящей работы было изучить спектр редких вариантов в генах транспортеров холестерина *ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8* и *NPC1L1*, которые встречаются у пациентов с нарушениями липидного обмена в популяции Северо-Западного региона России.

Материалы и методы

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России (протокол № 275 от 4 сентября 2023 г.). Все участники дали письменное информированное согласие.

Общий дизайн исследования представлен на рис. 1.

Анализ данных секвенирования

Поиск редких вариантов в генах транспортеров холестерина *ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8* и *NPC1L1* был проведен с использованием данных NGS-секвенирования, выполненного для 169 пациентов с нарушениями липидного обмена (134 взрослых (65 мужчин и 69 женщин) от 24 до 85 лет, средний возраст 52.3 ± 14.6 , и 35 детей (18 мальчиков и 17 девочек) от 3 до 17 лет, средний возраст 9.7 ± 3.8), направленных на генетическую диагностику наследственных дислипидемий в Отдел молекулярно-генетических и нанобиологических технологий (ОМГНТ) из различных клиничко-диагностических центров г. Санкт-Петербурга, в том числе из ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, в течение 2023–2024 гг.

Критерии направления образцов на генетическое исследование: 1) возможная/вероятная/определенная СГХС

у пациентов старше 18 лет в соответствии с Голландскими диагностическими критериями (Кухарчук и др., 2020); 2) вероятная/определенная СГХС у пациентов младше 18 лет в соответствии с критериями Саймона Брума (Ежов и др., 2019); 3) выраженная гипертриглицеридемия (были включены лица с концентрацией триглицеридов от 3.3 до 10.5 ммоль/л).

Библиотеки готовили с использованием набора реагентов Prep&Seq (Parseq Lab Co, Россия) и кастомной панели «Дислипидемия и риск ССЗ», включающей кодирующие регионы следующих генов: *ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, ANGPTL3, APOA1, APOA4, APOA5, APOB, APOC2, APOC3, APOE, CETP, CREB3L3, GCK, CYP27A1, CYP7A1, GPD1, GPIHBP1, HNF1A, LCAT, LDLR, LDLRAP1, LIPA, LIPC, LIPG, LMF1, LPL, LRP6, MTTP, MYLIP, NPC1L1, PCSK9, PNPLA5, SAR1B, SCARB1, SORT1, STAP1, TTR* (VariFind LM assay IL-v1.1.1, Parseq Lab Co, Россия). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, Inc., США). Данные секвенирования были обработаны автоматизированной программой Seq&Go Software (Parseq Lab Co, Россия). Выявленные генетические варианты аннотированы и описаны согласно рекомендациям the Human Genome Variation Society (HGVS) (www.hgvs.org) и представлены в формате таблиц. Далее был выполнен отбор редких вариантов (частота gnomAD менее 1 %) в генах транспортеров холестерина *ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8* и *NPC1L1*. Частоты отобранных вариантов сопоставляли с российской базой генетической информации RUSeq (<http://ruseq.ru/#/>) (Barbitoff et al., 2024). Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов нуклеотидной последовательности использованы базы данных OMIM (<https://omim.org/>), gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), HGMD (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), LOVD (<https://www.lovd.nl/>) и литературные данные. Клиническую значимость (патогенность) выявленных вариантов оценивали на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров, использованных для секвенирования по Сэнгеру

Генетический вариант	Последовательность 5'–3'
Экзон 2, р.(Val177Ile)	F-TTGGGACTCATTGCAACGTG R-CCCAATCAGAGCCTCTTCA
Экзон 2, р.(His221Tyr)	F-CCTTCTTGGGGTCCACCATC R-ATGTGTGGCGTGATGGCTCT
Экзон 2, р.(Ala271Phe)	F-CCTTCTTGGGGTCCACCATC R-CTCCACCTCTGGAGCCTG

методами массового параллельного секвенирования, а также рекомендаций ACMG2015 (Рыжкова и др., 2019).

Верификация вариантов р.(Val177Ile), р.(His221Tyr) и р.(Ala271Phe) гена *NPC1L1*, составляющих гаплотип, проводилась методом секвенирования по Сэнгеру на секвенаторе Нанофор-05 («Синтол», Россия) с использованием набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Mutation Surveyor (Soft Genetics, США). Праймеры для секвенирования были подобраны с помощью онлайн-программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (табл. 1).

Оценка вклада варианта р.(Val177Ile) гена *NPC1L1* в развитие атеросклероза

Характеристика групп. Генотипирование варианта р.(Val177Ile) гена *NPC1L1* было выполнено суммарно для 443 пациентов, в разное время проходивших обследование или лечение в ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, ДНК которых была доступна из биобанка ОМГНТ: пациенты с атеросклерозом различной локализации ($N = 209$); контрольная группа ($N = 234$).

В группу пациентов с ранним развитием атеросклероза вошло 209 пациентов (146 (70 %) мужчин и 63 (30 %) женщины; средний возраст 54.6 ± 8.5 года; средний возраст первых клинических проявлений 48.2 ± 6.8 года) с атеросклерозом артерий различной локализации (коронарных, церебральных, артерий нижних конечностей), подтвержденным при ангиографическом исследовании (табл. 2). Критерием отбора служило наличие гемодинамически значимых стенозов как минимум в одной артерии одного из трех артериальных бассейнов – церебрального, коронарного, бассейна артерий нижних конечностей. Следует отметить как ограничение, что выборка была сформирована по принципу наличия подтвержденного атеросклероза, безотносительно, имели ли пациенты дислипидемию, поскольку длительность и эффективность лечения статинами в большинстве случаев было сложно отследить.

Контрольную группу составили 234 человека (154 (66 %) мужчины и 80 (34 %) женщин; средний возраст 48.3 ± 5.8 года) соответствовал среднему возрасту начала заболевания у пациентов с атеросклерозом) без нарушений липидного обмена, ожирения и сердечно-сосудистых заболеваний. Лица, вошедшие в контрольную группу, были осмотрены врачом-кардиологом, а проведенные обследования включали электрокардиографию, велоэргометрию, ЭХО-кардиографию.

Идентификация варианта р.(Val177Ile) гена *NPC1L1* с использованием полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа. Типирование вариантов rs149017550 chr7:44539868C>T с.529G>A р.(Val177Ile) гена *NPC1L1* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего рестрикционного анализа. Праймеры для ПЦР были подобраны с помощью онлайн-программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Нуклеотидная последовательность праймеров (5'–3'): прямой – TTGGGACTCATTGCAACGTG, обратный – CCCAATCAGAGCCTCTTCA.

Таблица 2. Клинические и биохимические характеристики исследуемых групп

Параметры	Группа пациентов с атеросклерозом ($N = 209$)	Контрольная группа ($N = 234$)	p
Липидный профиль, ммоль/л*			
ОХС	5.20 (4.46 ÷ 6.15)	4.56 (4.02 ÷ 5.14)	0.000
ХС-ЛНП	2.76 (2.45 ÷ 3.39)	2.66 (2.19 ÷ 3.23)	0.129
ХС-ЛВП	1.06 (0.80 ÷ 1.10)	1.45 (1.26 ÷ 1.66)	0.000
ТГ	2.00 (1.18 ÷ 2.28)	0.81 (0.59 ÷ 1.02)	0.000
Параметры атеросклеротического поражения артерий, N (%)			
Коронарный атеросклероз	112 (53.6)	–	–
Церебральный атеросклероз	43 (20.6)	–	–
Атеросклероз сосудов нижних конечностей	76 (36.4)	–	–
Поражение двух и более артериальных бассейнов	21 (10)	–	–
Многососудистое поражение (трех и более артерий)	164 (78.5)	–	–

Примечание. ОХС – общий холестерин; ХС-ЛНП – холестерин в составе липопротеинов низкой плотности; ТГ – триглицериды.

* Указаны медиана и интерквартильный размах (IQR).

В результате амплификации с указанными праймерами получали ПЦР-продукт размером 352 п. н.

Для проведения рестрикционного анализа ПЦР-продукт инкубировали с 1 ед. эндонуклеазы Fok I в буфере Y, содержащем: 33 ммоль Tris-ацетата (pH 7.9 при 25 °C), 10 ммоль магний-ацетата, 66 ммоль калий-ацетата, 1 ммоль DTT, при +37 °C в течение ночи. Результаты визуализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле: в зависимости от генотипа получали фрагменты ДНК длиной 352, 224 и 128 п. н. (для GG – только фрагмент 352 п. н., для GA – фрагменты 352, 224 и 128 п. н., для AA – фрагменты 224 и 128 п. н.).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS, версия 17.0. Для сравнения категориальных переменных применяли критерий хи-квадрат. Соответствие данных нормальному распределению проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Для сравнения количественных показателей между двумя независимыми группами (пациенты–контроль) использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Возможное влияние генотипа NPC1L1 на развитие атеросклероза с учетом поправки на пол и возраст оценивали методом многофакторного логистического регрессионного анализа.

Результаты

Анализ встречаемости редких вариантов в генах ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 и NPC1L1 у пациентов с нарушениями липидного обмена

Нами проанализированы данные таргетного секвенирования для 169 пациентов с гиперхолестеринемией, а именно осуществлен поиск редких вариантов (частота gnomAD менее 1 %) в генах транспортеров холестерина ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 и NPC1L1. Результаты представлены в табл. 3–7.

Было выявлено 14 вариантов в гене ABCA1 у 17 пациентов и 4 варианта в гене ABCG1 у 5 пациентов (см. табл. 3 и 4). Эти варианты классифицируются в базах данных как доброкачественные. Транспортёр ABCA1 является важным регулятором биогенеза ЛВП, осуществляя перенос холестерина из клетки на незрелые частицы пре-бета-ЛВП. Таким образом, варианты гена ABCA1, влияющие на функцию белка, могут быть связаны со снижением концентрации ЛВП в плазме крови, способствуя развитию атерогенной дислипидемии (Shim et al., 2021). Одна из пациенток с клинической картиной СГХС и низким уровнем ХС-ЛВП (1.2 ммоль/л, нижняя граница нормы для женщин) была носителем сразу двух редких вариантов в гене ABCA1: rs187652566 p.(Cys887Phe) и rs138422574

Таблица 3. Редкие варианты гена ABCA1, выявленные у пациентов с нарушениями липидного обмена

Кол-во пациентов	rsID	Геномная координата (GRCh38)	Замена NM_013389.3/белок	Частота gnomAD	Частота RUSeq
1	rs199976989	chr9:104903705T>G	c.–26A>C	0.0001511	–
1	rs1408196930	chr9:104928007A>T	c.–165T>A	0.000006569	–
1	rs1015644827	chr9:104840350T>C	c.983A>G p.(Asn328Ser)	0.000001368	0.0002962
1	rs764824326	chr9:104832735C>T	c.1348G>A p.(Glu450Lys)	0.00001232	0.0002998
1	rs186911476	chr9:104832706T>G	c.1377A>C p.(Thr459=)	0.0002719	0.001574
1	rs142342160	chr9:104832616G>A	c.1467C>T p.(Asn489=)	0.0000314	0.0005928
1	rs145582736	chr9:104825781T>C	c.2444A>G p.(Glu815Gly)	0.0001826	0.0008339
2	rs370414528	chr9:104824558G>A	c.2563C>T p.(Pro855Ser)	0.00001232	0.0001044
1	rs187652566	chr9:104822664C>A	c.2660G>T p.(Cys887Phe)	0.0003932	0.001469
1	rs41277767	chr9:104820060G>A	c.2970C>T p.(Val990=)	0.00003765	0.0002089
1	rs138422574	chr9:104798522C>T	c.5020G>A p.(Val1674Ile)	0.0004845	0.001780
1	rs13306077	chr9:104796059G>A	c.5376C>T (Thr1792=)	0.0024642	0.001195
3	rs142688906	chr9:104791982C>T	c.5774G>A p.(Arg1925Gln)	0.002204	0.009880
1	rs144588452	chr9:104784371C>T	c.6730G>A p.(Val2244Ile)	0.0002198	0.0004175

Примечание. Все варианты – вероятно доброкачественные.

Таблица 4. Редкие варианты гена *ABCG1*, выявленные у пациентов с нарушениями липидного обмена

Кол-во пациентов	rsID	Геномная координата (GRCh38)	Замена NM_013389.3/ белок	Частота gnomAD	Частота RUSeq
1	rs141619254	chr21:42225766G>A	c.144G>A p.(Thr46=)	0.001088	0.0002413
2	rs4148108	chr21:42225918G>A	c.292+4G>A	0.001545	0.005481
1	rs143199611	chr21:g.42284612G>A	c.793G>A p.(Ala265Thr)	0.0001834	0.0009681
1	rs138421137	chr21:42290169C>T	c.1350C>T p.(Phe450=)	0.001220	0.002301

Примечание. Все варианты – вероятно доброкачественные.

Таблица 5. Редкие варианты гена *ABCG5*, выявленные у пациентов с нарушениями липидного обмена

Кол-во пациентов	rsID	Геномная координата (GRCh38)	Замена NM_013389.3/ белок	Частота gnomAD	Частота RUSeq	Клинический эффект согласно базе данных ClinVar
3	rs56204478	chr2:43838600C>G	c.80G>C p.(Gly27Ala)	0.00308	0.004534	Вероятно доброкачественный
1	rs560839317	chr2:43838755G>A	c.–76C>T	0.0006295	–	Неопределенная клиническая значимость
1	rs373819340	chr2:43837861G>T	c.238C>A p.(Gln80Lys)	0.00007	0.0001042	
2	rs145164937	chr2:43832056G>C	c.293C>G p.(Ala98Gly)	0.00237	0.002706	Неопределенная клиническая значимость
1	rs1250295912	chr2:43831947C>T	c.402G>A p.(Gln134=)	0.000003578	0.0001044	
1	rs1044946422	chr2:43828090C>T	c.527G>A p.(Ser176Asn)	0.000007	–	Неопределенная клиническая значимость
1	rs141828689	chr2:43828024C>T	c.593G>A p.(Arg198Gln)	0.00140	0.004739	
1	rs72796720	chr2:43826460G>A	c.696C>T p.(Val232=)	0.00199	0.002380	Вероятно доброкачественный
1	rs552803459	chr2:43824988C>T	c.805G>A p.(Gly269Arg)	0.000007	–	Неопределенная клиническая значимость
1	rs150716811	chr2:43813266G>A	c.1806C>T p.(Phe602=)	0.0003297	0.0004180	Вероятно доброкачественный
5	rs140374206	chr2:43813208T>C	c.1864A>G p.(Met622Val)	0.00602	0.007414	

p.(Val1674Ile). Можно отметить, что частота двух вариантов гена *ABCA1* в российской популяции выше частоты gnomAD: rs764824326 p.(Glu450Lys) и rs138422574 p.(Val1674Ile) (см. табл. 3).

Транспортер *ABCG1* обеспечивает насыщение зрелых ЛВП холестерином для последующего транспорта в печень. Среди выявленных вариантов гена *ABCG1*, согласно базе данных RUSeq, в российской популяции чаще встречаются два варианта: rs4148108 (c.292+4G>A) и rs143199611 p.(Ala265Thr) (см. табл. 4).

Выявлено 11 вариантов в гене *ABCG5* у 18 пациентов и 7 вариантов в гене *ABCG8* у 11 пациентов, включая два патогенных (*ABCG8* rs137852987 p.(Trp361Ter) у трех и *ABCG8* rs769576789 p.(Leu572Pro) у двух пациентов) и 9 вариантов неопределенной клинической значимости (VUS) (см. табл. 5 и 6). Таким образом, патогенные варианты в гене *ABCG8* были обнаружены у пяти пациентов (3 %). Варианты неопределенной клинической

значимости rs141828689 p.(Arg198Gln) и rs145164937 p.(Ala98Gly) в гене *ABCG5*, ранее описанные у пациентов с СГХС (Totoń-Żurańska et al., 2023), в настоящем исследовании были детектированы у двух пациентов с гиперхолестеринемией и ранним началом ССЗ, при этом частота этих генетических вариантов согласно базе данных RUSeq в российской популяции выше (см. табл. 5). Однако в настоящее время недостаточно данных, чтобы классифицировать эти варианты как патогенные. Кроме того, в нашем исследовании были выявлены варианты неопределенной клинической значимости rs1167870780 p.(Leu195Gln), rs776335488 p.(Ser569Pro) и rs113005049 p.(Ala642Thr). Варианты rs1167870780 p.(Leu195Gln) и rs776335488 p.(Ser569Pro) были описаны у пациентов с ситостеролиемией (Meašić et al., 2021; Chubykina et al., 2025), вариант rs113005049 p.(Ala642Thr) – у пациента с СГХС (Averkova et al., 2018). Варианты в гене *ABCG8* rs776335488 p.(Ser569Pro), rs189249032 p.(Tyr613His) и

Таблица 6. Редкие варианты гена *ABCG8*, выявленные у пациентов с нарушениями липидного обмена

Кол-во пациентов	rsID	Геномная координата (GRCh38)	Замена NM_013389.3/ белок	Частота gnomAD	Частота RUSeq	Клинический эффект согласно базе данных ClinVar
1	rs1167870780	chr2:43852376T>A	c.584T>A p.(Leu195Gln)	0.000003810	–	Неопределенная клиническая значимость
3	rs137852987	chr2:43872094G>A	c.1083G>A p.(Trp361Ter)	0.00102	0.0005935	Патогенный
1	rs115227860	chr2:43873940C>T	c.1365C>T p.(Ile455=)	0.00169	0.0003131	Вероятно доброкачественный
1	rs776335488	chr2:43875362T>C	c.1705T>C p.(Ser569Pro)	0.00001	0.0003132	Неопределенная клиническая значимость
2	rs769576789	chr2:43875372T>C	c.1715T>C p.(Leu572Pro)	0.00007	0.0005924	Патогенный
1	rs189249032	chr2:43877641T>C	c.1837T>C p.(Tyr613His)	0.00006	0.0002962	Неопределенная клиническая значимость
2	rs113005049	chr2:43877815G>A	c.1924G>A p.(Ala642Thr)	0.0008841	0.008137	

Таблица 7. Редкие варианты гена *NPC1L1*, выявленные у пациентов с нарушениями липидного обмена

Вариант	Кол-во пациентов	Уровень ОХС плазмы крови, ммоль/л	Уровень ХС-ЛНП в плазме крови, ммоль/л	Проявления атеросклероза	Частота gnomAD	Частота RUSeq
Гаплотип p.(Val177Ile) /p.(His221Tyr) /p.(Ala271Phe) [§]	13 взрослых 6 детей	8.5 ± 0.9 7.3 ± 0.9	6.2 ± 1.3 5.8 ± 0.8	у 7 из 13 (54 %) взрослых	0.0063*	0.042*
Гаплотип p.(His221Tyr) /p.(Ala271Phe)	2 взрослых 1 ребенок	8.7 8.0 6.9	6.2 4.9 4.3	Нет	–	–
rs375614485 chr7:44541254C>T c.6G>A p.(Ala2=)	1	5.1	3.4	Да	0.0018	0.0015
rs116204045 chr7:44539876C>T c.521G>A p.(Arg174His)	2	9.1 9.1	6.8 7.4	Нет	0.0009	0.0011
rs757263723 chr7:g.44538977G>A c.1420C>T p.(Pro474Ser)	1	–	–	–	0.00001	–
rs758137107 chr7:44534597C>T c.2016G>A p.(Gly672=)	1	9.3	5.5	Да	0.0003	0.0005
rs137889714 chr7:44533515G>A c.2325C>T p.(Thr775=)	2	10.0 9.3	7.0 6.6	Да	0.0005	0.0022
chr7:44533487G>A c.2353C>T p.(Leu785Phe)	1 ребенок	6.7	–	–	–	–

Примечание. ОХС – общий холестерин; ХС-ЛНП – холестерин в составе липопротеинов низкой плотности.
[§] Сочетанное носительство вариантов chr7:44539868C>T c.529G>A p.(Val177Ile) (rs149017550), chr7:44539736G>A c.661C>T p.(His221Tyr) (rs114376659) и chr7:44539585_44539586GC>AA c.811_812delinsTT p.(Ala271Phe) (rs117724326/rs139533378).
* Указана частота для rs149017550 chr7: 44539868C>T c.529G>A p.(Val177Ile).

rs113005049 p.(Ala642Thr), а также патогенный вариант rs769576789 p.(Leu572Pro) встречаются в российской популяции на порядок чаще, чем указано в базе данных gnomAD (см. табл. 6).

У 29 пациентов было выявлено девять вариантов в гене *NPC1L1* (см. табл. 7). 19 пациентов были носителями трех вариантов p.(Val177Ile), p.(His221Tyr) и p.(Ala271Phe), которые, как мы предполагаем, неравновесно сцеплены и составляют гаплотип (Fath et al., 2020), характеризующийся повышенной частотой носительства для российской популяции (см. табл. 7). Это предположение подтверждается результатами проведенного секвенирования по Сэнгеру двух семей, в которых для анализа были доступны родственники пациентов (рис. 2). Также нами

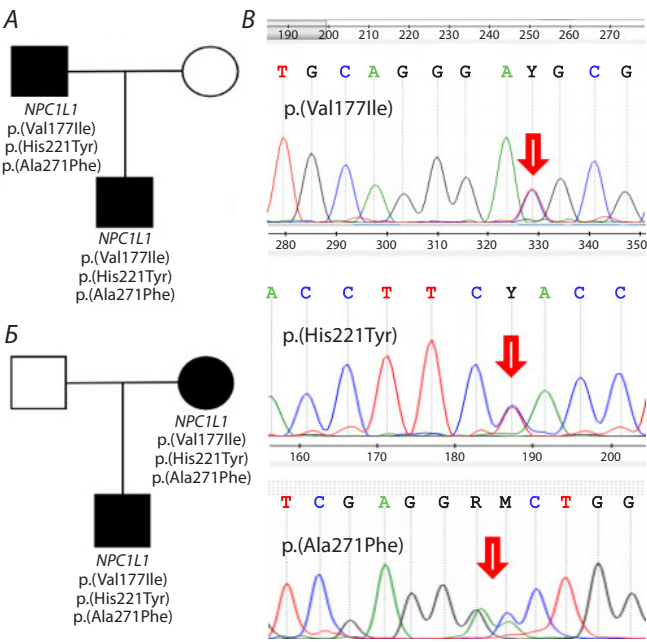


Рис. 2. Секвенирование по Сэнгеру для двух семейных случаев носительства гаплотипа p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) в гене *NPC1L1*.

А, Б – родословные пациентов, носителей гаплотипа p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) в гене *NPC1L1*; В – пример верификации входящих в гаплотип вариантов p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe).

идентифицирован один гомозиготный носитель гаплотипа p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) гена *NPC1L1*. Надо отметить, что описанные в базе данных однонуклеотидные замены rs117724326 p.(Ala271Val) (частота согласно RUSeq 0.04729) и rs139533378 p.(Ala271Ser) (частота согласно RUSeq 0.04729) в соседних нуклео-

тидах на самом деле являются одним вариантом с.811_812delinsTT p.(Ala271Phe) (рис. 3). Как правило, гаплотип p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) гена *NPC1L1* встречается у пациентов, у которых не удается подтвердить моногенную дислипидемию. В нашем исследовании только у одного носителя данного гаплотипа была также мутация в гене *LDLR*.

Оценка вклада варианта p.(Val177Ile) гена *NPC1L1* в развитие атеросклероза

Варианты p.(Val177Ile), p.(His221Tyr) и p.(Ala271Phe) гена *NPC1L1* расположены в N-концевом домене белка NPC1L1, который ответственен за связывание холестерина (Hu et al., 2021). Носительство данного гаплотипа может приводить к усилению абсорбции холестерина в кишечнике и быть ассоциировано с развитием дислипидемии и атеросклероза артерий (Fath et al., 2020). Для варианта p.(Val177Ile) гена *NPC1L1* была разработана методика идентификации на основе ПЦР и рестрикционного анализа. Генотипирование было проведено в группе пациентов с атеросклерозом различной локализации, а также в контрольной группе лиц (табл. 8).

Частота варианта p.(Val177Ile) гена *NPC1L1* в контрольной группе составила 0.043, что совпало с частотой в базе данных RUSeq (0.042). В группе пациентов с атеросклерозом частота (0.067) была выше, чем в контрольной группе, однако различия не достигли статистической значимости. При проведении регрессионного анализа с использованием всего массива данных, учитывающего дополнительно такие факторы, как пол, возраст, наличие атеросклероза, нам также не удалось показать связь варианта p.(Val177Ile) гена *NPC1L1* с развитием атеросклероза на фоне дислипидемии. Такой результат может быть связан с недостаточным размером рассматриваемых выборок, требуются дальнейшие исследования.

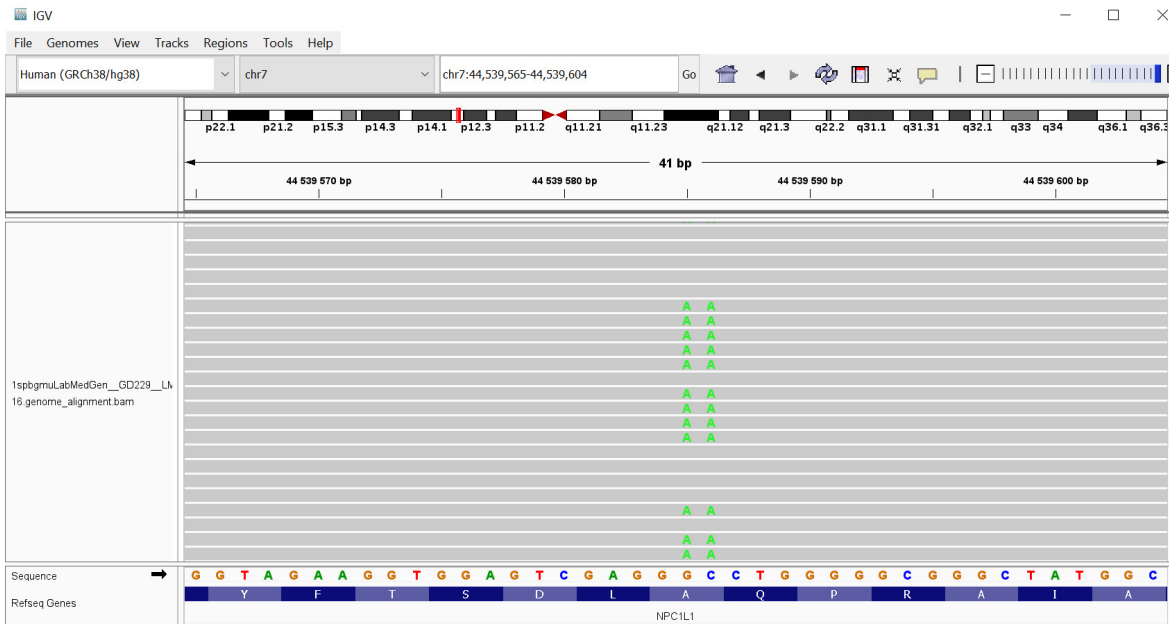


Рис. 3. Результаты NGS-секвенирования варианта p.(Ala271Phe) в гене *NPC1L1* (bam-файл).

Таблица 8. Сравнение частоты встречаемости варианта rs149017550 p.(Val177Ile) гена *NPC1L1* во всех исследуемых группах

Генотип	Гомозигота GG (Val/Val)	Носитель варианта p.(Val177Ile) (из них гомозигота по данному варианту)	Частота варианта p.(Val177Ile)
Контрольная группа, N = 234	214	20 (0)	0.043
Группа пациентов с атеросклерозом, N = 209	182	27 (1)*	0.067
Группа пациентов с нарушениями липидного обмена (данные секвенирования), N = 169	150	19 (1)**	0.059

* $p = 0.136$ при сравнении с контрольной группой; группы сопоставимы по возрасту и полу.
** $p = 0.366$ при сравнении с контрольной группой; группы не сопоставимы по возрасту и полу.

Обсуждение

Ввиду высокой распространенности ССЗ остается актуальным вопрос влияния различных факторов на развитие патологических процессов. Существенный генетический вклад в прогрессирование ССЗ свидетельствует о перспективности уточнения статуса редких вариантов, ассоциированных с накоплением липидов и последующим поражением сосудов (Мешков и др., 2022). Сложность генетической архитектуры дислипидемий определяет важность внедрения современных диагностических подходов для скрининга и раннего выявления носителей редких генетических вариантов (Kalwick, Roth, 2025).

Наиболее распространенная наследственная дислипидемия – это СГХС (Мирошникова и др., 2023). СГХС – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся высоким уровнем холестерина и ХС-ЛНП в плазме крови. К отличительным фенотипическим проявлениям СГХС относятся ксантомы, ксантелазмы и липидные дуги роговицы. Генодиагностика у пациентов с СГХС позволяет выявить только 40–60 % случаев с моногенным характером заболевания (Medeiros et al., 2024; Мирошникова и др., 2025). Распространенность СГХС варьирует от 1:250 до 1:173 в зависимости от популяции (Meshkov et al., 2021; Toft-Nielsen et al., 2022). Встречаются более редкие моногенные дислипидемии, такие как дефицит липопротеинлипазы (Hegele et al., 2015), дисбеталипопротеинемия (Heidemann et al., 2022), сидостеролемия (Miroshnikova et al., 2023) и другие (Иванова и др., 2020). Остальные случаи нарушений липидного обмена могут носить полигенный характер (Futema et al., 2015).

Как показано в GWAS-исследованиях, частые генетические варианты играют важную роль в формировании предрасположенности к нарушению липидного обмена (Ripatti et al., 2016), однако редкие и низкочастотные варианты тоже могут вносить весомый вклад в развитие дислипидемии с последующим прогрессированием атеросклероза (Hindy et al., 2022). Популяционно-специфический характер распределения генетических вариантов определяет важность проведения оценки частоты для каждой популяции отдельно (Read et al., 2021; Senfleber et al., 2024; Fan et al., 2025). Так, в данном исследовании был изучен спектр редких вариантов (частота gnomAD менее 1 %) в генах транспортеров холестерина *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8* и *NPC1L1* у пациентов с нарушениями липидного обмена в популяции Северо-Западного региона России.

Был выявлен ряд вариантов в генах *ABCG5* и *ABCG8*, ранее описанных у пациентов с СГХС или сидостеролемией (*ABCG5* rs141828689 (p.Arg198Gln); *ABCG8* rs776335488 p.(Ser569Pro), rs769576789 p.(Leu572Pro), rs189249032 p.(Tyr613His), rs113005049 p.(Ala642Thr)), некоторые оказались более распространенными в российской популяции (см. табл. 5 и 6). Гомозиготные и компаунд-гетерозиготные патогенные варианты в этих генах приводят к развитию редкого аутосомно-рецессивного заболевания сидостеролемии, частота которого оценивается как 1:200000 (Пшеничникова и др., 2024). Заболевание характеризуется повышением в крови концентрации растительных стеролов, а также ОХС и ХС-ЛНП. У пациентов с сидостеролемией часто наблюдаются ксантомы и раннее развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, клиническая картина заболевания схожа с СГХС. Гетерозиготное носительство варианта в генах *ABCG5* или *ABCG8* не приводит к развитию сидостеролемии, но может повышать риск развития гиперхолестеринемии (Reeskamp et al., 2020). В нашей работе гетерозиготные носители патогенных и вероятно патогенных вариантов в генах *ABCG5* и *ABCG8* составили 3 %, что согласуется с данными зарубежных авторов (Reeskamp et al., 2020; Medeiros et al., 2024).

Проведенное исследование позволило нам обратить внимание на повышенную частоту гаплотипа p.(Val177Ile)/p.(His221Tyr)/p.(Ala271Phe) гена *NPC1L1* как у пациентов с нарушениями липидного обмена в Северо-Западном регионе России, так и в целом в российской популяции. Активное изучение транспортера *NPC1L1* обусловлено возможностью терапии дислипидемий. В настоящее время широко применяется препарат эзетимиб – ингибитор *NPC1L1*, блокирующий абсорбцию холестерина в кишечнике. Эзетимиб является аллостерическим ингибитором *NPC1L1*, вызывающим образование «закрытой» конформации транспортера, что приводит к нарушению связывания с холестерином (Valdivia et al., 2023). Полиморфные варианты в гене *NPC1L1*, как было показано, обуславливают межиндивидуальные различия чувствительности к эзетимибу (Liao et al., 2022), а также могут приводить к полному отсутствию ответа (Mauriello et al., 2023). Поэтому важной задачей становится изучение генетических вариантов *NPC1L1* как факторов риска развития дислипидемии и фармакогенетических маркеров для прогнозирования эффективности гиполлипидемической терапии (Liao et al., 2022). Как правило, варианты в этом гене

ассоциированы со снижением активности белка и поэтому являются протективными, однако известны варианты, для которых характерно увеличение всасывания холестерина, как, например, р.(Arg174His), который был идентифицирован нами у двух пациентов (Mokhtar et al., 2022).

Замены р.(Arg174His), р.(Val177Ile), р.(His221Tyr), р.(Ala271Phe) располагаются в N-концевом домене белка NPC1L1, играющем ключевую роль в захвате холестерина (Valdivia et al., 2023; Yoon et al., 2023). Ранее уже была продемонстрирована вариабельность всасывания холестерина и уровня ХС-ЛНП в плазме крови в зависимости от совокупности редких вариантов в гене *NPC1L1* (Simonen et al., 2023). В исследовании F. Fath с коллегами варианты р.(Val177Ile), р.(His221Tyr) и р.(Ala271Phe) гена *NPC1L1* были описаны у одного пациента с гиперхолестеринемией, и их сочетание классифицировано авторами как возможная причина заболевания (Fath et al., 2020), что согласуется с нашими данными. Для российской популяции была показана популяционная специфичность гаплотипа р.(Val177Ile)/р.(His221Tyr)/р.(Ala271Phe): он является не редким, а скорее полиморфным. Мы также впервые оценили вклад одного из вариантов, составляющего данный гаплотип, р.(Val177Ile), в развитие атеросклероза. Однако различия частот генотипов у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе не достигли статистической значимости, что не позволяет сделать вывод о влиянии варианта р.(Val177Ile) гена *NPC1L1* на развитие атеросклероза. Полученные результаты не свидетельствуют об однозначном отсутствии вклада как отдельного варианта, так и гаплотипа р.(Val177Ile)/р.(His221Tyr)/р.(Ala271Phe) гена *NPC1L1* в полигенный фон, поэтому расширение размера изучаемой выборки может позволить точнее верифицировать значимость данных вариантов. Необходимы дальнейшие исследования для изучения влияния отдельных вариантов и гаплотипа на полигенный риск развития гиперхолестеринемии и эффективность лечения эзетимибом.

Заключение

В настоящее время при отсутствии у пациента моногенных вариантов предполагается полигенная гиперхолестеринемия, при которой накопление частых и редких генетических вариантов с небольшим эффектом может приводить к развитию дислипидемии. В работе был изучен спектр редких вариантов в генах транспортеров холестерина *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8* и *NPC1L1* у пациентов с нарушением липидного обмена, которым проводилась генетическая диагностика. Наши результаты указывают на более высокую частоту некоторых редких вариантов в этих генах, в частности *NPC1L1*, в российской популяции, однако для выявления их вклада в риск ССЗ требуется оценка их распространенности на расширенных группах пациентов. Необходимы дополнительные исследования для создания популяционно-специфических шкал генетического риска, которые могли бы учитывать суммарный вклад рискованных и протективных аллелей в генах, связанных с липидным обменом, и использоваться для прогнози-

рования индивидуального риска развития дислипидемии и сердечно-сосудистых заболеваний.

Ограничение исследования. К ограничениям исследования следует отнести сравнительно небольшой размер выборки для изучения популяционных особенностей распространения генетических вариантов и особенности формирования самих выборок. В частности, в первую выборку были включены лица с выраженной дислипидемией, которым показано проведение генетического тестирования. Следовательно, в данной выборке доля лиц с моногенными формами дислипидемии, в первую очередь СГХС, была достаточно высока и составила 30 %. С другой стороны, можно отметить, что гаплотип р.(Val177Ile)/р.(His221Tyr)/р.(Ala271Phe) гена *NPC1L1* за исключением одного пациента выявлялся только у лиц, у которых не установлена моногенная причина дислипидемии. Ограничением для выборок, используемых на втором этапе исследования, является формирование группы пациентов с атеросклерозом по принципу наличия заболевания, безотносительно, имели ли пациенты изначально дислипидемию, поскольку длительность и эффективность лечения статинами в большинстве случаев было сложно отследить.

Список литературы / References

- Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., ... Балахонова 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., ... Balakhonova T.V., Filippov A.E., Akhmedzhanov N.M., Aleksandrova O.Yu., Lipovetsky B.M. Clinical guidelines for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2019;15(1):58-98 (in Russian)]
- Иванова О.Н., Васильев П.А., Захарова Е.Ю. Молекулярные основы первичных моногенных дислипидемий. *Медицинская генетика*. 2020;19(12):4-17. doi 10.25557/2073-7998.2020.12.4-17
- [Ivanova O.N., Vasiliev P.A., Zakharova E.Y. Molecular basis of primary monogenic dyslipidemia. *Medical Genetics*. 2020;19(12):4-17. doi 10.25557/2073-7998.2020.12.4-17 (in Russian)]
- Кухарчук В.В., Ежов М.В., Сергиенко И.В., Арабидзе Г.Г., Бубнова М.Г., Балахонова Т.В., Гуревич В.С., ... Соколов А.А., Сумароков А.Б., Горнякова Н.Б., Обрезан А.Г., Шапошник И.И. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации, VII пересмотр. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2020;1(38):7-40. doi 10.34687/2219-8202.JAD.2020.01.0002
- [Kukharchuk V.V., Ezhov M.V., Sergienko I.V., Arabidze G.G., Bubnova M.G., Balakhonova T.V., Gurevich V.S., ... Sokolov A.A., Sumarokov A.B., Gornyakova N.B., Obrezan A.G., Shaposhnik I.I. Diagnosis and correction of lipid metabolism disorders in order to prevent and treat atherosclerosis. Russian recommendations VII revision. *J Atherosclerosis Dyslipidemias*. 2020;1(38):7-40. doi 10.34687/2219-8202.JAD.2020.01.0002 (in Russian)]
- Мешков А.Н., Киселева А.В., Ершова А.И., Сотникова Е.А., Сметнев С.А., Лимонова А.С., Жарикова А.А., Зайченко М., Раменский В.Е., Драпкина О.М. Варианты генов *ANGPTL3*, *ANGPTL4*, *APOA5*, *APOB*, *APOC2*, *APOC3*, *LDLR*, *PCSK9*, *LPL* и риск ишемической болезни сердца. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(10):22-26. doi 10.15829/1560-4071-2022-5232
- [Meshkov A.N., Kiseleva A.V., Ershova A.I., Sotnikova E.A., Smetnev S.A., Limonova A.S., Zharikova A.A., Zaichenok M., Ramensky V.E., Drapkina O.M. *ANGPTL3*, *ANGPTL4*, *APOA5*, *APOB*, *APOC2*, *APOC3*, *LDLR*, *PCSK9*, *LPL* gene variants and coronary

- artery disease risk. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(10):22-26. doi 10.15829/1560-4071-2022-5232 (in Russian)]
- Мирошникова В.В., Пчелина С.Н., Донников М.Ю., Воробьев А.С., Цай В.В., Коваленко Л.В., Глотов О.С. Генетическое тестирование в кардиологии с помощью NGS панели: от оценки риска заболевания до фармакогенетики. *Фармакогенетика и фармакогеномика*. 2023;1:7-19. doi 10.37489/2588-0527-2023-1-7-19 [Miroshnikova V.V., Pchelina S.N., Donnikov M.Yu., Vorobyev A.S., Tsai V.V., Kovalenko L.V., Glotov O.S. The NGS panel for genetic testing in cardiology: from the evaluation of disease risk to pharmacogenetics. *Farmakogenetika i Farmakogenomika = Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*. 2023;1:7-19. doi 10.37489/2588-0527-2023-1-7-19 (in Russian)]
- Мирошникова В.В., Изюмченко А.Д., Музалевская М.В., Легостаева К.В., Грунина М.Н., Драчева К.В., Уразгильдеева С.А., Беркович О.А., Баранова Е.И., Глотов О.С., Куликов А.Н., Гуревич В.С., Пчелина С.Н. Генетическая архитектура семейной гиперхолестеринемии на примере когорты жителей Санкт-Петербурга. *Российский кардиологический журнал*. 2025;30(10):87-94. doi 10.15829/1560-4071-2025-6432 [Miroshnikova V.V., Izyumchenko A.D., Muzalevskaya M.V., Legostaeva K.V., Grunina M.N., Dracheva K.V., Urazgildeeva S.A., Berkovich O.A., Baranova E.I., Glotov O.S., Kulikov A.N., Gurevich V.S., Pchelina S.N. Genetic architecture of familial hypercholesterolemia: a cohort of St. Petersburg residents. *Russian Journal of Cardiology*. 2025;30(10):87-94. doi 10.15829/1560-4071-2025-6432 (in Russian)]
- Пшеничникова И.И., Захарова И.Н., Корчагина Ю.В., Пупкина В.В., Окулова О.А., Тележникова Н.Д., Васильев П.А., Иванова О.Н., Баранова П.В., Захарова Е.Ю., Ежов М.В. Ситостеролемиа (фитостеролемиа): выявление, лечение и прогноз. *Медицинский совет*. 2024;18(19):198-205. doi 10.21518/ms2024-432 [Pshenichnikova I.I., Zakharova I.N., Korchagina Yu.V., Pupykina V.V., Okulova O.A., Teleznikova N.D., Vasiliev P.A., Ivanova O.N., Baranova P.V., Zakharova E.Yu., Ezhov M.V. Sitosterolemia (phytosterolemia): diagnosis, treatment, and prognosis. *Meditinskiy Sovet = Medical Council*. 2024;18(19):198-205. doi 10.21518/ms2024-432 (in Russian)]
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., ... 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., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., ... 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). *Med Genet*. 2019;18(2):3-23. doi 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23 (in Russian)]
- Averkova A.O., Brazhnik V.A., Speshilov G.I., Rogozhina A.A., Koroleva O.S., Zubova E.A., Galyavich A.S., Tereshenko S.N., Boyeva O.I., Zateyshchikov D.A. Targeted sequencing in patients with clinically diagnosed hereditary lipid metabolism disorder and acute coronary syndrome. *Bull Rus State Med Univ*. 2018;5:80-86. doi 10.24075/brsmu.2018.061
- Barbitoff Y.A., Khmelkova D.N., Pomerantseva E.A., Slepchenkov A.V., Zubashenko N.A., Mironova I.V., Kaimonov V.S., ... Aseev M.V., Shcherbak S.G., Glotov O.S., Isaev A.A., Predeus A.V. Expanding the Russian allele frequency reference via cross-laboratory data integration: insights from 7452 exome samples. *Natl Sci Rev*. 2024;11(10):nwae326. doi 10.1093/nsr/nwae326
- Chubykina U., Vasiluev P., Ivanova O., Ezhov M. The mysterious masks of hypercholesterolemia: a unique clinical case. *Circulation*. 2025;151(11):799-803. doi 10.1161/CIRCULATIONAHA.124.071638
- Cross B., Turner R., Pirmohamed M. Polygenic risk scores: an overview from bench to bedside for personalised medicine. *Front Genet*. 2022;13:1000667. doi 10.3389/fgene.2022.1000667
- Danilova I., Rau R., Barbieri M., Grigoriev P., Jdanov D.A., Meslé F., Vallin J., Shkolnikov V.M. Subnational consistency in cause-of-death data: the cases of Russia, Germany, the United States, and France. *Population*. 2021;76(4):645-674. doi 10.3917/popu.2104.0693
- Fan H.Y., Tsai M.C., Lai C.J., Yeh C.L., Hsu H.Y., Lai P.J., Hsu H.C., Su T.C., Lin H.J., Lin Y.F., Lu T.P., Chien K.L. Genetic variants in severe hypertriglyceridemia among Taiwanese participants – insights from genome-wide association and whole-exome sequencing analysis. *Circ J*. 2025;89(3):331-339. doi 10.1253/circj.CJ-24-0491
- Fath F., Bengeser A., Barresi M., Binner P., Schwab S., Ray K.K., Krämer B.K., Fraass U., März W. FH ALERT: a feasibility study of a novel approach to identify patients with familial hypercholesterolemia. *Res Square*. 2020. doi 10.21203/rs.3.rs-108034/v1
- Futema M., Shah S., Cooper J.A., Li K.W., Whittall R.A., Sharifi M., Goldberg O., ... Roeters van Lennep J.E., Sijbrands E.J.G., Whittaker J.C., Talmud P.J., Humphries S.E. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem*. 2015;61(1):231-238. doi 10.1373/clinchem.2014.231365
- Ghaleb Y., Elbitar S., Philippi A., El Khoury P., Azar Y., Andrianirina M., Loste A., ... Deleuze J.F., Rabès J.P., Boileau C., Abifadel M., Varret M. Whole exome/genome sequencing joint analysis of a family with oligogenic familial hypercholesterolemia. *Metabolites*. 2022;12(3):262. doi 10.3390/metabo12030262
- Hegele R.A., Ban M.R., Cao H., McIntyre A.D., Robinson J.F., Wang J. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(2):103-113. doi 10.1097/MOL.0000000000000163
- Heidemann B.E., Koopal C., Baass A., Defesche J.C., Zuurbier L., Mulder M.T., Roeters van Lennep J.E., Riksen N.P., Boot C., Marais A.D., Visseren F.L.J. Establishing the relationship between familial dysbetalipoproteinemia and genetic variants in the *APOE* gene. *Clin Genet*. 2022;102(4):253-261. doi 10.1111/cge.14185
- Heron M. Deaths: leading causes for 2018. *National Vital Stat Rep*. 2021;70(4):1-115. doi 10.15620/cdc:104186
- Hindy G., Dornbos P., Chaffin M.D., Liu D.J., Wang M., Selvaraj M.S., Zhang D., ... Willer C.J., Natarajan P., Flannick J.A., Khera A.V., Peloso G.M. Rare coding variants in 35 genes associate with circulating lipid levels – a multi-ancestry analysis of 170,000 exomes. *Am J Hum Genet*. 2022;109(1):81-96. doi 10.1016/j.ajhg.2021.11.021
- Hu M., Yang F., Huang Y., You X., Liu D., Sun S., Sui S.F. Structural insights into the mechanism of human NPC1L1-mediated cholesterol uptake. *Sci Adv*. 2021;7(29):eabg3188. doi 10.1126/sciadv.abg3188
- Kalwick M., Roth M. A comprehensive review of the genetics of dyslipidemias and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nutrients*. 2025;17(4):659. doi 10.3390/nu17040659
- Koseki M., Yamashita S., Ogura M., Ishigaki Y., Ono K., Tsukamoto K., Hori M., Matsuki K., Yokoyama S., Harada-Shiba M. Current diagnosis and management of tangier disease. *J Atheroscler Thromb*. 2021;28(8):802-810. doi 10.5551/jat.RV17053
- Li W., Wang Y., Huang R., Lian F., Xu G., Wang W., Xue S. Rare and common coding variants in lipid metabolism-related genes and their association with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord*. 2024;24(1):97. doi 10.1186/s12872-024-03759-5
- Liao J., Yang L., Zhou L., Zhao H., Qi X., Cui Y., Ouyang D. The *NPC1L1* gene exerts a notable impact on the reduction of low-density lipoprotein cholesterol in response to hyzetimibe: a factorial-designed clinical trial. *Front Pharmacol*. 2022;13:755469. doi 10.3389/fphar.2022.755469
- Mauriello A., Ascrizzi A., Molinari R., Falco L., Caturano A., D'Andrea A., Russo V. Pharmacogenomics of cardiovascular drugs for atherothrombotic, thromboembolic and atherosclerotic risk. *Genes*. 2023;14(11):2057. doi 10.3390/genes14112057

- McPherson R., Tybjaerg-Hansen A. Genetics of coronary artery disease. *Circ Res.* 2016;118(4):564-578. doi 10.1161/CIRCRESAHA.115.306566
- Meašić A.M., Bobinec A., Sansović I., Boban L., Pavić A.M., Pušeljić S., Barišić I. 96 homozygous ABCG8 mutation in a 14-year-old boy with sitosterolemia. *Arch Dis Child.* 2021;106(Suppl.2):A1-A216
- Medeiros A.M., Alves A.C., Miranda B., Chora J.R., Bourbon M., Rato Q., Gaspar A., ... Correia S., Vassalo T., Pack T., Martins V., Vieira V.F. Unraveling the genetic background of individuals with a clinical familial hypercholesterolemia phenotype. *J Lipid Res.* 2024;65(2):100490. doi 10.1016/j.jlr.2023.100490
- Meshkov A.N., Ershova A.I., Kiseleva A.V., Shalnova S.A., Drapkina O.M., Boytsov S.A.; on behalf of the FH-ESSE-RF investigators. The prevalence of heterozygous familial hypercholesterolemia in selected regions of the Russian Federation: the FH-ESSE-RF study. *J Pers Med.* 2021;11(6):464. doi 10.3390/jpm11060464
- Miroshnikova V.V., Vasiliev P.A., Linkova S.V., Soloviev V.M., Ivanova O.N., Tolmacheva E.R., Udalova V.Y., ... Grunina M.N., Smirnova N.N., Kuchina A.S., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. Pediatric patients with sitosterolemia: next-generation sequencing and biochemical examination in clinical practice. *J Pers Med.* 2023;13(10):1492. doi 10.3390/jpm13101492
- Mokhtar F.B.A., Plat J., Mensink R.P. Genetic variation and intestinal cholesterol absorption in humans: a systematic review and a gene network analysis. *Prog Lipid Res.* 2022;86:101164. doi 10.1016/j.plipres.2022.101164
- Musunuru K., Kathiresan S. Surprises from genetic analyses of lipid risk factors for atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):579-585. doi 10.1161/CIRCRESAHA.115.306398
- Pan-Lizcano R., Mariñas-Pardo L., Núñez L., Rebollal-Leal F., López-Vázquez D., Pereira A., Molina-Nieto A., Calviño R., Vázquez-Rodríguez J.M., Hermida-Prieto M. Rare variants in genes of the cholesterol pathway are present in 60 % of patients with acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):16127. doi 10.3390/ijms232416127
- Prasad K., Mishra M. Mechanism of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. *Rev Cardiovasc Med.* 2022;23(6):212. doi 10.31083/j.rcm2306212
- Read R.W., Schlauch K.A., Lombardi V.C., Cirulli E.T., Washington N.L., Lu J.T., Grzymalski J.J. Genome-wide identification of rare and common variants driving triglyceride levels in a Nevada population. *Front Genet.* 2021;12:639418. doi 10.3389/fgene.2021.639418
- Reeskamp L.F., Volta A., Zuurbier L., Defesche J.C., Hovingh G.K., Grefhorst A. ABCG5 and ABCG8 genetic variants in familial hypercholesterolemia. *J Clinical Lipidology.* 2020;14(2):207-217.e7. doi 10.1016/j.jacl.2020.01.007
- Ripatti P., Rämö J.T., Söderlund S., Surakka I., Matikainen N., Pirinen M., Pajukanta P., ... Wilson R.K., Palotie A., Freimer N.B., Taskinen M.R., Ripatti S. The contribution of GWAS loci in familial dyslipidemias. *PLoS Genet.* 2016;12(5):e1006078. doi 10.1371/journal.pgen.1006078
- Roberts R., Chang C.C., Hadley T. Genetic risk stratification: a paradigm shift in prevention of coronary artery disease. *JACC Basic Transl Sci.* 2021;6(3):287-304. doi 10.1016/j.jacbs.2020.09.004
- Senftleber N.K., Andersen M.K., Jørsboe E., Stæger F.F., Nøhr A.K., Garcia-Erill G., Meisner J., ... Jørgensen M.E., Zeggini E., Moltke I., Hansen T., Albrechtsen A. GWAS of lipids in Greenlanders finds association signals shared with Europeans and reveals an independent PCSK9 association signal. *Eur J Hum Genet.* 2024;32(2):215-223. doi 10.1038/s41431-023-01485-8
- 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
- Shim S.Y., Yoon H.Y., Yee J., Han J.M., Gwak H.S. Association between ABCA1 gene polymorphisms and plasma lipid concentration: a systematic review and meta-analysis. *J Pers Med.* 2021;11(9):883. doi 10.3390/jpm11090883
- Simonen P., Öörni K., Sinisalo J., Strandberg T.E., Wester L., Gylling H. High cholesterol absorption: a risk factor of atherosclerotic cardiovascular diseases? *Atherosclerosis.* 2023;376:53-62. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.003
- Tada H., Kojima N., Takamura M., Kawashiri M.A. Sitosterolemia. *Adv Clin Chem.* 2022;110:145-169. doi 10.1016/bs.acc.2022.06.006
- Toft-Nielsen F., Emanuelsson F., Benn M. Familial hypercholesterolemia prevalence among ethnicities – systematic review and meta-analysis. *Front Genet.* 2022;13:840797. doi 10.3389/fgene.2022.840797
- Tokgozoglu L., Kayikcioglu M. Familial hypercholesterolemia: global burden and approaches. *Curr Cardiol Rep.* 2021;23(10):151. doi 10.1007/s11886-021-01565-5
- Totoń-Zurańska J., Wołkow P., Kapusta M., Wójcik M., Starzyk J., Kawalec E., Idzior-Waluś B., Waluś-Miarka M. Targeted sequencing of a gene panel in patients with familial hypercholesterolemia from Southern Poland. *Pol Arch Intern Med.* 2023;133(6):16417. doi 10.20452/pamw.16417
- Valdivia A., Luque F.J., Llabrés S. Binding of cholesterol to the N-terminal domain of the NPC1L1 transporter: analysis of the epimerization-related binding selectivity and loop mutations. *J Chem Inf Model.* 2023;64(1):189-204. doi 10.1021/acs.jcim.3c01319
- Yoon H.J., Lee Y., Jeong J., Jang S., Lee H.H., Kim G.S. Binding free energy of several sterols to the N-terminal domain of Niemann-Pick C1-like 1 protein due to mutation: molecular dynamics study. *J Chin Chem Soc.* 2023;70(3):539-546. doi 10.1002/jccs.202200315
- Yu X.H., Tang C.K. ABCA1, ABCG1, and cholesterol homeostasis. In: Zheng L. (Ed.) HDL Metabolism and Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1377. Springer, Singapore, 2022;95-107. doi 10.1007/978-981-19-1592-5_7
- Zhang R., Liu W., Zeng J., Meng J., Shi L., Yang S., Chang J., Wang C., Xing K., Wen J., Liu N., Liang B., Xing D. Recent advances in the screening methods of NPC1L1 inhibitors. *Biomed Pharmacother.* 2022;155:113732. doi 10.1016/j.biopha.2022.113732

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.10.2025. После доработки 15.01.2026. Принята к публикации 17.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-21

Математическое и компьютерное моделирование биологических систем на разных иерархических уровнях организации

С.А. Лашин , Р.А. Иванов , Ю.Г. Матушкин 

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

 lashin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Современная биология все в большей степени опирается на математическое и компьютерное моделирование для описания сложных иерархически организованных биосистем. В данном обзоре рассматриваются математические модели, охватывающие основные уровни биологической организации – от молекулярно-генетического и клеточного до тканевого/органный, организменного, популяционного и экологического. Цель работы состоит в систематизации ключевых подходов к моделированию на каждом из этих уровней, анализе их возможностей и ограничений, а также в обсуждении стратегий построения многомасштабных и гибридных моделей, связывающих воедино процессы разных пространственно-временных масштабов. Рассматриваются классические детерминированные и стохастические модели на основе дифференциальных уравнений в частных производных, логические и графовые модели регуляторных сетей, клеточные автоматы, агентно-ориентированные и индивидуально-ориентированные модели и подходы, базирующиеся на балансе потоков. Приводятся типичные примеры моделирования молекулярно-генетических сетей, метаболизма и хемотаксиса, роста тканей и органов, динамики популяций и генетической структуры, а также функционирования экосистем. Особое внимание уделяется сопоставлению подходов по критериям масштабов описания, сложности моделируемых процессов, доступности исходных данных, вычислительной трудоемкости и интерпретируемости результатов. Обзор обобщает отечественный и зарубежный опыт, подчеркивая вклад российских и, в частности, новосибирских коллективов в развитие гибридных методов моделирования, построения многомасштабных моделей и реализации программных платформ для системной биологии. В результате проведенного анализа показано, что гибридные и многомасштабные модели позволяют наиболее полно учесть нелинейность, стохастичность и структурную неоднородность биологических систем, но требуют значительных вычислительных ресурсов и тщательной калибровки по данным. Отмечаются методические и программно-технологические тенденции, включая развитие специализированных платформ и репозитория моделей, средств стандартизации описания и повторного использования модельных компонентов.

Ключевые слова: математическое моделирование; биологические системы; многомасштабные модели; компьютерная биология

Для цитирования: Лашин С.А., Иванов Р.А., Матушкин Ю.Г. Математическое и компьютерное моделирование биологических систем на разных иерархических уровнях организации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026; 30(3):502-514. doi 10.18699/vjgb-26-21

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2025-0032.

Mathematical and computational modeling of biosystems at different levels of organization

S.A. Lashin , R.A. Ivanov , Y.G. Matushkin 

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

 lashin@bionet.nsc.ru

Abstract. Modern biology increasingly relies on mathematical and computational modeling to describe complex hierarchically organized biological systems. This review considers models that cover the main levels of biological organization, from the molecular-genetic and cellular levels to tissue/organ, organismal, population and ecological ones. The aim of the work is to systematize the key modeling approaches at each of these levels, to analyze their capabilities and limitations, and to discuss strategies for constructing multiscale and hybrid models that consistently link processes operating at different spatial and temporal scales. We survey classical deterministic and stochastic models based on ordinary and partial differential equations, logical and graph-based models of regulatory networks, cellular automata, agent-based models, as well as flux-balance approaches. Typical examples are given for the modeling of gene regulatory and metabolic networks, chemotaxis, tissue and organ growth, population dynamics and genetic structure, and ecosystem functioning. Special attention is paid to comparing approaches with respect to the scale of description, complexity of modeled processes, data requirements, computational cost and interpretability of results. The analysis shows that hybrid and multiscale models provide an adequate framework to account for nonlinearity, stochasticity and structural heterogeneity of biosystems, but

require substantial computational resources and careful data-driven calibration. Methodological and technological trends are outlined, including the development of specialized platforms and model repositories, standards for model representation and tools for reuse of model components.

Key words: mathematical modeling; biological systems; multiscale models; computational biology

For citation: Lashin S.A., Ivanov R.A., Matushkin Y.G. Mathematical and computational modeling of biosystems at different levels of organization. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii*=*Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):502-514. doi 10.18699/vjgb-26-21

Введение

Биологические системы – это сложноорганизованные иерархические системы, различия в характерных размерах объектов которых составляют до 10 порядков, а в характерных временах процессов – до 18 порядков (Ризниченко, 2003; Шумный и др., 2006).

Выделяя наиболее проработанные с точки зрения математического описания уровни биологической организации, отметим следующие:

- молекулярно-генетический;
- клеточный;
- тканевый/органный;
- организменный;
- популяционный;
- экологический/биоценотический.

Каждый из этих уровней характеризуется определенными объектами и процессами и, соответственно, требует для своего описания собственных математических и компьютерных моделей. Отметим также, что понятия *генотип* и *фенотип*, являясь одними из наиболее часто используемых терминов в биологии, могут быть описаны с точки зрения математического моделирования совершенно по-разному и, в зависимости от этого описания, формально относиться к различным уровням биологической организации. В зависимости от контекста рассматриваемой ситуации эти аллельные варианты могут быть выражены как символьные последовательности, числа и т.д. Разнообразие способов описания фенотипических признаков организма еще шире – это могут быть дискретные признаки (например, цвет глаз или волос, цветка) или непрерывные признаки (например, рост или вес). Признаки могут быть результатом измерений, проведенных с помощью как простых приборов типа линейки или весов, так и сложных физических и/или биохимических приборов (например, морфофизиологические признаки).

Цель настоящей обзорной работы – систематизация основных математических и компьютерных методов моделирования биологических систем на различных уровнях организации, анализ их возможностей и ограничений, а также рассмотрение подходов к построению многомасштабных и гибридных моделей, объединяющих несколько уровней в рамках единой концептуальной и вычислительной схемы.

Молекулярно-генетический уровень организации

Молекулярно-генетическая система управления (МГСУ) клетки – совокупность ее нерегулярных полимеров (ДНК, РНК и белков), а также молекулярных подсистем, выпол-

няющих различные биохимические процессы над нерегулярными полимерами (Проблемы теории..., 1985):

- синтез;
- преобразование;
- распад;
- перенос и т.д.

Среди методологических подходов для исследования МГСУ можно выделить три основных:

1. Структурно-функциональный подход – концентрирует внимание на материальных свойствах макромолекул и МГСУ в связи с их функцией. Изучаются структурные, физико-химические и энергетические закономерности строения макромолекул, термодинамика и кинетика процессов и т.п.
2. Информационно-кибернетический подход – сосредоточивается на выявлении принципов организации и управления МГСУ, отвлекаясь от их структурных особенностей. Исследуются самовоспроизведение, информационные процессы, кодирование, память, надежность, системы регулирования и т.д.
3. Эволюционный подход – выявляет пути возникновения и эволюции МГСУ в целом, различных подсистем и фракций макромолекул, а также факторы эволюции, типы эволюционной динамики и т.д. (Проблемы теории..., 1985).

Частным случаем МГСУ являются так называемые *генные сети* – группы 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 (Колчанов и др., 2013).

Модели биологических систем на молекулярно-генетическом уровне включают в себя простейшие ОДУ (обыкновенные дифференциальные уравнения) и системы ОДУ из нескольких уравнений, дискретные модели, построенные с использованием разных формализмов (булевы сети, сети Петри, клеточные автоматы и др.), дискретно-непрерывные модели, а также всевозможные компьютерные имитационные и агентно-ориентированные модели.

Простейшие модели МГС строились на основе уравнений химической кинетики вида (1), представляли собой различные способы представления *кинетического закона действующих масс* и обобщенного химико-кинетического метода моделирования (ОХКММ), предложенного В.А. Лихошваем (Лихошвай и др., 2000):

$$\frac{dX}{dt} = V(Y, K), \quad (1)$$

где X – вектор (список) управляемых переменных; Y – вектор (список) управляющих переменных; K – список параметров.

Допускается вхождение одних и тех же переменных в оба списка, но в общем случае списки X и Y не совпадают и могут вообще не пересекаться. Переменные обычно имеют смысл концентраций веществ или вероятностей реализации выделенных состояний веществ. Переменные из списка Y , не входящие в список X , являются параметрами для текущей элементарной модели. Функционал V описывает закон скоростей изменения концентраций веществ из списка X .

Кинетический закон действующих масс выводится на основе теории соударений. Пусть имеется биохимическая реакция



Тогда скорость $V_{A+B \rightarrow C}$ формирования комплекса C в текущий момент времени t равна

$$V_{A+B \rightarrow C}(t) = k_1[A][B], \quad (3)$$

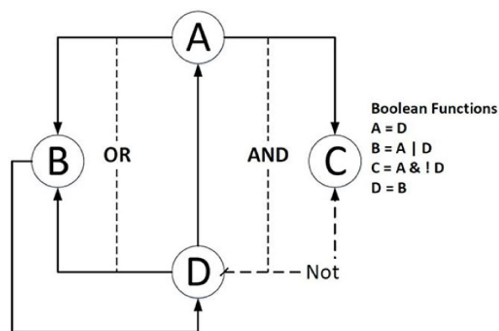
а скорость $V_{C \rightarrow A+B}$ распада комплекса C на составляющие A и B в текущий момент времени t равна

$$V_{C \rightarrow A+B}(t) = k_2[C]. \quad (4)$$

Если имеется конкретная биохимическая схема реакций вида (ур. (2)), то мгновенная скорость изменения концентрации любого вещества равняется сумме локальных скоростей изменения концентрации данного вещества в каждой реакции, в которой данное вещество участвует (Казанцев и др., 2009; Акбердин и др., 2013). Это простое правило позволяет легко выписать итоговую систему дифференциальных уравнений, описывающих целевую биохимическую схему, используя при этом в качестве правых частей уравнений системы (ур. (1)) только полиномы первого и второго порядка. Теоретической основой для этого служит важнейшая для моделирования химической кинетики теорема Корзухина, которая утверждает: «Для любой совокупности неотрицательных кривых, заданных на конечном интервале времени, и любой заданной точности существует такая (может быть, не одна) биохимическая схема, составленная только из бимолекулярных и мономолекулярных реакций, что математическая модель, построенная по данной биохимической схеме, приближает заданную совокупность кривых с заданной точностью» (Жаботинский, 1974).

Важнейшим элементом построения более сложных моделей МГС с помощью ОХКММ (Лихошвай и др., 2000) является правило суммирования локальных скоростей протекания биохимических реакций: общая скорость изменения концентраций компонентов системы является суммой скоростей изменения концентрации данного компонента во всех элементарных процессах (подробнее см. табл. S1 Приложения)¹.

Логические подходы для моделирования МГСУ, введенные еще в 60-х годах XX в., основаны на применении для описания молекулярно-генетических механизмов в терминах логики и дискретной математики (Kauffman, 1969). Приведем пример описания работы генной сети в терминах булевой логики. Генная сеть представляется в



Пример простой булевой генной сети.

В правой части перечислены булевы функции смены состояний; штриховая линия означает, что исходный ген должен быть ингибирован, сплошная – что исходный ген должен быть активирован (по: (Chen et al., 2018)).

виде булевой сети – направленного графа, где вершины – это состояния генов, а дуги – регуляторные события, т. е. действие генов на другие гены (Ратушный и др., 2005; Tran, 2016; Barbuti et al., 2020). Текущее состояние генной сети описывается списком экспрессирующихся (работающих) и не экспрессирующихся (не работающих) генов в дискретные моменты времени. Считается, что гены могут находиться только в двух состояниях: «экспрессируется» (true, 1) либо «не экспрессируется» (false, 0). Состояние генной сети, таким образом, представляет собой булевский вектор

$$X = (A_i), \quad i \in \overline{1, N}, \quad (5)$$

где A_i – состояние i -го гена. Смена состояний сети описывается с помощью булевой вектор-функции f :

$$X(t+1) = f(X(t)) = (f_{A_1}(X(t)), f_{A_2}(X(t)), \dots, f_{A_N}(X(t))), \quad (6)$$

где $f_{A_i}: \{0,1\}^N \rightarrow \{0,1\}$ описывает воздействие экспрессии всех генов на экспрессию i -го гена. Пример простой булевой генной сети показан на рисунке.

Отметим, что упомянутые выше подходы имеют ограниченную применимость в количественном прогнозировании в силу своей упрощенности. Поэтому в настоящее время наиболее часто используемыми подходами к описанию МГС являются различные гибридные методы, сочетающие применение непрерывных, дискретных методов и стохастических методов моделирования. Один из первых подобных методов – разработанный в Новосибирске Р.Н. Чураевым еще в 70-х годах XX в. обобщенный пороговый метод моделирования (Чураев, Ратнер, 1972; Чураев, 2005). В данном методе сочетаются подходы теории автоматов и линейных ОДУ. В основе идеи лежит разбиение фазового пространства системы на области, внутри которых поведение системы описывается линейными ОДУ, а условия перехода между областями – булевыми функциями. Решения линейных систем «сшиваются» на границах зон. Другим примером гибридных подходов является моделирование на основе правил (англ. rule-based modeling), в котором модель определяется косвенно, посредством заданного набора правил (Blinov et al., 2004; Harris et al., 2016). Дальнейшее развитие в ИЦиГ СО РАН

¹ Табл. S1 и рис. S1–S7 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx27.pdf>

ОХКММ и методов численного моделирования МГС на его основе также велось в парадигме гибридных подходов (Казанцев и др., 2009; Kazantsev et al., 2018).

Клеточный уровень организации

Математическое моделирование на клеточном уровне организации рассматривает такие биологические процессы, как транспорт веществ и энергии из окружающей среды в клетку и обратно и их метаболизм, передвижение клеток в пространстве и их деление. В части моделирования метаболических процессов клеточный уровень организации напрямую связан с молекулярно-генетическим. Появившийся в конце XX–начале XI в. термин «электронная клетка» (Tomita et al., 1999; Tomita, 2001; Ishii et al., 2004; Price et al., 2004; Karr et al., 2012; Акбердин и др., 2013) подразумевает моделирование клетки прежде всего на молекулярно-генетическом уровне биологической организации.

Тем не менее, в отличие от рассмотренных выше моделей, в которых интерес представляют сами МГС, их состояния, режимы функционирования и т. п., модели клетки могут фокусироваться и на других событиях и процессах, рассматривая модели МГС, входящие в них, в качестве «подручных инструментов». Так, японский системный биолог и биоинформатик Масару Томита, лидер проекта E-CELL – одного из первых успешных проектов по моделированию электронной бактериальной клетки, выделяет среди процессов клеточного уровня организации, которые можно смоделировать с помощью процессов МГС, транспорт веществ через мембрану, клеточный цикл и деление клеток, а также развитие патологических состояний (например, для клеток эритроцитов человека) (Tomita et al., 1999; Tomita, 2001; Hucka et al., 2003). Программы, разработанные в рамках проекта E-CELL, используют гибридный подход к моделированию жизнедеятельности клетки. В частности, в версии E-CELL 3 используются системы ОДУ, стохастическое моделирование с помощью алгоритма Гиллеспи, а также специальные алгоритмы «сшивки» решений.

Другим важным клеточным процессом, для моделирования которого также могут применяться модели МГС, является *хемотаксис* – клеточное движение. Бактериальный хемотаксис представляет собой один из самых простых и хорошо изученных примеров поведения микробов. Он позволяет плавающим бактериальным клеткам следовать за химическими веществами в окружающей среде по градиенту концентрации. Молекулярные механизмы хемотаксиса в модельной бактерии *E. coli* изучались с большой детализацией в течение последних 50 лет с использованием широкого спектра экспериментальных, в основном биофизических, методов (Berg, Purcell, 1977; Vladimirov, Sourjik, 2009; Kaizu et al., 2014). Накопление экспериментальных данных в этой области привело к созданию нескольких моделей хемотаксиса. Так, например, группой (Bray et al., 1993) опубликована гибридная блочно-модульная модель, в которой молекулярно-генетическая компонента описывается с помощью уравнений химической кинетики, а физическая – вращение специ-

альных белков-моторов – с помощью конечного автомата. Принципиальная схема этой модели приведена на рис. S1. Модель воспроизводит поведение более 30 мутантов, что говорит о ее высоком качестве. Она получила развитие и была реализована в виде программного комплекса BCT (BacterialChemoTaxis) (Bray, Bourret, 1995), что в дальнейшем позволило описать уже более 60 мутантов (Bray et al., 2007). Кроме того, для исследования хемотаксиса использовались агентно-ориентированные модели, сочетающие этот подход со стохастическим моделированием МГС (AgentCell (Emonet et al., 2005)), гибридным моделированием, комбинирующим блоки ОДУ и стохастического моделирования, а также аппроксимацией среднего поля для модели Моно–Уаймена–Шанжэ² (RapidCell (Vladimirov et al., 2008), см. также рис. S2).

Молекулярные механизмы движения более сложных клеток эукариот принципиально отличаются от таковых у бактерий. Тем не менее методический репертуар для математического моделирования этих процессов в целом такой же. Например, математическая модель регуляции волосковых клеток – рецепторов слуховой системы и вестибулярного аппарата животных и человека, описывающая ионный транспорт, мембранный потенциал и движение клеток (O’Beirne, Patuzzi, 2007), была реализована на основе уравнения Больцмана.

Несмотря на имеющийся задел по моделированию биологических систем на клеточном уровне организации, в большинстве работ, проводящихся в настоящее время, модели отдельных клеток используются в качестве вспомогательных инструментов. Это относится к уровням биологической организации, рассматривающим модели клеточных ансамблей, – тканевому, организменному и популяционному.

Тканевый/органный уровень организации

Биологическая *ткань* – это система клеток, сходных по происхождению, строению и выполняемым функциям в организме, а также межклеточных веществ и структур – продуктов их жизнедеятельности (Биологический... словарь, 1986). *Животные ткани* разделяются на четыре основных типа: соединительные, мышечные, нервные и эпителиальные. *Ткани растений* разделяются на *простые*, состоящие из клеток одного типа (например, колленхима), и *сложные*, состоящие из разных типов клеток (например, эпидерма). В зависимости от классификации выделяют два либо три типа растительных тканей. В первом случае ткани подразделяются на *меристематические* (активно делящиеся клетки, например, в корнях или кончиках стеблей) и *постоянные* (утратившие способность к делению). Во втором случае ткани делятся на *тканевые системы*: *эпидермис*, *механическая ткань* и *проводящая ткань* (Биологический... словарь, 1986). Совокупность различных и взаимодействующих тканей образует органы.

Учитывая такое разнообразие свойств и функций биологических тканей и органов, репертуар математических

² Модель Моно–Уаймена–Шанжэ описывает регуляцию ферментативной активности белка, состоящего из одинаковых субъединиц, из-за аллостерического изменения его структуры (Monod et al., 1965).

и компьютерных моделей, представляющих этот уровень биологической организации, чрезвычайно велик. Методический арсенал для построения подобных моделей широк и включает в себя как классические методы моделирования с помощью систем ОДУ и дифференциальных уравнений в частных производных (чаще используемых для моделирования биологических тканей), так и современные методы гибридного моделирования, включающие в себя агентно-ориентированные подходы и т. п.

Математическое и компьютерное моделирование биологических тканей и органов вызывает наибольший интерес медиков и биологов в следующих контекстах: 1) моделирование развития, так называемого *морфогенеза*, *эмбриогенеза* и т. п.; 2) моделирование патологий (болезней) и стратегий их коррекции. В ряде случаев одна и та же модель может рассматриваться в обоих контекстах одновременно, например, модель развития раковой опухоли, позволяющая численно исследовать различные стратегии лечения.

Классической моделью теории морфогенеза считается модель «реакция-диффузия», предложенная в середине XX в. Аланом Тьюрингом (Turing, 1952):

$$\begin{cases} \frac{\partial x}{\partial t} = P(x, y) + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2}, \\ \frac{\partial y}{\partial t} = Q(x, y) + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2}, \end{cases} \quad (7)$$

где r – пространственная координата; $D_x \partial^2 x / \partial r^2$ и $D_y \partial^2 y / \partial r^2$ описывают диффузию веществ x и y вдоль этой координаты. Диффузия нелинейно связанных компонент x и y в данной системе приводит не к выравниванию, а к периодическому во времени и неравномерному в пространстве распределению (Ризниченко, 2003).

Модификации модели «реакция-диффузия» активно исследовались и применялись для широкого круга биологических задач, включая моделирование тканей и органов. В частности, с помощью математической модели, реализованной в виде системы (8), исследовались паттерны окраски шкуры животных. В зависимости от параметров модели, которым соответствуют разные сочетания морфогенов (веществ, влияющих на индивидуальное развитие организма), паттерны окраски варьируют в широком пределе (рис. S3).

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= \gamma f(u, v) + \nabla^2 u, \quad \frac{\partial v}{\partial t} = \gamma g(u, v) + d \nabla^2 v, \\ f(u, v) &= a - u - h(u, v), \quad g(u, v) = \alpha(b - v) - h(u, v), \\ h(u, v) &= \frac{\rho uv}{1 + u + Ku^2}. \end{aligned} \quad (8)$$

Здесь f, g, h – функции, описывающие кинетику реакций; a, b, α, ρ и K – положительные параметры, описывающие кинетику реакции, представляющие собой соотношения кинетических констант (детальный вывод этих параметров приводится в (Murray, 2003)); d – соотношение коэффициентов диффузии; γ определяет размер области.

Другой подход к моделированию биологических систем на тканевом и органном уровне организации был предложен В.А. Лихошваем и получил развитие в работах под руководством В.В. Мироновой по моделированию тка-

ней растений (Лихошвай и др., 2007; Фадеев и др., 2008; Mironova et al., 2010, 2012; Novoselova et al., 2013; Pasternak et al., 2019). Его суть состоит в описании ткани растения в виде системы ОДУ достаточно большой размерности – от сотен до нескольких тысяч уравнений. При этом отдельной клетке ткани соответствует несколько уравнений, в большинстве работ – всего четыре уравнения, описывающих динамику интересующих исследователя веществ: белков и гормонов. Клетки рассматриваются как системы с полным перемешиванием. Перераспределение веществ между клетками посредством диффузии и процессов активного транспорта описывается уравнениями переноса вещества. Пример таких уравнений для гормона ауксин приведен в следующем фрагменте системы (9) из статьи (Лихошвай и др., 2007) (схему модели см. на рис. S4).

$$\begin{aligned} \frac{da_n}{dt} &= \alpha + P_t a_{n-1} - P_t a_n - K_d a_n + K_0 a_n f(a_n), \\ \frac{da_i}{dt} &= P_t (a_{i+1} + a_{i-1}) + K_0 a_{i+1} f(a_{i+1}) - \\ &\quad - 2P_t a_i - K_d a_i - K_0 a_i f(a_i), \quad i = \overline{n-1, 2}, \\ \frac{da_1}{dt} &= -P_t a_1 - K_d a_1 + P_t a_2 + K_0 a_2 f(a_2), \end{aligned} \quad (9)$$

где a_i – концентрация гормона ауксин в i -й клетке корня растения (сам корень рассматривается в этой модели как одномерный массив клеток, см. также рис. S4, а); параметр α описывает постоянный приток ауксина в систему; P_t – диффузию ауксина между клетками; K_d – параметр деградации ауксина в клетке; функция $f(a_i)$ описывает активный направленный транспорт ауксина через мембрану посредством действия специальных белков-транспортёров (ур. (10)):

$$f(a_i) = \left(\frac{\left(\frac{a_i}{q_{11}} \right)^{p_1}}{1 + \left(\frac{a_i}{q_{12}} \right)^{p_1}} \right) \times \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{a_i}{q_2} \right)^{p_2}} \right). \quad (10)$$

В этой функции q_{11} – константа порога активации ауксин-зависимого транспорта; q_{12} – константа порога насыщения ауксин-зависимого транспорта; q_2 – константа порога ингибирования ауксин-зависимого транспорта; p_1 и p_2 – коэффициенты нелинейности механизмов активации и ингибирования соответственно. В вышеупомянутой серии работ по моделированию органов и тканей растений рассматривались как одномерные (1D), так и двумерные (2D) модели (см. рис. S4). Хотя эти модели представляют собой системы ОДУ (нередко большой размерности), идеологически они близки к клеточно-автоматным моделям, которые тоже часто используются для моделирования биологических систем на тканевом и органном уровнях организации.

Так, моделирование с помощью клеточных автоматов использовалось для исследования процессов онтогенеза (Markus et al., 1999; Akberdin et al., 2007; Витвицкий, 2014; Pałubicki et al., 2019) и вегетации (Komarov et al., 2003; Colasanti et al., 2007) растений. Активно применяется этот подход и для моделирования тканей и органов животных и человека, в частности, болезненных состояний, таких как онкологические заболевания (Gevertz, Torquato, 2006; Szabó, Merks, 2013; Brüningk et al., 2019; Salguero et al.,

2019), иммунные (Bezzi et al., 1997), инфекционные (Slimi et al., 2009) и другие (Talaminos-Barroso et al., 2020).

В большинстве перечисленных работ, а также во множестве других, не вошедших в данный обзор, методология клеточно-автоматного моделирования используется в сочетании с другими подходами, в частности агентно-ориентированным моделированием и моделированием, основанным на правилах (рис. S5), упоминавшимся в разделе «Молекулярно-генетический уровень организации». Такие гибридные модели, используемые прежде всего для моделирования тканей и органов, получили название «клеточные модели Поттса» (Cellular Potts Models) (Glazier, Graner, 1993; Marée et al., 2007; Voss-Böhme, 2012).

Дальнейшее развитие методов моделирования биологических тканей и органов привело к появлению программных комплексов, библиотек и платформ, адаптирующих модели Поттса и агентно-ориентированное моделирование для решения конкретных содержательных задач в биологии. Отметим такие программные комплексы, как CellSys (Hoehme, Drasdo, 2010), EPISIM (Sütterlin et al., 2013, 2017), CompuCell3D (Swat et al., 2012) и др. Отдельно назовем проекты по моделированию целых органов, например, платформу для моделирования печени человека VirtualLiver (Holzhütter et al., 2012; Drasdo et al., 2014). Развитие методов моделирования биологических тканей и органов подготовило почву для разработки компьютерных моделей целых многоклеточных организмов, о чем будет сказано в следующем разделе.

Организменный уровень организации

История математического и компьютерного моделирования функционирования отдельных организмов берет свое начало еще в 60-х годах XX в. Первая и простейшая модель дерева была представлена И.А. Полетаевым и его учениками в 1965 г. (Полетаев, 1965, 1966). Несмотря на простоту, модель, базируясь на физических принципах, давала ответ на вопрос, «почему дерево не растет в высоту бесконечно?» В дальнейшем на базе этой модели были построены и исследованы более сложные варианты (Карев, Скоморовский, 1999; Колобов, Фрисман, 2008). Настоящий расцвет детальных моделей отдельных многоклеточных организмов пришелся на последние 10–15 лет. Во многом это обусловлено колоссальным прогрессом, которого достигла производительность компьютеров, а именно быстрым развитием, объемом оперативной памяти и объемами запоминающих устройств. Стало возможным создавать реалистичные модели живых организмов. Появился термин «цифровые двойники живых организмов» (англ. digital twin of biological organism) (Barnabas, Raj, 2020; Tellechea-Luzardo et al., 2020; Miehe et al., 2021) и др.

Методический арсенал, используемый для моделирования на организменном уровне биологической организации, естественным образом включает в себя все те подходы, о которых шла речь в предыдущих разделах. В зависимости от целей и задач, которые авторы «цифровых организмов» ставят перед собой, одни уровни биологической организации, а также соответствующие биологические процессы могут прописываться в модели более детально,

а другие – менее. Так, например, в известном проекте OpenWorm («Открытый червь»), посвященном созданию компьютерной модели червя *Caenorhabditis elegans* (Szigeti et al., 2014; Sarma et al., 2018; Пальянов, 2019), основное внимание уделено моделированию биомеханики движения и биофизике передачи нейроимпульсов, тогда как проект Digital Salmon («Цифровой лосось») (Omholt et al., 2013) в большей степени сосредоточен на процессах метаболизма и онтогенеза лосося.

Отметим, что работы по созданию компьютерных моделей целых организмов – «цифровых двойников» – в настоящее время ведутся большими научными коллективами, а нередко и консорциумами, состоящими из многих коллективов. Как правило, в рамках этих работ разрабатываются целые программные комплексы и даже программные платформы, которые способствуют развитию методической базы математической и системной биологии.

Популяционный уровень организации

Биологическая популяция (лат. *populus* – население) – совокупность особей одного вида, обладающих общим генофондом и занимающих определенную территорию (Биологический... словарь, 1986). История математической биологии связана, прежде всего, с моделированием биологических популяций. Начиная с «Книги абака» Л. Фибоначчи, который в своем труде по арифметике предложил модель изменения размера популяции кроликов с течением времени (решение модели – знаменитые числа Фибоначчи), и продолжая работами Т.Р. Мальтуса «О законе народонаселения» (Malthus, 1798) и П.Ф. Ферхюльста «Обратите внимание на закон, которому следует население в своем росте» (Verhulst, 1838), именно моделирование динамики популяций стало движущей силой развития математической биологии. Описанные в упомянутых работах модели, конечно, очень просты (см. ур. (11) и (12)), но они послужили фундаментом для более сложных моделей не только в биологии, но и в других областях науки – физике, химии и др. Ниже представлено уравнение Мальтуса:

$$\frac{dN}{dt} = aN, \quad a > 0, \quad (11)$$

где N – численность популяции; a – коэффициент прироста численности популяции.

Уравнение Ферхюльста выглядит следующим образом:

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{K} \right), \quad r > 0, K > 0, \quad (12)$$

где r – коэффициент прироста численности популяции; K – максимальная численность популяции.

Модели взаимодействующих популяций были впервые предложены А. Лоткой (Lotka, 1909, 1920, 1925) и В. Вольтеррой (Вольтерра, 1928, 1976) и получили в дальнейшем название «модели Лотки–Вольтерра», или «модели хищник–жертва»:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= x(\epsilon_x - \gamma_{xy}y), \\ \frac{dy}{dt} &= y(\gamma_{yx}x - \epsilon_y), \end{aligned} \quad (13)$$

где x – количество жертв; y – количество хищников; коэффициенты: ϵ_x – естественного прироста жертв, ϵ_y – есте-

ственной убыли хищников (в отсутствие жертв), γ_{xy} – влияния хищников на численность жертв, γ_{yx} – влияния жертв на численность хищников.

Обобщенная модель Вольтерры (ур. (14)) позволяет рассматривать помимо отношений «хищник–жертва» другие типы взаимодействий между двумя популяциями:

$$\begin{aligned} \frac{dN_1}{dt} &= a_1 N_1 + b_{12} N_1 N_2 - c_1 N_1^2, \\ \frac{dN_2}{dt} &= a_2 N_2 + b_{21} N_1 N_2 - c_2 N_2^2, \end{aligned} \quad (14)$$

где N_1, N_2 – численность (плотность) соответствующей популяции; a_1, a_2 – скорость прироста соответствующей популяции; c_1, c_2 – коэффициенты смертности соответствующей популяции; b_{12}, b_{21} – коэффициенты влияния популяций друг на друга. В зависимости от значений параметров b_{12} и b_{21} определяется тип взаимодействия между популяциями (см. таблицу).

Режимы функционирования, реализуемые в моделях (13) и (14), сводятся к двум типам – стационарные состояния системы и осциллирующие режимы (Ризниченко, 2002, 2017). При взаимодействии нескольких (более двух) популяций богатство динамических режимов моделей резко возрастает. Так, например, в системе «хищник–две жертвы» была показана возможность существования хаотических режимов (Апонина и др., 1982).

В книге А.Д. Базыкина «Нелинейная динамика взаимодействующих популяций» (2003) проведен исчерпывающий анализ моделей трех взаимодействующих популяций типа обобщенных моделей Вольтерры. Дискретные аналоги непрерывных моделей популяционной динамики – модели Морана и Рикера – рассматривают численность популяции в виде дискретной величины, изменяющейся в некоторые дискретные моменты времени, что соответствует экспериментальным данным по переписи реальных популяций. Если предположить, что численность популяции в момент времени t ($N_t, t = 0, 1, 2, \dots$) зависит от численностей в некоторые предшествующие моменты времени, то для описания динамики численности популяций можно применить аппарат рекуррентных или разностных уравнений (отображений):

$$N_t = F(N_{t-1}, N_{t-2}, \dots, N_{t-k}). \quad (15)$$

Решением этого уравнения является последовательность значений N_t , удовлетворяющая уравнению (15) при каждом t . Модель Морана и Рикера (ур. (16)) была предложена для описания динамики численности популяций насекомых (Moran, 1950) и рыб (Ricker, 1958):

$$N_t = N_{t-1} \exp \left\{ r \left[1 - \frac{N_{t-1}}{K} \right] \right\}. \quad (16)$$

Интересно, что даже в такой простой модели обнаруживаются очень разные режимы функционирования (рис. S6).

Другое большое направление в моделировании популяций – моделирование генетики популяций – было заложено классиками математической биологии: Рональдом Фишером, Дж. Холдейном, С. Райтом и другими (Haldane, 1924, 1926, 1990; Fisher, 1930; Wright, 1931, 1951). В отличие от моделей популяционной динамики, описывающих изменения численности популяций, модели популяцион-

ной генетики фокусируются на описании изменений частот аллелей (вариантов генов) в популяциях. Математический аппарат, используемый в классических моделях популяционной генетики, во многом напоминает таковой в моделях динамики популяций – это либо рекуррентные уравнения, либо ОДУ. В качестве примера ниже приведена модель менделевской бесполой диплоидной панмиктической популяции с одним диаллельным локусом (геном, имеющим только два состояния – A_1 или A_2):

$$\frac{dp}{dt} = \frac{sp(1-p)}{1-s(1-p)} \approx sp(1-p), \quad (17)$$

где p – частота аллеля A_1 в популяции (тогда частота q аллеля A_2 равна $1-p$); приспособленность гамет определяется как w_1, w_2 , а их разница $s = w_1 - w_2$. Уравнение (17) описывает изменение частот аллелей с течением времени.

Еще один класс моделей – матричные модели динамики структуры популяций со сложной половозрастной структурой, или популяции, включающие особей одного вида с различающимися физиологическими или биологическими характеристиками, впервые предложенные П. Лесли (Leslie, 1945, 1948), детально исследованы в работах (Динамическая теория..., 1974; Логофет, Белова, 2007). Модель представляется уравнением вида

$$x(t+1) = Lx(t), \quad t = 0, 1, 2, \dots, \quad (18)$$

где вектор-столбец $x(t) = [x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)]^T$ описывает структуру популяции (численности отдельных групп особей), а матрица L , называемая также матрицей Лесли, имеет вид

$$L = \begin{pmatrix} b_1 & b_2 & \dots & b_{n-1} & b_n \\ s_1 & 0 & & 0 & 0 \\ \vdots & & \ddots & \vdots & \\ 0 & 0 & \dots & s_{n-1} & 0 \end{pmatrix},$$

где b_i – коэффициенты рождаемости; s_i – коэффициенты дожития.

До недавнего времени, в связи с недостатком широко-масштабных геномных данных, такие модели строились преимущественно исходя из неких биологически осмысленных предположений, что позволяло проводить теоретические исследования в этой области лишь на качественном

уровне. Развитие методов секвенирования и последовавший за этим большой объем экспериментальных данных привели к появлению компьютерных моделей популяционно-генетических процессов, учитывающих эти данные на количественном уровне. Имитационное моделирование эволюции генетических последовательностей получило название «моделирование коалесценций» (coalescence simulation).

Методически моделирование коалесценций представляет собой разновидность стохастического моделирования с применением различных подходов (методов Монте-Карло, марковских цепей и др.) (Salem et al., 2005). Большинство работ в этой области основывается на развитии и модификации классических моделей популяционной генетики, таких как модель Райта–Фишера (Hudson, 2002), островная модель (Wakeley, 2001) и др. Схема последовательного усложнения популяционно-генетической модели путем добавления в нее дополнительных биологических параметров была предложена (Schaffner et al., 2005) совместно с алгоритмом верификации значений этих параметров. В настоящее время создан ряд программных пакетов для такого моделирования: SIMCOAL 2.0 (Laval, Excoffier, 2004), GENOME (Liang et al., 2007), Migrate-n (Beerli, Palczewski, 2010), CoaSim (Mailund et al., 2005) и др. С помощью этих пакетов получены биологически значимые результаты. В работе (Bataillon et al., 2006) были оценены эффективная численность популяции Исландии, скорость рекомбинации, а также ряд других популяционных параметров. Тестирование новых методов анализа генетических ассоциаций с болезнями человека с помощью компьютерного моделирования приводится в (Guan et al., 2009). Статистическая оценка альтернативных сценариев эволюции человека с помощью моделирования проведена в работе (Fagundes et al., 2007).

Экологический/биоценотический уровень организации

Экология (от греч. oikos – дом и logos – учение), согласно Э. Геккелю, – наука о взаимоотношениях организмов и их популяций друг с другом и со средой обитания (Haeckel, 1866). Экология изучает *биоценозы* и *экосистемы* как результат взаимообусловленной эволюции организмов (биоты) и биоценологической среды с учетом осуществляемой на разных трофических уровнях деятельности популяций, определяющей мощность потоков энергии и веществ в экосистемах и общий круговорот веществ, а также авторегуляцию экосистем и их роль в биосфере планеты (Быков, 1983). В настоящее время функционирование экосистем планеты зависит от социальных факторов и антропогенных влияний. В любом ограниченном пространстве, как правило, обитает множество видов, между которыми установились постоянные и сложные взаимоотношения. Иными словами, различные виды организмов, существующие в определенном пространстве с комплексом физико-химических условий, образуют сложную систему, более или менее длительно сохраняющуюся в природе. В экологии их называют *экосистемами* (Tansley, 1935) или *биогеоценозами* (Сукачев, 1972).

Термин «*экологическое моделирование*» включает в себя рассмотрение как моделей взаимодействия отдельных организмов со средой (*аутоэкология*), взаимодействия популяций со средой (*демэкология*), так и целых сообществ или биоценозов (*синэкология*). В основе экологических моделей лежит, прежде всего, описание переноса вещества, энергии и информации между разными частями экосистемы. Основное внимание уделяется тому, как эти части взаимодействуют, как они связаны друг с другом и влияют друг на друга, включая физическую среду.

Размерными единицами, используемыми в экологическом моделировании, как правило, являются количество энергии или материи, перемещающейся через систему. Это одно из основных отличий экологических моделей от популяционных, в которых единицей измерения обычно служит размер популяции (Jørgensen, 2009).

Методический арсенал экологического моделирования во многом повторяет методы, используемые для описания молекулярно-генетического, клеточного, организменного и популяционного уровней. В частности, в экологическом моделировании применяется *метод анализа баланса потоков* (англ. flux balance analysis, FBA) (Allen, Gillooly, 2009; Orth et al., 2010). Его основная идея состоит в описании потоков превращения веществ в виде задачи линейного программирования с ограничениями, что дает возможность оценить скорости синтеза и деградации этих веществ. Пример схематичного изображения модели, основанной на принципах баланса потоков, приведен на рис. S7.

Активно используются в экологическом моделировании и методы ОДУ (Введение..., 2001; Owolabi, Patidar, 2016; Lavaud et al., 2020) и систем ДУ в частных производных (Holmes et al., 1994; Введение..., 2001), клеточные автоматы (Gómez Esteban, Rodríguez-Patón, 2011), стохастическое моделирование (Kutalik et al., 2005; Phillips et al., 2006; Khatri et al., 2012), графовый анализ (Fath et al., 2007) и др.

Экологическое моделирование является также одним из направлений, в котором многомасштабное (англ. multiscale) и многоуровневое (англ. multilevel/multilayer) получило наиболее сильный импульс к развитию (Grimm et al., 2005, 2010; Grimm, Berger, 2016).

Частный случай многомасштабных моделей – агентно-ориентированные модели, которые в экологическом моделировании традиционно называются индивидуально-ориентированными. Являясь по своей сути имитационными моделями, они покрывают значительный спектр вопросов функционирования экосистем на уровне как отдельных организмов, так и их популяций и сообществ (Kreft et al., 1998; Doebeli, Dieckmann, 2003, 2004; Hellweger et al., 2016; Widder et al., 2016). В индивидуально-ориентированной парадигме разработаны современные программные комплексы, в частности, для моделирования бактериальных сообществ. Например, программа-симулятор BacSim (Kreft et al., 1998, 2001), а также программный комплекс (Xavier et al., 2005) описывают такие процессы жизнедеятельности бактерий, как поглощение (транспорт) субстратов, метаболизм, клеточное деление и гибель клеток, выделяя в качестве объекта отдельную клетку и рас-

смаивая сообщества в виде ансамблей таких объектов. Они ориентированы, прежде всего, на исследование бактериальных сообществ в виде биопленок. Программа Micro-Gen Bacteria Simulator моделирует жизненный цикл растущей культуры бактерий и ее взаимодействие с различными молекулами, например антибиотиками (Murphy, Walshe, 2011). В этих программах детально описываются экологические, метаболические и популяционные компоненты, но отсутствует описание генетических процессов и наследования.

Заклучение

Современные методы моделирования биологических систем на разных иерархических уровнях организации базируются как на традиционных подходах (дифференциальные, алгебраические и стохастические уравнения, теория графов, клеточные автоматы и т. д.), так и на гибридных техниках, сочетающих объектно-ориентированный и агентно-ориентированный (индивидуально-ориентированный) подходы с упомянутыми выше традиционными. Хотя в совокупности они охватывают практически все аспекты экологических (Jørgensen et al., 2009) и эволюционных (de Jong, 2002; Ferrer et al., 2008) процессов, сочетание экологической и эволюционной составляющих в рамках одной модели по-прежнему встречается достаточно редко.

Сравнивая традиционные подходы построения математических моделей с имитационным моделированием, мы видим, что и в том и в другом случае присутствуют определенные ограничения, существенные для такого объекта моделирования, как сложно организованная биологическая система, например микробное сообщество. В первом случае в качестве ограничения выступает статичная структура модели: число уравнений, переменных и параметров модели в процессе расчета не меняется. В случае имитационного моделирования проблема статичности структуры модели решается, поскольку имитационные модели могут содержать переменное количество объектов (например, особей). Однако имитационные модели эволюции и динамики популяций весьма требовательны к размеру оперативной памяти и имеют большую вычислительную сложность.

Исходя из вышесказанного, разработка методов моделирования сложных иерархически организованных биологических систем с учетом разномасштабных процессов, протекающих в этих системах, а также с учетом их эволюции – важная задача современной математической биологии. Не менее важной является и задача разработки программных комплексов, позволяющих эффективно решать содержательные задачи биологии с помощью математического и компьютерного моделирования.

Отдельно следует подчеркнуть, что роль математических и компьютерных моделей в биотехнологии будет только возрастать. Моделирование биотехнологических процессов – от кинетики ферментативных реакций и работы биореакторов до рационального конструирования метаболических путей и оптимизации штаммов-продуцентов – позволяет не только снижать стоимость и длительность экспериментального поиска, но и целенаправленно

формировать пространство решений. Такие модели служат основой для *in silico*-скрининга условий культивирования и конструкций генетических модификаций, поддержки принятия технологических решений и масштабирования процессов от лабораторного уровня к промышленному. Включение биотехнологических приложений в контур системного моделирования сложных биосистем представляется важным направлением дальнейшего развития междисциплинарных исследований на стыке математики, биологии и инженерных наук.

Список литературы / References

- Акбердин И.Р., Казанцев Ф.В., Ермак Т.В., Тимонов В.С., Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. «Электронная клетка»: проблемы и перспективы. *Математическая биология и биоинформатика*. 2013;8(1):295-315. doi 10.17537/2013.8.295
- [Akberdin I.R., Kazantsev F.V., Ermak T.V., Timonov V.S., Khlebo-darova T.M., Likhoshvai V.A. *In silico* cell: challenges and perspectives. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2013;8(1):295-315. doi 10.17537/2013.8.295 (in Russian)]
- Апонина Е.А., Апонин Ю.М., Базыкин А.Д. Анализ сложного динамического поведения в модели хищник – две жертвы. *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем*. 1982;5:163-180
- [Aponina E.A., Aponin Yu.M., Bazykin A.D. Analysis of complex dynamic behavior in the “predator – two prey” model. *Problems of Ecological Monitoring and Ecosystem Modeling*. 1982;5:163-180 (in Russian)]
- Базыкин А.Д. Нелинейная динамика взаимодействующих популяций. Ижевск, 2003
- [Bazykin A.D. *Nonlinear Dynamics of Interacting Populations*. Izhevsk, 2003 (in Russian)]
- Биологический энциклопедический словарь. М.: Сов. энциклопедия, 1986
- [Gilyarov M.S., Baev A.A., Vinberg G.G., Zavarzin G.A., Ivanov A.V., Severin S.E., Simolin A.V., Sokolov V.E., Tatarinov L.P., Takhtadzhian A.L., Yablokov A.V. (Eds) *Biological Encyclopedic Dictionary*. Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya Publ., 1986. (in Russian)]
- Быков Б.А. Экологический словарь. Алма-Ата: Наука, 1983
- [Bykov B.A. *Ecological Dictionary*. Alma-Ata: Nauka Publ., 1983 (in Russian)]
- Введение в экологическое моделирование. Барнаул: Азбука, 2001
- [Tskhai A.A., Pulian M., Beldeeva L.N., Ganulis J., Zherelina I.V., Kvon V.I., Kirillov V.V., Liakhova S.A., Nakhtnebel H.-P. *Introduction to Ecological Modeling*. Barnaul: Azbuka Publ., 2001 (in Russian)]
- Витвицкий А.А. Клеточные автоматы с динамической структурой для моделирования роста биологических тканей. *Сибирский журнал вычислительной математики*. 2014;17(4):315-327
- [Vitvitsky A.A. Cellular automata with dynamic structure to simulate the growth of biological tissues. *Numer Anal Appl*. 2014;17(4):263-273. doi 10.1134/S1995423914040016]
- Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование. *Успехи физических наук*. 1928;8(1):13-34. doi 10.3367/UfNr.0008.192801b.0013
- [Volterra V. *Mathematical theory of the struggle for existence*. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. 1928;8(1):13-34. doi 10.3367/UfNr.0008.192801b.0013 (in Russian)]
- Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование. М.: Наука, 1976
- [Volterra V. *Mathematical Theory of the Struggle for Existence*. Moscow: Nauka Publ., 1976 (in Russian)]
- Динамическая теория биологических популяций. М.: Наука, 1974
- [Gimelfarb A.A., Ginzburg L.R., Poluektov R.A., Pykh Yu.A., Ratner V.A. *Dynamic Theory of Biological Populations*. Moscow: Nauka Publ., 1974 (in Russian)]

- Жаботинский А.М. Концентрационные автоколебания. М.: Наука, 1974
[Zhabotinskii A.M. Concentration Self-oscillations. Moscow: Nauka Publ., 1974 (in Russian)]
- Казанцев Ф.В., Акбердин И.Р., Безматерных К.Д., Лихошвай В.А. Система автоматизированной генерации математических моделей генных сетей. *Информационный вестник ВОВиС*. 2009; 13(1):163-169
[Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Bezmaternykh K.D., Likhoshvai V.A. The tool for automatic generation of gene networks mathematical models. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2009;13(1):163-169 (in Russian)]
- Карев Г.П., Скоморовский Ю.И. Моделирование динамики однопородных древостоев. *Сибирский экологический журнал*. 1999; 6(4):403-417
[Karev G.P., Skomorovsky Yu.I. Simulation on the time course of the state of one-species tree stands. *Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal = Siberian Journal of Ecology*. 1999;6(4):403-417 (in Russian)]
- Колобов А.Н., Фрисман Е.Я. Моделирование процессов динамической самоорганизации в пространственно распределенных растительных сообществах. *Математическая биология и биоинформатика*. 2008;3(2):85-102
[Kolobov A.N., Frisman E.Ya. Modelling of dynamics of the self-organizing processes in spatially distributed plant communities. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2008;3(2):85-102 (in Russian)]
- Колчанов Н.А., Игнатъева Е.В., Подколотная О.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. Генные сети. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):833-850
[Kolchanov N.A., Ignat'eva E.V., Podkolodnaia O.A., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Gene networks. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2013;17(4/2):833-850 (in Russian)]
- Лихошвай В.А. Математическое моделирование и компьютерный анализ генных сетей: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2008
[Likhoshvai V.A. Mathematical Modeling and Computational Analysis of Gene Networks. Dr. Biol. Sci. Diss. Novosibirsk, 2008 (in Russian)]
- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Ватолин Ю.Н., Бажан С.И. Обобщенный химико-кинетический метод моделирования сложных биологических систем. Компьютерная модель онтогенеза бактериофага Lambda. *Вычислительные технологии*. 2000;5(Спец-выпуск):87-99
[Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Vatin Yu.N., Bazhan S.I. A generalized chemical-kinetic method for modeling complex biological systems. Computer model of bacteriophage Lambda ontogenesis. *Journal of Computational Technologies*. 2000;5(Special issue):87-99 (in Russian)]
- Лихошвай В.А., Омелянчук Н.А., Миронова В.В., Фадеев С.И., Мелнес Э.Д., Колчанов Н.А. Математическая модель распределения ауксина в корне растения. *Онтогенез*. 2007;38(6):446-456
[Likhoshvai V.A., Omel'yanchuk N.A., Mironova V.V., Fadeev S.I., Mjolsness E.D., Kolchanov N.A. Mathematical model of auxin distribution in the plant root. *Russ J Dev Biol*. 2007;38(6):374-382. doi 10.1134/S1062360407060057]
- Логофет Д.О., Белова И.Н. Неотрицательные матрицы как инструмент моделирования динамики популяций: классические модели и современные обобщения. *Фундаментальная и прикладная математика*. 2007;13(4):145-164
[Logofet D.O., Belova I.N. Nonnegative matrices as a tool to model population dynamics: classical models and contemporary expansions. *J Math Sci*. 2008;155(6):894-907. doi 10.1007/s10958-008-9249-2]
- Одум Ю. Основы экологии. М.: Мир, 1975
[Odum E. Fundamentals of Ecology. Moscow: Mir Publ., 1975 (in Russian)]
- Пальянов А.Ю. Методы и алгоритмы для решения ряда актуальных задач в области вычислительной нейробиологии, биомеханики и молекулярной биологии. Новосибирск, 2019
[Palyanov A.Yu. Methods and Algorithms for Solving a Number of Current Problems in Computational Neurobiology, Biomechanics and Molecular Biology. Novosibirsk, 2019 (in Russian)]
- Поletaев И.А. О некоторых моделях биогеоценозов. В: Применение математических методов в биологии. Л., 1965
[Poletaev I.A. On some models of biogeocenoses. In: Application of Mathematical Methods in Biology. Leningrad, 1965 (in Russian)]
- Поletaев И.А. О математических моделях элементарных процессов в биоценозах. В: Проблемы кибернетики. Вып. 16. М.: Наука, 1966;171-190
[Poletaev I.A. On mathematical models of elementary processes in biocenoses. In: Problemy Kibernetiki. Iss. 16. Moscow: Nauka Publ., 1966;171-190 (in Russian)]
- Проблемы теории молекулярной эволюции. Новосибирск: Наука, 1985
[Ratner V.A., Zharkikh A.A., Kolchanov N.A., Rodin S.N., Solov'ev V.V., Shamin V.V. Problems of the Theory of Molecular Evolution. Novosibirsk: Nauka Publ., 1985. (in Russian)]
- Ратушный А.В., Лихошвай В.А., Ананько Е.А., Владимиров Н.В., Гунбин К.В., Лашин С.А., Недосекина Е.А., Николаев С.В., Омелянчук Л.В., Матушкин Ю.Г., Колчанов Н.А. Новосибирская школа системной компьютерной биологии: исторический экскурс и перспективы развития. *Информационный вестник ВОВиС*. 2005;9(2):232-261
[Ratushnyi A.V., Likhoshvai V.A., Anan'ko E.A., Vladimirov N.V., Gunbin K.V., Lashin S.A., Nedosekina E.A., Nikolaev S.V., Omel'yanchuk L.V., Matushkin Yu.G., Kolchanov N.A. The Novosibirsk school of systems computational biology: historical review and future prospects. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2005;9(2):232-261 (in Russian)]
- Ризниченко Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии. М.; Ижевск, 2002
[Riznichenko G.Yu. Lectures on Mathematical Models in Biology. Moscow, Izhevsk, 2002 (in Russian)]
- Ризниченко Г.Ю. Математические модели в биофизике и экологии. М.; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2003
[Riznichenko G.Yu. Mathematical Models in Biophysics and Ecology. Moscow, Izhevsk, 2003 (in Russian)]
- Ризниченко Г.Ю. Математическое моделирование биологических процессов. Модели в биофизике и экологии. М.: Изд-во Юрайт, 2017
[Riznichenko G.Yu. Mathematical Modeling of Biological Processes: Models in Biophysics and Ecology. Moscow: Urait Publ., 2017 (in Russian)]
- Сукачёв В.Н. Избранные труды в трех томах. Л.: Наука, 1972
[Sukachev V.N. Selected Works: in 3 vols. Leningrad: Nauka Publ., 1972 (in Russian)]
- Фадеев С.И., Лихошвай В.А., Когай В.В., Омелянчук Н.А. О математическом моделировании паттерна распределения ауксина в корне растений. *Сибирские электронные математические известия*. 2008;5:25-41
[Fadeev S.I., Likhoshvai V.A., Kogai V.V., Omel'yanchuk N.A. On mathematical modeling of auxin distribution patterns in plant root. *Siberian Electronic Mathematical Reports*. 2008;5:25-41 (in Russian)]
- Чураев Р.Н. Генные и эпигенные сети: два уровня организации наследственной системы. *Информационный вестник ВОВиС*. 2005; 9(2):199-208
[Churaev R.N. Gene and epigene networks: two levels of organization of the hereditary system. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2005; 9(2):199-208 (in Russian)]
- Чураев Р.Н., Ратнер В.А. Моделирование молекулярно-генетических систем управления на языке теории автоматов. Сообщ. 1.

- Опероны и оперонные системы. В: Исследования по теоретической генетике. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1972;210-228 [Churaev R.N., Ratner V.A. Modeling of molecular-genetic control systems in the language of automata theory. Report 1. Operons and operon systems. In: Studies in Theoretical Genetics. Novosibirsk, 1972;210-228 (in Russian)]
- Шумный В.К., Шокин Ю.И., Колчанов Н.А., Федотов А.М. (ред.) Биоразнообразие и динамика экосистем: информационные технологии и моделирование. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2006 [Shumnyi V.K., Shokin Yu.I., Kolchanov N.A., Fedotov A.M. (Eds) Biodiversity and Ecosystem Dynamics: Information Technologies and Modeling. Novosibirsk, 2006 (in Russian)]
- Akberdin I.R., Ozonov E.A., Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Likhoshvai V.A., Gorpichenko D.N., Kolchanov N.A. A cellular automaton to model the development of primary shoot meristems of *Arabidopsis thaliana*. *J Bioinf Comput Biol*. 2007;05(02b):641-650. doi 10.1142/S0219720007002862
- Allen A.P., Gillooly J.F. Towards an integration of ecological stoichiometry and the metabolic theory of ecology to better understand nutrient cycling. *Ecol Lett*. 2009;12(5):369-384. doi 10.1111/j.1461-0248.2009.01302.x
- Barbuti R., Gori R., Milazzo P., Nasti L. A survey of gene regulatory networks modelling methods: from differential equations, to Boolean and qualitative bioinspired models. *J Membr Comput*. 2020;2(3):207-226. doi 10.1007/s41965-020-00046-y
- Barnabas J., Raj P. The human body: a digital twin of the cyber physical systems. *Adv Comput*. 2020;117(1):219-246. doi 10.1016/bs.adcom.2019.09.004
- Bataillon T., Mailund T., Thorlacius S., Steingrimsen E., Rafnar T., Halldorsson M.M., Calian V., Schierup M.H. The effective size of the Icelandic population and the prospects for LD mapping: inference from unphased microsatellite markers. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(9):1044-1053. doi 10.1038/sj.ejhg.5201669
- Beerli P., Palczewski M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*. 2010;185(1):313-326. doi 10.1534/genetics.109.112532
- Berg H.C., Purcell E.M. Physics of chemoreception. *Biophys J*. 1977;20(2):193-219. doi 10.1016/S0006-3495(77)85544-6
- Bezzi M., Celada F., Ruffo S., Seiden P.E. The transition between immune and disease states in a cellular automaton model of clonal immune response. *Physica A Statist Mech Appl*. 1997;245(1-2):145-163. doi 10.1016/S0378-4371(97)00290-2
- Blinov M.L., Faeder J.R., Goldstein B., Hlavacek W.S. BioNetGen: software for rule-based modeling of signal transduction based on the interactions of molecular domains. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3289-3291. doi 10.1093/bioinformatics/bth378
- Bray D., Bourret R.B. Computer analysis of the binding reactions leading to a transmembrane receptor-linked multiprotein complex involved in bacterial chemotaxis. *Mol Biol Cell*. 1995;6(10):1367-1380. doi 10.1091/mbc.6.10.1367
- Bray D., Bourret R.B., Simon M.I. Computer simulation of the phosphorylation cascade controlling bacterial chemotaxis. *Mol Biol Cell*. 1993;4(5):469-482. doi 10.1091/mbc.4.5.469
- Bray D., Levin M.D., Lipkow K. The chemotactic behavior of computer-based surrogate bacteria. *Curr Biol*. 2007;17(1):12-19. doi 10.1016/j.cub.2006.11.027
- Brüningk S.C., Ziegenhein P., Rovens I., Oelfke U., Haar G.T. A cellular automaton model for spheroid response to radiation and hyperthermia treatments. *Sci Rep*. 2019;9(1):17674. doi 10.1038/s41598-019-54117-x
- Chen L., Kulasiri D., Samarasinghe S. A novel data-driven Boolean model for genetic regulatory networks. *Front Physiol*. 2018;9:1328. doi 10.3389/fphys.2018.01328
- Colasanti R.L., Hunt R., Watrud L. A simple cellular automaton model for high-level vegetation dynamics. *Ecol Modell*. 2007;203(3-4):363-374. doi 10.1016/j.ecolmodel.2006.12.039
- de Jong H. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J Comput Biol*. 2002;9(1):67-103. doi 10.1089/10665270252833208
- Doebeli M., Dieckmann U. Speciation along environmental gradients. *Nature*. 2003;421(6920):259-264. doi 10.1038/nature01274
- Doebeli M., Dieckmann U. Adaptive dynamics of speciation: spatial structure. In: Adaptive Speciation. Cambridge Studies in Adaptive Dynamics. Cambridge University Press, 2004;140-168
- Drasdo D., Bode J., Dahmen U., Dirsch O., Dooley S., Gebhardt R., Ghallab A., ... Klingmüller U., Kuepfer L., Timmer J., Zerial M., Hengstler J.G. The virtual liver: state of the art and future perspectives. *Arch Toxicol*. 2014;88(12):2071-2075. doi 10.1007/s00204-014-1384-6
- Emonet T., Macal C.M., North M.J., Wickersham C.E., Cluzel P. AgentCell: a digital single-cell assay for bacterial chemotaxis. *Bioinformatics*. 2005;21(11):2714-2721. doi 10.1093/bioinformatics/bti391
- Fagundes N.J.R., Ray N., Beaumont M., Neuenschwander S., Salzano F.M., Bonatto S.L., Excoffier L. Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(45):17614-17619. doi 10.1073/pnas.0708280104
- Fath B.D., Scharler U.M., Ulanowicz R.E., Hannon B. Ecological network analysis: network construction. *Ecol Modell*. 2007;208(1):49-55. doi 10.1016/j.ecolmodel.2007.04.029
- Ferrer J., Prats C., López D. Individual-based modelling: an essential tool for microbiology. *J Biol Phys*. 2008;34(1-2):19-37. doi 10.1007/s10867-008-9082-3
- Fisher R.A. The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon Press, Oxford, 1930. Available: <https://archive.org/details/geneticaltheoryo31631mbp/page/n25/mode/2up>
- Gevertz J.L., Torquato S. Modeling the effects of vasculature evolution on early brain tumor growth. *J Theor Biol*. 2006;243(4):517-531. doi 10.1016/j.jtbi.2006.07.002
- Glazier J.A., Graner F. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*. 1993;47(3):2128-2154. doi 10.1103/physreve.47.2128
- Gómez Esteban P., Rodríguez-Patón A. Simulating a Rock-Scissors-Paper bacterial game with a discrete cellular automaton. In: Ferrández J.M., Álvarez Sánchez J.R., de la Paz F., Toledo F.J. (Eds) New Challenges on Bioinspired Applications. IWINAC 2011. Lecture Notes in Computer Science. Vol. 6687. Berlin: Springer, 2011;363-370. doi 10.1007/978-3-642-21326-7_39
- Grimm V., Berger U. Structural realism, emergence, and predictions in next-generation ecological modelling: synthesis from a special issue. *Ecol Modell*. 2016;326:177-187. doi 10.1016/j.ecolmodel.2016.01.001
- Grimm V., Revilla E., Berger U., Jeltsch F., Mooij W.M., Railsback S.F., Thulke H.-H., Weiner J., Wiegand T., DeAngelis D.L. Pattern-oriented modeling of agent-based complex systems: lessons from ecology. *Science*. 2005;310(5750):987-991. doi 10.1126/science.1116681
- Grimm V., Berger U., DeAngelis D.L., Polhill J.G., Giske J., Railsback S.F. The ODD protocol: a review and first update. *Ecol Modell*. 2010;221(23):2760-2768. doi 10.1016/j.ecolmodel.2010.08.019
- Guan W., Liang L., Boehnke M., Abecasis G.R. Genotype-based matching to correct for population stratification in large-scale case-control genetic association studies. *Genetic Epidemiol*. 2009;33(6):598-517. doi 10.1002/gepi.20403
- Haeckel E. Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundsätze der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von C. Darwin reformirte Descendenz-Theorie. Berlin: Verlag Von Georg Reimer, 1866. Available: <https://archive.org/details/generellemorphol01haec/page/n9/mode/2up>
- Haldane J.B.S. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part II. The influence of partial self-fertilisation, inbreeding, assortative mating, and selective fertilisation on the composition of Mendelian populations, and on natural selection. *Biol Rev*. 1924;1(3):158-163. doi 10.1111/j.1469-185X.1924.tb00546.x

- Haldane J.B.S. A mathematical theory of natural and artificial selection. *Math Proc Cambridge Philos Soc.* 1926;23(4):363-372. doi 10.1017/S0305004100015176
- Haldane J.B.S. A mathematical theory of natural and artificial selection – I. 1924. *Bull Math Biol.* 1990;52(1-2):209-240. doi 10.1007/BF02459574
- Harris L.A., Hogg J.S., Tapia J.J., Sekar J.A., Gupta S., Korsunsky I., Arora A., Barua D., Sheehan R.P., Faeder J.R. BioNetGen 2.2: advances in rule-based modeling. *Bioinformatics.* 2016;32(21):3366-3368. doi 10.1093/bioinformatics/btw469
- Hellweger F.L., Clegg R.J., Clark J.R., Plugge C.M., Kreft J.-U. Advancing microbial sciences by individual-based modelling. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(7):461-471. doi 10.1038/nrmicro.2016.62
- Hoehme S., Drasdo D. A cell-based simulation software for multi-cellular systems. *Bioinformatics.* 2010;26(20):2641-2642. doi 10.1093/bioinformatics/btq437
- Holmes E.E., Lewis M.A., Banks J.E., Veit R.R. Partial differential equations in ecology: spatial interactions and population dynamics. *Ecology.* 1994;75(1):17-29. doi 10.2307/1939378
- Holzhueter H.-G., Drasdo D., Preusser T., Lippert J., Henney A.M. The virtual liver: a multidisciplinary, multilevel challenge for systems biology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012;4(3):221-235. doi 10.1002/wsbm.1158
- Hucka M., Finney A., Sauro H.M., Bolouri H., Doyle J.C., Kitano H., Arkin A.P., ... Stelling J., Takahashi K., Tomita M., Wagner J., Wang J. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics.* 2003;19(4):524-531. doi 10.1093/bioinformatics/btg015
- Hudson R.R. Generating samples under a Wright–Fisher neutral model of genetic variation. *Bioinformatics.* 2002;18(2):337-338. doi 10.1093/bioinformatics/18.2.337
- Ishii N., Robert M., Nakayama Y., Kanai A., Tomita M. Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation. *J Biotechnol.* 2004;113(1-3):281-94. doi 10.1016/j.jbiotec.2004.04.038
- Jørgensen S.E. (Ed.) Ecosystem Ecology. Elsevier, 2009
- Jørgensen S.E., Chon T.-S., Recknagel F.A. (Eds) Handbook of Ecological Modelling and Informatics. WIT Press, 2009
- Kaizu K., de Ronde W., Pajmans J., Takahashi K., Tostevin F., ten Wolde P.R. The Berg–Purcell limit revisited. *Biophys J.* 2014;106(4):976-985. doi 10.1016/j.bpj.2013.12.030
- Karr J.R., Sanghvi J.C., MacKlin D.N., Gutschow M.V., Jacobs J.M., Bolival B., Assad-Garcia N., Glass J.I., Covert M.W. A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell.* 2012;150(2):389-401. doi 10.1016/j.cell.2012.05.044
- Kauffman S.A. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theor Biol.* 1969;22(3):437-467. doi 10.1016/0022-5193(69)90015-0
- Kazantsev F., Akberdin I., Lashin S., Ree N., Timonov V., Ratushnyi A., Khlebodarova T., Likhoshvai V. MAMMOTH: a new database for curated mathematical models of biomolecular systems. *J Bioinf Comput Biol.* 2018;16(01):1740010. doi 10.1142/S0219720017400108
- Khatri B.S., Free A., Allen R.J. Oscillating microbial dynamics driven by small populations, limited nutrient supply and high death rates. *J Theor Biol.* 2012;314:120-129. doi 10.1016/j.jtbi.2012.08.013
- Komarov A.S., Palenova M.M., Smirnova O.V. The concept of discrete description of plant ontogenesis and cellular automata models of plant populations. *Ecol Modell.* 2003;170(2-3):427-439. doi 10.1016/S0304-3800(03)00243-6
- Kreft J., Booth G., Wimpenny J.W.T. BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth. *Microbiology.* 1998;144(12):3275-3287. doi 10.1099/00221287-144-12-3275
- Kreft J.U., Picioreanu C., Wimpenny J.W., Van Loosdrecht M.C. Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology.* 2001;147(11):2897-2912. doi 10.1099/00221287-147-11-2897
- Kutalik Z., Razaz M., Baranyi J. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *J Theor Biol.* 2005;232(2):285-299. doi 10.1016/j.jtbi.2004.08.013
- Laval G., Excoffier L. SIMCOAL 2.0: a program to simulate genomic diversity over large recombining regions in a subdivided population with a complex history. *Bioinformatics.* 2004;20(15):2485-2487. doi 10.1093/bioinformatics/bth264
- Lavaud R., Filgueira R., Nadeau A., Steeves L., Guyondet T. A Dynamic Energy Budget model for the macroalga *Ulva lactuca*. *Ecol Modell.* 2020;418:108922. doi 10.1016/j.ecolmodel.2019.108922
- Leslie P.H. On the use of matrices in certain population mathematics. *Biometrika.* 1945;33(3):183-212. doi 10.1093/biomet/33.3.183
- Leslie P.H. Some further notes on the use of matrices in population mathematics. *Biometrika.* 1948;35(3/4):213. doi 10.2307/2332342
- Liang L., Zöllner S., Abecasis G.R. GENOME: a rapid coalescent-based whole genome simulator. *Bioinformatics.* 2007;23(12):1565-1567. doi 10.1093/bioinformatics/btm138
- Lotka A.J. Contribution to the theory of periodic reactions. *J Phys Chem.* 1909;14(3):271-274. doi 10.1021/j150111a004
- Lotka A.J. Undamped oscillations derived from the law of mass action. *J Am Chem Soc.* 1920;42(8):1595-1599. doi 10.1021/ja01453a010
- Lotka A.J. Elements of Physical Biology. Williams and Wilkins, Baltimore, 1925
- Mailund T., Schierup M.H., Pedersen C.N.S., Meeklenborg P.J.M., Madsen J.N., Schauer L. CoaSim: a flexible environment for simulating genetic data under coalescent models. *BMC Bioinformatics.* 2005;6(1):252. doi 10.1186/1471-2105-6-252
- Malthus T.R. An Essay on the Principle of Population. Cambridge University Press, 2008
- Marée A.F.M., Grieneisen V.A., Hogeweg P. The Cellular Potts Model and biophysical properties of cells, tissues and morphogenesis. In: Anderson A.R.A., Chaplain M.A.J., Rejniak K.A. (Eds) Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine. Mathematics and Biosciences in Interaction. Birkhäuser, Basel, 2007;107-136. doi 10.1007/978-3-7643-8123-3_5
- Markus M., Böhm D., Schmick M. Simulation of vessel morphogenesis using cellular automata. *Math Biosci.* 1999;156(1-2):191-206. doi 10.1016/S0025-5564(98)10066-4
- Miehe R., Horbelt J., Baumgarten Y., Bauernhansl T. Reprint of: Basic considerations for a digital twin of biointelligent systems: applying technical design patterns to biological systems. *CIRP J Manuf Sci Technol.* 2021;34:133-145. doi 10.1016/j.cirpj.2021.06.004
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G., Fadeev S.I., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root. *BMC Syst Biol.* 2010;4(3):98. doi 10.1186/1752-0509-4-98
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Novoselova E.S., Doroshkov A.V., Kazantsev F.V., Kochetov A.V., Novchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. Combined *in silico/in vivo* analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance. *Ann Bot.* 2012;110(2):349-360. doi 10.1093/aob/mcs069
- Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol.* 1965;12(1):88-118. doi 10.1016/S0022-2836(65)80285-6
- Moran P.A.P. Some remarks on animal population dynamics. *Biometrics.* 1950;6(3):250-258. doi 10.2307/3001822
- Murphy J.T., Walshe R. Modeling antibiotic resistance in bacterial colonies using agent-based approach. In: Dubitzky W., Southgate J., Fuß H. (Eds) Understanding the Dynamics of Biological Systems. Springer, New York, 2011;131-154. doi 10.1007/978-1-4419-7964-3_7
- Murray J.D. (Ed.) Mathematical Biology. II. Spatial Models and Biomedical Applications. New York: Springer, 2003. doi 10.1007/b98869
- Novoselova E.S., Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Kazantsev F.V., Likhoshvai V.A. Mathematical modeling of auxin transport in protoxylem and protophloem of *Arabidopsis thaliana* root tips. *J Bioinf Comput Biol.* 2013;11(1):1340010. doi 10.1142/S0219720013400106
- O’Beirne G.A., Patuzzi R.B. Mathematical model of outer hair cell regulation including ion transport and cell motility. *Hear Res.* 2007;234(1-2):29-51. doi 10.1016/j.heares.2007.09.008

- Omholt S.W., Gjuvslund A.B., Vik J.O. The Digital Salmon – key to both more science and more profit. In: Grue J., Almås K.A. (Eds) Food from the Ocean – Norway's Opportunities. Oslo, Norway, 2013;81-112
- Orth J.D., Thiele I., Palsson B.Ø. What is flux balance analysis? *Nate Biotech.* 2010;28(3):245-248. doi 10.1038/nbt.1614
- Owolabi K.M., Patidar K.C. Numerical simulations of multicomponent ecological models with adaptive methods. *Theor Biol Med Modell.* 2016;13(1):1. doi 10.1186/s12976-016-0027-4
- Pałubicki W., Kokosza A., Burian A. Formal description of plant morphogenesis. *J Exp Bot.* 2019;70(14):3601-3613. doi 10.1093/jxb/erz210
- Pasternak T., Groot E.P., Kazantsev F.V., Teale W., Omelyanchuk N., Kovrizhnykh V., Palme K., Mironova V.V. Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiol.* 2019;180(3):1725-1739. doi 10.1104/pp.19.00130
- Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell.* 2006;190(3-4):231-259. doi 10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026
- Price N.D., Reed J.L., Palsson B.Ø. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(11):886-897. doi 10.1038/nrmicro1023
- Ricker W.E. Handbook of Computations of Biological Statistics of Fish Populations. Ottawa: Queen's Printer and Controller of Stationery, 1958. Available: <https://waves-vagues.dfo-mpo.gc.ca/library-bibliotheque/10161.pdf>
- Salem R.M., Wessel J., Schork N.J. A comprehensive literature review of haplotyping software and methods for use with unrelated individuals. *Hum Genom.* 2005;2(1):39. doi 10.1186/1479-7364-2-1-39
- Salguero A.G., Capel M.I., Tomeu A.J. Parallel cellular automaton tumor growth model. In: Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics, 12th International Conference. PACBB-2018. Advances in Intelligent Systems and Computing. Vol. 803. Springer, 2019;175-182. doi 10.1007/978-3-319-98702-6_21
- Sarma G.P., Lee C.W., Portegys T., Ghayoomie V., Jacobs T., Alicea B., Cantarelli M., ... Khayrulin S., Lung D., Palyanov A., Watts M., Larson S.D. OpenWorm: overview and recent advances in integrative biological simulation of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1758):20170382. doi 10.1098/rstb.2017.0382
- Schaffner S.F., Foo C., Gabriel S., Reich D., Daly M.J., Altshuler D. Calibrating a coalescent simulation of human genome sequence variation. *Genome Res.* 2005;15(11):1576-1583. doi 10.1101/gr.3709305
- Slimi R., El Yacoubi S., Dumontel E., Gourbière S. A cellular automata model for Chagas disease. *Appl Math Modell.* 2009;33(2):1072-1085. doi 10.1016/j.apm.2007.12.028
- Sütterlin T., Kolb C., Dickhaus H., Jäger D., Grabe N. Bridging the scales: semantic integration of quantitative SBML in graphical multi-cellular models and simulations with EPISIM and COPASI. *Bioinformatics.* 2013;29(2):223-229. doi 10.1093/bioinformatics/bts659
- Sütterlin T., Tsingos E., Bensaci J., Stamatas G.N., Grabe N. A 3D self-organizing multicellular epidermis model of barrier formation and hydration with realistic cell morphology based on EPISIM. *Sci Rep.* 2017;7(1):43472. doi 10.1038/srep43472
- Swat M.H., Thomas G.L., Belmonte J.M., Shirinifard A., Hmeljak D., Glazier J.A. Multi-scale modeling of tissues using CompuCell3D. *Methods Cell Biol.* 2012;110:325-366. doi 10.1016/B978-0-12-388403-9.00013-8
- Szabó A., Merks R.M.H. Cellular potts modeling of tumor growth, tumor invasion, and tumor evolution. *Front Oncol.* 2013;3:87. doi 10.3389/fonc.2013.00087
- Szigeti B., Gleeson P., Vella M., Khayrulin S., Palyanov A., Hakan-son J., Currie M., Cantarelli M., Idili G., Larson S. OpenWorm: an open-science approach to modeling *Caenorhabditis elegans*. *Front Comput Neurosci.* 2014;8:137. doi 10.3389/fncom.2014.00137
- Talaminos-Barroso A., Reina-Tosina J., Roa-Romero L.M. Models based on cellular automata for the analysis of biomedical systems. In: Control Applications for Biomedical Engineering Systems. Elsevier, 2020;405-445. doi 10.1016/B978-0-12-817461-6.00014-7
- Tansley A.G. The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology.* 1935;16(3):284-307. doi 10.2307/1930070
- Tellechea-Luzardo J., Winterhalter C., Widera P., Kozyra J., de Lorenzo V., Krasnogor N. Linking engineered cells to their digital twins: a version control system for strain engineering. *ACS Synth Biol.* 2020;9(3):536-545. doi 10.1021/acssynbio.9b00400
- Tomita M. Whole-cell simulation: a grand challenge of the 21st century. *Trends Biotechnol.* 2001;19(6):205-210. doi 10.1016/S0167-7799(01)01636-5
- Tomita M., Hashimoto K., Takahashi K., Shimizu T., Matsuzaki Y., Miyoshi F., Saito K., Tanida S., Yugi K., Venter J., Hutchison C. E-CELL: software environment for whole-cell simulation. *Bioinformatics.* 1999;15(1):72-84. doi 10.1093/bioinformatics/15.1.72
- Tran Q.N. Finding long-term influence and sensitivity of genes using probabilistic genetic regulatory networks. In: Emerging Trends in Applications and Infrastructures for Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology. Morgan Kaufmann, 2016;107-120. doi 10.1016/B978-0-12-804203-8.00008-0
- Turing A.M. The chemical theory of morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1952;237(641):37-72. doi 10.1098/rstb.1952.0012
- Verhulst P.F. Notice sur la loi que population suit dans son accroissement. *Correspondance Mathématique et Physique.* 1838;10:113-121
- Vladimirov N., Sourjik V. Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biol Chem.* 2009;390(11):1097-1104. doi 10.1515/BC.2009.130
- Vladimirov N., Løvdok L., Lebedz D., Sourjik V. Dependence of bacterial chemotaxis on gradient shape and adaptation rate. *PLoS Comp Biol.* 2008;4(12):e1000242. doi 10.1371/journal.pcbi.1000242
- Voss-Böhme A. Multi-scale modeling in morphogenesis: a critical analysis of the cellular Potts model. *PLoS One.* 2012;7(9):e42852. doi 10.1371/journal.pone.0042852
- Wakeley J. The coalescent in an island model of population subdivision with variation among demes. *Theor Popul Biol.* 2001;59(2):133-144. doi 10.1006/tpbi.2000.1495
- Widder S., Allen R.J., Pfeiffer T., Curtis T.P., Wiuf C., Sloan W.T., Cordero O.X., ... Klapper I., Labarthe S., Smets B.F., Wang H., Soyer O.S. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J.* 2016;10(11):2557-2568. doi 10.1038/ismej.2016.45
- Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics.* 1931;16(2):97-159. doi 10.1093/genetics/16.2.97
- Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen.* 1951;15(4):323-354. doi 10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x
- Xavier J.B., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M. A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms. *Environ Microbiol.* 2005;7(8):1085-1103. doi 10.1111/j.1462-2920.2005.00787.x

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.11.2025. После доработки 04.02.2026. Принята к публикации 04.02.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-54

Evolutionary inferences from the analysis of mutation dynamics in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex

A.Yu. Palyanov ^{1, 2} , A.P. Devyaterikov¹, N.V. Palyanova ², A.M. Shestopalov ²¹ A.P. Ershov Institute of Informatics Systems of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia palyanov@iis.nsk.su

Abstract. The SARS-CoV-2 virus continues to evolve and remains a significant public health threat, while the worldwide monitoring and sequencing of its genomic variants provide a unique opportunity to study its evolution and better understand its molecular mechanisms. In our work, we analyze its replication-transcription complex (RTC) over a 5.5-year period (December 2019–July 2025). This complex is significantly more conserved (as any alteration impairing its function prevents viral replication) than the S-protein (directly impacting infectivity and immune evasion) but still dynamically evolving part of the genome. The study focuses on high-frequency substitutions, their temporal behavior, co-occurrence, and structural context. Using genomes from GISAID, we identified 22 amino acid point mutations present in at least 1 % of currently available sequences, analyzed their weekly dynamics, revealed three distinct temporal patterns, and enumerated frequent co-occurring groups (pairs, triplets, and larger sets) within the same genomes. We mapped the affected residues onto an RTC 3D structure and reviewed the literature to examine the reported functional consequences. Notably, all these substitutions were single-nucleotide. One of the mutations, nsP12:G671S, showed a unique dynamic feature: it emerged, dominated globally for months, disappeared twice, and in 2025 reappeared for the 3rd time, always accompanied with other mutations in the RTC. Thus, it was interesting to trace its dynamics as an indicator of probable changes. In addition, our analysis of mutation and variant timelines suggests that the Delta variant may have emerged 7–8 months earlier than commonly reported. Taken together, these results provide a consolidated view of recurrent RTC variation, its temporal classes, co-occurrence, and structural context, underscoring the value of systematic surveillance of nsP7–nsP14 alongside analyses focused on structural proteins.

Key words: SARS-CoV-2; RdRp; RTC; evolution; substitutions; mutations; dynamics; analysis; nsP12:G671S; Delta

For citation: Palyanov A.Yu., Devyaterikov A.P., Palyanova N.V., Shestopalov A.M. Evolutionary inferences from the analysis of mutation dynamics in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):515-526. doi 10.18699/vjgb-26-54

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation, project 23-64-00005.

Эволюционные аспекты динамики мутаций в репликационно-транскрипционном комплексе SARS-CoV-2

А.Ю. Пальянов ^{1, 2} , А.П. Девятериков¹, Н.В. Пальянова ², А.М. Шестопалов ²¹ Институт систем информатики им. А.П. Ершова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Научно-исследовательский институт вирусологии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия palyanov@iis.nsk.su

Аннотация. Вирус SARS-CoV-2 остается заметной угрозой для человечества, поскольку продолжает циркулировать и эволюционировать. При этом продолжающийся глобальный мониторинг и накопление геномных данных позволяют детально изучать эволюционные механизмы. В нашей работе мы анализируем репликационно-транскрипционный комплекс (RTC, nsP7–nsP14) – более консервативную, чем S-белок, напрямую связанный с инфекционностью и избеганием иммунитета, но все-таки динамично эволюционирующую часть генома – в течение 5.5-летнего периода (декабрь 2019 г. – июль 2025 г.). Исследование сосредоточено на аминокислотных заменах, присутствующих по крайней мере в 1 % доступных в базе GISAID геномов, их временной динамике, совместной встречаемости и структурном контексте. Мы идентифицировали 22 таких точечных аминокислотных замены, проанализировали их недельную динамику, выявили три различных временных паттерна и рассчитали частоты для групп мутаций (пары, тройки и т.д.), одновременно присутствующих в геномах. Примечательно, что все изученные замены были однонуклеотидными. Мы визуализировали аминокислотные остатки, соответствующие рассмотренным мутациям, на трехмерной структуре RTC, описали их особенности и обобщили данные литературы для изучения известных функциональных последствий. Одна из мутаций, nsP12:G671S, продемонстрировала уникальную динамику: она появлялась, доминировала в

глобальном масштабе в течение нескольких месяцев, затем исчезала дважды, а в 2025 г. появилась в третий раз. При этом она всегда сопровождалась набором сопутствующих мутаций в комплексе RTC, что делает ее потенциальным индикатором изменений в геноме, т.е. необходимо продолжить отслеживание ее динамики. Кроме того, наш анализ временных линий мутаций и вариантов позволяет предположить, что вариант Дельта мог появиться на 7–8 месяцев раньше, чем принято считать. В совокупности эти результаты дают целостное представление о повторяющихся вариациях в RTC, их временных классах и совместной встречаемости, а также о структурном контексте, подчеркивая ценность систематического мониторинга nsp7–nsp14 наряду с анализом, сфокусированным на структурных белках.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; RdRp; RTC; эволюция; замены; мутации; динамика; анализ; nsp12:G671S; Дельта

Introduction

The COVID-19 pandemic catalyzed a sustained global effort in next-generation sequencing, virology, and bioinformatics, yielding an unprecedented corpus of SARS-CoV-2 genomes over the past five years. As the virus continues to evolve and remains a major public health concern, continuous genomic surveillance and further investigation of its molecular mechanisms are of considerable importance. The 29.9-kb positive-sense RNA genome encodes structural (S, E, M, N), nonstructural (nsp1–nsp16), and nine small accessory proteins (Bai et al., 2022; Yan W. et al., 2022), with approximately two-thirds of the coding capacity assigned to the nonstructural machinery on the 5' end (Eriani, Martin, 2022). A similar genomic structure, in terms of both gene composition and gene order, is observed across multiple related coronaviruses, including those hosted by humans, bats, and pangolins (Brant et al., 2021, Fig. 1; Temmam et al., 2022, Fig. 1). Approximately two-thirds of the genome on the 5' part codes for non-structural proteins and one-third of the genome on the 3' part codes for structural and accessory proteins (Eriani, Martin, 2022).

Mutations in the S-protein gene (~13 % of the 29.9 kb genome) attract the greatest attention due to their direct impact on infectivity and immune evasion. However, mutations in other structural and nonstructural proteins, as well as recombination events and other genomic alterations, can also lead to diverse consequences that affect virus adaptability. SARS-CoV-2 exhibits a complex interplay between antigenicity, transmissibility, and virulence, which usually has unpredictable consequences for the future trajectory of evolution of the virus (Carabelli et al., 2023). In the present study, we continue our investigation of SARS-CoV-2 evolution, using genomic sequences that have been collected and deposited in public databases since the virus first emerged in late 2019. In our previous works, we analyzed SARS-CoV-2 evolution at several scales: globally (Palyanov, Palyanova, 2024), regionally across Siberia (Palyanova et al., 2023), and within the genomic variant landscape of the virus (Palyanov, Palyanova, 2023). Here, we focus on a mutational analysis of the replication-transcription complex, which carries out several essential viral functions, including genome replication and proofreading, and constitutes a substantial portion of the viral genome (Romano et al., 2020).

Among nonstructural proteins, the replication-transcription complex (RTC) is central to RNA synthesis and error control. The nsp12 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) operates with cofactors nsp7 and nsp8. Together they form a subcomplex (holoenzyme), which is the minimal core component for mediating coronavirus RNA synthesis (Peng et al., 2020;

Singh et al., 2025). In this work we analyze an extended, structurally characterized RTC assembly spanning nsp7–nsp14 (PDB: 7EIZ) (Yan L. et al., 2021), which enables assessment of substitutions not only within RdRp but also across its binding interfaces and the exonuclease proofreading module. The analysis of this extended configuration may provide additional insights into the structural and functional consequences of mutations, particularly in cases where multiple substitutions occur in close spatial proximity. For example, point mutations at specific sites of the nsp12–nsp8 interface dramatically affect the RNA polymerization activity of SARS-CoV-2 (Ferrer-Orta et al., 2024). In the same year 2024, it was discovered that the combination of nsp8:A21V and nsp12:P323L mutations resulted in an approximately 50 % increase in polymerase activity (Danda et al., 2024). The authors described this as the first biochemical study demonstrating the functional impact of amino acid substitutions involving all components of the RdRp complex in emerging SARS-CoV-2 subvariants.

The evolution of SARS-CoV-2 proceeds through a mixture of point mutations, insertions, deletions, and recombinations, and its consequences are highly diverse and difficult to predict. For instance, mutations in nonstructural proteins such as nsp6:ΔSGF(3675–3677) (Feng et al., 2023) and nsp12:P323L/G671S (Kim et al., 2023) have been shown to increase viral replication efficiency. Next, nsp1:(Y154A/F157A) and nsp1:(R171E/R175E) mutations have been found to abolish protein translation inhibition in a cell free system (Schubert et al., 2020). The single mutation nsp14:F60S in the exoribonuclease (ExoN), responsible for replication proofreading, accelerates viral evolution by increasing the mutation rate (Mack et al., 2023). Moreover, the evolutionary rate of SARS-CoV-2 varies considerably among variants, and the emergence of new lineages often coincides with episodic accelerations of this rate. In certain periods, the evolutionary rate increased up to fourfold relative to the background phylogenetic rate, leading to the emergence of new variants within weeks rather than months, as would be expected from the baseline tempo of viral evolution (Tay et al., 2022).

While early global surveys mapped common substitutions across the genome (Abbasian et al., 2023), a focused and time-resolved analysis of RTC variation at population scale is still warranted given its functional importance. Genes encoding RTC are among the most conserved in viral genomes, as malfunction of the replication machinery prevents the production of viable virions. Nevertheless, SARS-CoV-2 (2019) exhibits four to eight point amino acid substitutions compared to its closest relatives (e.g., BANAL-20-52 (Temmam et al., 2022; Ou et al., 2023) and RaTG13 (Rahalkar, Bahulikar, 2020;

Zhou et al., 2020)), a range similar to the divergence observed between the RTC genes of the ancestral SARS-CoV-2 and of a typical 2023 Omicron descendant (Table S1)¹. The RNA-dependent RNA polymerases (RdRps) of viruses and cellular organisms share a conserved structural core, most notably the canonical palm domain that forms the catalytic center of the polymerase, underscoring the universality of the RNA synthesis mechanism. However, they diverge significantly in their structural details and a variety of accessory proteins – so, there is scope for variation, and the virus exploits it during evolution. Therefore, it is crucial to monitor the rate and consequences of these changes to identify emerging, functionally significant RTC substitutions that rise above the background noise in global surveillance data.

In this study, we aimed to identify RTC substitutions that eventually attain population-level peaks and to characterize their post-peak behaviors, including distinct cycles of re-emergence and decline or extinction, while also assessing co-occurrence within the extended complex. Using all publicly available genomes from late 2019 to July 2025, we quantified amino acid substitutions in nsp7–nsp14 occurring in ≥ 1 % of sequences; profiled their weekly and monthly dynamics to classify persistent, transient, and recurrent patterns; and analyzed co-occurrence. We then interpreted these population-scale signals in structural and functional terms by centering the analysis on the structurally resolved RTC (nsp7–nsp14; PDB 7EIZ), with the broader genome-wide context provided by prior surveys (Abbasian et al., 2023).

Materials and methods

We performed a secondary analysis of SARS-CoV-2 genomic surveillance data in the public domain to quantify the amino acid (AA) substitution dynamics in the proteins of the replication-transcription complex (RTC: nsp7/8/9/10/12/13/14) from the start of the pandemic through July 15, 2025. The primary outcome was the weekly global fraction of genomes carrying a given AA substitution; secondary outcomes included (i) geographic stratification by continent, (ii) co-occurrence patterns among substitutions within RTC genes, and (iii) lineage/clade context for substitutions with notable temporal behavior. The pre-specified gene set and date horizon are described in the main text and the Results sections.

Data sources

1. GISAID (<https://gisaid.org>) (Khare et al., 2021): the source of genome sequences and metadata used for lineage context and targeted queries by mutation, date, and location. All GISAID queries used the web interface (EpiCov→Search) with the filters *complete + low coverage excluded + collection date complete* for reliability, as detailed in the Results and Materials sections of the manuscript. It retains 15.5 of 17.5 million of genome samples, whereas the stronger variant, *high coverage* instead of *low coverage excluded* (entries with <1 % of Ns vs entries with <5 % of Ns), keeps only 5.7 million genomes. Text input fields for *collection*

(*from*) and *collection (to)* dates were used to specify the necessary time interval, *AA Substitutions*, to input single or multiple mutations in proteins (for example, nsp9_T35I, nsp12_G671S, nsp13_S36P), and *Nucl. Mutations*, to input single or multiple mutations in genome nucleotides.

2. CovidCG (<https://covidcg.org>) (Elbe, Buckland-Merrett, 2017): weekly counts of genomes carrying specified AA substitutions, and tools for comparing/combining substitutions within a gene (the *Compare AA mutations* module), used to obtain mutation frequency time-series and co-occurrence tallies. As of July 15, 2025, CovidCG reported 21,082,039 analyzable genomes (vs. 17,413,645 in the GISAID's own counter).
3. Nextclade (<https://clades.nextstrain.org>) (Aksamentov et al., 2021): used for clade assignment and recombinant flags on downloaded FASTA selections.
4. PDB structure 7EIZ from the Protein Data Bank, PDB (<https://www.rcsb.org>) and PyMOL v3.1 (<https://www.pymol.org>) were used solely for structure-mapping of residues corresponding to substitutions.
5. SARS-CoV-2 (COVID-19) stores the genome map of the Wuhan-Hu-1 isolate, with complete nucleotide and amino acid sequences ([https://www.snapgene.com/plasmids/coronavirus_resources/SARS-CoV-2_\(COVID-19\)_Genome](https://www.snapgene.com/plasmids/coronavirus_resources/SARS-CoV-2_(COVID-19)_Genome)); together with GISAID's genome sequences lists of nucleotide and corresponding amino acid mutations available for all genome samples. We used it to create the table, showing which specific codon triplets in nucleotide sequences represent protein sequences in the reference genome.

Inclusion criteria and quality control

Sequences: human SARS-CoV-2 genomes flagged as complete, with low-coverage entries excluded, and complete collection dates (YYYY-MM-DD) required. These exact GISAID web interface options are enumerated in the Results/Methods narrative and were applied to every targeted query (e. g., *first occurrence* tables).

Time frame: December 2019 – July 15, 2025, matching the scope stated in the paper. Access dates for all web tools were within July 1–15, 2025 (final extraction and checks on July 15, 2025). All queries (filters, date ranges, and mutation lists) are specified in the main text (Tables/Figures).

Gene set: RTC proteins nsp7/8/9/10/12/13/14.

Data acquisition for single-point mutation frequencies

Data on amino acid substitution frequencies in SARS-CoV-2 RTC proteins (nsp7–nsp14) were obtained from the *Compare AA Mutations* section of the CovidCG platform (<https://covidcg.org>). This tool provides aggregated daily/weekly/monthly/annual counts of genomes carrying specific amino acid substitutions based on submissions to the GISAID database.

For each RTC protein (nsp7 through nsp14), amino acid-level data were selected. The grouping parameter was set to mutation, and the genomic coordinate system defined by protein. The analysis was performed using the full residue

¹ Supplementary Materials 1–4 are available at:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx28.pdf>

range for each protein and included all geographic regions. The time range was set to cover the entire pandemic period (from December 2019 to July 2025) according to the *Since pandemic start* preset.

We extracted the information on all single amino acid substitutions with a total global frequency exceeding 1 % from the resulting datasets. This threshold is not a biological or statistical boundary. It was chosen as a pragmatic, operational cutoff to suppress locality-driven and unstable low-frequency noise and to keep the population-scale analysis tractable. Functionally important sub-1 % changes can exist, but these fall outside the scope of our population-scale focus. For each mutation, the CovidCG interface provides the number and proportion of genomes carrying the substitution relative to the total number of genomes available for the corresponding week, and the figures were used in further analysis of temporal dynamics.

Construction of weekly frequency-time series

Building on the dataset described above, we investigated the weekly dynamics of each identified mutation using the *AA Mutation Co-occurrence* module of the mentioned CovidCG platform. For each selected amino acid substitution within RTC proteins (nsp7–nsp14), we examined the New AA Mutation Percentages by Week chart, which displays the proportion of SARS-CoV-2 genomes carrying a given substitution over time. The data are shown as percentages and grouped by week to visualize the mutation prevalence dynamics throughout the entire observation period. The resulting time series for each substitution were exported via the CovidCG *Download* function and used to assess temporal trends in mutation frequencies.

Classification of dynamic types

Each mutation identified within the RTC (nsp7–nsp14) was represented as a weekly series reflecting the proportion of genomes carrying that substitution relative to the total number of genomes reported globally for the same week.

The observed temporal trajectories were categorized into three distinct dynamic types based on their characteristic shapes and relative frequency changes over time.

Persistent or fixation-like pattern. The frequency of the mutation exhibited a rapid increase from near 0 % to ≥ 90 –100 %, followed by a consistently high level for the remainder of the observation period. These trajectories correspond to mutations that became fixed or near-fixed in the global SARS-CoV-2 population.

Transient pattern. The mutation frequency increased noticeably (typically reaching 10–60 %) but subsequently declined to near 0 %, indicating the rise and disappearance of a temporary lineage or variant in which the substitution was predominant.

Recurrent pattern. The mutation frequency showed multiple distinct peaks separated by intervals of decline, i. e., a pattern of emergence, near-complete disappearance, and subsequent re-establishment of high frequency (≥ 80 –100 %). In our dataset, this behavior was observed only for the nsp12:G671S substitution. This mutation was accompanied by

different sets of co-occurring substitutions during individual peaks, each exhibiting highly correlated frequency profiles throughout their respective intervals.

Lineage and clade context

Nextclade was run on representative FASTA samples exported from the GISAID for periods of rising and falling phases to obtain Nextstrain clades and recombinant flags. The Pango lineage labels shown in tables/figures were taken from the GISAID metadata of the same records (e. g., B.1.617.2/Delta, XBB.*, JN.1, etc.).

Structural mapping

Substitutions with a weekly peak frequency of over 25 % were mapped onto 7EIZ (extended RTC) with residue atoms rendered as spheres in PyMOL v3.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.1 Schrödinger, LLC, <https://www.pymol.org>). Figures were rendered directly from these models and used solely to visualize the spatial dispersion and proximity to RNA. No structural inference beyond visualization was performed.

Results and discussion

Mutations in SARS-CoV-2 RTC (nsp7–nsp14) proteins with overall average frequencies >1 % in the population

The list of mutations in nsp7–nsp14 proteins with the total average frequency exceeding 1 % in the global dataset during the period from January 1, 2020 to July 15, 2025 was obtained from CovidCG.org (Elbe, Buckland-Merrett, 2017), as described in “Data acquisition for single-point mutation frequencies” (section Materials and Methods). The results are presented in Table 1. The rightmost column contains values of peak weekly frequency of the same mutations, obtained as described in “Construction of weekly frequency-time series” (section Materials and Methods). In total, 22 mutations were identified.

Dynamics of SARS-CoV-2 mutation frequencies within RTC

The data on the weekly dynamics of mutation frequencies (from CovidCG.org) presented in Table 1 were obtained as described in “Construction of weekly frequency-time series” (section Materials and Methods). The analyzed time interval is from January 1, 2020 to July 15, 2025.

We classified the curves presented in Figure 1 into three dynamic patterns: (1) persistent or fixation-like, (2) transient and (3) recurrent, as described in “Classification of dynamic types”. We noticed only one mutation out of 22, nsp12:G671S, with two specific properties that distinguished it from all the others.

First, upon its emergence, it reached a 100 % frequency, remained dominant for months and then disappeared; however, the cycle repeated, and the mutation appears to be undergoing this process for the third time at present. Second, during each round of emergence, it was accompanied by other RTC mutations during either a single tide (nsp13:S36P, nsp14:A394V) or two subsequent tides (nsp13:S36P). Their mutation frequency curves during this period also reach high values (up to 90–100 %) and closely resemble that of nsp12:G671S.

Table 1. High-frequency substitutions in the RTC proteins

RTC protein	Protein length, aa	Mutation name	Number of genomes with this mutation	% of genomes with this mutation	Peak % in weekly dynamics
nsp7	83	–	–	–	–
nsp8	198	N118S	218,846	1.0	12.9
nsp9	113	T35I	1,181,871	6.8	100.0
nsp10	139	–	–	–	–
nsp11	14	–	–	–	–
nsp12 (RdRp)	932	F192V	484,275	2.3	9.6
		P227L	313,050	1.5	17.2
		Y273H	199,613	3.1	53.6
		P323L	20,916,671	99.3	100.0
		G671S	7,424,696	35.3	100.0
		F694Y	328,845	1.6	10.9
		L838I	325,059	1.5	8.1
nsp13 (helicase)	601	S36P	1,452,092	6.9	89.4
		P77L	5,810,196	27.6	100.0
		T127N	501,924	2.4	23.0
		H164Y	370,389	1.8	6.4
		M233I	792,615	3.8	53.9
		N268S	490,535	2.3	40.6
		I334V	600,127	2.8	13.1
		E341D	207,872	1.0	10.0
		R392C	8,622,554	40.9	100.0
		K460R	335,412	1.6	15.7
nsp14 (ExoN)	527	I42V	11,613,863	55.1	100.0
		N129D	274,952	1.3	24.0
		A394V	5,197,852	24.7	95.6

Note. Substitutions present in at least 1 % of genomes were collected globally for the period from December, 2019 to July 15, 2025. For each mutation, the number of genomes with this mutation, the percentage of genomes with this mutation in the global population, and the weekly peak percentage are presented.

The dynamics of nsp12:G671S frequency in the population – two and a half tides

The first tide of nsp12:G671S

The atypical dynamics of nsp12:G671S frequency in the population showed two complete “tides” (by analogy with the SARS-CoV-2 pandemic waves), each consisting of an emergence phase, growth, a plateau, and a decline to near-zero level. Early in 2025, a third tide appeared to have begun, and it is still ongoing. As we needed to better understand the process dynamics, we conducted an investigation to determine the connection between these events and the dominance periods of the Delta, Omicron, and other variants.

Since the frequency curves of genomes with nsp12:G671S, nsp13:P77L and nsp14:A394V almost completely overlapped during the first tide (May 2021 – May 2022), rising from near 0 % to nearly 100 % level and back, it is highly probable that these three mutations tended to occur together. Indeed, among 4.12 million genomes with nsp12:G671S, 4.19 million with nsp13:P77L and 3.81 million with nsp14:A394V (collection dates between May 1, 2021 and May 1, 2022 in GISAID), 3.75 million contained all the three amino acid substitutions simultaneously. Moreover, all samples collected in mid-May 2021 (during the rise of the tide) belonged to the Pango lineage B.1.617.2+AY.*, also known as the Delta variant. Our

analysis aimed to determine whether the genomes carrying the nsp12:G671S + nsp13:P77L + nsp14:A394V combination or the Delta variant appeared first, or whether they appeared simultaneously. The results indicate that the latter is likely. Supporting details and evidence for this conclusion are shown in Figure 2.

By March 2020, the SARS-CoV-2 genome variants carrying nsp12:G671S, nsp13:P77L, and nsp14:A394V already existed. However, according to GISAID data, none of the samples contained them all simultaneously. When this combination first appeared in August 2020, the earliest genome identified as belonging to the Delta variant was detected, and it carried precisely these three mutations. Nearly all Delta genomes collected and sequenced thereafter also contained this mutation trio, suggesting that these mutations may have been required for the emergence and/or fitness advantage of Delta. Literature analysis revealed that this mutation trio had been mentioned in two articles describing variants detected in Iran (Ahmadi et al., 2023) and India (Bokolia, Gadepalli, 2022), but apparently received little attention at the time.

Timing the emergence of the Delta variant

The analysis of samples corresponding to the Delta variant (including early events classified as B.1.617.2 / Delta based on GISAID Pango metadata) and containing the trio of muta-

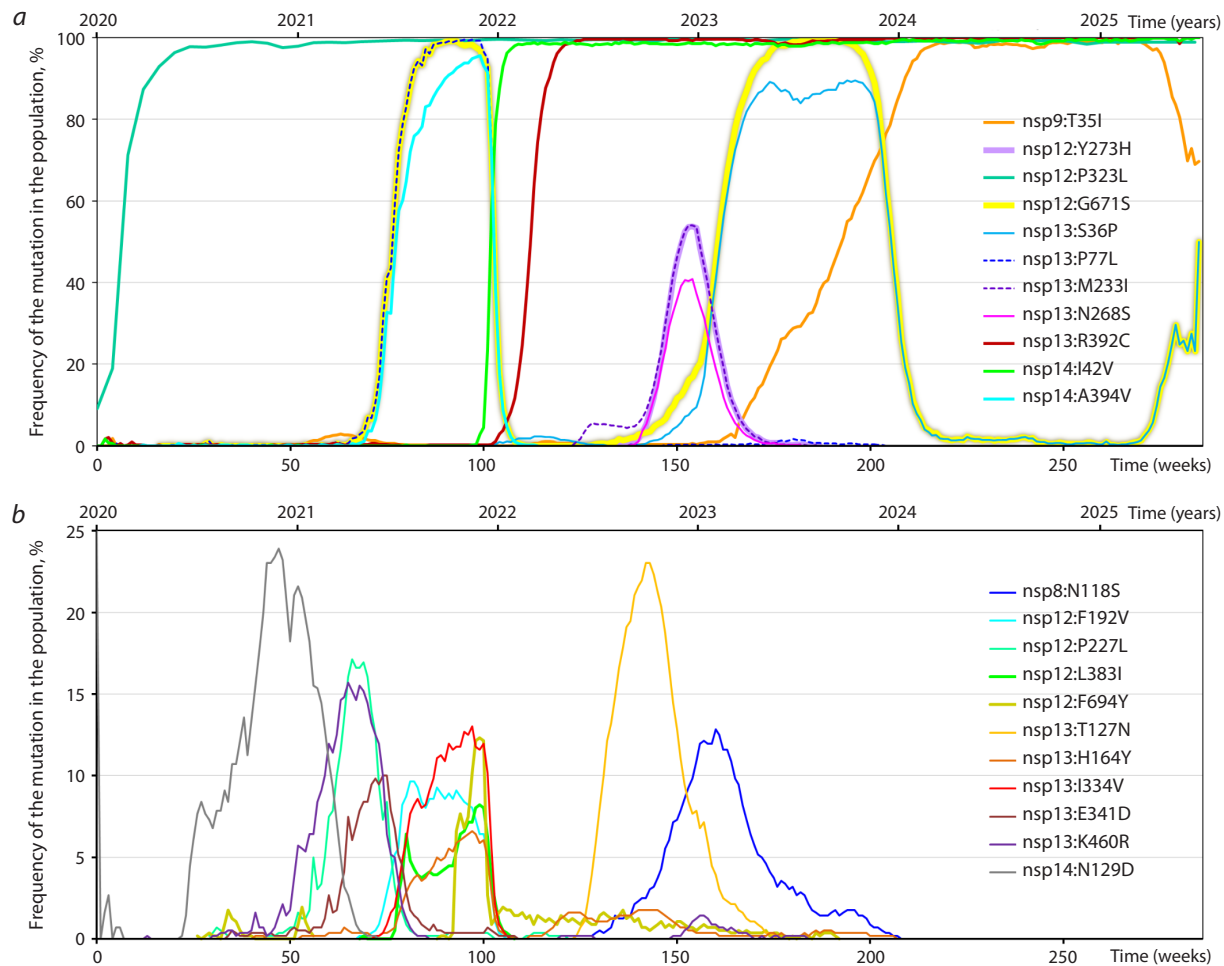


Fig. 1. Global frequency dynamics of mutations within RTC. Weekly frequencies of 22 substitutions in the RTC proteins (listed in Table 1) from January 2020 to July 2025. *a*, Trajectories of mutations that reached a peak frequency between 25 and 100 %. *b*, Trajectories of mutations with a peak frequency below 25 %. Frequencies were calculated as the proportion of all GISAID genomes per week containing a specific mutation.

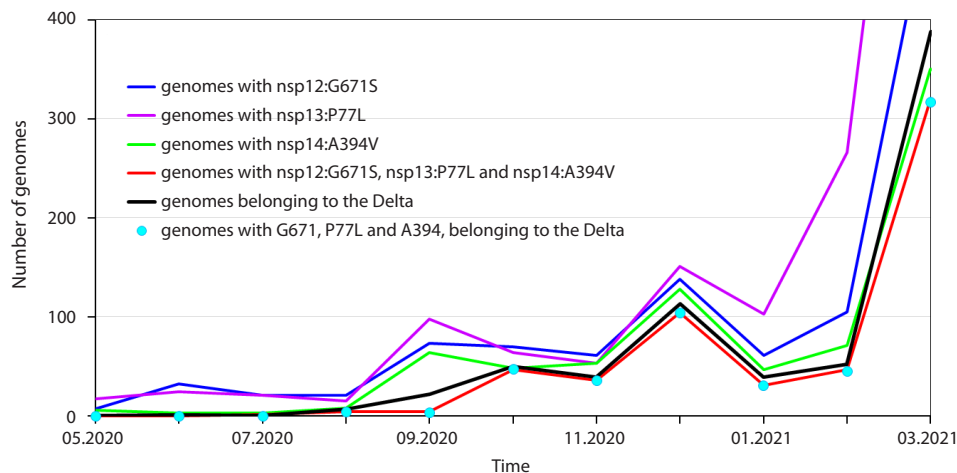


Fig. 2. Dynamics of the number of genomes with three key mutations in RTC genes related to the Delta variant. Shortly after their simultaneous appearance in the Delta genomes, their number started to increase rapidly. Monthly numbers of genomes (GISAID) carrying only one of the mutations (nsp12:G671S, nsp13:P77L or nsp14:A394V), genomes with all three mutations and genomes belonging to Delta variant during the latent period (less than 10 cases per month) before the apparent rise of Delta in May 2021 are shown.

tions in question led us to an accidental finding: according to these data the Delta variant may have emerged 7–8 months earlier than commonly reported in the literature, and in a different geographical location. This observation is based on the GISAID data, which includes hundreds of genome samples (filtered by *complete + low coverage excluded + collection date complete* for reliability). Detailed data providing the evidence and explaining this conclusion are presented in the Supplementary Materials, Table S2 and Figure S1. In brief, the earliest B.1.617.2 (Delta) genome was collected on April 26, 2020 in “Europe/Germany/Freiburg” (GISAID EPI_ISL=852796). This contradicts the statement that “The Delta (B.1.617.2) variant was first identified in Maharashtra, India, in late 2020” (Cherian et al., 2021), which is frequently cited in earlier (Mlcochova et al., 2021), later (Rahman et al., 2023), and very recent (Kandhasamy et al., 2025) publications.

According to GISAID data, during the period from April 26, 2020 to December 9, 2020 – that is, before the first Delta case reported in India (Maharashtra) in “late 2020” (December 10, 2020, GISAID EPI_ISL_2131509) – the Delta (B.1.617.2) variant was not only detected but also collected and fully sequenced in various locations across multiple continents, including North America, South America, Europe, Asia, Africa, and Oceania, with a total of 275 genome records. Notably, 254 of these contained the nsp12:G671S mutation. During the subsequent period from April 26, 2020 to April 26, 2021, a total of 12,157 Delta genomes were collected and sequenced, of which 11,135 (92 %) also carried the nsp12:G671S substitution. A pronounced and rapid increase in the number of Delta genomes began only in mid-May 2021, marking the onset of its global expansion. The accompanying details and contextual events are described in “The first tide of nsp12:G671S”.

The second tide of the nsp12:G671S

The SARS-CoV-2 variants with the mutations nsp13:P77L, nsp14:A394V and nsp12:G671S, which were discovered almost simultaneously and dominated at the peak of the first nsp12:G671S tide, completely disappeared in early 2023 (Fig. 1a). However, in contrast to nsp13:P77L and nsp14:A394V, which have not been detected since then, nsp12:G671S reappeared about six months later and once again reached a 100 % prevalence. This time, its rise almost coincided with the emergence of a new mutation, nsp13:S36P, which peaked at 89 %. The details and illustrations are provided in Supplementary Material 3 (Fig. S2).

We analyzed two sets of SARS-CoV-2 genome samples collected worldwide. The first set (499 samples) was collected on January 1, 2023, during the period of nsp12:G671S frequency increase, and the second set (1,497 samples) was collected in August 2023, at the onset of its frequency decline. During the rise, almost all samples (91 %) belonged to the XBB lineage (from XBB.1 to XBB.9), with the largest fraction (39 %) corresponding to XBB.1.5. During the decline, eight months later, the set of genomes was represented by XBB.* (31 %), EG.* (30 %), FL.* (9.3 %), GK.* (3.2 %), and several other sublineages. However, almost all of them were descendants of earlier XBB, and XBB itself was derived from Omicron, not Delta, which was the carrier of the nsp12:G671S muta-

tion during the tide 1. Thus, it appears that in the tide 2 the nsp12:G671S emerged *de novo*. The cause of the subsequent extinction of all these variants was the emergence of the JN.1(24A) lineage, which appeared at the end of 2023 and took over almost the entire population by early 2024.

Additionally, within the considered period, another group of three mutations (nsp12:Y273H, nsp13:M233I, and nsp13:N268S) emerged and began to spread rapidly, coinciding with the rise of the nsp12:G671S + nsp13:S36P combination (Fig. 1a, b). Globally, the mutations nsp12:Y273H (a total of 493,881 samples), nsp13:M233I (489,239) and nsp13:N268S (377,576) showed similar dynamics and in most cases appeared in genomes together. This trio therefore represents a somewhat less extensive, but still substantial process: at one point, over 40 % of all genomes carried all three mutations. Variants harboring these substitutions mainly belonged to the BQ.1.* lineage.

The third tide of the nsp12:G671S, in progress

In autumn 2024, the frequencies of the nsp12:G671S and nsp13:S36P mutations declined for the second time to only a few percent, dropping below 1 % by the end of the year. However, this line did not disappear completely and continued to persist at low levels through late 2024. At the beginning of 2025, for the third time, the proportion of nsp12:G671S and nsp13:S36P in the population began to grow again, reaching 50 % in July 2025. The dynamics of nsp13:S36P in 2025 completely coincides with that of nsp12:G671S, i.e. these mutations occurred mostly together during this period. This pattern suggests that, unlike the disappearance of the carriers of the nsp12:G671S mutation after the first tide, it persisted after the second tide, albeit in small numbers in individual variants and then, under favorable circumstances and/or after advantageous mutations, began to spread again.

The analysis of samples collected in early 2025 showed that the vast majority of them originated from the JN.1 variant, which gave rise to such lineages as NB.1(24B), NB.1.8.1(25B), LP.8.1(25A), KP.3.1.1(24E), XFG(25C), LF.7(24H), XEC(24F) and XDV (24D), as well as to the recombinants XDA and XEV. Among them, the largest number of genomes carrying the nsp12:G671S mutation (42 %) corresponded to the lineage NB.1.8.1 (clade 25B) and 35 %, to PQ.1–PQ.9 (also clade 25B). Since JN.1 is a descendant of XBB, the suggestion that the nsp12:G671S and nsp13:S36P mutations have been preserved and their proportion in the population has grown again appears quite plausible.

Overview of all three tides of nsp12:G671S

At the start of both tide 1 and tide 2, a rapid and significant change in the proportion of nsp12:G671S in the population occurred, accompanied by the emergence of new co-occurring mutations in the RTC genes (and sometimes in the rest of the virus genome) or noticeable changes in their mutation frequencies. This trend also holds for tide 3 due to nsp13:S36P, which co-occurred with nsp12:G671S in 2025 (Fig. 1a). Additionally, we identified a recent mutation, nsp12:D284Y, which accompanied the two mutations and exhibited the same frequency dynamics in 2025. It is not included in Table 1,

because its prevalence among all genomes in GISAID in the time span from December 2019 to mid-July 2025 is below 1 %. However, in 2025, the frequency of this mutation followed the same pattern as nsp12:G671S and nsp13:S36P, reaching 50 % by mid-July 2025.

In addition, we noticed that during tide 3 (from early 2025 to mid-July 2025), the frequency curves of nsp12:G671S and nsp9:T35I were in antiphase (Fig. 1a). As the frequency of nsp12:G671S increased, that of nsp9:T35I decreased, and together, they consistently accounted for ≥ 80 % of all genomes in the weekly global samples. Based on these observations, a general trend can be inferred: when the fraction of nsp12:G671S mutation in the population changes rapidly, an emergence of new mutations in the RTC genes or changes in the frequencies of existing ones becomes more likely.

In contrast to nsp12:G671S, there are mutations with no obvious relation to others. One of them, nsp9:T35I, which emerged shortly after the onset of tide 2, displayed a nearly linear increase in frequency, from 0 to 100 %, in the interval between early 2023 and early 2024. This rise was much slower than any other curve in Figure 1, and it showed no correlation with any of them, which is quite unusual. The analysis of the genome samples carrying this mutation revealed the following. At the beginning of the growth phase in early 2023, it was represented by 51 % of FL.*, 25 % of XBB.1.9*, 20 % of EG.*, and 4 % others, including XCC recombinants. At the beginning of the decline phase in early 2025, the distribution shifted to its descendants: 29 % LP.*, 21 % XEC.*, 12 % NY.*, 7 % LP.*, 7 % MC.*, and the remaining 23 % comprised other lineages, including various recombinants: XFL, XFJ, XFH, XFC, XFB, XEW, XER, XEQ, and XEK.

Specific properties of the considered mutations in the RTC nsp7–nsp14 proteins

Each single mutation in amino acid sequences encoded by nucleotide triplets can include one to three changes within the triplet. Due to the degeneracy of the genetic code, there may be synonymous substitutions in RNA/DNA that do not change the amino acid, but even such mutations can have a noticeable effect on the fitness of their carrier, as shown by Shen et al. (2022). They came to this conclusion by experimenting with yeast, but they found “no particular reason why their results would not generalize to other organisms”.

From the list of the previously considered mutations, we selected those with peak proportions ≥ 25 % of the population. By comparing their nucleotide and amino acid sequences in the reference genome and after mutation, we determined which mutated triplets appeared in the initial states and how they changed after mutation (Table 2).

All 13 mutations examined involved only a single nucleotide substitution within the codon encoding the affected amino acid; no double or triple substitutions were detected. This is not surprising, since if p is the probability of a single rare random event, then the probability that another similar event with the same probability occurs within the two adjacent nucleotides is $\sim p^2$ or less. The probability of a single point nucleotide substitution in SARS-CoV-2 is quite low since its replication mechanism includes a proofreading system. According to data from (Amicone et al., 2022), during one cell infection cycle (i. e., from virus entry into a cell until the release of new virions), on average, $1.3 \cdot 10^{-6} \pm 0.2 \cdot 10^{-6}$ substitutions occur per nucleotide position. The actual number of observable cases of 2 substitutions at once will be less than p^2 because there will

Table 2. Properties of most prevalent mutations in RTC genes (peak frequency ≥ 25 %)

Mutation name	Change at amino acid level	Changes at RNA level (bold indicates changed triplet, underline – changed a.a.)	Change of AA physico-chemical properties
nsp9:T35I	Thr→Ile	(ACU,ACC, ACA ,ACG) → (ATT,ATC, ATA)	polar, hydroxylic → non-polar, aliphatic
nsp12:Y273H	Tyr→His	(TAT ,TAC) → (CAT ,CAC)	polar, aromatic → polar(+), heterocyclic
nsp12:D284Y	Asp→Tyr	(GAT, GAC) → (TAT, TAC)	polar(–) → polar, aromatic
nsp12:P323L	Pro→Leu	(CCT ,CCC,CCA,CCG) → (TTA,TTG, CTT ,CTC,CTA,CTG)	non-polar, heterocyclic → non-polar, aliphatic
nsp12:G671S	Gly→Ser	(GGT ,GGC,GGA,GGG) → (TCT,TCC,TCA,TCG, AGT ,AGC)	non-polar, aliphatic → non-polar, oxymonoaminocarboxylic
nsp12:L838I	Leu→Ile	(TTA,TTG,CTT,CTC, CTA ,CTG) → (ATT,ATC, ATA)	non-polar, aliphatic → non-polar, aliphatic
nsp13:S36P	Ser→Pro	(TCT,TCC, TCA ,TCG,AGT,AGC) → (CCT,CCC, CCA ,CCG)	non-polar, oxymonoaminocarboxylic → non-polar, heterocyclic
nsp13:P77L	Pro→Leu	(CCT,CCC, CCA ,CCG) → (TTA,TTG,CTT,CTC, CTA ,CTG)	non-polar, heterocyclic → non-polar, aliphatic
nsp13:M233I	Met→Ile	ATG → (ATT,ATC, ATA)	non-polar, sulfur-containing → non-polar, aliphatic
nsp13:N268S	Asn→Ser	(AAT ,AAC) → (TCT,TCC,TCA,TCG, AGT ,AGC)	polar, amide → non-polar, oxymonoaminocarboxylic
nsp13:R392C	Arg→Cys	(CGT ,CGC,CGA,CGG,AGA,AGG) → (TGT ,GTC)	polar(+) → polar, sulfur-containing
nsp14:I42V	Ile→Val	(ATT,ATC, ATA) → (GTT,GTC, GTA ,GTG)	non-polar, aliphatic → non-polar, aliphatic
nsp14:A394V	Ala→Val	(GCT ,GCC,GCA,GCG) → (GTT ,GTC,GTA,GTG)	non-polar, aliphatic → non-polar, aliphatic

Note. Substitutions of amino acids, changes in their physico-chemical properties and changes in RNA triplets encoding amino acids before and after mutations, are presented. In RNA triplets, the original combinations (among possible variants due to degeneracy of genetic code) are shown in bold-face; changed points are underscored.

be only those variants which leave the virus viable despite caused changes in the replication-transcription complex, and the probability of this appears to be so small that it is practically unlikely to occur even over years. Nevertheless, it was not obvious in advance that all mutations would consist only of single-nucleotide substitutions, so this observation also brings some new knowledge of mutation patterns. However, changes can accumulate sequentially over multiple generations, experiencing only up to one nucleotide substitution per triplet in each replication cycle.

Additionally, the amino acid substitutions derived from the mutations examined frequently result in pronounced alterations of physicochemical properties.

The groups of co-existing mutations in the RTC nsp7–nsp14 proteins

Since we noticed co-occurring mutations in RTC proteins, we decided to identify all such groups in an attempt to reveal the underlying processes and possible connections between them. Using GISAID web interface queries (as described in “Data sources”, section Materials and Methods) for the time interval from December 24, 2019 to July 15, 2025, we obtained the numbers of genome sequences containing all possible pairwise combinations of the mutations from Table 2, with the exception of nsp12:P323L (because it is present in 99.3 % of all sequences in GISAID). The results are presented in Table 3.

For a pair of mutations, for example, $i = \text{nsp12:G671S}$ (34.9 % of total genomes) and $j = \text{nsp13:P77L}$ (27.3 % of all genomes), the value in cell $[i][j]$ of the colored matrix corresponds to 98.6 % of the smaller of the two proportions (34.9 and 27.3 %). Thus, the number of genomes carrying both mutations simultaneously is approximately $0.273 \cdot 0.986 \cdot 15.5$ million ≈ 4.2 million. In the global dataset, the most frequent pairs include:

- nsp13:R292C + nsp14:I42V (41.2 %),
- nsp12:G671S + nsp13:P77L (26.9 %),
- nsp13:P77L + nsp14:A394V (24.7 %),
- nsp12:G671S + nsp14:A394V (24.4 %).

Extending to triplets, representative high-frequency sets (among the 15.5 million GISAID genomes analyzed) are:

- nsp12:G671S + nsp13:P77L + nsp14:A394V (24.3 %),
- nsp13:R392C + nsp14:I42V + nsp13:M233I (3.6 %),
- nsp13:R392C + nsp14:I42V + nsp12:Y273H (2.9 %).

A notable triplet here is nsp12:G671S + nsp13:S36P + nsp12:D284Y (0.08 %), as nsp12:D284Y emerged only in 2025, and the number of genome samples carrying this mutation continues to increase, with its peak frequency reaching 50 % (see “The second tide of the nsp12:G671S”, section Results and Discussion).

Finally, there are groups of genome samples with four or five mutations occurring simultaneously. Illustrative sets include:

- nsp13:R392C + nsp14:I42V + nsp13:M233I + nsp12:Y273H: (2.89 %),
- nsp13:R392C + nsp14:I42V + nsp13:M233I + nsp12:Y273H + nsp13:N268S: (2.23 %).

Three-dimensional visualization of the selected mutations

We rendered the examined mutations listed in Table 2 in the 3D structure of the RTC to learn about their spatial location, specific features, and distances between mutated amino acids, as well as between amino acids and RNA threads (Fig. 3).

According to Figure 3, the highest concentration of mutations is observed in nsp9 and nsp13 (helicase): 0.88 and 0.83 substitutions per 100 amino acids, respectively. Half as many mutations, 0.43 and 0.38 per 100 aa, occur in nsp12 (RdRp) and nsp14 (ExonN), correspondingly. In the remaining proteins, no mutations with a peak frequency exceeding 25 % of the population size were found. Three of four shown mutations in nsp12

Table 3. Pairs and larger groups of simultaneous mutations in RTC proteins

	mutation i →	nsp9: T35I	nsp13: S36P	nsp12: D284Y	nsp12: G671S	nsp12: L838I	nsp13: P77L	nsp14: A394V	nsp12: Y273H	nsp13: M233I	nsp13: N268S	nsp14: I42V	nsp13: R392C
mutation j ↓	% in the population → ↓	7.1	6.7	0.1	34.9	2.0	27.3	24.7	3.0	3.7	2.3	55.5	41.8
nsp9:T35I	7.1	100.0	35.1	0.7	34.3	0.3	0.8	0.7	0.3	0.3	0.2	95.7	96.3
nsp13:S36P	6.7	35.1	100.0	88.3	92.4	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	98.9	99.8
nsp12:D284Y	0.1	0.7	88.3	100.0	95.4	0.2	7.2	6.8	0.3	0.3	0.2	89.9	89.8
nsp12:G671S	34.9	34.3	92.4	95.4	100.0	98.9	98.6	98.7	0.2	1.1	0.2	22.4	22.7
nsp12:L838I	2.0	0.3	0.0	0.2	98.9	100.0	99.8	99.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.3
nsp13:P77L	27.3	0.8	0.0	7.2	98.6	99.8	100.0	99.8	0.1	1.0	0.1	0.0	0.2
nsp14:A394V	24.7	0.7	0.0	6.8	98.7	99.5	99.8	100.0	0.1	0.8	0.1	0.0	0.2
nsp12:Y273H	3.0	0.3	0.1	0.3	0.2	0.0	0.1	0.1	100.0	99.3	99.3	98.4	99.7
nsp13:M233I	3.7	0.3	0.1	0.3	1.1	0.1	1.0	0.8	99.3	100.0	99.4	97.2	98.5
nsp13:N268S	2.3	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.1	0.1	99.3	99.4	100.0	98.2	99.6
nsp14:I42V	55.5	95.7	98.9	89.9	22.4	0.0	0.0	0.0	98.4	97.2	98.2	100.0	98.5
nsp13:R392C	41.8	96.3	99.8	89.8	22.7	0.3	0.2	0.2	99.7	98.5	99.6	98.5	100.0

Note. The percentage of genomes in the GISAID (collected from December 2019 to July 15, 2025) that simultaneously contain mutation i and mutation j, relative to the minimum value between the percentages of genomes with mutation i and genomes with mutation j.

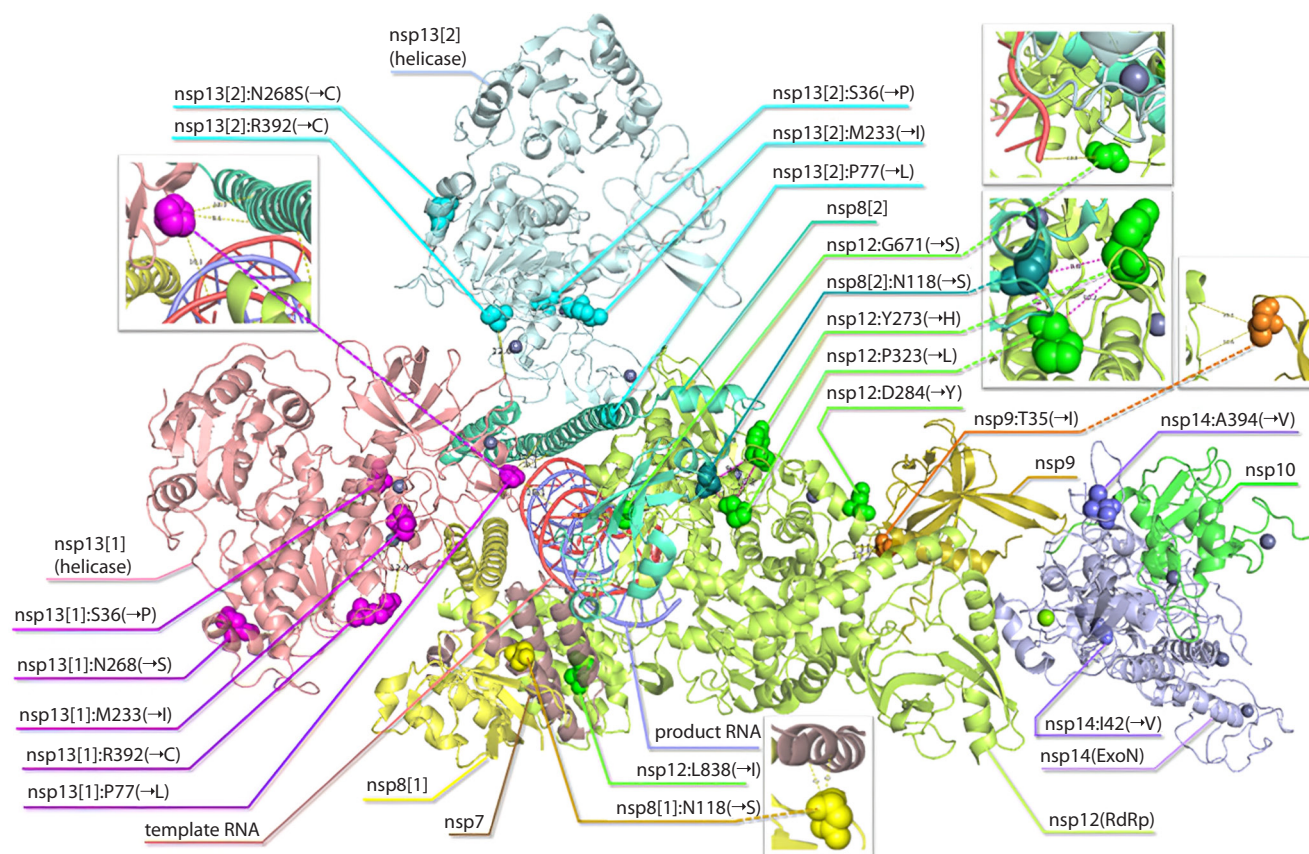


Fig. 3. 3D structure of the RTC, and its amino acids with mutations under consideration shown.

Distribution of the mutations from Table 3 over the replication-transcription complex (PDB:7EIZ) including nsp7, 2×nsp8, nsp9, nsp10, RdRp(nsp12), 2×nsp13, and nsp14 together with template RNA and product RNA. Cases with specific features are shown in the insets. The generated PyMOL files based on PDB RTC 3D structures and examined mutations, are available upon request.

(RdRp) are located on the surface of the polymerase, on the side closer to RNA. There are several proximity-based (within ~6–14 Å) potential relationships that may merit functional follow-up. The mutated amino acid closest to the template RNA (9.1 Å) is nsp13:M233I (Fig. 3, inset). In nsp13, P77L is positioned 10.1 Å from the RNA strand coursing through the complex and 9.1 Å from an nsp8 α-helix, placing it in a location where effects on replication kinetics and/or fidelity are plausible. Next, nsp8:N118S resides 6.1 Å from nsp7, which may affect the interaction between them.

RTC includes two copies of nsp8 and two copies of nsp13, with different neighborhoods for each protein of a couple. In one nsp8, the amino acid N118 (mutation N→S) lies near two nsp12 amino acids corresponding to the P323L and Y273H mutations: the distance between N118 and P323 is 5.1 Å, between N118 and Y273 is 9.8 Å, and between P323 and Y273 is 10.2 Å. This triangle (Fig. 3, inset) constitutes a cluster of three amino acids involved in mutations, close to each other, and we flag this cluster as a priority for subsequent functional investigation.

Search for literature on SARS-CoV-2 RTC mutation effects

To complement our mutational analysis, we performed a literature search for all substitutions listed in Table 2. The goal was to identify any previously reported structural, biochemi-

cal, or phenotypic effects associated with these mutations. Brief summaries of the available evidence are provided in Supplementary Material 4. Overall, the collected publications describe diverse potential impacts, including changes in RTC stability, replication efficiency, drug response, and enzymatic activity, although for many mutations experimental validation remains limited.

Conclusions

We surveyed the evolution of the SARS-CoV-2 RTC (nsp7–nsp14) over a 5.5-year horizon (December 2019 – July 15, 2025), identified 22 amino acid substitutions with a global average frequency >1 % and quantified their weekly dynamics. Compared to earlier global overviews that used higher prevalence thresholds (Rodriguez et al., 2023, 2025), this extended window and finer temporal resolution revealed three characteristic dynamic patterns: persistent, transient, and recurrent. Interestingly, one notable mutation, nsp12:G671S, exhibited a unique multi-phase trajectory (“three tides”) marked by a rise, near-disappearance, and re-emergence.

Re-analysis of early records indicated that SARS-CoV-2 genomes deposited to GISAID database and assigned to Delta (B.1.617.2) variant have submission dates that are 7–8 months earlier than commonly reported date of the first appearance of Delta. GISAID’s first samples of Delta appear for the first

time on April 26, 2020, they spanned multiple continents by the end of 2020 (and frequently carrying the trio of mutations nsp12:G671S + nsp13:P77L + nsp14:A394V). This observation motivates a reassessment of the widely cited timeline stating that “Delta was first identified in Maharashtra, India, in late 2020” (Cherian et al., 2021) and emphasizes the value of stringent filtering of public surveillance datasets.

In the course of systematically scanning RTC variation, we revealed a robust linkage between Delta and the nsp12:G671S + nsp13:P77L + nsp14:A394V trio. Tracing these substitutions back showed that each appeared separately before Delta, and that early genomes labeled as Delta appeared sporadically for several months but had little immediate effect on global frequency among sequenced genomes. The subsequent co-occurrence of all three substitutions around August 2020 coincided with a marked shift to rapid expansion and, soon after, global dominance. This perspective emerges specifically from an RTC-centered analysis (traditionally viewed as a conserved, lower-visibility target) and, in our view, illuminates otherwise overlooked contingencies in the evolutionary dynamics of the virus.

Across waves, nsp12:G671S re-emerged with different companions: first with nsp13:P77L and nsp14:A394V, later with nsp13:S36P, and most recently with nsp12:D284Y. In contrast, nsp9:T35I followed a slow, largely independent, monotonic rise, longer period of 97–100 % prevalence, and a slow decline that began in 2025. A codon-level inspection of the 13 highest-peak substitutions (≥ 25 %) showed only single-nucleotide changes (no double/triple codon substitutions), yet many corresponding amino acid replacements entail substantial physicochemical shifts. Co-occurrence analysis highlighted frequent groups of co-existing mutations, ranging from two to five. Structural mapping onto RTC assemblies showed a relatively even spatial distribution without dense clusters; only nsp13:M233I had a notable feature – it lay directly adjacent to the template RNA. The repeated rise and fall in the number of genome samples with the nsp12:G671S mutation, given the accompanying events, probably represents an example of natural selection in action. We can propose as a hypothesis for discussion that it may be not a neutral change, but a key player in the evolutionary “strategy” that provides a short-term fitness advantage (compensating for proofreading errors) at the expense of long-term stability (increasing mutation load). This creates a predictable cycle of emergence and extinction – a pattern that is the hallmark of selection, not random drift.

Independent population genetic analyses have shown that the evolutionary rate of SARS-CoV-2 varies among lineages and can undergo episodic accelerations, up to fourfold exceeding the baseline phylogenetic rate, with new variants emerging within weeks rather than months (Tay et al., 2022). The recurrent G671S tides with changing co-mutation partners documented in this study are consistent with such episodic phases. Given that several high-prevalence co-mutations lie in nsp14 (ExoN), these patterns raise the question of whether fluctuations in effective error correction could accompany periods of rapid diversification. Targeted assays will be required to test this hypothesis.

To contextualize these findings, we reviewed the available literature on all substitutions from Table 3 (Supplementary Material 4). Reported effects encompass altered polymerase stability/transmissibility for nsp12:P323L/G671S (Kim et al., 2023), lineage-linked occurrences and additional RTC changes documented through mid-2023 (Rodriguez et al., 2023, 2025), and mixed evidence regarding drug response and enzymatic activity for several sites. While suggestive, many substitutions still lack a definitive experimental validation of their functional impact. Protein-protein and protein-RNA interactions are complicated, and they involve many factors even if a single protein is considered (for example, (St Laurent et al., 2012, Fig. 5)). Our study is focused on one of the most intricate protein complexes with a critically important function, RNA replication.

To sum up, our results refine the timeline of early Delta emergence and dissemination, document repeated large-scale shifts centered around nsp12:G671S, and provide a reproducible catalog of RTC mutation dynamics, co-occurrence, coding changes, and structural context. The continued integration of high-quality genomic surveillance with targeted biochemical and virological assays will be essential to resolve the functional consequences of these substitutions and to anticipate future shifts in the RTC mutational landscape.

References

- Abbasian M.H., Mahmanzar M., Rahimian K., Mahdavi B., Tokhanbigli S., Moradi B., Sisakht M.M., Deng Y. Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. *J Transl Med.* 2023;21(1):152. doi 10.1186/s12967-023-03996-w
- Ahmadi A.S., Shafiei-Jandaghi N.Z., Sadeghi K., Nejati A., Zadehdar S., Mokhtari-Azad T., Yavarian J. Comparison of circulating variants during the beginning, middle and the end of the 4th wave of COVID-19 in Tehran Province, Iran in 2021. *Iran J Public Health.* 2023;52(12):2621-2629. doi 10.18502/ijph.v52i12.14323
- Aksamentov I., Roemer C., Hodcroft E.B., Neher R.A. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw.* 2021;6(67):3773. doi 10.21105/joss.03773
- Amicone M., Borges V., Alves M.J., Isidro J., Ze-Ze L., Duarte S., Vieira L., Guiomar R., Gomes P.J., Gordo I. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol Med Public Health.* 2022;10(1):142-155. doi 10.1093/emph/eoac010
- Bai C., Zhong Q., Gao G.F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci.* 2022;65(2):280-294. doi 10.1007/s11427-021-1964-4
- Bokolia N.P., Gadepalli R. Identification of genomic signatures and multiple lineage markers from the second and third wave samples of COVID-19 in Western Rajasthan, India. *bioRxiv.* 2022. doi 10.1101/2022.12.10.518819
- Brant A.C., Tian W., Majerciak V., Yang W., Zheng Z.-M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci.* 2021;11(1):136. doi 10.1186/s13578-021-00643-z
- Carabelli A.M., Peacock T.P., Thorne L.G., Harvey W.T., Hughes J.; COVID-19 Genomics UK Consortium; Peacock S.J., Barclay W.S., de Silva T.I., Towers G.J., Robertson D.L. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):162-177. doi 10.1038/s41579-022-00841-7
- Cherian S., Potdar V., Jadhav S., Gupta N., Das M., Rakshit P., Singh S., Abraham P., Panda S., Team N. SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms.* 2021;9(7):1542. doi 10.3390/microorganisms9071542

- Danda M., Klimešová A., Kušková K., Dostálková A., Pagáčová A., Prchal J., Kapisheva M., Ruml T., Rumlová M. Biochemical characterization of naturally occurring mutations in SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *Protein Sci.* 2024;33(9):e5103. doi 10.1002/pro.5103
- Elbe S., Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Glob Chall.* 2017;1(1):33-46. doi 10.1002/gch2.1018
- Eriani G., Martin F. Viral and cellular translation during SARS-CoV-2 infection. *FEBS Open Bio.* 2022;12(9):1584-1601. doi 10.1002/2211-5463.13413
- Feng S., O'Brien A., Chen D., Saeed M., Baker S.C. SARS-CoV-2 non-structural protein 6 from Alpha to Omicron: evolution of a transmembrane protein. *mBio.* 2023;14(4):e00688-23. doi 10.1128/mbio.00688-23
- Ferrer-Orta C., Vázquez-Montegudo S., Ferrero D.S., Verdaguer N. Point mutations at specific sites of the nsp12-nsp8 interface dramatically affect the RNA polymerization activity of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2024;121(29):e2317977121. doi 10.1073/pnas.2317977121
- Kandhasamy V., Pillai A.B., Mariappan V., Ramalingam M., Raganadin P., Ramadoss R., Moovarkumudalvan B., Easow J.M., Vasudevan M., Rao S.R. A study of SARS-CoV-2 genomic profiles, evolutionary changes, and transmission dynamics in Southeastern India during three pandemic waves. *JIOMICS.* 2025;15(2):239. doi 10.5584/jiomics.v15i2.239
- Khare S., Gurry C., Freitas L., Schultz M.B., Bach G., Diallo A., Akite N., Ho J., Lee R.T., Yeo W., Curation Team G.C., Maurer-Stroh S. GISAID's role in pandemic response. *China CDC Wkly.* 2021;3(49):1049-1051. doi 10.46234/ccdcw2021.255
- Kim S.M., Kim E.H., Casel M.A.B., Kim Y.I., Sun R., Kwak M.J., Yoo J.S., ... Hwang J., Song M.S., Kim M.H., Jung J.U., Choi Y.K. SARS-CoV-2 variants with NSP12 P323L/G671S mutations display enhanced virus replication in ferret upper airways and higher transmissibility. *Cell Rep.* 2023;42(9):113077. doi 10.1016/j.celrep.2023.113077
- Mack A.H., Menzies G., Southgate A., Jones D.D., Connor T.R. A proofreading mutation with an allosteric effect allows a cluster of SARS-CoV-2 viruses to rapidly evolve. *Mol Biol Evol.* 2023;40(10):msad209. doi 10.1093/molbev/msad209
- MLcochova P., Kemp S.A., Dhar M.S., Papa G., Meng B., Ferreira I.A.T.M., Datir R., ... Piccoli L., Barclay W.S., Rakshit P., Agrawal A., Gupta R.K. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature.* 2021;599(7883):114-119. doi 10.1038/s41586-021-03944-y
- Ou X., Xu G., Li P., Liu Y., Zan F., Liu P., Hu J., ... Jin Q., Liu P., Lu J., Wang X., Qian Z. Host susceptibility and structural and immunological insight of S proteins of two SARS-CoV-2 closely related bat coronaviruses. *Cell Discov.* 2023;9(1):78. doi 10.1038/s41421-023-00581-9
- Palyanov A.Y., Palyanova N.V. On the space of SARS-CoV-2 genetic sequence variants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2023;27(7):839-850. doi 10.18699/VJGB-23-97
- Palyanov A.Y., Palyanova N.V. A novel approach to analyzing the evolution of SARS-CoV-2 based on visualization and clustering of large genetic data compactly represented in operative memory. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2024;28(8):843-853. doi 10.18699/vjgb-24-92
- Palyanova N.V., Sobolev I.A., Palyanov A.Y., Kurskaya O.G., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Fadeev A.V., Shestopalov A.M. The development of the SARS-CoV-2 epidemic in different regions of Siberia in the 2020–2022 period. *Viruses.* 2023;15(10):2014. doi 10.3390/v15102014
- Peng Q., Peng R., Yuan B., Zhao J., Wang M., Wang X., Wang Q., Sun Y., Fan Z., Qi J., Gao G.F., Shi Y. Structural and biochemical characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 core polymerase complex from SARS-CoV-2. *Cell Rep.* 2020;31(11):107774. doi 10.1016/j.celrep.2020.107774
- Rahalkar M.C., Bahulikar R.A. Lethal pneumonia cases in Mojiang miners (2012) and the mineshaft could provide important clues to the origin of SARS-CoV-2. *Front Public Health.* 2020;8:581569. doi 10.3389/fpubh.2020.581569
- Rahman M.S., Hoque M.N., Chowdhury S.R., Siddique M.M., Islam O.K., Galib S.M., Islam M.T., Hossain M.A. Temporal dynamics and fatality of SARS-CoV-2 variants in Bangladesh. *Health Sci Rep.* 2023;6(4):e1209. doi 10.1002/hsr2.1209
- Rodriguez L., Li J., Han D., Martin R., Moshiri J., Peinovich N., Bilello J.P., Perry J.K., Hedskog C. Remdesivir and obeldesivir retain potent activity against SARS-CoV-2 omicron variants. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(Suppl.2):ofad500.614. doi 10.1093/ofid/ofad500.614
- Rodriguez L., Zamora J.L.R., Han D., Moshiri J., Peinovich N., Martinez C., Ho P.Y., Li J., Aeschbacher T., Martin R., Pekosz A., Bilello J.P., Perry J.K., Hedskog C. Remdesivir and obeldesivir retain potent antiviral activity against SARS-CoV-2 omicron variants. *Viruses.* 2025;17(2):168. doi 10.3390/v17020168
- Romano M., Ruggiero A., Squeglia F., Maga G., Berisio R. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells.* 2020;9(5):1267. doi 10.3390/cells9051267
- Schubert K., Karousis E.D., Jomaa A., Scaiola A., Echeverria B., Gutzler L.A., Leibundgut M., Thiel V., Mühlemann O., Ban N. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(10):959-966. doi 10.1038/s41594-020-0511-8
- Shen X., Song S., Li C., Zhang J. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. *Nature.* 2022;606(7915):725-731. doi 10.1038/s41586-022-04823-w
- Singh D., Kushwaha T., Kulandaisamy R., Kumar V., Baswal K., Tiwari S.H., Ghorai A., ... Gadde S., Côté M., Kayampeta S.R., Appiahgari M.B., Inampudi K.K. Redefining NSP12 activity in SARS-CoV-2 and its regulation by NSP8 and NSP7. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2025;36(1):102452. doi 10.1016/j.omtn.2025.102452
- St Laurent G., Shtokalo D., Heydarian M., Palyanov A., Babi D., Zhou J., Kumar A., Urcuqui-Inchima S. Insights from the HuR-interacting transcriptome: ncRNAs, ubiquitin pathways, and patterns of secondary structure dependent RNA interactions. *Mol Genet Genomics.* 2012;287(11-12):867-879. doi 10.1007/s00438-012-0722-8
- Tay J.H., Porter A.F., Wirth W., Duchene S. The emergence of SARS-CoV-2 variants of concern is driven by acceleration of the substitution rate. *Mol Biol Evol.* 2022;39(2):msac013. doi 10.1093/molbev/msac013
- Temmam S., Vongphayloth K., Baquero E., Munier S., Bonomi M., Regnault B., Douangboubpha B., ... Nilges M., Rey F.A., van der Werf S., Brey P.T., Eloit M. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature.* 2022;604(7905):330-336. doi 10.1038/s41586-022-04532-4
- Yan L., Yang Y., Li M., Zhang Y., Zheng L., Ge J., Huang Y.C., ... Huang Y.Y., Guddat L.W., Gao Y., Rao Z., Lou Z. Coupling of N7-methyltransferase and 3'-5' exonuclease with SARS-CoV-2 polymerase reveals mechanisms for capping and proofreading. *Cell.* 2021;184(13):3474-3485.e11. doi 10.1016/j.cell.2021.05.033
- Yan W., Zheng Y., Zeng X., He B., Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):26. doi 10.1038/s41392-022-00884-5
- Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., ... Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-273. doi 10.1038/s41586-020-2012-7

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

Received November 22, 2025. Revised February 4, 2026. Accepted February 12, 2026.

doi 10.18699/vjgb-26-55

Генетический анализ архитектуры колоса пшеницы и его компьютерное фенотипирование у F₂ гибридов тетраплоидных пшениц *Triticum aethiopicum* и *T. carthlicum*

Ю.В. Кручинина , Е.Г. Комышев^{1, 2}, М.А. Генаев , В.С. Коваль^{1, 2}, Д.А. Афонников ^{1, 2, 3}, Н.П. Гончаров¹

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

² Курчатовский геномный центр ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 kruchinina2023@yandex.ru

Аннотация. Всестороннее описание фенотипов растений конкретных таксонов является важной задачей при описаниях родов, видов и построениях их естественных классификаций. Развитие современных технологий эффективного фенотипирования позволяет получать большое количество данных с количественным и/или качественным описанием различных признаков у растений, преимущественно на основе анализа их цифровых изображений. В исследовании проведено сравнение результатов оценки расщепления в F₂ гибридов двух эндемичных тетраплоидных ($2n = 4x = 28$) видов пшениц – пшеницы эфиопской (*Triticum aethiopicum* Jakubz.) и пшеницы карталинской (*T. carthlicum* Nevski), полученных визуально и с помощью методов машинного обучения. В последнем случае для анализа расщеплений предложено использовать метод смеси гауссовых (нормальных) распределений в морфометрии растений для того, чтобы выделить группы, которые различаются по значениям признаков. Ввиду того что большинство таксономически значимых (видообразующих) признаков у пшениц контролируется олигогенно и имеет четкое фенотипическое проявление, гибридологический анализ был незаменимым и основным видом анализа для последующего детального фенотипирования колосов видов пшениц с использованием методов машинного обучения. По ряду признаков оценки характера наследования таких признаков, полученные разными методами, совпадают. На основании результатов проведенного исследования мы можем утверждать, что признак «тетраостость» (наличие остей одновременно на цветковой и колосковой чешуях) видоспецифический (таксономически значим) для *T. carthlicum* и он может быть эффективно использован исследователями в таксономических целях как при проведении гибридологического анализа, так и в экспериментах с использованием машинного обучения. Для *T. aethiopicum* таким видоспецифическим признаком является «характер (тип) остистости». Наша работа демонстрирует, что комбинация методов автоматического фенотипирования, модели смеси гауссовых распределений в принципе позволит проводить автоматический анализ выделения классов в F₂ гибридов, различающихся по величинам фенотипических признаков. Это позволит, в свою очередь, выявлять наличие генов, ассоциированных с видоспецифическими признаками растений. Тем не менее требуется совершенствование применяемых алгоритмов искусственного интеллекта.

Ключевые слова: тетраплоидные пшеницы; *Triticum aethiopicum*; *T. carthlicum*; генетический анализ; гибридизация; расщепление; цифровое фенотипирование; машинное обучение

Для цитирования: Кручинина Ю.В., Комышев Е.Г., Генаев М.А., Коваль В.С., Афонников Д.А., Гончаров Н.П. Генетический анализ архитектуры колоса пшеницы и его компьютерное фенотипирование у F₂ гибридов тетраплоидных пшениц *Triticum aethiopicum* и *T. carthlicum*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(3):527-536. doi 10.18699/vjgb-26-55

Финансирование. Подготовка данных, разработка и верификация алгоритма выполнены при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-14-00150.

Благодарности. Растения были выращены в Центре коллективного пользования по выращиванию растений ИЦИГ СО РАН в рамках бюджетного проекта FWN-2022-0017.

Genetic analysis of wheat ear architecture in F₂ hybrid of tetraploid wheats *Triticum aethiopicum* and *T. carthlicum* and its computer phenotyping

Yu.V. Kruchinina , E.G. Komyshev^{1, 2}, M.A. Genaev , V.S. Koval^{1, 2}, D.A. Afonnikov ^{1, 2, 3}, N.P. Goncharov¹

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

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 kruchinina2023@yandex.ru

Abstract. A comprehensive description of plant phenotypes of certain taxa is an important task when describing genera and species, as well as when setting their natural taxonomies. The development of modern technologies of effective phenotyping makes it possible to obtain a large amount of data with a quantitative and/or qualitative description of various traits in plants, mainly based on the analysis of their digital images. The study compared the results of the F₂ hybrids assessment – visually and using machine learning methods – of two endemic tetraploid ($2n = 4x = 28$) wheat species which are Ethiopian wheat (*Triticum aethiopicum* Jakubz.) and Kartalian or Dika wheat (*T. carthlicum* Nevski). In the latter case, it is proposed to use the method of a mixture of Gaussian (normal) distributions in plant morphometry in order to identify groups that differ in character values. Most taxonomically important (species-specific) traits are controlled oligogenically and have a clear phenotypic manifestation, so hybridological analysis was an indispensable and basic type of analysis for subsequent detailed phenotyping of wheat spikes using machine-learning methods. According to a number of criteria, the estimates of patterns of inheritance obtained by different methods coincide. Based on the conducted research, we can state that the trait “tetraaristatum” (the presence of awns on both flower and spike glumes) is species-specific (taxonomically important) for *T. carthlicum* and it can be effectively used for taxonomic purposes both in carrying out hybridological analysis and in experiments using machine learning. Such a species-specific character is the “character (type) of awnedness” for *T. aethiopicum*. Our study demonstrates that a combination of automatic phenotyping methods and a model of a mixture of Gaussian distributions can, in principle, lead to an automatic analysis of the allocation of classes in F₂ hybrids. It allows, in turn, to detect the presence of genes associated with species-specific traits of wheat plants. Further, the improvement of the applied artificial intelligence (AI) algorithms is required.

Key words: tetraploid wheat; *Triticum aethiopicum*; *T. carthlicum*; genetic analysis; hybridization; cleavage; digital phenotyping; machine learning

For citation: Kruchinina Yu.V., Komyshev E.G., Genaev M.A., Koval V.S., Afonnikov D.A., Goncharov N.P. Genetic analysis of wheat ear architecture in F₂ hybrid of tetraploid wheats *Triticum aethiopicum* and *T. carthlicum* and its computer phenotyping. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):527-536. doi 10.18699/vjgb-26-55

Введение

Всестороннее описание фенотипических признаков растений у конкретных таксонов – важная задача для эффективного описания видов и построения естественных классификаций (Hodač et al., 2023; Ran et al., 2024). Однако это и трудоемкая задача. В одних случаях сведений по конкретному виду крайне мало или вид очень редкий (Goncharov, Adonina, 2025). В других – информации, наоборот, настолько много, что исследователи расходятся во мнении по поводу классификации конкретных образцов (Ляпунова, 2021). Помимо этого, в ряде классификаций, использующихся и по сей день, информация по видам и объемам конкретных родов существенно различается. В качестве примеров можно привести картофель *Solanum* L. – систематики С.М. Букасова (1971) и J. Hawkes (1963) эгилопс *Aegilops* L. – П.М. Жуковский (1928) и А. Eig (1929); пшеницу *Triticum* L. – N.P. Goncharov (2011) и К. Hammer et al. (2011); и другие. Поэтому, даже несмотря на то что известно, какие видообразующие (таксономически значимые) признаки характерны для определенного таксона, могут возникнуть неточности при классификации видов. Выход из этой ситуации один – построение системы видообразующих признаков.

При использовании в качестве экспериментального материала злаковых (Poaceae Barnhart), а именно пшеницы (род *Triticum*) можно столкнуться со всем комплексом затруднений, описанных выше. Помимо этого, следует иметь в виду, что пшеница – полиморфная культура, что предполагает значительную как меж-, так и внутривидовую вариабельность (Дорофеев и др., 1979). Так, в процессе ее изучения можно столкнуться с тем, что, даже имея конкретный вид, фенотипически растения внутри него будут не похожи и потребуют проведения экспериментальной оценки их видовой принадлежности (Зуев и др., 2019). В таких случаях речь будет идти об однозначной классифи-

кации более низких таксонов – подвидов и разновидностей (Дорофеев и др., 1979; Гончаров, 2009).

В настоящее время существует ряд методов, позволяющих с высокой вероятностью отнести конкретный образец пшеницы к определенному виду. Используя цитологические методы, можно с точностью отнести образец к конкретной группе пloidности, посчитав у него число хромосом (Dolezel et al., 2007), применение молекулярно-биологических методов позволит отнести образец к конкретному виду (Golovnina et al., 2007). Однако использование молекулярных методов предполагает наличие по каждому виду большого объема информации, а именно описание конкретных видоспецифических генов, их локализацию и информацию об их нуклеотидной последовательности. У пшениц видоспецифические гены описаны только у всех гексаплоидов ($2n = 6x = 42$) (Goncharov, 2011). Собственно, здесь у таксономистов и начинаются проблемы. Во-первых, не у каждого описанного на данный момент вида пшеницы выявлен такой видоспецифический ген(ы). Во-вторых, даже если такие ген(ы) известны (описаны), могут существовать затруднения с идентификацией их нуклеотидных последовательностей. В-третьих, в некоторых случаях ген известен, как и его последовательность, однако молекулярная функция и фенотипическое проявление оказываются не изучены. Кроме того, информация о том, как наследуется тот или иной ген, может отличаться у разных авторов (URL: <http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp> Accepted 20 October 2025). Помимо этого, необходимо иметь в виду, что молекулярно-биологические методы анализа больших выборок предполагают значительный уровень затрат.

Существуют и другие методы, используя которые можно уточнить информацию о видоспецифических генах, например гибридологический анализ, позволяющий понять, как видоспецифические признаки наследуются у кон-

кретных видов пшеницы. С помощью этого метода, зная характер расщепления в гибридных популяциях, можно выяснить характер наследования признака.

Отметим, что развитие современных технологий эффективного фенотипирования способствует получению большого количества данных с количественным или качественным описанием различных признаков растений преимущественно на основе анализа цифровых изображений (Афонников и др., 2016; Awada et al., 2024). Извлеченные на основе анализа цифровых изображений данные могут быть успешно использованы в том числе и для систематики и классификации растений (Chouhan et al., 2024; Mulugeta et al., 2024).

Подходы, основанные на анализе больших объемов данных и машинном обучении, применяются и для анализа морфологических характеристик пшеницы. Показано, что данные, полученные методами анализа изображений и машинного обучения, могут успешно решать задачи для классификации видов пшеницы и ее сородичей (Martinek, Bednar, 2001; Пронозин и др., 2021; Artemenko et al., 2024; Komyshev et al., 2024). Это очень перспективное направление исследования гибридов с помощью методов биоинформатики находится в процессе разработки. Вопрос о том, насколько надежно можно использовать признаки, характеристика которых получена на основе анализа цифровых изображений, для видовой классификации и как они наследуются, остается открытым.

Цель работы – объединение возможностей гибридологического метода с анализом расщепления гибридной популяции вручную с анализом цифровых характеристик растений (колосьев) для решения задачи разделения растений на группы, несущие различные гены контроля признаков растений. Исследование проводится на гибридах растений, полученных в результате скрещивания двух эндемичных видов пшеницы – *T. aethiopicum* и *T. carthlicum*.

Материалы и методы

Гибридологический анализ. В работе выполнена идентификация генотипов тетраплоидных ($2n = 4x = 28$) пшениц и их F₂ гибридов по видоспецифическим (таксономически значимым) признакам (Приложение, табл. S1)¹. Ввиду того что большинство таких признаков контролируется олиогенно и имеет четкое фенотипическое проявление, гибридологический метод был незаменимым и основным видом анализа для последующего детального фенотипирования колосьев видов пшениц с использованием методов машинного обучения.

Растительный материал. Объектом изучения послужили межвидовые гибриды от скрещивания двух эндемичных тетраплоидных видов пшеницы ♀ *T. aethiopicum* Jakubz. (к-19301/2) с ♂ *T. carthlicum* Nevski (к-32496). Эксперимент проведен в яровом посеве в парниках селекционно-генетического комплекса (СТК) Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). F₁ гибридов выращивали и фенотипировали в теплице, F₂ – в парниках в 2022 г. Число изученных F₂ гибридов равнялось 185 растениям.

¹ Табл. S1–S3 и рис. S1 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx29.pdf>

Фенотипирование колосьев. Изображения колосьев получали по протоколу «на прищепке», описанному ранее (Генаев и др., 2018; Genaev et al., 2019). Колос фиксировали в вертикальном положении прищепкой на синем фоне. Съемку проводили цифровой камерой Canon 350D, объектив EF-S 18-55mm f/3.5-5.6. Для оценки масштаба и калибровки цвета использован маркер X-Rite Mini ColorChecker Classic (<http://xritephoto.com/colorchecker-targets>), который располагали в кадре. Колосья снимали в четырех проекциях. Первая соответствовала лицевой (наиболее широкой) стороне колоса, остальные проекции получены последовательным вращением колоса на прищепке на 90°: 2-я и 4-я – боковые, 3-я – обратная сторона.

Каждое изображение колоса было сегментировано на фон, цветовую палитру, тело колоса и ости с помощью метода глубокого машинного обучения, разработанного нами ранее (Artemenko et al., 2024). Полученные маски использовались программой WERecognizer (Genaev et al., 2019) для расчета морфометрических характеристик колосьев. Рассматривали сокращенный набор признаков, который включал описание колоса на основе модели двух четырехугольников, симметризованной относительно оси колоса, характеристики контура колоса (периметр, площадь, округлость и пр.) и площадь остей на изображении (Komyshev et al., 2024). Схема модели четырехугольников и использованных параметров колоса приведена на рис. S1. Всего анализировали 19 признаков размера и формы колосьев независимо для каждой проекции (табл. S2).

Статистический анализ признаков колоса. В нашей работе мы предположили, что популяция гибридных растений F₂ может расщепляться на классы не только по качественным (дискретным) (табл. 1), но и количественным признакам. Во втором случае считали, что каждый класс растений характеризуется распределением величины признака с отличными от другого матожиданием и дисперсией. Таким образом, распределение величины признака для всей выборки будет смесью двух гауссовых распределений с различными средними и дисперсиями (Мережко, 2005; Речкин, 2024). Отметим, что метод смеси гауссовых распределений используется в морфометрии растений, для того чтобы выделить группы, которые различаются значениями признаков, а также для классификации (Kim et al., 2024; Tiburtini et al., 2025).

Для выявления смесей двух гауссовых распределений использована функция `sklearn.mixture.GaussianMixture` пакета `scikit-learn v. 1.7` (<https://scikit-learn.org/stable/index.html>). Она позволяет проводить анализ модели смеси гауссовых распределений на основе метода максимального правдоподобия: оценить количество и параметры распределений в смеси, классифицировать образцы в выборке по принадлежности к этим распределениям. В настоящей работе для каждой проекции колоса мы предполагали, что распределение признака является смесью двух распределений. С помощью функции `sklearn.mixture.GaussianMixture` для каждого из распределений были оценены средние значения, дисперсии и число колосьев, принадлежащих каждому из них. После определения числа колосьев в каждом из классов проводили тест с ис-

Таблица 1. Фенотипическое описание родительских форм

Признак	Вид/образец	
	♀ <i>T. aethiopicum</i> (к-19301/2)	♂ <i>T. carthlicum</i> (к-32496)
Тетраостость (наличие остей одновременно на цветковой и колосковой чешуе), <i>ta</i>	–	+
Окраска колоса	–	+
Характер (тип) остистости	Ости направлены в стороны	Ости направлены вертикально
Зубец на верхушке колосковой чешуи	+	+
Опушение чешуи, <i>Hg</i>	–	+
Плешка в опушении колосковой чешуи, <i>Hg^C</i>	–	+/-

Примечание. Признак: – рецессивный, + доминантный.

пользованием критерия Пирсона χ^2 на соответствие теоретически ожидаемому отношению. Считали, что для признаков колоса наблюдаемые и полученные с использованием искусственного интеллекта расщепления соответствовали, если последнее было достоверно для всех четырех проекций колоса. Для статистической обработки (тесты на равенство средних, дисперсионный анализ) и визуализации данных использовали пакет Past v 5.3 (Hammer Ø. et al., 2001).

Результаты

Примеры изображений колосьев родительских видов, F₁ и F₂ гибридов (проекция 1) приведены на рис. 1.

Для оценки разнообразия по признакам «размер» и «форма» колосьев для четырех проекций был проведен анализ главных компонент (PCA), результаты которого представлены на рис. 2. Из 76 использованных для анализа переменных на две первые компоненты пришлось 45 % дисперсии: 35 % на PC1 и 10 % на PC2 (см. рис. 2). Основ-

ной вклад в изменчивость внесли признаки, связанные с размером колоса, – его длина и площадь. Вторая главная компонента изменчивости зависит от формы колоса и отражает его округлость. Из рис. 2 видно, что колосья материнских и отцовских растений и F₁ гибридов располагаются компактно, занимая отчасти перекрывающиеся области и демонстрируя близость признаков формы/размера колоса (см. рис. 1, а–в). Растения F₂ гибридов демонстрируют существенно большую вариабельность по признакам колоса, прежде всего размера. В ней представлено большое число растений, имеющих размер колоса больше, чем в среднем для первых трех линий.

На втором этапе исследований нами проведен анализ расщепления в F₂ гибридов по видоспецифическим признакам колосьев (см. табл. 1). Для каждого признака для оценки достоверности расщепления растений в популяции в пропорциях, отражающих тип генетического контроля (3:1, 13:3, 15:1, 61:3 и 63:1), подсчитано значение критерия Пирсона χ^2 (табл. 2).



Рис. 1. Колосья родительских видов, F₁ и F₂ гибридов, представленных в одинаковом масштабе и проекции. Материнская *T. aethiopicum* (к-19301/2) (а) и отцовская *T. carthlicum* (к-32496) (б) формы; F₁ (в) и F₂ (з) гибридов.

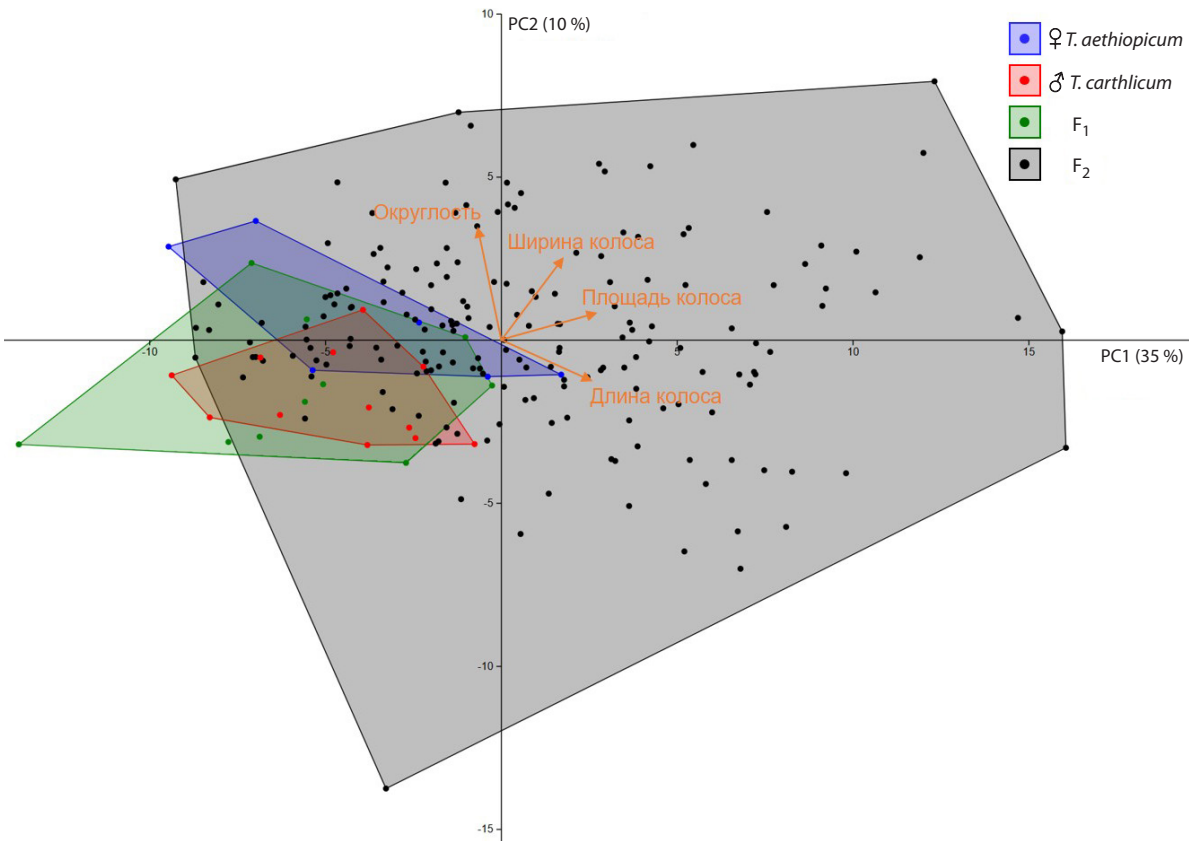


Рис. 2. Диаграмма рассеяния в пространстве двух первых главных компонент (PC1, PC2) для колосьев, параметры размера и формы которых были независимо оценены для четырех проекций. Обозначения в верхнем правом углу. Доля дисперсии, приходящейся на первую (PC1, горизонтальная ось) и вторую (PC2, вертикальная ось), дана в скобках. Усредненные направления проекции основных групп признаков колоса обозначены оранжевыми стрелками.

Таблица 2. Значения статистики χ^2 для различных пропорций встречаемости категорий видоспецифических признаков колоса в F₂ гибридов *T. aethiopicum* и *T. carthlicum*

Признак с указанием категорий	Число растений по категориям 1, 2		Характер наследования и соответствующие им значения χ^2				
	1	2	3:1	13:3	15:1	61:3	63:1
Тетраостость, нет (1), есть (2)	125	54	2.549	15.317	174.758	260.114	952.268
Окраска колоса, нет (1), есть (2)	28	144	6.977	0.689	29.526	51.728	242.193
Тип остистости, <i>T. aethiopicum</i> (1), <i>T. carthlicum</i> (2)	46	133	0.047	5.673	115.549	176.868	677.948
Зубец, нет (1), есть (2)	10	175	37.883	21.626	0.225	0.213	17.763
Опушение колосковой чешуи, нет (1), есть (2)	69	116	14.921	41.774	304.346	440.328	1535.938
Плешка, нет (1), есть (2)	120	65	10.135	32.602	263.432	383.873	1355.695

Примечание. В левой колонке указаны признаки колоса и номера соответствующих категорий (в скобках). $\chi^2_{0.05} = 3.84$. Значения χ^2 соотношений, которые достоверно не отличаются от теоретически ожидаемых пропорций, выделены полужирным начертанием.

На основании полученных результатов (см. табл. 2) можно сделать заключение, что тетраостость и тип (характер) остистости расщепляются в F₂ гибридов в отношении 3:1 (моногенное наследование), наличие окраски колоса в отношении 13:3 (дигенное наследование с неполным доминированием), а наличие зубца на колосковой чешуе в отношении 15:1 (дигенное наследование). Для таких признаков, как опушение колосковой чешуи и наличие плешки, для исследованных нами пропорций достоверного сходства для F₂ гибридов не выявлено.

Нами были оценены 19 признаков колоса для F₂ гибридов, представляющих интерес для выявления среди них тех, которые могут давать расщепление, соответствующее конкретным типам наследования. Для изучения этого во-

Таблица 3. Характеристики расщепления колосьев в F₂ гибридов по признаку «площадь остей» на изображении (SAA). Для каждой проекции колоса приведены оценки средних значений (SAA₁ и SAA₂) и дисперсий для двух групп колосьев – Var(SAA₁), Var(SAA₂), идентифицированных на основе модели смеси двух гауссовых распределений

Проекция изображения колоса	SAA ₁	Var(SAA ₁)	SAA ₂	Var(SAA ₂)	N ₁	N ₂	χ ²	p
1	792.3	151092.6	244.6	32393.1	41	146	0.80	0.37
2	574.1	119803.5	147.5	12517.7	42	145	0.53	0.47
3	759.0	136893.6	229.9	30079.3	48	139	0.09	0.76
4	578.4	127534.0	133.5	11256.2	51	136	0.66	0.42

Примечание. N₁, N₂ – выборки групп колосьев, p – вероятность.

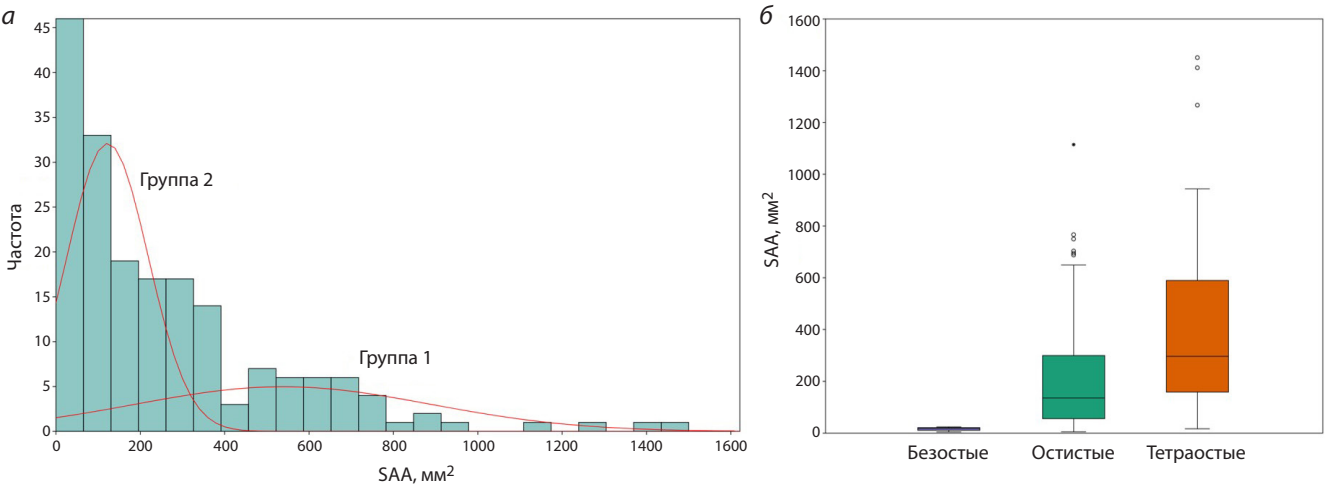


Рис. 3. Распределение площади остей: а – гистограмма распределения площади остей на изображении (SAA) колосьев в F₂ гибридов (проекция 4). По оси X отложено значение признака, по оси Y – число колосьев. Красными линиями показаны распределения плотности вероятности для двух групп колосьев: с большим (группа 2) и меньшим (группа 1) количеством остей; б – распределение площади остей на изображении колосьев в проекции 4 для безостых, остистых и тетраостых колосьев, показанное в виде диаграмм. По оси X приведены типы остистости, по оси Y – площадь остей.

проса мы использовали модель смеси двух гауссовых (нормальных) распределений. Для каждой проекции оценка проводилась независимо. Поскольку достоверная оценка параметров гауссового распределения обусловлена объемом выборки (числом изученных образцов), мы решили в данной работе ограничиться проверкой расщепления 3:1; для общей выборки из 187 колосьев теоретически ожидаемая численность групп растений будет 140 к 47. В табл. S3 для каждого признака и проекции колоса приведены средние значения и дисперсии для первой и второй групп колосьев (колонки mean1, var1, mean2, var2), предположительная численность колосьев в первой и второй группах (num1, num2), соотношение числа колосьев (numratio_1vs2), значение χ^2 и уровня значимости (chisq, chisq_p). Из результатов, представленных в табл. S3, видно, что для от двух до семи признаков в каждой проекции выполняется соотношение численности колосьев в двух группах, близкое к 3:1. Например, для первой проекции – это признак площади остей (SAA) и цельность (SSO) колоса. Для второй проекции – ширина модели колоса и ее площадь (q_ym, q_S), периметр контура проекции колоса (SP), ее площадь (SA), площадь остей (SAA) и округлость (SRO) и так далее. Важно отметить, что лишь для одного признака, а именно «площади остей» на изображении (SAA) достоверное расщепление в пропорции близкой к 3:1 наблюдается для всех четырех проекций колоса. Характеристики расщепления по этому признаку для четырех проекций и оценки числа колосьев для двух групп, χ^2 и вероятность гипотезы о равенстве соотношения с моногенным наследованием 3:1 приведены в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 результатов видно, что средние значения площади колосьев несколько больше для проекции лицевой (1) и обратной (тыльной) сторон (3), чем для их двух боковых проекций (2, 4), как для первой, так и второй изученных групп. Для группы колосьев с большей площадью остей (и большим их числом, первая группа) их число меньше и варьирует в пределах 41–51. Для группы растений с меньшей площадью остей число колосьев варьирует от 136 до 146. Гистограмма распределения значений SAA для 4-й проекции с отображением двух гауссовых распределений приведена на рис. 3, а.

Область гистограммы визуально разбивается на две части: правую с меньшим числом растений и большим значением SAA и левую с меньшими значениями SAA (число таких растений больше) (см. рис. 3, а). Это хорошо согласуется с данными табл. 3. Данные, представленные в

Таблица 4. Сравнение статистик распределений колосьев по среднему значению площади остей (мм²) на четырех проекциях

Статистика	Безостые	Остистые	Тетраостые
Число колосьев	6	127	54
SAA	13.79	280.13	481.03
Var(SAA)	25.59	73082.20	129227.80
Стандартное отклонение	5.06	270.34	359.48
Стандартная ошибка	2.07	23.99	48.92

Примечание. SAA – площадь остей на изображении; Var – дисперсия.

табл. 3 и на рис. 3, а, находятся в согласии с результатами ручной оценки расщепления колосьев в F₂ гибридов по признаку «тетраостость» (см. табл. 2). Хотя на основе только такого параметра, как площадь остей, нельзя определить тетраостость колоса (наличие остей одновременно на цветковой и на колосковой чешуе); тетраостые колосья в целом имеют большее число остей, что приводит к возрастанию у них параметра SAA. Это подтверждается смещением площади остей у тетраостых колосьев в сторону больших значений по сравнению с обычными остистыми (см. рис. 3, б). Мы также рассчитали средние значения параметра SAA для четырех проекций колосьев на изображениях F₂ гибридов и провели тест на равенство средних в трех группах растений: безостых, остистых и тетраостых (табл. 4).

Отметим, что среднее значение площади остей наименьшее у безостых растений, максимально у тетраостых и промежуточное у остистых, в согласии с результатами распределения (см. табл. 4), представленными на рис. 3, б. Дисперсионный анализ демонстрирует значимые различия средних для трех групп колосьев ($p < 10^{-4}$). Попарное сравнение средних с использованием парного теста Манна–Уитни также показывает значимые различия между всеми тремя группами колосьев по признаку «площадь остей» ($p < 0.001$). Таким образом, расщепление колосьев в F₂ гибридов по площади остей связано с тем, что тетраостые колосья в среднем имеют на изображении большую площадь остей (см. рис. 3, б).

Что касается других признаков колосьев, которые демонстрируют моногенное расщепление 3:1 не для всех проекций, то значение соответствия выше у признака, связанного с площадью контура колоса на изображении (SA), который дает расщепление для трех из четырех проекций. Периметр контура колоса (SP), его длина (SL), площадь модели четырехугольников (q_S) и длина (q_L) демонстрируют близость расщепления к пропорции 3:1 для двух из четырех проекций колосьев. Возможно, эти признаки также контролируются моногенно, однако неточность (неоднозначность) определения параметров признаков колоса на изображении может давать их неполное соответствие для разных проекций и затруднять анализ.

Обсуждение

Наиболее важным результатом нашей работы является ответ на вопрос, насколько результаты, полученные разными методами: гибридологического анализа и машинного

обучения – совпадают и можно ли судить о том, на какой стадии находится возможность использования методов машинного обучения в контексте работы с видоспецифическими признаками.

Анализ тетраостости. Среди изученных гибридных растений получаем расщепление 125 (норма) к 54 (тетраостость), $\chi^2 3:1 = 2.549$, $p < 0.05$. Результаты согласуются с гипотезой моногенного наследования признака «тетраостость» по рецессивному типу. Ранее в работах (Мигушова, Жуковский, 1969; Haque et al., 2011; Рожков и др., 2014; Добровольская и др., 2020) также был показан рецессивный характер наследования этого признака. Ген, контролирующий признак тетраостости – *ta*, локализован на длинном плече хромосомы 5A (Haque et al., 2011). Несмотря на тот факт, что В.Ф. Дорофеев и его коллеги (1979) отмечали наличие тетраостых форм колоса, помимо *T. carthlicum*, и у ряда разновидностей тетраплоидного вида *T. aethiopicum*, большинство исследователей сходятся в том, что признак «тетраостость» является видоспецифическим только для одного тетраплоидного вида пшеницы, а именно для *T. carthlicum* (Haque et al., 2011; Гончаров, 2012; Добровольская и др., 2020).

Помимо тетраплоидных видов, признак, фенотипически похожий на тетраостость, характерен для гексаплоидного вида пшеницы *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch., однако в этом случае речь идет о слегка удлинённых остевидных придатках на колосковой чешуе (Гончаров, 2009). Тем не менее мы можем утверждать, что «тетраостость» является видоспецифическим признаком только для *T. carthlicum* и может быть эффективно использована в таксономических целях.

Анализ окраски колоса. Среди изученных гибридных растений получаем расщепление 144 (черный + красный колос) к 28 (белый колос), $\chi^2 13:3 = 0.689$, $p < 0.05$. Такие результаты иллюстрируют явление доминантного эпистаза. Гены, контролирующие окраску колоса – *Bg* и *Rg1*, локализованы в хромосоме 1AS, а *Rg2* – 2BS. Дигенный контроль красной окраски колоса у пшениц был ранее показан в работах (Собко, Созинов, 1993; Кудрявцев, Попова, 1994; и др.).

Анализ типа (характера) остистости. По характеру остистости в изученной комбинации F₂ гибридов наблюдалось расщепление 46 растений с остями «по типу *T. aethiopicum*» к 133 растениям с остями «по типу *T. carthlicum*», что согласуется с гипотезой моногенного наследования по рецессивному типу ($\chi^2 = 0.047$). Признак «тип

остей» наследуется моногенно, а ген, контролирующий его, расположен в хромосоме 3A (Гончаров и др., 2003). Наблюдаемый в нашей работе разброс по выраженности признака «остистость» (см. рис. 3) обусловлен наличием значительного числа генов-модификаторов, контролирующих его выраженность (Sourdille et al., 2002; Wang et al., 2019). Известно, что у некоторых видов пшеницы модификаторы приводят к «частичной остистости» (полустистость и др.) или изменению длины остей (от коротких до очень длинных, превышающих длину колоса).

Анализ формы зубца на колосковой чешуе. Наличие/отсутствие зубца на колосковой чешуе характерно для всех тетраплоидных видов пшеницы, и признак у них не является видоспецифическим. Однако он может иметь разную выраженность у ряда разновидностей. Согласно полученным данным расщепление 175 (зубец есть) к 10 (зубца нет) соответствует гипотезе дигенного наследования признака 15:1 ($\chi^2 = 0.225$). В «Определителе пшеницы» (1980) указано, что как для *T. aethiopicum*, так и *T. carthlicum* характерно наличие зубца, причем у обоих видов форма зубца варьирует от короткой до длинной, от тупой до острой. Однако только у *T. aethiopicum* зубец может быть настолько длинным, что переходит в остевидный придаток.

Анализ опушения колосковой чешуи и наличие на ней плешки. Опушение колосковой чешуи – важный таксономический признак (Goncharov et al., 2007). Оно контролируется у тетраплоидных видов пшениц моногенно – геном *Hg*, локализованным в хромосоме 1AS (Гончаров, 2012). Кроме того, для *T. carthlicum* показано отсутствие сплошного опушения колосковой чешуи, а именно – наличие плешки в ее нижней части (Гандилян, 1972). В связи с разным типом опушения колосковой чешуи для вида *T. carthlicum* опушение с плешкой является видоспецифическим признаком, и для их отличия гену *Hg* нами присвоен символ «С» по названию вида: *Hg^C*. Рассматривая эти признаки, мы не получили достоверных результатов для гипотезы наследования 3:1, поэтому требуется проведение дополнительных исследований, поскольку выраженность затруднена как для визуальной оценки, так и при использовании искусственного интеллекта.

Тем не менее цифровые методы позволили нам оценить разнообразие колосьев по 19 признакам и продемонстрировали гораздо большее их разнообразие у растений F₂, чем в родительских и F₁ гибридов. Это может быть связано с наличием генов-модификаторов (Берсимбаев, Шулембаева, 2005). С исследованными нами видоспецифическими признаками (см. табл. 1), тетраостостью можно связать напрямую лишь один из количественных признаков – площадь остей на изображении (SAA). Остальные 18 признаков характеризуют форму колоса и его размер и не связаны с признаками окраски и колосковой чешуи. Примененный нами анализ смеси гауссовых распределений показал, что по признаку площади остей растения F₂ гибридов демонстрируют расщепление на два класса в пропорции 3:1, в согласии с признаком тетраостости. Сходные эффекты расщепления популяции на классы по распределению

массы зерен описаны у тритикале $\times$ *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus. (= син. $\times$ *Triticale* Tscherm.-Seys. ex Muntzing) (Kim et al., 2024). Следует отметить, что тритикале является результатом межродовой гибридизации пшеницы *Triticum* spp. и ржи *Secale cereale* L. Расщепление различных сортов тритикале по массе зерен наблюдалось в разные дни сбора колосьев (2–5 дней после колошения) для различной плотности посева (150–300 кг/га). Однако авторы не проверяли соотношение числа растений в классах по массе зерна. Наша работа демонстрирует, что комбинация методов автоматического фенотипирования, модели смеси гауссовых распределений в принципе может позволить проводить автоматический анализ выделения классов в F₂ гибридов, различающихся по величинам фенотипических признаков, имеющих расщепление в зависимости от модели наследования. Это позволит, в свою очередь, выявлять наличие генов, ассоциированных с видоспецифическими признаками растений.

Заключение

На основании проведенного исследования мы можем утверждать, что «тетраостость» является видоспецифическим признаком только для *T. carthlicum* и может быть эффективно использована как в таксономических целях, так и в экспериментах с применением машинного обучения, равно как и характер остистости для *T. aethiopicum*.

Продолжен поиск алгоритмов для решения задачи автоматизированного разделения фенотипов в гибридных популяциях на классы (Мережко, 2005; Речкин, 2024). Предложенный в настоящей работе метод использования двух гауссовских (нормальных) распределений эффективен для распределения на классы при олиогенном (моно- и дигенном) наследовании признаков.

Список литературы / References

- Афонников Д.А., Генаев М.А., Дорошков А.В., Комышев Е.Г., Пшенникова Т.А. Методы высокопроизводительного фенотипирования растений для массовых селекционно-генетических экспериментов. *Генетика*. 2016;52(7):788-803. doi 10.7868/S001667581607002X
- [Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. *Russ J Genet*. 2016;52(7):688-701. doi 10.1134/S1022795416070024]
- Берсимбаев Р.И., Шулембаева К.К. Цитогенетические исследования мягкой пшеницы в Казахстане. *Информационный вестник ВОГуС*. 2005;9(3):317-323
- [Bersimbaev R.I., Shulembaeva K.K. Cytogenetic studies of common wheat in Kazakhstan. *Informatsionnyy Vestnik VOGiS*. 2005; 9(3):317-323 (in Russian)]
- Букасов С.М. Система видов картофеля секции *Tuberarium* (Dum.) Buk. рода *Solanum* L. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1971;46(1):3-44
- [Bukasov S.M. Potato species system of section *Tuberarium* (Dum.) Buk. genus *Solanum* L. *Proc Appl Bot Genet Breed*. 1971;46(1):3-44 (in Russian)]
- Гандилян П.А. Спонтанная гибридизация, мутации и вопросы филогении пшеницы. *Генетика*. 1972;8(8):5-19
- [Gandilian P.A. Spontaneous hybridization, mutations, and phylogeny issues in wheat. *Genetika (Moscow)*. 1972;8(8):5-19 (in Russian)]

- Генаев М.А., Комышев Е.Г., Фу Хао, Коваль В.С., Гончаров Н.П., Афонников Д.А. SpikeDroidDB – информационная система для аннотации морфометрических характеристик колоса пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):132-140. doi 10.18699/VJ18.340
- [Genaev M.A., Komyshev E.G., Fu Hao, Koval V.S., Goncharov N.P., Afonnikov D.A. SpikeDroidDB: an information system for annotation of morphometric characteristics of wheat spike. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2018; 22(1):132-140. doi 10.18699/VJ18.340 (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Определитель разновидностей мягкой и твердой пшениц. Новосибирск: СО РАН, 2009
- [Goncharov N.P. Manual book of common and durum wheat. Novosibirsk: RAS SB Publ. House, 2009 (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Гео, 2012
- [Goncharov N.P. Comparative genetics of wheat and its relatives. Novosibirsk: Geo Publ., 2012 (in Russian)]
- Гончаров Н.П., Митина Р.Л., Анфилова Н.А. Наследование безостости у тетраплоидных видов пшениц. *Генетика*. 2003;39(4): 565-569
- [Goncharov N.P., Mitina R.L., Anfilova N.A. Inheritance of awnlessness in tetraploid wheat species. *Russ J Genet*. 2003;39(4):463-466. doi 10.1023/A:1023326202320]
- Добровольская О.Б., Дресвянникова А.Е., Бадаева Е.Д., Попова К.И., Травничкова М., Мартинек П. Изучение генетических факторов, определяющих признак «тетраостость» мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6): 568-574. doi 10.18699/VJ20.650
- [Dobrovolskaya O.B., Dresvyannikova A.E., Badaeva E.D., Popova K.I., Travnichkova M., Martinek P. The study of genetic factors that determine the awned glume trait in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(6):568-574. doi 10.18699/VJ20.650 (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф. Культурная флора СССР. Т.1. Пшеница. Л.: Колос, 1979
- [Dorofeev V.F. Cultural flora of the USSR. Vol. 1. Wheat. Leningrad, Kolos, 1979 (in Russian)]
- Жуковский П.М. Критико-систематический обзор видов рода *Aegilops*. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1928;18(1):417-609
- [Zhukovsky P.M. A critical and systematic review of the species of the genus *Aegilops*. *Proc Appl Bot Genet Breed*. 1928;18(1):417-609 (in Russian)]
- Зуев Е.В., Брыкова А.Н., Кудрявцева Е.Ю. Результаты анализа паспортной базы данных «Местные сорта яровой мягкой пшеницы в коллекции ВИР». *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):7-11. doi 10.30901/2227-8834-2019-1-7-11
- [Zuev E.V., Brykova A.N., Kudryavtseva E.Yu. Results of analyzing the passport database 'Spring bread wheat landraces in the VIR collection'. *Proc Appl Bot Genet Breed*. 2019;180(1):7-11. doi 10.30901/2227-8834-2019-1-7-11 (in Russian)]
- Кудрявцев А.М., Попова Т.А. Генетическое сцепление между глиадинкодирующими генами и генами окраски и опушения колоса у яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.). *Генетика*. 1994;30(12):1587-1592
- [Kudryavtsev A.M., Popova T.A. Genetic linkage between gliadin-coding genes and genes for color and pubescence of the ear in spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Genetika (Moscow)*. 1994; 30(12):1587-1592 (in Russian)]
- Ляпунова О.А. Внутривидовое разнообразие твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): унифицированная классификация. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):260-268. doi 10.18699/VJ21.029
- [Lyapunova O.A. Intraspecific diversity of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): a unified classification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2021;25(3):260-268. doi 10.18699/VJ21.029]
- Мережко А.Ф. Использование менделевских принципов в компьютерном анализе наследования варьирующих признаков. В: Экологическая генетика культурных растений. Краснодар: ВНИИ риса, 2005;107-117
- [Merezhko A.F. The use of Mendelian principles in computer analysis of the inheritance of varying traits. In: Ecological genetics of cultivated plants. Krasnodar: All-Russian Research Institute of Rice Publ., 2005;107-117 (in Russian)]
- Мигушова Э.Ф., Жуковский П.М. К познанию пшеницы *T. ispahanicum* Heslot. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1969;39(3):71-90
- [Migushova E.F., Zhukovsky P.M. Towards the knowledge of wheat *T. ispahanicum* Heslot. *Proc Appl Bot Genet Breed*. 1969;39(3): 71-90 (in Russian)]
- Определитель пшеницы (Методические указания) / Сост. В.Ф. Дорофеев, А.А. Филатенко, Э.Ф. Мигушова. Л.: ВИР, 1980.
- [Wheat manual book / Eds V.F. Dorofeev, A.A. Filatenko, E.F. Migushova. Leningrad: VIR, 1980 (in Russian)]
- Пронозин А.Ю., Паулиш А.А., Заварзин Е.А., Приходько А.Ю., Прохoshin Н.М., Кручинина Ю.В., Гончаров Н.П., Комышев Е.Г., Генаев М.А. Автоматическое фенотипирование морфологии колоса тетра- и гексаплоидных видов пшеницы методами компьютерного зрения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(1):71-81. doi 10.18699/VJ21.009
- [Pronozin A.Yu., Paulish A.A., Zavarzin E.A., Prikhodko A.Yu., Prokoshin N.M., Kruchinina Y.V., Goncharov N.P., Komyshev E.G., Genaev M.A. Automatic phenotyping of ear morphology of tetra- and hexaploid wheat species by computer vision methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2021;25(1): 71-81. doi 10.18699/VJ21.009]
- Речкин Д.В. Анализ расщеплений количественных признаков, основанный на фундаментальных свойствах нормального распределения. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):199-203. doi 10.18699/letvjgb-2024-10-25
- [Rechkin D.V. Analysis of quantitative traits segregation based on fundamental properties of the normal distribution. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Lett Vavilov J Genet Breed*. 2024; 10(4):199-203. doi 10.18699/letvjgb-2024-10-25 (in Russian)]
- Рожков Р.В., Криворученко Р.В., Коваленко И.В. Генетический контроль тетраостости у пшеницы. *Вестник Харьковского национального аграрного университета*. 2014;2(32):70-76
- [Rozhkov R.V., Krivoruchenko R.V., Kovalenko I.V. Genetic control of the awned glume trait in wheat. *Vestnik Khar'kovskogo Natsional'nogo Agrarnogo Universiteta = Herald of the Kharkiv National Agrarian University*. 2014;2(32):70-76 (in Russian)]
- Собко Т.А., Созинов А.А. Генетический контроль морфологических признаков колоса и взаимосвязь аллельной изменчивости маркерных локусов хромосом 1А и 1В озимой мягкой пшеницы. *Цитология и генетика*. 1993;27(5):15-22
- [Sobko T.A., Sozinov A.A. Genetic control of morphological features of the ear and the relationship of allelic variability of marker loci of chromosomes 1A and 1B of winter soft wheat. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 1993;27(5):15-22 (in Russian)]
- Artemenko N.V., Genaev M.A., Epifanov R.U., Komyshev E.G., Kruchinina Y.V., Koval V.S., Goncharov N.P., Afonnikov D.A. Image-based classification of wheat spikes by glume pubescence using convolutional neural networks. *Front Plant Sci*. 2024;14:1336192. doi 10.3389/fpls.2023.1336192
- Awada L., Phillips P.W.B., Bodan A.M. The evolution of plant phenomics: global insights, trends, and collaborations (2000-2021). *Front Plant Sci*. 2024;15:1410738. doi 10.3389/fpls.2024.1410738
- Chouhan S.S., Singh U.P., Sharma U., Jain S. Classification of different plant species using deep learning and machine learning algorithms. *Wireless Pers Commun*. 2024;136(4):2275-2298. doi 10.1007/s11277-024-11374-y

- Dolezel J., Greilhuber J., Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2233-2244. doi 10.1038/nprot.2007.310
- Eig A. Monographisch-kritische Übersicht der Gattung *Aegilops*. Repertorium specierum novarum regni vegetabilis. Beihefte, Berlin, 1929
- Genaev M.A., Komyshev E.G., Kruchinina Y.V., Goncharov N.P., Afonnikov D.A., Smirnov N.V. Morphometry of the wheat spike by analyzing 2D images. *Agronomy.* 2019;9(7):390. doi 10.3390/agronomy9070390
- Golovnina K.A., Glushkov S.A., Blinov A.G., Mayorov V.I., Adkison L.R., Goncharov N.P. Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. *Plant Syst Evol.* 2007;264:195-216. doi 10.1007/s00606-006-0478-x
- Goncharov N.P. Genus *Triticum* L. taxonomy: The present and the future. *Plant Syst Evol.* 2011;295(1):1-11. doi 10.1007/s00606-011-0480-9
- Goncharov N.P., Adonina I.G. A new hexaploid wheat species *Triticum aminovii*. *Cereal Res Comm.* 2025;53:2159-2165. doi 10.1007/s42976-025-00677-w
- Goncharov N.P., Bannikova S.V., Kawahara T. Wheat artificial amphiploids involving *Triticum timopheevii* genome: their studies, preservation and reproduction. *Genet Resour Crop Evol.* 2007;54(7):1507-1516. doi 10.1007/s10722-006-9141-1
- Hammer K., Filatenko A.A., Pistrick K. Taxonomic remarks on *Triticum* L. and *×Triticosecale* Wittm. *Genet Resour Crop Evol.* 2011;58:3-10. doi 10.1007/s10722-010-9590-4
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001;4(1):1-9
- Haque M.A., Takayama A., Watanabe N., Kuboyama T. Cytological and genetic mapping of the gene for four-awned phenotype in *Triticum carthlicum* Nevski. *Genet Resour Crop Evol.* 2011;58:1087-1093. doi 10.1007/s10722-010-9644-7
- Hawkes J. A revision of the tuber-bearing Solanums. In: Record Scottish Plant Breeding Station. 1963;76-181
- Hodač L., Karbstein K., Tomasello S., Wäldchen J., Bradican J.P., Hörandl E. Geometric morphometric versus genomic patterns in a large polyploid plant species complex. *Biology.* 2023;12(3):418. doi 10.3390/biology12030418
- Kim B.H., Kwon H., Kim W. Deciphering individual triticale grain weight patterns: A gaussian mixture model approach. *PloS One.* 2024;19(11):e0313942. doi 10.1371/journal.pone.0313942
- Komyshev E.G., Genaev M.A., Kruchinina Yu.V., Koval V.S., Goncharov N.P., Afonnikov D.A. Evaluation of the spike diversity of seven hexaploid wheat species and an artificial amphidiploid using a quadrangle model obtained from 2D images. *Plants.* 2024;13(19):2736. doi 10.3390/plants13192736
- Martinek P., Bednar J. Changes of spike morphology (multirow spike – MRS, long glumes – LG) in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their importance for breeding. In: Proc. Intern. Conf. “Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines”. Novosibirsk, 2001;192-194
- Mulugeta A.K., Sharma D.P., Mesfin A.H. Deep learning for medicinal plant species classification and recognition: a systematic review. *Front Plant Sci.* 2024;14:1286088. doi 10.3389/fpls.2023.1286088
- Ran Z., Xiao X., Zhou L., Yan C., Bai X., Ou J., Li Z. Phenotypic diversity analysis in the Sect. *Tuberculata* (*Camellia* L.) population, an endemic taxon in China. *Plants.* 2024;13(22):3210. doi 10.3390/plants13223210
- Sourdille P., Cadalen T., Gay G., Bernard M. Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. *Plant Breeding.* 2002;121(4):320-324. doi 10.1046/j.1439-0523.2002.728336.x
- Tiburtini M., Scrucca L., Peruzzi L. Using Gaussian Mixture Models in plant morphometrics. *Perspect Plant Ecol Evol Syst.* 2025;69:125902. doi 10.1016/j.ppees.2025.125902
- Wang D., Yu K., Jin D., Sun L., Chu J., Wu W., Xin P., Gregová E., Li X., Sun J., Yang W., Zhan K., Zhang A., Liu D. Natural variations in the promoter of Awn Length Inhibitor 1 (ALI-1) are associated with awn elongation and grain length in common wheat. *Plant J.* 2019;101(5):1075-1090. doi 10.1111/tpj.14575

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.11.2025. После доработки 22.12.2025. Принята к публикации 22.12.2025.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)»
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМЭ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Белый список (уровень 1), Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....
Дата выхода в свет 21.05.2026. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 26.6.
.....