

# ВАВИЛОВСКИЙ

## ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2023 • 27 • 6

Генетика растений / Иммунигенет растений / Селекция растений на продуктивность и качество /  
Генетика животных / Генетика человека / Экологическая генетика / Тест-системы и вакцинопрофилактика



Клёст

vavilov.ejrbud.ru  
vavilov.fcg.ru  
vavilov\_journal@biomet.nsc.ru  
Индекс издания 42153





Сетевое издание

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJGB-23-65

## Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

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

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

## Ответственный секретарь

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Online edition

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

## VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJGB-23-65

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

## Генетика растений

- 545 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Получение и изучение линии с замещением хромосомы 4В пшеницы *Triticum aestivum* L. на хромосому 4N<sup>mar</sup> дикого ячменя *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x). Л.А. Першина, Н.В. Трубачеева, В.К. Шумный, Е.Д. Бадаева

- 553 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Молекулярно-цитологический анализ интрогрессивных линий, полученных от скрещивания мягкой пшеницы *Triticum aestivum* с *T. dicoccum* и *T. dicoccoides*. О.А. Орловская, И.Н. Леонова, Л.А. Соловей, Н.И. Дубовец

## Иммунитет растений

- 565 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Полногеномный анализ ассоциации устойчивости к пепельной гнили сои, выращенной в Казахстане. А. Затыбеков, С. Аbugалиева, С. Дидоренко, А. Рсалиев, А. Мауленбай, Ч. Фанг, Е. Турусбеков (на англ. языке)

- 572 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Исследование устойчивости клоновых подвоев яблони из коллекции Мичуринского государственного аграрного университета к мучнистой росе. И.Н. Шамшин, М.Л. Дубровский, А.А. Трифонова, К.В. Борис, А.М. Кудряцев

- 582 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Устойчивость сортов мягкой пшеницы, возделываемых на территории Саратовской области, к возбудителям септориозных пятнистостей. Ю.В. Зеленева, Э.А. Конькова

## Селекция растений на продуктивность и качество

- 591 **ОБЗОР**  
Развитие селекции яровой твердой пшеницы в России (странах бывшего СССР), результаты и перспективы. П.Н. Мальчиков, М.Г. Мясникова

- 609 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Анализ генетических компонент, гетерозиса и комбинационной способности пакистанских элитных сортов пшеницы по признакам урожайности и устойчивости к желтой ржавчине. М.Ш. Ахмед, М. Камар, С. Вакар, А. Наим, Р.А. Джавайд, С.Х. Танвир, И. Хусейн (на англ. языке)

- 623 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Пребридинговые исследования устойчивой к листовой ржавчине *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624. С.Н. Сибикеев, И.Г. Адонина, А.Е. Дружин, О.А. Баранова

## Генетика животных

- 633 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Прижизненное МРС исследование долгосрочных последствий травматической внутричерепной инъекции культуральной среды у мышей. О.Б. Шевелев, О.П. Черкасова, И.А. Разумов, Е.Л. Завьялов (на англ. языке)

- 641 **ОБЗОР**  
Хромосомы певчих птиц, ограниченные зародышевой линией. П.М. Бородин

- 651 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Профиль экспрессии генов, связанных с регуляцией стресса, поведения и нейрогенеза, вдоль дорзовентральной оси в гиппокампе у взрослых ручных и агрессивных лисиц. Ю.В. Александрович, Е.В. Антонов, С.Г. Шихевич, А.В. Харламова, Л.В. Мейстер, Ю.В. Маковка, Д.В. Шепелева, Р.Г. Гулевич, Ю.Э. Гербек

## Генетика человека

- 662 **ОБЗОР**  
Однонуклеотидные замены в геноме человека, влияющие на связывание факторов транскрипции, и их роль в развитии патологий. Е.В. Антонцева, А.О. Дегтярева, Е.Е. Корболина, И.С. Дамаров, Т.И. Меркулова

- 676 **ОБЗОР**  
Молекулярно-генетическая характеристика гипогидротических эктодермальных дисплазий. В.А. Ковальская, Т.Б. Череватова, А.В. Поляков, О.П. Рыжкова

684

ОБЗОР

Проблемы изучения направленного естественного отбора у человека.

*С.В. Михайлова*

### Экологическая генетика

694

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование сообществ макробеспозвоночных животных в бухте Большие Коты озера Байкал с использованием ДНК метабаркодинга.

*Л.С. Кравцова, Т.Е. Перетолчина, Т.И. Трибой, И.А. Небесных, А.Е. Тупикин, М.Р. Кабилов*

703

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Разнообразие почвенных Alveolata в ненарушенной степи и агроценозах пшеницы при разной обработке почвы.

*Н.Б. Наумова, П.А. Барсуков, О.А. Батурина, О.А. Русалимова, М.Р. Кабилов (на англ. языке)*

### Тест-системы и вакцинопрофилактика

712

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Противооспенная вакцинация на модели мышей. *С.Н. Щелкунов, А.А. Сергеев, С.А. Пьянков,*

*К.А. Титова, С.Н. Якубицкий*

## Plant genetics

- 545 ORIGINAL ARTICLE  
Development and characterization of a line with substitution of chromosome 4B of wheat *Triticum aestivum* L. on chromosome 4H<sup>mar</sup> of wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x). L.A. Pershina, N.V. Trubacheeva, V.K. Shumny, E.D. Badaeva

- 553 ORIGINAL ARTICLE  
Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines created by crossing of *Triticum aestivum* with *T. dicoccoides* and *T. dicoccum*. O.A. Orlovskaya, I.N. Leonova, L.A. Solovey, N.I. Dubovets

## Plant immunity

- 565 ORIGINAL ARTICLE  
Genome-wide association study for charcoal rot resistance in soybean harvested in Kazakhstan. A. Zatybekov, S. Abugaliyeva, S. Didorenko, A. Rsaliyev, A. Maulenbay, C. Fang, Y. Turuspekov

- 572 ORIGINAL ARTICLE  
Powdery mildew resistance of apple clonal rootstocks from the collection of the Michurinsk State Agrarian University. I.N. Shamshin, M.L. Dubrovsky, A.A. Trifonova, K.V. Boris, A.M. Kudryavtsev

- 582 ORIGINAL ARTICLE  
Soft wheat cultivars grown in the Saratov region and their resistance to Septoria blotch. Yu.V. Zeleneva, E.A. Konkova

## Plant breeding for performance and quality

- 591 REVIEW  
Development, results and prospects of the spring durum wheat breeding in Russia (post-Soviet states). P.N. Malchikov, M.G. Myasnikova

- 609 ORIGINAL ARTICLE  
Estimation of genetic components, heterosis and combining ability of elite Pakistani wheat varieties for yield attributing traits and stripe rust response. M.S. Ahmed, M. Qamar, S. Waqar, A. Naeem, R.A. Javaid, S.K. Tanveer, I. Hussain

- 623 ORIGINAL ARTICLE  
Prebreeding studies of leaf rust resistant *Triticum aestivum*/T. *timopheevii* line L624. S.N. Sibikeev, I.G. Adonina, A.E. Druzhin, O.A. Baranova

## Animal genetics

- 633 ORIGINAL ARTICLE  
*In vivo* MRS study of long-term effects of traumatic intracranial injection of a culture medium in mice. O.B. Shevelev, O.P. Cherkasova, I.A. Razumov, E.L. Zavjalov

- 641 REVIEW  
Germline-restricted chromosomes of the songbirds. P.M. Borodin

- 651 ORIGINAL ARTICLE  
The expression profile of genes associated with behavior, stress, and adult neurogenesis along the hippocampal dorsoventral axis in tame and aggressive foxes. Yu.V. Alexandrovich, E.V. Antonov, S.G. Shikheevich, A.V. Kharlamova, L.V. Meister, Y.V. Makovka, D.V. Shepeleva, R.G. Gulevich, Yu.E. Herbeck

## Human genetics

- 662 REVIEW  
Human-genome single nucleotide polymorphisms affecting transcription factor binding and their role in pathogenesis. E.V. Antontseva, A.O. Degtyareva, E.E. Korbolina, I.S. Damarov, T.I. Merkulova

- 676 REVIEW  
Molecular basis and genetics of hypohidrotic ectodermal dysplasias. V.A. Kovalskaia, T.B. Cherevatova, A.V. Polyakov, O.P. Ryzhkova

- 684 **REVIEW**  
Problems with studying directional natural selection in humans. *S.V. Mikhailova*

## Ecological genetics

- 694 **ORIGINAL ARTICLE**  
A study of macroinvertebrate communities in Bolshiye Koty Bay of Lake Baikal using DNA metabarcoding.  
*L.S. Kravtsova, T.E. Peretolchina, T.I. Triboy, I.A. Nebesnykh, A.E. Tupikin, M.R. Kabilov*

- 703 **ORIGINAL ARTICLE**  
Soil Alveolata diversity in the undisturbed steppe and wheat agrocenoses under different tillage. *N.B. Naumova, P.A. Barsukov, O.A. Baturina, O.A. Rusalimova, M.R. Kabilov*

## Test kits and preventive vaccination

- 712 **ORIGINAL ARTICLE**  
Smallpox vaccination in a mouse model.  
*S.N. Shchelkunov, A.A. Sergeev, S.A. Pyankov, K.A. Titova, S.N. Yakubitskiy*



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Получение и изучение линии с замещением хромосомы 4В пшеницы *Triticum aestivum* L. на хромосому 4Н<sup>mar</sup> дикого ячменя *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)

Л.А. Першина<sup>1,2</sup>✉, Н.В. Трубачеева<sup>1,2</sup>, В.К. Шумный<sup>1</sup>, Е.Д. Бадаева<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ pershina@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Интрогрессивная гибридизация является основным методом расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы. В качестве источника новых генов для мягкой пшеницы может служить дикий ячмень *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ( $2n = 4x = 28$ ), который характеризуется высокой устойчивостью к стрессовым факторам. Настоящая работа посвящена изучению возможности использования неполного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)–*T. aestivum* (Пиротрикс 28) ( $2n = 54$ ), носителя цитоплазмы дикого ячменя, в качестве источника хромосом *H. marinum* для их интрогрессии в геном мягкой пшеницы. С этой целью получены гибриды между линией сорта мягкой пшеницы Пиротрикс 28 (далее П28) и неполным амфиплоидом, а затем среди потомков гибридов проведен отбор цитогенетически стабильных 42-хромосомных растений с высоким уровнем фертильности. С использованием GISH-анализа обнаружено наличие пары хромосом *H. marinum* в геноме этих растений. По результатам С-окрашивания хромосом установлено, что у этой гибридной линии произошло замещение хромосомы 4В мягкой пшеницы на хромосому дикого ячменя 4Н<sup>mar</sup>. С помощью хромосом-специфичных SSR-маркеров *Xgwm368* и *Xgwm6* подтверждено отсутствие хромосомы 4В мягкой пшеницы, а с применением EST-маркеров *BAWU808* и *BAW112* – наличие хромосомы 4Н<sup>mar</sup> в геноме выделенной дисомной пшенично-ячменной линии. Изучение этой линии показало, что замещение хромосомы 4В мягкой пшеницы на хромосому дикого ячменя 4Н<sup>mar</sup> привело к изменению ряда признаков: сильно выраженной антоциановой окраске колеоптиле, характерной для дикого ячменя *H. marinum*, а также отсутствию пурпурной окраски ушек у основания листьев, которая проявляется у линии сорта пшеницы П28. По высоте растений, числу стеблей и колосьев в растении, числу колосков и зерен в главном колосе, а также числу зерен в растении линия 4Н<sup>mar</sup>(4В) превосходит родительскую линию П28, а по массе 1000 зерен ей уступает. Цитогенетическая стабильность и фертильность линии 4Н<sup>mar</sup>(4В) указывают на высокую компенсационную способность хромосомы 4Н<sup>mar</sup> ячменя по отношению к хромосоме 4В мягкой пшеницы и гомеологию между этими хромосомами.

Ключевые слова: *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum*; мягкая пшеница; пшенично-ячменная замещенная линия 4Н<sup>mar</sup>(4В).

**Для цитирования:** Першина Л.А., Трубачеева Н.В., Шумный В.К., Бадаева Е.Д. Получение и изучение линии с замещением хромосомы 4В пшеницы *Triticum aestivum* L. на хромосому 4Н<sup>mar</sup> дикого ячменя *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):545-552. DOI 10.18699/VJGB-23-66

## Development and characterization of a line with substitution of chromosome 4B of wheat *Triticum aestivum* L. on chromosome 4Н<sup>mar</sup> of wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)

Л.А. Pershina<sup>1,2</sup>✉, N.V. Trubacheeva<sup>1,2</sup>, V.K. Shumny<sup>1</sup>, E.D. Badaeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Kurchatov Genomics Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ pershina@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Introgressive hybridization is the main method of broadening the genetic diversity of bread wheat. Wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ( $2n = 4x = 28$ ) has useful agronomical traits, such as high resistance to stress factors, that could be a potential source of new genes for bread wheat improvement. This study aimed to evaluate the possibility of introgression of *H. marinum* chromosomes into the genome of bread wheat using an incomplete amphiploid *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x)–*T. aestivum* (Pyrotrix 28) ( $2n = 54$ ) carrying the cytoplasm of wild barley. For this purpose, we crossed the line of bread wheat variety Pyrotrix 28 with an incomplete amphiploid, and then selected cytogenetically stable 42-chromosome plants with a high level of fertility in hybrid progeny. Genomic *in situ*

hybridization (GISH) revealed a pair of *H. marinum* chromosomes in the genome of these plants. C-banding analysis confirmed that bread wheat chromosome 4B was replaced by wild barley chromosome 4H<sup>mar</sup>. SSR markers *Xgwm368* and *Xgwm6* confirmed the absence of chromosome 4B, and EST markers *BAWU808* and *BAW112* identified chromosome 4H<sup>mar</sup> in the genome of the isolated disomic wheat-barley substitution line. The study of this line showed that the substitution of chromosome 4B with chromosome 4H<sup>mar</sup> resulted in a change of some morphological traits. It included intense anthocyanin coleoptile coloration, specific for *H. marinum*, as well as a lack of purple coloration of the ears in the leaf sheath, specific for Pyrotrix 28. Line 4H<sup>mar</sup>(4B) showed increased performance for several traits, including plant height, number of spikes and tillers per plant, spikelet and grain number in the main spike, grain number per plant, but it had decreased values of 1000-grain weight compared to wheat. Cytogenetic stability and fertility of line 4H<sup>mar</sup>(4B) indicated a high compensation ability of barley 4H<sup>mar</sup> for wheat chromosome 4B and confirmed their homeology.

Key words: *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum*; bread wheat; wheat-barley substitution line 4H<sup>mar</sup>(4B).

**For citation:** Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Shumny V.K., Badaeva E.D. Development and characterization of a line with substitution of chromosome 4B of wheat *Triticum aestivum* L. on chromosome 4H<sup>mar</sup> of wild barley *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* (4x). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6): 545–552. DOI 10.18699/VJGB-23-66

## Введение

Интрогрессивная гибридизация – основной метод увеличения генетического разнообразия мягкой пшеницы, а выявление источников новых генов, определяющих хозяйственно ценные признаки, такие как устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, улучшенные хлебопекарные качества, повышенное содержание микроэлементов в зерне и др., представляет собой актуальную задачу (Molnár-Láng, Linc, 2015; Hao et al., 2020). Виды рода *Hordeum* L., к которым относятся однолетние и многолетние ячменные травы, а также виды зернового типа рассматриваются в качестве одного из таких источников (Garthwaite et al., 2005; Rubiales, Moral, 2011).

Проведение гибридизации между видами ячменя и пшеницы стало возможным с развитием методов преодоления прогамной и эмбриональной несовместимости, сильно выраженной при скрещиваниях видов этих родов (Kruse, 1973). К настоящему времени получены пшенично-ячменные замещающие, дополненные и транслокационные линии с участием хромосом *Hordeum vulgare* (Molnár-Láng et al., 2014), *H. spontaneum* (Taketa, Takeda, 2001), *H. chilense* (Rey et al., 2015), *H. californicum* (Fang et al., 2014), а также аллоплазматические линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, которые используются в селекции для создания перспективных форм и сортов пшеницы (Першина и др., 2018). Кроме того, на основе гибридов *H. chilense* с мягкой и твердой пшеницей создана новая зерновая культура тритордеум (Martín et al., 1999; Martín, 2017).

Способность к скрещиванию с пшеницей проявляют и два подвида из комплекса ячменя морского *H. marinum*: травянистые однолетники *H. marinum* Hudson ssp. *marinum* (2x) и *H. marinum* Hudson ssp. *gussoneanum* (Parl.) Thell. (2x, 4x) (Першина и др., 2004; Islam et al., 2007). Благодаря высокой устойчивости к засолению и заболачиванию эти виды способны произрастать на засоленных лугах и болотах вдоль морских побережий (Garthwaite et al., 2005; Islam et al., 2007). При этом устойчивость к засолению у *H. marinum* оценивается выше, чем у других представителей Triticeae (Garthwaite et al., 2005). Кроме того, у *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (= *H. geniculatum* All.) (2n = 28) отмечена устойчивость к засухе и резким перепадам температуры (Кобылянский, 1967), а также выделены образцы с высоким содержанием белка в семенах (Першина и др., 2009).

На основе ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4x) × *T. aestivum* (Першина и др., 2004) и *H. marinum* (2x) × *T. aestivum* (Islam et al., 2007) получены амфиплоиды, несущие цитоплазму дикого ячменя. По сравнению с родительскими генотипами у амфиплоидов промежуточные показатели солеустойчивости и устойчивости к заболачиванию (Islam et al., 2007; Malik et al., 2009), а по сравнению с пшеницей у них понижена продуктивность. Такое проявление признаков у амфиплоидов может быть обусловлено негативным влиянием цитоплазмы *H. marinum*. Чтобы устранить это влияние, необходимо получение эуплазматических гибридных генотипов, у которых пшеница – материнская форма. Однако использование *H. marinum* ssp. *gussoneanum* в качестве опылителя при скрещивании с пшеницей крайне затруднено из-за образования ограниченного количества пыльцы в мелких цветках *H. marinum*.

В настоящей работе приведены результаты использования неполного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum*-*T. aestivum* (2n = 54), носителя цитоплазмы дикого ячменя, в качестве источника хромосом *H. marinum* для интрогрессии их в геном мягкой пшеницы, а также охарактеризована выделенная среди потомков этих гибридов эуплазматическая пшенично-ячменная дисомная линия 4H<sup>mar</sup>(4B).

## Материалы и методы

**Растительный материал и условия его изучения.** Выполнена гибридизация между линией, сформированной от одного растения сорта яровой мягкой пшеницы Пиротрикс 28 (материнский генотип, П28), и отдельными растениями неполного амфиплоида Л-503 *H. marinum* ssp. *gussoneanum*-*T. aestivum* (Пиротрикс 28) (2n = 54). Неполный амфиплоид, выделенный среди потомков цитогенетически нестабильного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum*-*T. aestivum* (2n = 68–70), содержит 42 хромосомы пшеницы и 12 хромосом *H. marinum*, за исключением пары хромосом 5H<sup>mar</sup> (Trubacheeva et al., 2019).

Из семян, завязавшихся в двух гибридных комбинациях (П28 × 503р5) и (П28 × 503р10), были выращены растения, а их потомки изучены в поколениях F<sub>2</sub>–F<sub>6</sub>. Каждое поколение формировали из семян наиболее продуктивного растения предыдущего поколения. Растения характеризо-

вали по завязываемости семян в главном колосе, разделяя их по уровню фертильности на группы: ПС – полностью стерильные (нет зерен); ЧС – частично стерильные (1–9 зерен); ЧФ – частично фертильные (10–19); Ф – фертильные (20–30); ПФ – полностью фертильные (более 30 зерен). Начиная с поколения F<sub>2</sub>, у растений подсчитывали число хромосом. У эуплоидных (2n = 42) растений F<sub>2</sub> гибрида (П28 × 503р10) определяли хромосомный состав в метафазе I (МI). Цитогенетически стабильные эуплоидные растения включали в исследования по идентификации хромосом *H. marinum* ssp. *gussoneanum*. Гибридизацию и изучение потомков гибридов проводили в гидропонной теплице.

Выделенная пшенично-ячменная замещенная линия 4N<sup>mar</sup>(4В) была изучена на полевом участке. Растения выращивали на делянках шириной 1 м по 20 растений в ряду, с расстоянием между рядами 25 см. Контролем служила родительская линия сорта яровой мягкой пшеницы Пиротрикс 28. Каждый генотип выращивали по три ряда, расположенных в рандомизированном порядке. Выполнена оценка линий по морфологическим признакам. Во время уборки определяли высоту растений, число побегов, число продуктивных колосьев, длину главного колоса, число колосков в главном колосе, число зерен в главном колосе и растении. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2007. Использован однофакторный дисперсионный анализ с последующим вычислением наименьшей существенной разности (НСР) (Доспехов, 1985).

**Цитогенетический анализ, геномная *in situ* гибридизация и С-окрашивание хромосом.** Анализ числа хромосом выполняли по стандартной методике приготовления препаратов по Фельгену с использованием кончиков корешков растений, выращиваемых в гидропонной теплице. Характер конъюгации в МI мейоза материнских клеток пыльцы (МКП) изучали на временных давленных препаратах при окрашивании 2 % ацетокармином. Геномную *in situ* гибридизацию (GISH) осуществляли в соответствии с ранее опубликованной методикой (Trubacheeva et al., 2019). В качестве зонда для гибридизации использовали меченную биотином геномную ДНК *H. marinum* ssp. *gussoneanum*. Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioImagerM1 (Zeiss, Германия). Работа выполнена при использовании оборудования ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ФИЦ ИЦиГ СО РАН. С-окрашивание хромосом проводили по ранее опубликованному протоколу (Badaeva et al., 1994).

**Молекулярные методы исследований.** EST-маркеры *BAWU808* и *BAW112*, эффективность которых для выявления хромосомы 4N<sup>mar</sup> показана ранее в работе (Trubacheeva et al., 2019), использовали для подтверждения ее наличия в геноме растений выделенной линии. Отсутствие хромосомы 4В мягкой пшеницы у пшенично-ячменной замещенной линии 4N<sup>mar</sup>(4В) подтверждали с помощью хромосом-специфичных SSR-маркеров *Xgwm368* и *Xgwm6*, разработанных для мягкой пшеницы (Röder et al., 1998). Структура праймеров и условия ПЦР описаны ранее (Trubacheeva et al., 2019). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Bio-Rad T-100 Thermal Cycler, разделение продуктов ПЦР – в 1.5–2.5 %

агарозном геле, содержащем бромистый этидий, визуализацию – с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

## Результаты

### Выявление эуплоидных растений среди потомков гибридов (П28 × Л-503)

В результате скрещивания линии пшеницы П28 с неполным амфилоидом Л-503 в четырех гибридных комбинациях с частотой от 3.1 до 6.6 % завязались щуплые зерна, из которых были выращены растения F<sub>1</sub> (табл. 1).

Щуплые зерна, завязавшиеся у растений F<sub>1</sub>, проявили всхожесть у гибрида (П28 × 503р5) с частотой 13.9 %, а у гибрида (П28 × 503р10) – с частотой 55.5 %. Со второго поколения у потомков этих гибридов изучен уровень фертильности, оцененный по числу зерен, завязавшихся в главном колосе, и проанализировано число хромосом (табл. 2).

Поклоение F<sub>2</sub> гибридной комбинации (П28 × 503р5) было представлено частично фертильными (33 %) растениями с числом хромосом 2n = 46, а также стерильными (45 %) и частично стерильными (22 %), среди которых были выявлены 46- и 48-хромосомные растения. Поклоение F<sub>3</sub>, сформированное от частично фертильного растения (2n = 46), также состояло из стерильных (31 %), частично стерильных (44 %) и частично фертильных (25 %) растений. Лучшим по продуктивности в F<sub>3</sub> было 44-хромосомное растение, среди потомков которого в поколении F<sub>4</sub> наряду со стерильными (18 %), частично стерильными (41 %) и частично фертильными (27 %) отмечены и фертильные (14 %) растения. Среди потомства поколений F<sub>4</sub> найдены 42- и 44-хромосомные растения. В поколениях F<sub>5</sub> и F<sub>6</sub>, сформированных от фертильных 42-хромосомных растений, помимо эуплоидов (2n = 42), обнаружены и анеуплоиды (2n = 41; 2n = 43). При этом по-прежнему наблюдалось расщепление на растения с разным уровнем фертильности, в том числе и стерильные (см. табл. 2). Растения с полной фертильностью появились только в поколении F<sub>6</sub> (6 %).

При отборе по продуктивности у гибридной комбинации (П28 × 503р10) происходило более ускоренное образование 42-хромосомных цитотипов с высоким уровнем фертильности. Уже в F<sub>2</sub> при наличии стерильных (13 %), частично стерильных (27 %) и частично фертильных (49 %) растений были выявлены и 46-хромосомные фертильные (20 %) растения. Остальные группы растений были представлены цитотипами с числами хромосом 2n = 46, 46 + t, 46 + 2t. Потомками 46-хромосомного растения в F<sub>3</sub> были стерильные (6 %), частично стерильные (38 %), частично фертильные (25 %), а также 42-хромосомные фертильные (31 %) растения. В F<sub>3</sub>, кроме эуплоидов, обнаружены анеуплоиды, в том числе с телоцентрическими хромосомами (2n = 43, 43 + t, 44 + t, 44 + 2t).

Среди 26 растений поколения F<sub>4</sub>, сформированного от 42-хромосомного растения поколения F<sub>3</sub>, преобладали фертильные растения (62 %) при наличии растений с полной фертильностью (11 %). В общей сложности в F<sub>4</sub> комбинации (П28 × 503р10) полностью стерильные (8 %) растения и растения с низким уровнем фертильности (ча-

**Таблица 1.** Характеристика гибридных комбинаций (П28 × Л-503) по завязываемости зерен в колосе, числу зерен у растений F<sub>1</sub> и их всхожести

Гибридная комбинация	Число и частота* (%) гибридных зерен в опыленном колосе	Число		Всхожесть зерен, %
		изученных растений F <sub>1</sub>	зерен в растении F <sub>1</sub>	
П28 × 503p5	1 (3.3)	1	129	13.9
П28 × 503p9	1 (3.1)	1	2	0
П28 × 503p10	2 (6.6)	2	18	55.5
П28 × 503p22	1 (4.0)	1	0	–

\* От числа опыленных цветков.

**Таблица 2.** Уровень фертильности и число хромосом у растений F<sub>1</sub>–F<sub>6</sub> гибридной комбинации *T. aestivum* (П28) (2n = 42) × (*H. marinum* ssp. *gussoneanum* × П28) (2n = 54)

Поклоение	Изучено растений	Число и частота (%) растений					Число хромосом
		ПС 0	ЧС (1–9) <sup>#</sup>	ЧФ (10–19) <sup>#</sup>	Ф (20–30) <sup>#</sup>	ПФ (более 30) <sup>#</sup>	
П28 × 503p5							
F <sub>2</sub>	18	8 (45 %)	4 (22 %)	6 (33 %)	0	0	46*, 48
F <sub>3</sub>	16	5 (31 %)	7 (44 %)	4 (25 %)	0	0	44*, 46
F <sub>4</sub>	22	4 (18 %)	9 (41 %)	6 (27 %)	3 (14 %)	0	42*, 44
F <sub>5</sub>	28	5 (18 %)	6 (21 %)	8 (29 %)	9 (32 %)	0	41, 42*, 43
F <sub>6</sub>	32	2 (6 %)	4 (13 %)	10 (31 %)	14 (44 %)	2 (6 %)	41, 42, 43
П28 × 503p10							
F <sub>2</sub>	15	2 (13 %)	4 (27 %)	6 (40 %)	3 (20 %)	0	46*, 46 + t, 46 + 2t
F <sub>3</sub>	16	1 (6 %)	6 (38 %)	4 (25 %)	5 (31 %)	0	42*, 43, 43 + t, 44 + t, 44 + 2t
F <sub>4</sub>	26	2 (8 %)	3 (11 %)	2 (8 %)	16 (62 %)	3 (11 %)	41, 42*, 42 + t
F <sub>5</sub>	30	0	0	0	21 (70 %)	9 (30 %)	42*, 42 + t, 42 + 2t
F <sub>6</sub>	38	0	0	0	6 (16 %)	32 (84 %)	42, 42 + t

<sup>#</sup> Число зерен в главном колосе; \* наиболее продуктивные цитотипы, использованные для формирования следующего поколения.**Таблица 3.** Цитологическая характеристика линий, выделенных из гибридной комбинации (П28 × 503p10) F<sub>6</sub>

Линия	Изучено растений	Растения с конфигурацией хромосом в М1 мейоза		
		21''	20'' + 2'	21'' + t''
(П28 × 503p10) F <sub>6</sub> p1	18	18 (100 %)	–	–
(П28 × 503p10) F <sub>6</sub> p2	19	15 (79 %)	4 (21 %)	–
(П28 × 503p10) F <sub>6</sub> p3	18	16 (89 %)	–	2 (12 %)

стично стерильные – 11 % и частично фертильные – 8 %) составляли лишь менее одной трети. Остальные растения были фертильными (62 %) и полностью фертильными (11 %). В F<sub>4</sub> среди изученных растений обнаружены цитотипы с 2n = 41, 42, 42 + t. В результате отбора наиболее продуктивных 42-хромосомных растений поколения F<sub>5</sub> и F<sub>6</sub> были представлены только фертильными растениями (в F<sub>5</sub> – 70 %, а в F<sub>6</sub> – 16 %) и растениями с полной фертильностью (в F<sub>5</sub> – 30 %, а в F<sub>6</sub> – 84 %) (см. табл. 2).

Чтобы произвести отбор мейотически стабильных 42-хромосомных растений для дальнейшей работы, три

линии, сформированные от отдельных растений гибрида П28 × 503p10 из поколения F<sub>6</sub>, были охарактеризованы по конфигурации хромосом в М1 мейоза. Анализ М1 мейоза МКП показал, что эти эуплоидные линии характеризуются стабильным мейозом. Все изученные растения линии (П28 × 503p10) F<sub>6</sub> p1 и основная часть растений линии (П28 × 503p10) F<sub>6</sub> p2 (79 %) и линии (П28 × 503p10) F<sub>6</sub> p3 (89 %) имеют конфигурацию хромосом 21'' (табл. 3). Выявленные нарушения связаны с наличием унивалентов (20'' + 2'), в том числе с участием телоцентрических хромосом (21'' + 2t').

### Идентификация пшенично-ячменной дисомной замещенной линии 4Н<sup>mar</sup>(4В)

На следующем этапе в работу были включены растения с конфигурацией хромосом 21". С использованием GISH-анализа показано, что они содержат пару хромосом *H. marinum* (рис. 1).

Этот результат указывает на то, что в процессе образования эуплоидных форм у самоопыленных потомков гибрида (П28 × 503р10) произошла интрогрессия пары хромосом *H. marinum* в геном мягкой пшеницы. На основании данных С-окрашивания хромосом у выделенной линии подтверждено присутствие пары хромосом ячменя и установлен тип замещения 4Н<sup>mar</sup>(4В) (рис. 2, а). Кроме того, с помощью С-окрашивания хромосом определена принадлежность телоцентрической хромосомы, которая оказалась производной хромосомы 4Н<sup>mar</sup> ячменя *H. marinum* (см. рис. 2, б).

Молекулярный анализ подтвердил наличие 4Н<sup>mar</sup> хромосомы ячменя *H. marinum* и отсутствие хромосомы мягкой пшеницы 4В в геноме дисомных пшенично-ячменных линий, выделенных среди самоопыленных потомков гибридной комбинации (П28 × 503р10). Отсутствие у этих линий продуктов амплификации SSR-маркеров, локализованных на хромосоме 4В пшеницы (рис. 3, а), и наличие маркеров хромосомы 4Н<sup>mar</sup> хромосомы ячменя *H. marinum* (см. рис. 3, б) оценивали как замещение соответствующей хромосомы пшеницы гомеологической хромосомой дикого ячменя. В качестве контроля использована ДНК родительской линии пшеницы П28 и дикого ячменя *H. marinum*.

### Характеристика дисомной пшенично-ячменной замещенной линии 4Н<sup>mar</sup>(4В)

У растений линии 4Н<sup>mar</sup>(4В) выявлены фенотипические признаки, отличные от родительской линии мягкой пшеницы Пиротрикс 28. Это сильно выраженная антоциановая окраска колеоптиле, характерная для дикого ячменя *H. marinum* (рис. 4, а), а также отсутствие пурпурной окраски ушек у основания листьев (см. рис. 4, б).

Замещение хромосомы 4В пшеницы на хромосому 4Н<sup>mar</sup> дикого ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (4х) привело к развитию жизнеспособных растений, у которых значения показателей ряда количественных признаков были выше, чем у родительской линии Пиротрикс 28. По высоте растений и значениям показателей отдельных признаков, определяющих продуктивность растений, различия между линией 4Н<sup>mar</sup>(4В) и родительской линией достоверны (табл. 4). Так, по высоте растений, числу побегов и колосьев в растении, длине колоса, числу колосков в колосе, числу зерен в колосе и растении линия 4Н<sup>mar</sup>(4В) превосходит П28, а по массе 1000 зерен – уступает. На рис. 5 и 6 представлены колосья и зерна соответственно.

### Обсуждение

Источниками генов дикорастущих сородичей для интрогрессивной гибридизации могут выступать не только исходные виды, но и полученные с их участием синтетические формы пшеницы (Давоян и др., 2012; Molnár-Láng, Linc, 2015; Li et al., 2018). В гибридизации с пшеницей тритордиум используют с целью переноса в геном пшеницы хромосом *H. chilense* (Martin, 2017), а тритикале – хромосом ржи (Щапова, Кравцова, 1990).

Ранее в наших работах амфиплоид *H. marinum* ssp. *gussoneanum*–*T. aestivum* (2n = 70), носитель цитоплазмы дикого ячменя, был использован в качестве материнской формы в скрещиваниях с мягкой пшеницей при получении аллоплазматических дисомных пшенично-ячменных замещенных 7Н<sup>mar</sup>(7В), 7Н<sup>mar</sup>(7D), 7Н<sup>mar</sup>L(7D) линий, а также дителосомных дополненных 2n = 42 + 2t (7Н<sup>mar</sup>L) линий (Першина и др., 2004; Trubacheeva et al., 2019). В настоящей работе отдельные растения неполного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum*–*T. aestivum* (2n = 54), носителя цитоплазмы дикого ячменя, использованы в качестве опылителей при скрещивании с линией П28 с целью интрогрессии генетического материала *H. marinum* в эуплазматическую генотипическую среду мягкой пшеницы. Частота

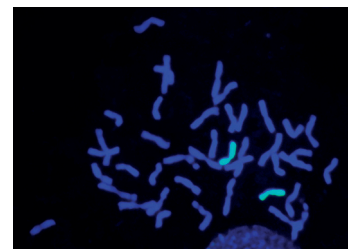


Рис. 1. Геномная *in situ* гибридизация линии с замещением пары хромосом пшеницы на пару хромосом *H. marinum* (окрашены зеленым цветом).

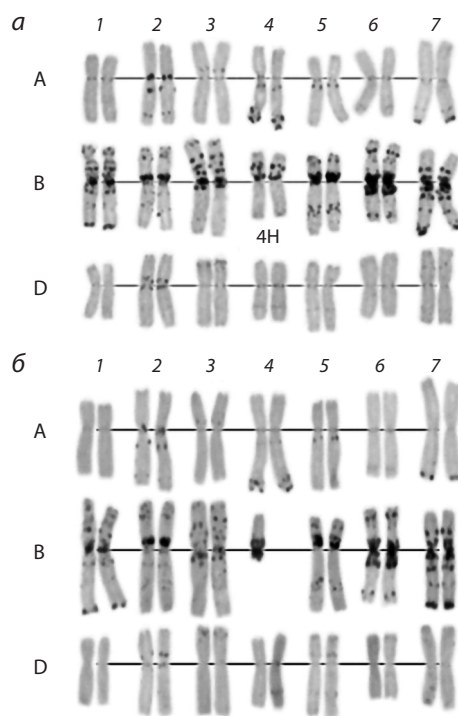


Рис. 2. С-окрашивание хромосом: а – линии с замещением хромосом 4Н<sup>mar</sup>(4В) (2n = 42); б – линии с замещением хромосом 4Н<sup>mar</sup>L (2n = 40 + t).

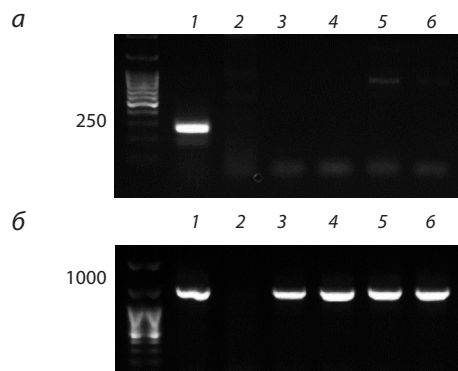


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием молекулярных маркеров.

а – SSR-маркер *Xgwm368*. 1 – *T. aestivum*; 2 – *H. marinum*; 3–6 – растения линии 4Н(4В); б – EST-маркер *BAWU808*. 1 – *H. marinum*; 2 – *T. aestivum*; 3–6 – растения линии 4Н(4В). Цифрами указана длина фрагмента в п. н.



**Рис. 4.** Колеоптиле (а); ушки у основания листа (б).  
1 – линия 4H<sup>mar</sup>(4B); 2 – линия мягкой пшеницы Пиротрикс 28.



**Рис. 5.** Колосья: 1 – линии мягкой пшеницы П28; 2–4 – линии 4H<sup>mar</sup>(4B).



**Рис. 6.** Зерна: 1 – линии мягкой пшеницы П28; 2 – линии 4H<sup>mar</sup>(4B).

завязываемости гибридных семян была низкой, но часть гибридных растений F<sub>1</sub> оказались жизнеспособными, а у двух гибридов F<sub>1</sub> (П28 × 503р5) и (П28 × 503р10), завязались зерна, которые проросли. Это позволило, начиная с поколения F<sub>2</sub>, провести отбор по продуктивности в ряду самоопыленных поколений данных гибридов с целью выявления эуплоидных (2n = 42) растений с высоким уровнем фертильности.

Анализ полученных данных показал различия между потомками гибридов (П28 × 503р5) и (П28 × 503р10) по характеру формообразования и скорости цитологической стабилизации. Этот процесс проходил медленнее в гибридной комбинации (П28 × 503р5) по сравнению с (П28 × 503р10). Так, у потомков 42-хромосомных растений гибрида (П28 × 503р5) еще в поколениях F<sub>5</sub> и F<sub>6</sub> происходило расщепление на растения с разным уровнем фертильности, включая полностью стерильные. В F<sub>6</sub> только половина из 32 растений были фертильными и с полной фертильностью, остальные растения – стерильные, частично стерильные и частично фертильные. У гибридной комбинации (П28 × 503р10), напротив, уже в поколениях F<sub>5</sub> и F<sub>6</sub> формировались только фертильные растения или растения с полной фертильностью. Кроме того, у потомков гибрида (П28 × 503р10), в отличие от (П28 × 503р5), происходило образование телоцентрических хромосом. Такие результаты согласуются с данными исследователей, которые подчеркивали уникальность потомства каждого гибридного зерна как источника разнообразия при формообразовании у отдаленных гибридов (Щапова, Кравцова, 1990).

Как следует из полученных результатов, процесс стабилизации кариотипов 42-хромосомных форм в потомстве гибрида (П28 × 503р10) F<sub>6</sub> сопровождался замещением пары хромосом пшеницы на пару хромосом *H. marinum*. Это показали данные GISH-анализа, С-окрашивания хромосом и молекулярного анализа. У цитогенетически стабильных эуплоидных растений идентифицировано замещение хромосомы 4В мягкой пшеницы на 4H<sup>mar</sup> хромосому *H. marinum*. Кроме того, обнаружено участие 4H<sup>mar</sup> хромосомы в образовании телоцентриков.

Характер пшенично-ячменного замещения подтверждается и морфологическими признаками, которые обнаружены у линии 4H<sup>mar</sup>(4B). Отсутствие пурпурной окраски ушек в основании листьев линии 4H<sup>mar</sup>(4B) указывает на отсутствие хромосомы мягкой пшеницы 4В, поскольку этот признак контролируется геном *Ra2*, локализованным именно на этой хромосоме (Melz, Thiele, 1990), и проявляется у Пиротрикс 28. Формирование более мелкого

**Таблица 4.** Характеристика дисомной пшенично-ячменной замещенной линии 4H<sup>mar</sup>(4B) по агрономическим признакам

Генотип	Высота растений, см	Число		Длина колоса	Число			Масса 1000 зерен
		побегов	колосьев		колосков в колосе	зерен в колосе	зерен в растении	
4H <sup>mar</sup> (4B)	133.63*	9.11*	5.6*	11.9*	22.3*	63.0*	236*	32.51*
П28	123.73	4.5	3.8	8.3	17.0	43.9	138.3	39.77
НСР <sub>05</sub>	3.63	2.2	0.8	0.94	0.8	4.56	41.32	3.44

\* p < 0.05.

зерна у замещенной линии 4Н<sup>mar</sup>(4В) можно связать как с отсутствием хромосомы 4В, которая оказывает влияние на размер и форму зерна у пшеницы (Rahman et al., 2020), так и с влиянием хромосомы 4Н<sup>mar</sup> вида *H. marinum*, принадлежащего к мелкосеменным ячменным травам (Bothmer et al., 1991).

У линии 4Н<sup>mar</sup>(4В) присутствовал четкий фенотипический маркерный признак, характерный для *H. marinum*, – это антоциановая окраска колеоптиле, отсутствующая у родительской линии П28 и ранее обнаруженная у аллоплазматической пшенично-ячменной замещенной линии 7Н<sup>mar</sup>(7D) (Khlestkina et al., 2011). Накопление антоциана в вегетативных органах растений связано с устойчивостью к стрессовым факторам, а у пшеницы способность накапливать антоциан в колеоптиле контролируется геном *Rc* (red coleoptile) (Khlestkina et al., 2011). В связи с этим линия 4Н<sup>mar</sup>(4В) в перспективе может представлять интерес для исследований устойчивости к абиотическим факторам, характерной для *H. marinum* (Garthwaite et al., 2005; Islam et al., 2007; Malik et al., 2009).

Установлено, что хромосомы 4-й гомеологической группы других видов ячменя также обладают признаками, важными для селекционных программ. Так, хромосома 4Н<sup>ch</sup> дикого вида ячменя *H. chilense* оказывает влияние на устойчивость к *Septoria tritici* и к засолению (Said, Cabrera, 2009), а хромосома 4Н культурного ячменя *H. vulgare* в отсутствие хромосомы мягкой пшеницы 4D у дисомной пшенично-ячменной замещенной линии пшеницы 4Н(4D) повышает эффективность использования воды, что приводит к засухоустойчивости пшеницы (Molnár et al., 2007). Полученная в нашей работе линия 4Н<sup>mar</sup>(4В) может представлять практический интерес, так как характеризуется высокими показателями признаков урожайности. По числу колосьев, длине колоса, числу колосков в колосе, числу зерен в колосе и растении линия 4Н<sup>mar</sup>(4В) превосходит реципиент – линию пшеницы Пиротрикс 28. Эти результаты, как и цитогенетическая стабильность линии 4Н<sup>mar</sup>(4В), свидетельствуют о гомеологии хромосомы 4Н<sup>mar</sup> дикого ячменя *H. marinum* и хромосомы 4В мягкой пшеницы, а также указывают на высокую компенсационную способность хромосомы 4Н<sup>mar</sup> по отношению к хромосоме 4В мягкой пшеницы.

## Заключение

Таким образом, показана эффективность использования неполного амфилоида (*H. marinum* ssp. *gussoneanum*–*T. aestivum*) ( $2n = 54$ ), носителя цитоплазмы дикого ячменя, для переноса хромосом *H. marinum* в эуплазматическую генотипическую среду мягкой пшеницы.

## Список литературы / References

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зинченко А.Н., Давоян Э.Р., Кравченко А.М., Зубанова Ю.С. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):44-51.  
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zabanova Y.S. The use of synthetic forms in the preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2:480-485. DOI 10.1134/S2079059712060044.]

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985.  
[Dospikhov B.A. Methodology of Field Experiments (With the Basics of Statistical Processing of Research Results. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]

Кобылянский В.Д. Биологические особенности диких видов ячменя применительно к задачам селекции. *Биол. журн. Армении*. 1967;20(10):41-51.  
[Kobylyanskiy V.D. Biological characters of wild barley species in relation to aims of breeding. *Biologicheskii Zhurnal Armenii = Armenian Journal of Biology*. 1967;20(10):41-51. (in Russian)]

Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Раковцева Т.С., Шумный В.К. Проявление фертильности в процессе формообразования у самоопыленных беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфидиплоидов [*Hordeum geniculatum* All. ( $2n = 28$ ) × *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ )] ( $2n = 70$ ). *Генетика*. 2004;40(5):636-641.  
[Persheina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P., Rakovtseva T.S., Shumny V.K. Expression of fertility during morphogenesis in self-pollinated backcrossed progenies of barley-wheat amphiploids [*Hordeum geniculatum* All. ( $2n = 28$ ) × *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ )] ( $2n = 70$ ). *Russ. J. Genet.* 2004;40:510-514. DOI 10.1023/B:RUGE.0000029153.61243.c2.]

Першина Л.А., Девяткина Э.П., Белова Л.И., Трубачеева Н.В., Арбузова В.С., Кравцова Л.А. Изучение особенностей аллоплазматических пшенично-ячменных замещенных и дополненных линий (*Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum*)-*Triticum aestivum*. *Генетика*. 2009;45(10):1386-1392.  
[Persheina L.A., Devyatkina E.P., Belova L.I., Trubacheeva N.V., Arbutzova V.S., Kravtsova L.A. Features of alloplasmic wheat-barley substitution and addition lines (*Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum*)-*Triticum aestivum*. *Russ. J. Genet.* 2009;45(10):1223-1229. DOI 10.1134/S102279540910010X.]

Першина Л.А., Белова Л.И., Трубачеева Н.В., Осадчая Т.С., Шумный В.К., Белан И.А., Росеева Л.П., Немченко В.В., Абакумов С.Н. Аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* с транслокацией 1RS.1BL: исходные генотипы для создания сортов яровой мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(5):544-552. DOI 10.18699/VJ18.393.  
[Persheina L.A., Belova L.I., Trubacheeva N.V., Osadchaya T.S., Shumny V.K., Belan I.A., Rosseeva L.P., Nemchenko V.V., Abakumov S.N. Alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL translocation: initial genotypes for production of common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(5):544-552. DOI 10.18699/VJ18.393. (in Russian)]

Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука, 1990.  
[Shchapova A.I., Kravtsova L.A. Cytogenetics of Wheat-rye Hybrids. Novosibirsk: Nauka Publ., 1990. (in Russian)]

Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192:117-145. DOI 10.1007/BF00985912.

Bothmer R.V., Jacobsen N., Baden C., Jorgensen R.B., Linde-Laurson I. An Ecogeographical Study of the Genus *Hordeum*. Rome: IBPGR, 1991.

Fang Y., Yuan J., Wang Z., Wang H., Xiao J., Yang Z. Development of *T. aestivum* L.–*H. californicum* alien chromosome lines and assignment of homoeologous groups of *Hordeum californicum* chromosomes. *J. Genet. Genomics*. 2014;41(8):439-477. DOI 10.1016/j.jgg.2014.06.004.

Garthwaite A.J., von Bothmer R., Colmer T.D. Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> into the shoots. *J. Exp. Bot.* 2005;56(419):2365-2378. DOI 10.1093/jxb/eri229.

- Hao M., Zhang L., Ning S., Huang L., Yuan Z., Wu B., Yan Z., Dai S., Jiang B., Zheng Y., Liu D. The resurgence of introgression breeding, as exemplified in wheat improvement. *Front. Plant Sci.* 2020;11:252. DOI 10.3389/fpls.2020.00252.
- Islam S., Malik A.I., Islam A.K.M.R., Colmer T.D. Salt tolerance in a *Hordeum marinum*–*Triticum aestivum* amphiploid, and its parents. *J. Exp. Bot.* 2007;58(5):1219–1229. DOI 10.1093/jxb/erl293.
- Khlestkina E.K., Antonova E.V., Pershina L.A., Soloviev A.A., Badaeva E.D., Borner A.A., Salina E.A. Variability of *Rc* (red coleoptile) alleles in wheat and wheat-alien genetic stock collections. *Cereal Res. Commun.* 2011;39(4):465–474. DOI 10.1556/CRC.39.2011.4.1.
- Kruse A. *Hordeum* × *Triticum* hybrids. *Hereditas.* 1973;73(1):157–161. DOI 10.1111/j.1601-5223.1973.tb01078.x.
- Li A., Lui D., Yang W., Kishii M. Synthetic hexaploid wheat: yesterday, today, and tomorrow. *Engineering.* 2018;4(4):552–558. DOI 10.1016/j.eng.2018.07.001.
- Malik A.I., English J.P., Colmer T.D. Tolerance of *Hordeum marinum* accessions to O<sub>2</sub> deficiency, salinity and these stresses combined. *Ann. Bot.* 2009;103(2):237–248. DOI 10.1093/aob/mcn142.
- Martín A. Tritordeum: a man-made cereal. In: 4th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding Jointly Organized by EUCARPIA Cereal Section November 6–9, 2017, Budapest, Hungary. Budapest, 2017;5–6.
- Martín A., Álvarez J.B., Martín L.M., Barro F., Ballesteros J. The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. *J. Cereal Sci.* 1999;30(2):85–95. DOI 10.1006/jcrs.1998.0235.
- Melz G., Thiele V. Chromosome locations of genes controlling ‘purple leaf base’ in rye and wheat. *Euphytica.* 1990;49:155–159. DOI 10.1007/BF00027265.
- Molnár-Láng M., Linc G. Wheat–barley hybrids and introgression lines. In: Molnár-Láng M., Ceoloni C., Dolezel J. (Eds.). *Alien Introgression in Wheat. Cytogenetics, Molecular Biology and Genomics*. Cham: Springer, 2015;315–346. DOI 10.1007/978-3-319-23494-6\_12.
- Molnár I., Linc G., Dulai S., Nagy E.D., Molnár-Láng M. Ability of chromosome 4H to compensate for 4D in response to drought stress in a newly developed and identified wheat–barley 4H(4D) disomic substitution line. *Plant Breed.* 2007;126(4):369–374. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01300.
- Molnár-Láng M., Linc G., Szakács É. Wheat–barley hybridization: the last 40 years. *Euphytica.* 2014;195:315–329. DOI 10.1007/s10681-013-1009-9.
- Rahman S., Islam S., Yu Z., She M., Nevo E., Ma W. Current progress in understanding and recovering the wheat genes lost in evolution and domestication. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(16):5836. DOI 10.3390/ijms21165836.
- Rey M.-D., Calderón M.-C., Rodrigo M.J., Zacarías L., Alós E., Prieto P. Novel bread wheat lines enriched in carotenoids carrying *Hordeum chilense* chromosome arms in the *ph1b* background. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134598. DOI 10.1371/journal.pone.0134598.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149(4):2007–2023. DOI 10.1093/genetics/149.4.2007.
- Rubiales D., Moral A. Resistance of *Hordeum chilense* against loose smuts of wheat and barley (*Ustilago tritici* and *U. nuda*) and its expression in amphiploids with wheat. *Plant Breed.* 2011;130(1):101–103. DOI 10.1111/j.1439-0523.2010.01818.x.
- Said M., Cabrera A. A physical map of chromosome 4H<sup>ch</sup> from *H. chilense* containing SSR, STS and EST–SSR molecular markers. *Euphytica.* 2009;167:253–259. DOI 10.1007/s10681-009-9895-6.
- Taketa S., Takeda K. Production and characterization of a complete set of wheat–wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) chromosome addition lines. *Breed Sci.* 2001;51(3):199–206. DOI 10.1270/jsbbs.51.199.
- Trubacheeva N.V., Badaeva E.D., Osadchaya T.S., Pershina L.A. Use of *H. vulgare* EST markers, GISH and C-banding to study bread wheat–*H. marinum* subsp. *gussoneanum* (2n = 28) introgression lines. *Cereal Res. Commun.* 2019;47(4):593–603. DOI 10.1556/0806.47.2019.37.

#### ORCID ID

L.A. Pershina [orcid.org/0000-0002-9941-2026](https://orcid.org/0000-0002-9941-2026)  
N.V. Trubacheeva [orcid.org/0000-0002-6701-6811](https://orcid.org/0000-0002-6701-6811)  
V.K. Shumny [orcid.org/0000-0003-1939-6140](https://orcid.org/0000-0003-1939-6140)  
E.D. Badaeva [orcid.org/0000-0001-7101-9639](https://orcid.org/0000-0001-7101-9639)

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (научный проект № 20-016-00196) и в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0017. Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.03.2023. После доработки 17.05.2023. Принята к публикации 18.05.2023.



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Молекулярно-цитологический анализ интрогрессивных линий, полученных от скрещивания мягкой пшеницы *Triticum aestivum* с *T. dicocum* и *T. dicoccoides*

О.А. Орловская<sup>1</sup>, И.Н. Леонова<sup>2,3</sup>✉, Л.А. Соловей<sup>1</sup>, Н.И. Дубовец<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

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

<sup>3</sup> Кафедра генетики и селекции, Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

✉ leonova@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Дикая и культурная полбы (BBAA,  $2n = 28$ ) представляют значительный интерес для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы как источники генетических факторов, определяющих высокое содержание белка и микроэлементов в зерне и устойчивость ко многим биотическим и абиотическим факторам. Особое внимание к этим видам обусловлено их близким родством с *Triticum aestivum*, что облегчает межвидовую гибридизацию. Целью настоящей работы были анализ характера чужеродных интрогрессий у гибридных линий, полученных от скрещивания сортов мягкой пшеницы с *T. dicoccoides* и *T. dicocum*, и оценка их влияния на цитологическую стабильность. Для установления локализации и протяженности фрагментов интрогрессии использовали С-бэндинг и генотипирование маркерами SNP и SSR. Оценку цитологической стабильности проводили на основе изучения поведения хромосом в микроспорогенезе. Молекулярно-цитогенетический анализ интрогрессивных линий пшеницы свидетельствует о том, что включение генетического материала дикой и культурной полбы осуществляется преимущественно в виде целых плеч или крупных фрагментов в хромосомах генома В и менее протяженных вставок в геноме А. При этом наибольшая частота интрогрессий фрагментов генома полб наблюдалась в хромосомах 1А, 1В, 2В, 3В. Изучение заключительной стадии мейоза показало высокий уровень цитологической стабильности у большинства интрогрессивных линий пшеницы  $F_{10}$  (мейотический индекс составил 83.0–99.0 %), что обеспечивает формирование у них функциональных гамет в количестве, достаточном для успешной репродукции. Данные линии представляют интерес для отбора перспективного материала с хозяйственно ценными признаками с последующим включением их в селекционный процесс. Ключевые слова: мягкая пшеница; *Triticum aestivum*; *T. dicoccoides*; *T. dicocum*; интрогрессивные линии; С-бэндинг; SSR-анализ; SNP-анализ; микроспорогенез; цитологическая стабильность.

**Для цитирования:** Орловская О.А., Леонова И.Н., Соловей Л.А., Дубовец Н.И. Молекулярно-цитологический анализ интрогрессивных линий, полученных от скрещивания мягкой пшеницы *Triticum aestivum* с *T. dicocum* и *T. dicoccoides*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(6):553-564. DOI 10.18699/VJGB-23-67

## Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines created by crossing of *Triticum aestivum* with *T. dicoccoides* and *T. dicocum*

O.A. Orlovskaya<sup>1</sup>, I.N. Leonova<sup>2,3</sup>✉, L.A. Solovey<sup>1</sup>, N.I. Dubovets<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Department of Genetics and Selection, Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia

✉ leonova@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Wild and domesticated emmer (BBAA,  $2n = 28$ ) are of significant interest for expanding the genetic diversity of common wheat as sources of a high protein and microelement grain content, resistance to many biotic and abiotic factors. Particular interest in these species is also determined by their close relationship with *Triticum aestivum* L., which facilitates interspecific hybridization. The objective of this work was to analyze the nature of alien introgressions in hybrid lines from crossing common wheat varieties with *T. dicoccoides* and *T. dicocum*, and to assess the effect of their genome fragments on the cytological stability of introgression lines. A C-banding technique and genotyping with SNP and SSR markers were used to determine localization and length of introgression fragments. Assessment of cytological stability was carried out on the basis of chromosome behavior in microsporogenesis. A molecular cytogenetic analysis of introgression wheat lines indicated that the inclusion of the genetic material of wild and domesticated emmer was carried out mainly in the form of whole arms or large fragments in the chromosomes of the B genome and less extended inserts in the A genome. At the same time, the highest frequency of introgressions of the emmer genome was observed in chromosomes 1A, 1B, 2B, and 3B. The analysis of the final stage of meiosis showed a high level of cytological stability in the vast majority of introgression wheat lines  $F_{10}$  (meiotic index was 83.0–99.0 %), which

ensures the formation of functional gametes in an amount sufficient for successful reproduction. These lines are of interest for the selection of promising material with agronomically valuable traits and their subsequent inclusion in the breeding process.

Key words: common wheat; *Triticum aestivum*; *T. dicoccoides*; *T. dicoccum*; introgression lines; C-banding; SSR analysis; SNP analysis; microsporogenesis; cytological stability.

**For citation:** Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Solovey L.A., Dubovets N.I. Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines created by crossing of *Triticum aestivum* with *T. dicoccoides* and *T. dicoccum*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):553-564. DOI 10.18699/VJGB-23-67

## Введение

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. (BBAADD,  $2n = 42$ ) – одна из наиболее важных зерновых культур и основной источник калорий для большинства населения земного шара. Кроме пищевого назначения, пшеница используется в целлюлозно-бумажной и химической промышленности, для производства этанола, а отходы мукомольного производства и фуражное зерно – в качестве корма для скота. Селекция мягкой пшеницы с целью получения высокоурожайных сортов значительно снизила уровень генетического разнообразия по сравнению с дикорастущими сородичами (Xie, Nevo, 2008; Nevo, Chen, 2010; Budak et al., 2013). Поэтому в настоящее время для расширения генофонда хлебной пшеницы все чаще привлекаются другие виды рода *Triticum* (Jaradat, 2013; Liu et al., 2019; Orlovskaya et al., 2020).

Дикорастущая тетраплоидная пшеница, или дикая полба *T. dicoccoides* Schwein f. (BBAA,  $2n = 28$ ), появилась в результате спонтанной гибридизации между диплоидными видами *T. urartu* Thum. (AA,  $2n = 14$ ) и родственным современному *Aegilops speltoides* Tausch. (SS,  $2n = 14$ ) (Dvorak et al., 1993; Peng et al., 2011). Предполагается, что дикая полба участвовала в формировании культурной полбы *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. (BBAA,  $2n = 28$ ). Образование мягкой пшеницы произошло в результате естественной гибридизации тетраплоидного вида из рода *Triticum* (BBAA) и диплоидного вида *Ae. tauschii* Coss., донора генома D (Petersen et al., 2006).

Дикая и культурная полбы представляют значительный интерес для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы. Известно, что многие образцы *T. dicoccoides* приспособлены к произрастанию в неблагоприятных экологических условиях (Peleg et al., 2005; Nevo, Chen, 2010), характеризуются высоким содержанием белка и микроэлементов в зерне (Cakmak et al., 2004; Uauy et al., 2006; Wang Z. et al., 2018). В геноме *T. dicoccum* и *T. dicoccoides* идентифицировано более 20 генов и локусов количественных признаков (Quantitative Trait Loci – QTLs), определяющих устойчивость к мучнистой росе, бурой и желтой ржавчинам и фузариозу (Peng et al., 2000; Xie, Nevo, 2008). Интерес к дикой и культурной полбам также обусловлен филогенетическим родством с мягкой пшеницей. Однако, несмотря на близость геномов полбы к геномам A и B мягкой пшеницы, перенос генетического материала в культурные сорта может сопровождаться интрогрессией генетического материала, негативно влияющей на хозяйственно важные признаки.

Для хромосомной идентификации чужеродного хроматина в геноме мягкой пшеницы применяются цитологические и молекулярные методы. Один из них – дифферен-

циальное окрашивание митотических хромосом (С-бэндинг), позволяющее на основе сопоставления рисунков С-бэндинга у гибридов и исходных родительских форм выявлять структурные преобразования кариотипа, свидетельствующие об интрогрессии чужеродного хроматина. Однако многие геномы злаков содержат незначительное количество гетерохроматина, а близкородственные виды часто имеют сходный рисунок С-окрашивания, что ограничивает применение данного метода (Surzhikov et al., 2007; Дедкова и др., 2009).

Для обнаружения структурных изменений в малогетерохроматиновых геномах и выявления коротких интрогрессированных фрагментов эффективны молекулярные маркеры, среди которых наиболее широко применяются маркеры SSR и SNP (Zhou et al., 2013; Jorgensen et al., 2017). На сегодняшний день на основе разработанных маркеров SSR и SNP, специфичных для геномов A, B и D *T. aestivum*, созданы молекулярно-генетические карты хромосом гексаплоидной пшеницы и дикой полбы (Röder et al., 1998; Pestsova et al., 2000; Wang S. et al., 2014; Maccaferri et al., 2015), использование которых повышает эффективность мониторинга чужеродных интрогрессий.

Ранее нами были изучены характер чужеродных замещений и транслокаций и процесс стабилизации гибридных линий, полученных от скрещивания мягкой пшеницы с *T. kiharae* (A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>GGDD,  $2n = 42$ ) (Orlovskaya et al., 2020). Показано, что интрогрессия генетического материала *T. kiharae* происходит в виде целых хромосом или больших фрагментов (центрических и терминальных транслокаций). Целью настоящей работы были анализ характера чужеродных интрогрессий у гибридных линий от скрещивания сортов мягкой пшеницы с образцами тетраплоидных видов *T. dicoccum* и *T. dicoccoides* и оценка их влияния на цитологическую стабильность интрогрессивных линий.

## Материалы и методы

В работе использовано девять интрогрессивных линий F<sub>10</sub>, полученных в Институте генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси от скрещивания сортов мягкой пшеницы Рассвет, Фестивальная и Pitic S62 с образцами полб из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР) *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccoides* (информация о происхождении образца не сохранилась) и *T. dicoccum* к-45926. Линии 29 (Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199), 11-1, 13-3, 15-7-2 и 16-5 (*T. dicoccoides* × Фестивальная), 206-2-2 и 213-1-2 (Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926) и 1-3 и 2-7 (Фестивальная × *T. dicoccum* к-45926) созданы в результате самоопыления гибридов F<sub>1</sub> и последующих поколений и

отобраны для молекулярно-цитогенетических исследований на основании оценки наследования морфологических признаков и продуктивности в поколениях F<sub>1</sub>–F<sub>9</sub>.

Приготовление цитологических препаратов и процедуру дифференциального окрашивания хромосом (С-бэндинг) проводили согласно методике (Badaeva et al., 1994). Идентификацию индивидуальных хромосом геномов А, В, D осуществляли в соответствии с обобщенной видовой идиограммой дифференциально окрашенных хромосом (Badaeva et al., 1990). Окрашенные препараты анализировали с использованием микроскопа Amplival (Carl Zeiss, Yena, Германия) с объективом Апохромат 100х апертура 1.32 МИ. Отобранные метафазные пластинки фотографировали с помощью цифровой видеокамеры LeicaDC 300. Полученные изображения обрабатывали с применением графического редактора Adobe Photoshop CC 2017.

Геномную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков, как описано в работе Е.С. Сколотневой с коллегами (2017). Генотипирование маркерами SNP проводили с помощью технологии Illumina Infinium 20K (компания TraitGenetics, Германия, <http://www.traitgenetics.com>). Маркеры SSR (WMC, GWM, GDM) были использованы для уточнения хромосомной локализации и протяженности фрагментов интрогрессии. Условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для маркеров SSR описаны в работе М.С. Röder с коллегами (1998). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ABI GeneScan (версия 2.1). Предполагаемую хромосомную локализацию определяли на основании консенсусных карт хромосом пшеницы для маркеров SSR и SNP (Somers et al., 2004; Wang S. et al., 2014).

Микроспорогенез изучали на временных давленных препаратах. Колосья срезали перед выходом из листового влагалища и фиксировали в этанол-уксусной смеси (3:1). Через сутки после фиксации материал переносили в 70 % этиловый спирт и хранили при температуре +2–4 °С. В качестве красителя использовали ацетоорсеин (2 %). Для каждой комбинации скрещивания и исходных форм

анализировали по 30 пластинок метафазы I и 50–100 пластинок следующих стадий мейоза (анафазы I и II, метафазы II, тетрады). Слайды анализировали на микроскопе Amplival (Carl Zeiss) с апохроматной линзой, 100-кратной апертурой 1.32 МИ.

Статистический анализ выполняли с помощью программ STATISTICA v. 10 (<http://statsoft.ru/>) и MS Excel 2010.

## Результаты

### С-бэндинг

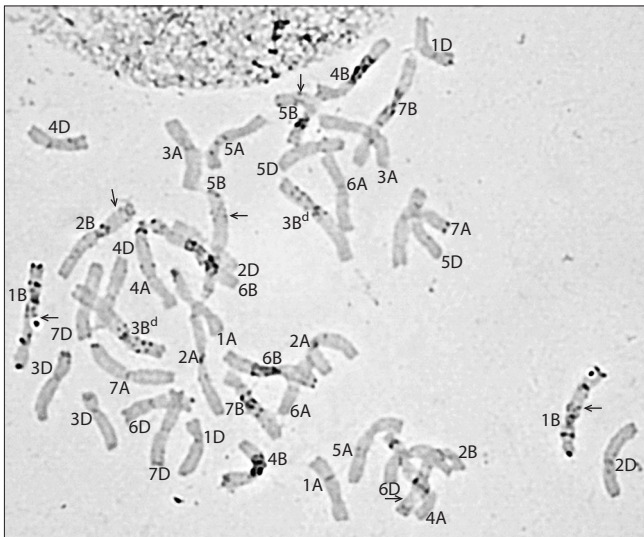
Проведено кариотипирование пяти гибридных линий, полученных с участием сортов мягкой пшеницы, и двух образцов дикой полбы *T. dicoccoides*. Из них две линии (11-1 и 13-3) были тетраплоидными ( $2n = 4x = 28$ ), остальные три стабилизировались на гексаплоидном уровне пloidности ( $2n = 6x = 42$ ).

Оба образца *T. dicoccoides*, использованные в скрещиваниях, имели практически идентичный рисунок С-бэндинга, в то время как между сортами наблюдались различия по степени выраженности и наличию/отсутствию ряда теломерных и интеркалярных блоков гетерохроматина, что обеспечивало индивидуальность их кариотипов. При этом большинство различий было выявлено в богатом гетерохроматином геноме В. В геноме А полиморфизм по рисунку С-бэндинга между родительскими формами отмечен лишь у двух хромосом, 4А и 6А, и только в комбинации скрещивания *T. dicoccoides* × Фестивальная: у хромосомы 4А *T. dicoccoides* в длинном плече присутствует крупный теломерный блок гетерохроматина, в то время как у сорта Фестивальная более выражен субтеломерный блок, а хромосома 6А *T. dicoccoides* отличается наличием яркого интеркалярного блока в проксимальном районе длинного плеча. Сопоставление полученных рисунков дифференциального окрашивания хромосом у гибридных линий пшеницы и соответствующих родительских форм позволило идентифицировать наличие интрогрессий генетического материала *T. dicoccoides* у всех пяти линий (табл. 1).

У линии 29 свойственное дикой полбе распределение блоков гетерохроматина отмечено в проксимальном райо-

**Таблица 1.** Хромосомная локализация генетического материала полб у интрогрессивных линий пшеницы по данным С-бэндинга и результатам генотипирования с помощью маркеров SSR и SNP

Комбинация скрещивания	Линия	С-бэндинг	Маркеры SSR и SNP
Рассвет × <i>T. dicoccoides</i> κ-5199	29	1BL, 2BS, 3B, 5BL	1BL, 2BS, 3B, 5B, 6AL
<i>T. dicoccoides</i> × Фестивальная	11-1	1B, 2BL, 3BS, 4AL, 5BL	1AL, 1BL, 2BL, 4AL, 4B, 5BL, 6AL, 6BL, 7A, 7B
	13-3	2BL, 3B, 4AL, 6AL, 6BS, 7BS	1A, 1BL, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5BS, 6AL, 6B, 7A, 7B
	15-7-2	2BL, 3BL, 5BL	1AL, 1BL, 2B, 3A, 3BL, 4AL, 4B, 5AL, 5BL, 6BL, 7AL, 7BL
	16-5	2BL, 3BL, 5BL, 6BS	1A, 1B, 2B, 3A, 3BL, 4AL, 4B, 5BL, 6AL, 6B, 7A, 7B
Pitic S62 × <i>T. dicocum</i> κ-45926	206-2-2	1BL, 7A, 7BL	1AL, 1BL, 2AL, 2B, 3AL, 3BL, 4AL, 4BL, 5AL, 5BL, 6AL, 6BS, 7A, 7BL
	213-1-2	2BL	1BL, 2AL, 2BL, 3AL, 3BL, 4AL, 5AL, 5BL, 6A, 7AL, 7BL
<i>T. dicocum</i> κ-45926 × Фестивальная	1-3	1AL, 1BS, 2AL, 6BL	1AL, 1BS, 2AL, 2B, 3AS, 3BL, 4AS, 5AL, 5BL, 6AS, 6BL, 7AS, 7B
	2-7	1BS, 2AS, 3B, 4AL, 6BL, 7BL	1AS, 1BS, 2AS, 2BL, 3A, 3B, 4AL, 5A, 5BL, 6AS, 6BL, 7AS, 7BL



**Рис. 1.** Кариотип интродуктивной линии 29 (Рассвет  $\times$  *T. dicoccoides* к-5199).

Здесь и на рис. 2: места локализации фрагментов дикой полбы указаны стрелками.

не длинного плеча хромосомы 1В и в дистальных районах короткого плеча хромосомы 2В и длинного плеча 5В (рис. 1).

Определить размер включенных в геном сорта Рассвет фрагментов генома *T. dicoccoides* не представлялось возможным вследствие идентичности рисунков С-бэндинга родительских форм в прилежащих районах хромосом. В связи с этим на рис. 1 и на всех следующих рисунках с изображением кариотипов исследованных линий стрелками отмечены лишь места локализации чужеродных фрагментов. Изменения в рисунке С-бэндинга выявлены также у хромосомы 3В, причем как в длинном, так и в коротком плечах, что дало основание предположить, что в данном случае произошла интродукция целой хромосомы *T. dicoccoides*. Что касается хромосомы 4В, то у всех родительских форм она имела идентичный рисунок дифференциального окрашивания. Это не позволило засвидетельствовать возможный факт обмена генетическим материалом между гомеологами пшеницы и *T. dicoccoides* ни в одной из гибридных линий.

В кариотипе линии 11-1 рисунок С-бэндинга, типичный для *T. dicoccoides*, наблюдался в дистальном районе длинного плеча хромосомы 4А, а также в центральных районах короткого плеча 3В и длинных плеч хромосом 2В и 5В (рис. 2, а). Учитывая тот факт, что гомеологи 4А как дикой полбы, так и сорта Фестивальная различаются лишь по рисунку С-бэндинга дистального района длинного плеча, нельзя однозначно сказать, – произошла в данном случае интродукция целой хромосомы полбы или длинного плеча, или лишь его дистального фрагмента. В то же время хромосома 1В, судя по распределению блоков гетерохроматина в обоих плечах, принадлежит *T. dicoccoides*. В остальных случаях более вероятно включение, скорее всего целиком, в кариотип сорта фрагментов хроматина полбы.

В кариотипе линии 13-3 (см. рис. 2, б) выявлены изменения рисунка С-бэндинга в дистальном районе длинного плеча хромосомы 4А, аналогичные изменениям у линии 11-1. Кроме того, у хромосомы 6А отмечено наличие типичного для *T. dicoccoides* яркого интеркалярного блока в проксимальном районе длинного плеча. У хромосом генома В интродукции фрагментов хроматина *T. dicoccoides* идентифицированы в 2ВЛ (предположительно, целое плечо принадлежит дикой полбе), дистальном районе 6ВS и проксимальном районе 7ВS. Хромосома 3В, судя по рисунку С-бэндинга, целиком принадлежит дикой полбе. Особо следует отметить тот факт, что растения этой линии содержат гетероморфную пару хромосом 6В, в которой только один из гомологов характеризуется изменением рисунка С-бэндинга в дистальном районе короткого плеча. При этом неясен размер интродуцированного фрагмента полбы, поскольку, как и в случае с хромосомой 4А, полиморфизм в распределении блоков гетерохроматина у гомеологов 6В отмечен только в вышеуказанном районе.

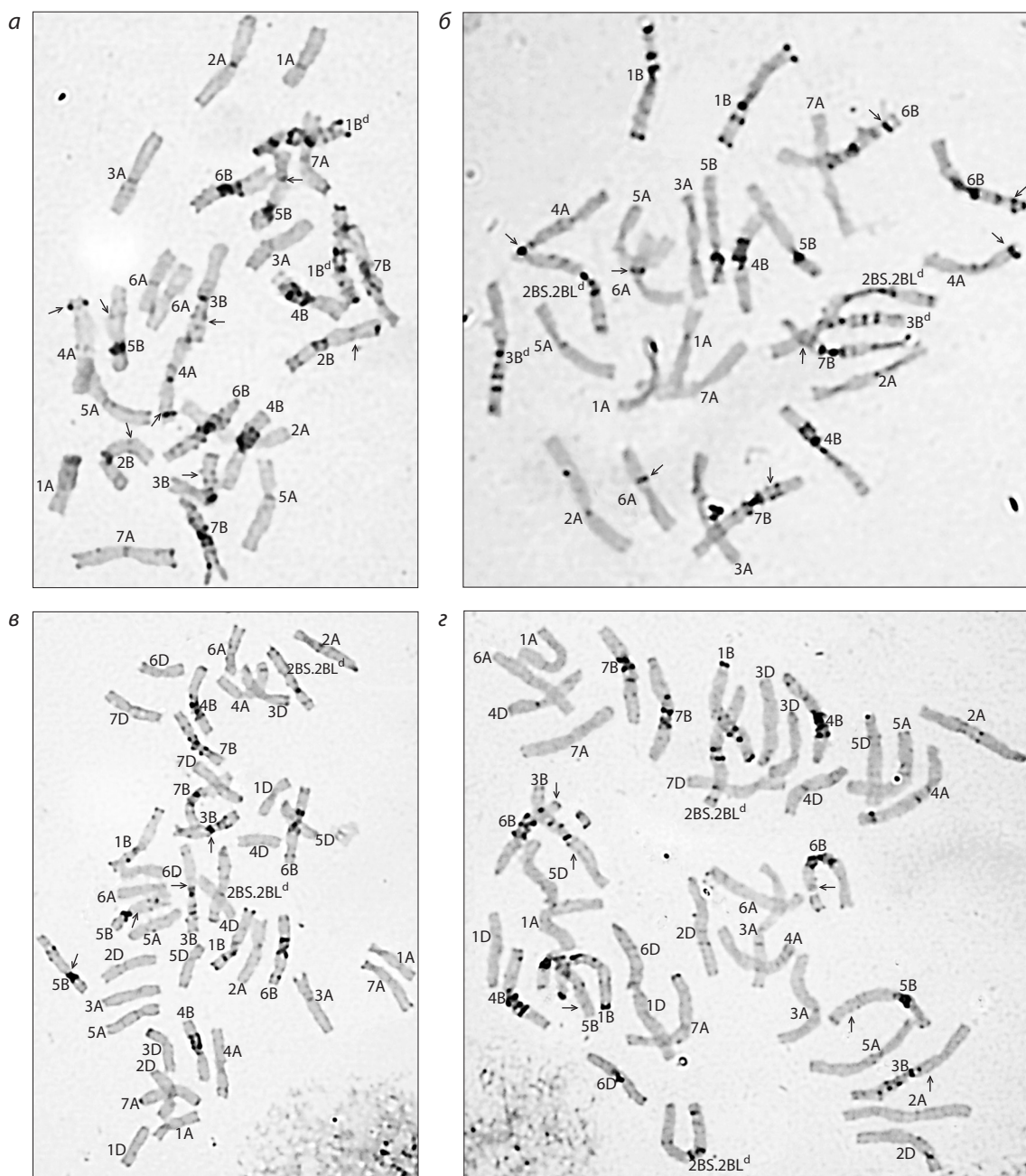
Для линии 15-7-2 установлена интродукция в кариотип генетического материала *T. dicoccoides* в виде длинного плеча хромосомы 2В, а также фрагментов проксимальных районов длинных плеч хромосом 3В и 5В (см. рис. 2, в).

Аналогичный набор рекомбинантных хромосом (2В, 3В и 5В) выявлен у линии 16-5 с той лишь разницей, что хромосома 5В содержала фрагмент хроматина полбы не проксимального, а дистального района длинного плеча. Помимо этого, фрагмент хроматина *T. dicoccoides* идентифицирован в дистальном районе короткого плеча хромосомы 6В (см. рис. 2, г).

Следует отметить, что интродукция генетического материала *T. dicoccoides* в геном мягкой пшеницы была в строгом соответствии с гомологией хромосом, причем в ходе стабилизации кариотипов гибридных форм в каждой гомеологической группе произошел подбор идентичных вариантов возникших рекомбинантных хромосом, вследствие чего все интродуцированные фрагменты генома полбы присутствуют в дисомном состоянии (единственное исключение – ситуация с хромосомой 6В у линии 13-3). Каких-либо обменов хроматином между негемологичными хромосомами в изученном материале не обнаружено.

Исследование характера интродукций в геном мягкой пшеницы генетического материала культурной полбы проводили на материале четырех гибридных линий, полученных при участии сортов пшеницы Фестивальная и Pitic S62 и образца *T. dicoccum* к-45926. Анализ кариотипа данного образца полбы показал наличие транслокации 7АL-5ВS.5ВL, возникшей в результате переноса фрагмента длинного плеча хромосомы 7А в дистальный район короткого плеча хромосомы 5В. Вторым продуктом таких структурных преобразований является хромосома 7А с делецией дистального фрагмента длинного плеча. Согласно литературным данным, оба типа aberrантных хромосом широко распространены среди образцов *T. dicoccum*, произрастающих в странах Средиземноморья и Западной Европы (Дедкова и др., 2007). Аналогичные структурные перестройки хромосом отмечены также в некоторых генотипах *T. dicoccoides* (Badaeva et al., 2007).

При сравнении полученных рисунков дифференциального окрашивания хромосом у гибридных линий пшеницы



**Рис. 2.** Кариотипы интрогрессивных линий пшеницы комбинации *T. dicoccoides* × Фестивальная. Линии: а – 11-1; б – 13-3; в – 15-7-2; 2 – 16-5.

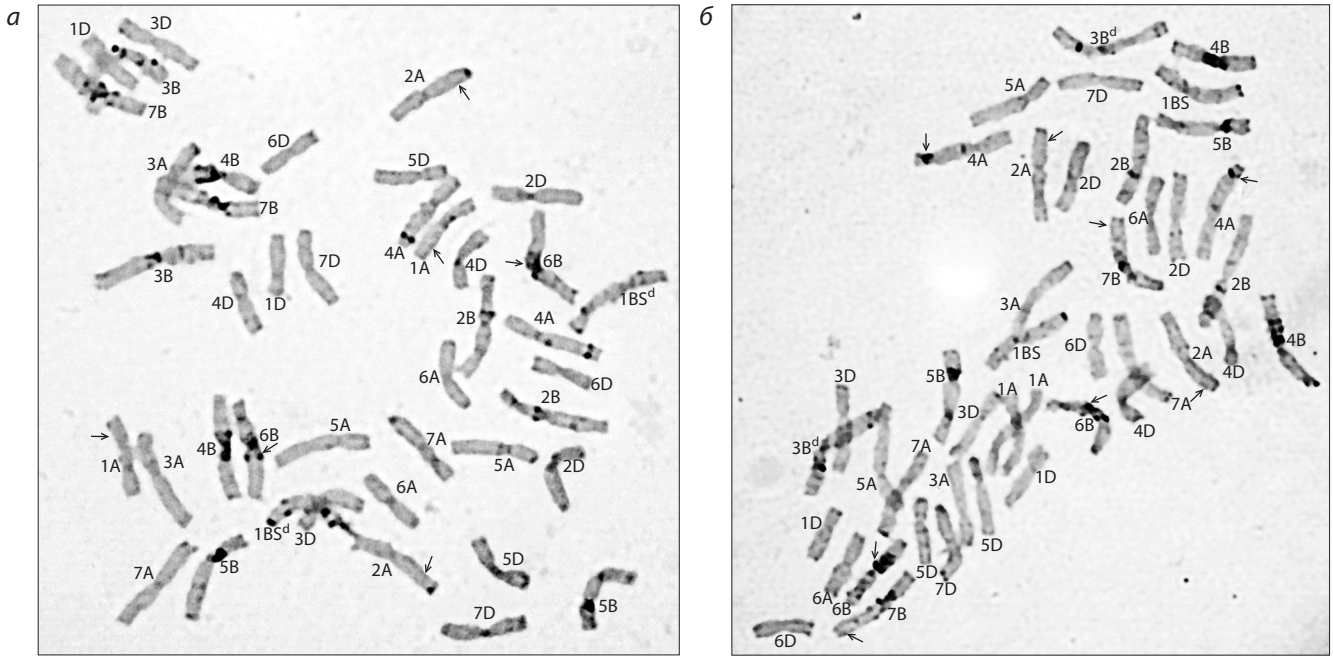
Целые плечи *T. dicoccoides* обозначены надстрочной буквой "d".

и родительских форм наличие интрогрессий генетического материала *T. dicoccum* было установлено у всех исследованных линий (см. табл. 1). В кариотипе линии 1-3 из комбинации скрещивания *T. dicoccum* × Фестивальная рисунок С-бэндинга, типичный для *T. dicoccum*, наблюдался в дистальных районах длинных плеч хромосом 1А, 2А и 6В, при этом размер интрогрессированных фрагментов был приблизительно равен половине плеча. Для хромосомы 1В идентифицировано включение целого короткого плеча полбы (рис. 3, а).

Для второй линии из этой же комбинации скрещивания характерно большее количество интродуцированно-

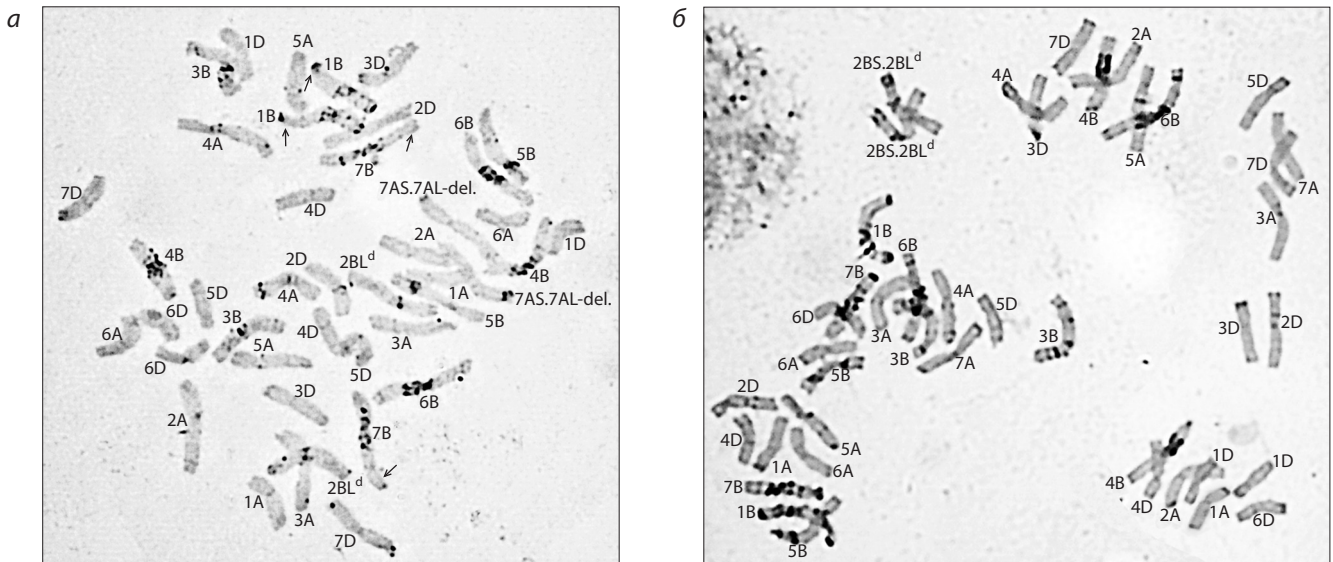
го хроматина полбы: в кариотипах всех растений полбе принадлежали хромосома 3В, короткое плечо хромосомы 1В, небольшие фрагменты длинных плеч вблизи теломер хромосом 6В и 7В, дистальный район короткого плеча хромосомы 2А, а также дистальный район длинного плеча хромосомы 4А (см. рис. 3, б).

В кариотипе линии 206-2-2 из комбинации скрещивания Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926 присутствовала характерная для исходного образца полбы хромосома 7А с делецией дистального фрагмента длинного плеча. Сходство рисунков С-бэндинга в коротких плечах этой хромосомы у исходного сорта и полбы не позволяет сделать одно-



**Рис. 3.** Кариотипы интрогрессивных линий пшеницы комбинации *T. dicoccum* к-45926 × Фестивальная: а – линия 1-3; б – линия 2-7.

Здесь и на рис. 4: интродуцированные хромосомы и целые плечи *T. dicoccum* к-45926 обозначены надстрочной буквой "d". Места локализации фрагментов культурной полбы указаны стрелками.



**Рис. 4.** Кариотипы интрогрессивных линий пшеницы комбинации Pitic S62 × *T. dicoccum* к-45926: а – линия 206-2-2; б – линия 213-1-2.

значный вывод, является ли эта хромосома рекомбинантной или полностью принадлежит полбе. Помимо этого, рисунок С-бэндинга, типичный для *T. dicoccum* к-45926, отмечен в дистальных районах хромосом 1BL и 7BL (рис. 4, а). Наименьшее количество интродуцированного в геном пшеницы генетического материала *T. dicoccum* к-45926 (хромосома 2BL) было найдено у линии 213-1-2 (см. рис. 4, б). Как и в случае с интрогрессией генетического материала дикой полбы, все интродуцированные фрагменты генома культурной полбы присутствуют в кариотипах гибридных линий в дисомном состоянии.

#### Молекулярный анализ

Количество маркеров SNP, использованных для анализа хромосом геномов А, В или D, значительно различалось, при этом наименьшее число их было отмечено для хромосом 4-й гомеологической группы (Приложение 1)<sup>1</sup>. Более 50 % маркеров геномов А и В выявляли полиморфизм между *T. dicoccum*, *T. dicoccoides* и родительскими сортами мягкой пшеницы. Отмечен также высокий уровень амплификации маркеров генома D у образцов *T. dicoccum*

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx20.pdf>

и *T. dicoccoides*. Однако установить их хромосомную локализацию в геноме дикорастущей и культурной полбы на данный момент не представляется возможным.

Несмотря на высокое покрытие хромосом маркерами SNP, в дистальных районах некоторых хромосом (1AS, 1AL, 2BS, 3BL, 4AS, 4BL, 6AL, 7AS) число полиморфных маркеров оказалось недостаточным для определения полноты замещения и длин фрагментов. Для корректировки протяженности интрогрессированных фрагментов были использованы маркеры SSR. Анализ полиморфизма маркеров SSR свидетельствует о том, что практически все использованные маркеры были полиморфными, при этом у тетраплоидных видов отсутствовали фрагменты амплификации, специфичные для генома D (см. Приложение 1). Высокий уровень полиморфизма маркеров SSR отмечается в большинстве работ по изучению генетического разнообразия сортов и гибридных форм злаковых культур (Jassi et al., 2021; Pour-Aboughadareh et al., 2022). По данным многих исследователей, амплификация маркеров SSR, специфичных для генома D, у чужеродных видов составляет 10–15 % (Salina et al., 2006; El-Rawy, Hassan, 2021).

Генотипирование интрогрессивных линий пшеницы и исходных родительских форм свидетельствует о том, что у всех изученных линий произошли рекомбинационные события с участием хромосом сородичей пшеницы, при этом частота замещений и транслокаций и длина интрогрессированных фрагментов зависят от гибридной комбинации и от направления скрещивания (см. табл. 1; Приложение 2). Сравнение спектров амплификации маркеров SNP и SSR показало наличие генетического материала дикой полбы в большинстве хромосом мягкой пшеницы, за исключением линии 29 (Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199). В геноме этой линии выявлено только пять фрагментов, причем их локализация совпадает с данными цитологического анализа. Можно предположить, что это связано с направлением скрещивания, так как в данном случае сорт пшеницы выступал в качестве материнского компонента, в отличие от линий комбинации *T. dicoccoides* × Фестивальная, где мягкая пшеница была опылителем.

Две линии комбинации *T. dicoccoides* × Фестивальная (11-1 и 13-3) стабилизировались на тетраплоидном уровне плоидности, однако характер рекомбинационных событий этих линий отличался. Фрагменты интрогрессии у линии 13-3, как правило, более протяженные, чем у линии 11-1. У линии 11-1, по данным молекулярного анализа, предполагается полное замещение длинных плеч хромосом 1B, 4A, 5B, 6A и 7A, в остальных случаях вставки чужеродного хроматина были незначительного размера (см. Приложение 2). У линий 15-7-2 и 16-5 чужеродный хроматин не обнаружен в хромосомах 6A и 5A соответственно, также обе линии не имеют интрогрессий в хромосоме 2A.

Что касается рекомбинационных событий в геноме A, то у линии 16-5 значительная часть хромосомы 7A замещена на хромосому *T. dicoccoides*, плечи 3AS и 4AL – также от дикой полбы, в остальных хромосомах генома A участки *T. dicoccoides* небольшой протяженности, как правило, в длинных плечах. У линии 15-7-2 в геноме A фрагменты интрогрессии небольшого размера встречались только

в длинных плечах хромосом, за исключением хромосомы 3A (см. Приложение 2).

У линии 206-2-2 (*Pitic* S62 × *T. dicocum* к-45926) генетический материал культурной полбы обнаружен во всех хромосомах геномом A и B, а у линии 213-1-2 не обнаружены интрогрессии в хромосомах 1A, 4B и 6B. Рекомбинационные события у линий данной комбинации скрещивания имели схожий характер (см. Приложение 2). Для линий 1-3 и 2-7 (*T. dicocum* к-45926 × Фестивальная) молекулярный анализ не выявил присутствия чужеродного генетического материала в хромосоме 4B, при этом в хромосомах 1A, 2A, 2B, 3B, 4A и 7B фрагменты культурной полбы локализованы в разных плечах (см. Приложение 2).

### Микроспорогенез

Анализ поведения хромосом на стадии метафазы I показал, что у всех интрогрессивных линий количество хромосом, образующих биваленты, превышало 90 % и у большинства приближалось к 100 % (табл. 2). Наиболее высокий уровень спаривания хромосом (100 %) отмечен у линии 16-5. Только одна клетка с двумя унивалентами из всех изученных материнских клеток пыльцы (МКП) обнаружена у линий 29 и 1-3, единичные клетки с двумя унивалентами встречались у линий 13-3, 15-7-2, 213-1-2, 2-7. У линии 11-1 было 73.3 % клеток с нарушениями от числа проанализированных МКП, и число унивалентов в них варьировало от двух (33.3 %) до шести (10.0 %). Следует отметить, что для линии 11-1 характерно также самое высокое число открытых бивалентов среди изученных генотипов, что говорит об ослаблении спаривания хромосом (см. табл. 2). Последующие стадии мейоза протекали с незначительными нарушениями, что привело к формированию нормальных тетрад на заключительной стадии (табл. 3).

Исключением была линия 11-1, мейотический индекс которой составил только 53.65 %, что согласуется с данными, полученными при анализе поведения хромосом на стадии метафазы I. Именно для этой линии характерен самый низкий уровень синапсиса среди линий с чужеродными интрогрессиями (см. табл. 2). Линии, имеющие высокий показатель хромосомных ассоциаций на ранних стадиях мейоза, как правило, имели более высокое значение мейотического индекса (83.0–99.0 %).

На завершающей стадии мейоза наряду с нормальными тетрадами образуются и аномальные – с микроядрами различного размера, количество которых варьировало от 1 до 6, однако чаще всего образовывались тетрады с 1–2 микроядрами. Примечательно, что спектр нарушений у более стабильных линий был значительно меньше (см. табл. 3). Например, у линии 2-7 с высоким мейотическим индексом обнаружена только одна клетка с одним микроядром. Материнские клетки пыльцы, содержащие шесть микроядер, отмечены только для наименее стабильных линий 11-1 и 206-2-2, причем частота их встречаемости была очень низкой (0.91–2.0 % от общего числа проанализированных клеток). У линии 13-3 наблюдали единичные триады и пентады. Количество клеток с такими нарушениями составило всего 1.11 %. Появление триад часто объясняют наличием на стадии метафазы I или метафазы II автономного веретена, отсутствием кинетохорных

**Таблица 2.** Средние частоты различных хромосомных ассоциаций в метафазе I мейоза у интрогрессивных линий пшеницы и родительских форм

Генотип	Линия	Биваленты, шт.			Количество хромосом в бивалентах, %	Униваленты, шт.
		закрытые	открытые	Всего		
Рассвет × <i>T. dicoccoides</i> к-5199	29	19.23 ± 0.22	1.73 ± 0.22	20.96 ± 0.03	99.76	0.07 ± 0.06
<i>T. dicoccoides</i> × Фестивальная	11-1	7.37 ± 0.33	5.30 ± 0.26	12.67 ± 0.23	90.48	2.47 ± 0.35
	13-3	12.23 ± 0.26	1.67 ± 0.24	13.90 ± 0.06	99.29	0.20 ± 0.11
	15-7-2	19.50 ± 0.22	1.23 ± 0.21	20.73 ± 0.08	98.7	0.53 ± 0.16
	16-5	19.67 ± 0.19	1.33 ± 0.20	21.00 ± 0	100	0
Pitic S62 × <i>T. dicoccum</i> к-45926	206-2-2	18.30 ± 0.28	2.40 ± 0.28	20.70 ± 0.1	98.57	0.60 ± 0.2
	213-1-2	19.27 ± 0.26	1.60 ± 0.24	20.87 ± 0.08	99.37	0.27 ± 0.16
<i>T. dicoccum</i> к-45926 × Фестивальная	1-3	19.50 ± 0.18	1.47 ± 0.18	20.97 ± 0.03	99.84	0.07 ± 0.06
	2-7	19.50 ± 0.23	1.43 ± 0.22	20.93 ± 0.05	99.68	0.13 ± 0.09
Pitic S62		19.80 ± 0.19	1.17 ± 0.19	20.97 ± 0.03	99.84	0.07 ± 0.06
Рассвет		20.03 ± 0.16	0.97 ± 0.16	21.00 ± 0	100.0	0
Фестивальная		19.50 ± 0.21	1.43 ± 0.21	20.97 ± 0.03	99.76	0.06 ± 0.06
<i>T. dicoccum</i> к-45926		12.97 ± 0.24	0.97 ± 0.24	13.97 ± 0.03	99.76	0.07 ± 0.06
<i>T. dicoccoides</i>		12.63 ± 0.18	1.30 ± 0.18	13.93 ± 0.07	99.52	0.07 ± 0.06
<i>T. dicoccoides</i> к-5199		12.20 ± 0.49	1.50 ± 0.43	13.70 ± 0.21	97.86	0.60 ± 0.43

**Таблица 3.** Характеристика стадий мейоза у интрогрессивных линий пшеницы и родительских форм

Генотип	Линия	Количество МКП без нарушений, %			Мейотический индекс, %
		Анафаза I	Метафаза II	Анафаза II	
Рассвет × <i>T. dicoccoides</i> к-5199	29	68.00	81.67	82.86	93.00
<i>T. dicoccoides</i> × Фестивальная	11-1	49.18	41.82	19.51	53.65
	13-3	80.0	74.55	80.0	92.33
	15-7-2	78.30	81.40	82.00	86.20
	16-5	85.00	88.57	85.00	89.09
Pitic S62 × <i>T. dicoccum</i> к-45926	206-2-2	62.9	77.14	88.57	83.0
	213-1-2	86.0	85.0	85.37	92.0
<i>T. dicoccum</i> к-45926 × Фестивальная	1-3	82.86	90.00	90.01	96.00
	2-7	83.33	86.25	82.86	99.00
Pitic S62		87.14	89.19	80.0	87.00
Рассвет		80.00	96.67	91.12	99.00
Фестивальная		82.50	90.91	88.32	84.55
<i>T. dicoccum</i> к-45926		91.25	92.50	95.00	97.50
<i>T. dicoccoides</i>		91.67	80.00	82.86	96.25
<i>T. dicoccoides</i> к-5199		82.35	81.67	85.00	95.71

фибрилл или аномальным преждевременным цитокинезом в профазе II (Соснихина и др., 2007).

Необходимо отметить, что достаточно высокий уровень синапсиса хромосом был установлен нами у растений поколений F<sub>2</sub>, полученных от скрещивания полб с сортами мягкой пшеницы (Орловская и др., 2010). Количество хромосом, входивших в биваленты, у этих гибридов было на уровне 90.9–99.3 %. В процесс спаривания, как правило, не вступали только хромосомы 4A и 4B. Несмотря на достаточно высокий уровень спаривания хромосом гибри-

дов F<sub>2</sub> в метафазе I, последующие стадии мейоза в этом поколении протекали со значительными нарушениями, вследствие чего процент нормальных тетрад (мейотический индекс, являющийся показателем нормального течения всего мейоза) был очень низким с вариацией от 8 до 20 %. Анализ микроспорогенеза показал, что к поколению F<sub>10</sub> произошла существенная стабилизация мейотического цикла, что обеспечивает формирование достаточного количества функциональных гамет для успешной репродукции созданного гибридного материала.



## Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте интрогрессии генетического материала полб в геном исследованных гибридных линий. Данные анализа маркерами SNP и SSR подтверждают результаты дифференциального окрашивания хромосом. Так, наиболее высокая частота включения генетического материала *T. dicoccum* и *T. dicoccoides* в геном мягкой пшеницы обнаружена для хромосом 1B, 2B и 3B по результатам как молекулярного анализа, так и С-бэндинга.

Как уже отмечено, идентификация интрогрессий в хромосомах генома А полб с помощью С-бэндинга затруднена из-за небольшого числа диагностических блоков и малого полиморфизма хромосом генома А. Кроме того, дикая и культурная полбы являются тетраплоидами ( $2n = 4x = 28$ ) с геномной структурой ВВАА, где оба генома гомеологичны соответствующим геномам *T. aestivum* ( $2n = 6x = 42$ ; геном ВВААDD). Вследствие этого данные виды имеют одинаковый рисунок геном-специфичных С-бэндов, а необходимые для мониторинга чужеродных интрогрессий различия могут касаться лишь полиморфных по размеру постоянных блоков гетерохроматина, а также непостоянных С-бэндов, варьирующих по их наличию/отсутствию и размерам. Это в значительной степени осложняет выявление фактов включения хроматина полб в геном мягкой пшеницы методом С-окрашивания. Поэтому для более точного описания хромосомных перестроек оптимально применение и молекулярных, и цитологических методов. Это продемонстрировано в работах по изучению гибридных форм от скрещивания различных видов пшеницы, ячменя и тритикале (Силкова и др., 2006; Mattera et al., 2015; Adonina et al., 2022).

Результаты маркерного анализа показывают, что уровень полиморфизма и информативность маркеров SNP ниже по сравнению с маркерами SSR (см. Приложение 1). Это подтверждается литературными данными, полученными на различных видах растений (Singh et al., 2013; Garcia et al., 2018; Tereba, Konecka, 2021). Однако снижение информативности компенсируется более высоким уровнем покрытия молекулярно-генетических карт хромосом маркерами SNP и низким уровнем нуль-аллелей при генотипировании отдаленных видов.

Можно отметить, что рекомбинационные события у линий, созданных с участием полбы, происходили значительно чаще в длинных плечах хромосом, что согласуется с данными, полученными при исследовании SNP-полиморфизма 445 рекомбинантных линий от скрещивания твердой пшеницы с образцом дикой полбы (Jorgensen et al., 2017).

Выявленная нами высокая частота интрогрессий генетического материала *T. dicoccum* и *T. dicoccoides* в геном *T. aestivum* – следствие схожести субгеномов мягкой пшеницы и полб. Исследования большой группы ученых по сравнительному анализу геномов А, В, D мягкой пшеницы и ее диплоидных и тетраплоидных сородичей показали высокую степень гомологии между соответствующими геномами родственных видов (Petersen et al., 2006; IWGSC, 2014). В то же время найдены и очевидные различия между видами рода *Triticum* в виде утраты генетического материала, образования новых генов, дупликаций, появив-

шихся в результате эволюционных процессов (IWGSC, 2014; Bariah et al., 2020). В некоторых исследованиях установлено замолкание или изменение функции генов (Ozkan et al., 2001; Kashkush et al., 2002; Feldman, Levy, 2012). При окультуривании дикой полбы обнаружены изменения как морфологических признаков, так и структуры генома. Например, размер генома культурной полбы несколько сократился по сравнению с диким Эммером (12.87 и 12.91 pg соответственно) (Eilam et al., 2008). Все это может привести к различиям нуклеотидной последовательности в гомологичных хромосомах *T. aestivum* и *T. dicoccoides* и повлиять на частоту рекомбинационных событий.

В нашем исследовании самый низкий уровень интрогрессии отмечен для хромосомы 2А; для двух линий из пяти не обнаружены перестройки в хромосомах 3А (см. табл. 1), что согласуется с литературными данными. Так, анализ нуклеотидного полиморфизма геномов А и В у *T. aestivum* и *T. dicoccoides* продемонстрировал значительные различия между хромосомами 2А этих родственных видов (Akhunov et al., 2010). Общий нуклеотидный полиморфизм для хромосомы 2А *T. aestivum* и *T. dicoccoides* составил 0.56 и 0.83 соответственно, а число гаплотипов на локус – 1.85 и 2.25 соответственно. Существенные различия также обнаружены между хромосомами 3А и 4А *T. aestivum* и *T. dicoccoides* по сравнению с остальными хромосомами. Сравнительный анализ субгеномов мягкой пшеницы и диплоидных, и тетраплоидных сородичей *T. aestivum* показал различия в последовательности генов на хромосомах 2А и 7В, что предполагает наличие небольших транслокаций или интрогрессий, произошедших в процессе эволюции (IWGSC, 2014).

Учитывая гомеологию геномов А и В *T. aestivum* с аналогичными геномами *T. dicoccoides* и *T. dicoccum*, следует ожидать достаточно высокого уровня спаривания хромосом в метафазе I мейоза гибридов F<sub>1</sub> с последующим образованием реципрокных обменов между участками гомологичных хромосом пшеницы и полб. Анализ стадии метафазы I выявил высокий уровень бивалентного спаривания хромосом у всех изученных интрогрессивных линий F<sub>10</sub> (см. табл. 2).

Известно, что в длинном плече хромосомы 5В находится локус *Ph1* – основной регулятор синапсиса хромосом, препятствующий спариванию гомеологов (Riley, Charman, 1958; Naranjo, 2012). Отсутствие активности данного локуса у диплоидных сородичей пшеницы говорит о его возникновении в результате структурных изменений хромосомы 5В после полиплоидизации (Charman, Riley, 1970). В настоящее время найден ген-кандидат (*C-Ph1*) локуса *Ph1*, подавление которого приводит к формированию мультивалентов (Bhullar et al., 2014). Обнаружены три гомеологичные копии *C-Ph1* на хромосомах 5А, 5В и 5D.

Нуклеотидная последовательность гомеологичных генов имеет сходство около 90 % и отличается, как правило, инсерциями и делециями, которые приводят к изменению в аминокислотной последовательности белка. Кроме того, установлены существенные различия в уровне экспрессии гомеологичных генов во время разных стадий мейотического цикла. Для *C-Ph1* на хромосоме 5В наибольший уровень активности отмечен во время мета-

фазы I, более низкий – во время анафазы I и отсутствие активности – на последующих стадиях. В хромосоме 5A *C-Ph1* экспрессируется только на стадиях анафазы I, диад и тетрад. Копия гена в 5D проявляет наивысшую активность только на ранних стадиях мейоза (стадии интерфазы и профазы) (Bhullar et al., 2014). В нашем исследовании у всех линий, за исключением линии 13-3, обнаружены структурные изменения в длинном плече хромосомы 5B, однако чаще всего эти преобразования не вызывают существенного ослабления синапсиса гомологов. Негативный эффект интрогрессии хроматина хромосомы 5B дикой полбы наиболее сильно выражен у линии 11-1, что, возможно, связано с протяженностью транслоцированного чужеродного фрагмента (см. Приложение 2).

Для линий, созданных с участием культурной полбы, отмечен более высокий мейотический индекс, чем для линий на основе дикорастущей полбы. Максимальный мейотический индекс выявлен для линий 2-7 и 1-3 (*T. dicoccum* к-45926 × Фестивальная) (см. табл. 3). Вероятно, это связано с более тесным сходством геномов А и В *T. aestivum* и *T. dicoccum*. Наибольшая стабильность среди линий с включением генетического материала дикорастущей полбы отмечена для линии 29 (93.0 %), уровень спаривания хромосом которой был одним из самых высоких (см. табл. 2). Линия 16-5 со 100 % количеством хромосом, входящих в биваленты, характеризовалась более низким значением по этому показателю (89.09 %). Данный факт можно объяснить различиями по числу интрогрессированных фрагментов у линий 29 и 16-5. Так, линия 29 содержит фрагменты чужеродного генома в 5 хромосомах, а линия 16-5 – в 12 хромосомах.

Корреляции между числом чужеродных фрагментов и степенью нарушения процесса мейоза продемонстрированы и в работах других исследователей, выполненных на межвидовых гибридах (Гордеева и др., 2009; Zeng et al., 2013). Кроме того, не следует исключать определенной доли влияния на цитологическую стабильность изученных линий генотипа исходного сорта пшеницы. Так, мейотический индекс сорта Рассвет (99.0 %) был выше, чем у сорта Фестивальная (84.55 %), а линия 29, созданная с участием более стабильного сорта, имела самый высокий процент нормальных тетрад среди интрогрессивных линий (см. табл. 3).

Линии с высоким мейотическим индексом, содержащие чужеродные фрагменты в хромосомах 1В, 2В, 3В, 5В и 6В, могут представлять интерес для расширения генофонда пшеницы. Согласно литературным данным, в хромосоме 6В дикой полбы обнаружен функциональный аллель гена *Grc-B1*, который ассоциирован с высоким содержанием белка и микроэлементов в зерне пшеницы (Uauy et al., 2006). У образцов дикой полбы гены, связанные с увеличенным содержанием общего белка в зерне, также найдены в хромосомах 2А, 5В и 7В (Ohm et al., 2010). В хромосомах 2В (Zhang et al., 2010) и 5В (Xue et al., 2012) дикой полбы картированы гены устойчивости к мучнистой росе, в 5В – локусы засухоустойчивости (Акрпнар et al., 2015). В настоящее время с использованием методов полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) выявлены генетические факторы, ассоциированные с накоплением белка и минералов в зерне дикой полбы (Liu et al., 2021; Gong et al., 2022).

## Заключение

Таким образом, результаты молекулярно-цитогенетического анализа интрогрессивных линий пшеницы свидетельствуют о том, что включение генетического материала дикой и культурной полбы, геномы которых гомологичны геномам мягкой пшеницы, осуществляется преимущественно в виде целых плеч или крупных фрагментов в хромосомах генома В и менее протяженных вставок в геноме А. При этом наибольшая частота интрогрессивных фрагментов генома полбы наблюдалась в хромосомах 1А, 1В, 2В, 3В интрогрессивных линий.

Использование методов кариотипирования в сочетании со скринингом гибридных линий молекулярными маркерами различного типа позволяет получить объемную информацию о хромосомных перестройках и размерах интрогрессированных фрагментов. Анализ заключительной стадии мейоза показал высокий уровень цитологической стабильности у преобладающего большинства интрогрессивных линий пшеницы. Следует отметить, что линии, характеризующиеся незначительным количеством аномалий на ранних стадиях микроспорогенеза, как правило, имели более высокое значение мейотического индекса. Интрогрессивные линии с нормальным течением мейоза будут использоваться в дальнейших исследованиях (идентификации генов, контролирующих устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам, высокое качество зерна и т. д.) с целью выявления перспективного материала для включения в селекционный процесс.

## Список литературы / References

- Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П., Салина Е.А., Будашкина Е.Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. *Генетика*. 2009; 45(12):1616-1626.
- [Gordeeva E.I., Leonova I.N., Kalinina N.P., Salina E.A., Budashkina E.B. Comparative cytological and molecular analysis of common wheat introgression lines containing genetic material of *Triticum timopheevii* Zhuk. *Russ. J. Genet.* 2009;45(12):1428-1437. DOI 10.1134/S1022795409120047.]
- Дедкова О.С., Бадаева Е.Д., Митрофанова О.П., Билинская Е.Н., Пухальский В.А. Исследование внутривидового разнообразия тетраплоидной пшеницы *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом. *Генетика*. 2007;43(11):1517-1533.
- [Dedkova O.S., Badaeva E.D., Mitrofanova O.P., Bilinskaya E.N., Pukhalskiy V.A. Analysis of intraspecific diversity of cultivated emmer *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. using C-banding technique. *Russ. J. Genet.* 2007;43(11):1271-1285. DOI 10.1134/S1022795407110105.]
- Дедкова О.С., Бадаева Е.Д., Амосова А.В., Мартынов С.П., Руанет В.В., Митрофанова О.П., Пухальский В.А. Разнообразие и происхождение европейской популяции *Triticum dicoccum* (Schank) Schuebl. на основании хромосомного анализа. *Генетика*. 2009;45(9):1234-1243.
- [Dedkova O.S., Badaeva E.D., Amosova A.V., Martynov S.P., Ruanet V.V., Mitrofanova O.P., Pukhalskiy V.A. Diversity and the origin of the European population of *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. as revealed by chromosome analysis. *Russ. J. Genet.* 2009; 45(9):1082-1091. DOI 10.1134/S1022795409090099.]
- Орловская О.А., Корень Л.В., Хотылева Л.В. Цитологическая характеристика гибридов пшеницы, созданных при отдаленной гибридизации в трибе *Triticeae*. *Изв. Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2010;4:50-54.

- [Orlovskaya O.A., Koren L.V., Khotyleva L.V. Cytological characteristic of wheat hybrids produced by remote hybridization of the *Triticeae* tribe. *Izvestiya Natsionalnoy Akademii Nauk Belarusi. Seriya Biologicheskikh Nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2010;4:50-54. (in Russian)]
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Родер М.С., Салина Е.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров. *Генетика*. 2006;42(6):793-802.
- [Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Roeder M.S., Salina E.A., Shchapova A.I., Shumny V.K. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet.* 2006;42(6):645-653. DOI 10.1134/S1022795406060093.]
- Сколотнева Е.С., Леонова И.Н., Букатич Е.Ю., Салина Е.А. Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307.
- [Skolotneva E.S., Leonova I.N., Bukatich E.Yu., Salina E.A. Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307. (in Russian)]
- Соснихина С.П., Михайлова Е.И., Тихолиз О.А., Цветкова Н.В., Ловцюс А.В., Сапронова О.С., Федотова Ю.С., Коломиец О.Л., Богданов Ю.Ф. Проявление и наследование дисинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синапса. *Генетика*. 2007;43(10):1424-1433.
- [Sosnikhina S.P., Mikhailova E.I., Tikholiz O.A., Tsvetkova N.V., Lovtsyus A.V., Sapronova O.S., Fedotova Yu.S., Kolomiets O.L., Bogdanov Yu.F. Expression and inheritance of a desynaptic phenotype with impaired homologous synapsis in rye. *Russ. J. Genet.* 2007;43(10):1193-1200. DOI 10.1134/S1022795407100146.]
- Adonina I.G., Shcherban A.B., Zorina M.V., Mehdiyeva S.P., Timonova E.M., Salina E.A. Genetic features of triticale-wheat hybrids with vaviloid-type spike branching. *Plants*. 2022;11(1):58. DOI 10.3390/plants11010058.
- Akhunov E.D., Akhunova A.R., Anderson O.D., Anderson J.A., Blake N., Clegg M.T., Coleman-Derr D., Conley E.J., Crossman C.C., Deal K.R., Dubcovsky J., Gill B.S., Gu Y.Q., Hadam J., Heo H., Huo N., Lazo G.R., Luo M.C., Ma Y.Q., Matthews D.E., McGuire P.E., Morrell P.L., Qualset C.O., Renfro J., Tabanao D., Talbert L.E., Tian C., Toleno D.M., Warburton M.L., You F.M., Zhang W., Dvorak J. Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes. *BMC Genomics*. 2010;11:702. DOI 10.1186/1471-2164-11-702.
- Akpinar B.A., Yuce M., Lucas S., Vrána J., Burešová V., Doležel J., Budak H. Molecular organization and comparative analysis of chromosome 5B of the wild wheat ancestor *Triticum dicoccoides*. *Sci. Rep.* 2015;5:10763. DOI 10.1038/srep10763.
- Badaeva E.D., Sozinova L.F., Badaev N.S., Muravenko O.V., Zelenin A.V. "Chromosomal passport" of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standardization of chromosomal analysis of cereals. *Cereal Res. Commun.* 1990;18(4):273-281.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192:117-145. DOI 10.1007/BF00985912.
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskiy V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*. 2007;50(10):907-926. DOI 10.1139/g07-072.
- Bariah I., Keidar-Friedman D., Kashkush K. Identification and characterization of large-scale genomic rearrangements during wheat evolution. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231323. DOI 10.1371/journal.pone.0231323.
- Bhullar R., Nagarajan R., Bennypaul H., Sidhu G.K., Sidhu G., Rustgi S., von Wettstein D., Gill K.S. Silencing of a metaphase I-specific gene results in a phenotype similar to that of the Pairing homeologous 1 (*Ph1*) gene mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(39):14187-14192. DOI 10.1073/pnas.1416241111.
- Budak H., Kantar M., Kurtoglu K.Y. Drought tolerance in modern and wild wheat. *Sci. World J.* 2013;2013:548246. DOI 10.1155/2013/548246.
- Cakmak I., Torun A., Millet E., Feldman M., Fahima T., Korol A., Nevo E., Braun H.I., Özkan H. *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2004;50(7):1047-1054. DOI 10.1080/00380768.2004.10408573.
- Chapman V., Riley R. Homoeologous meiotic chromosome pairing in *Triticum aestivum* in which chromosome 5B is replaced by an alien homoeologue. *Nature*. 1970;226(5243):376-377. DOI 10.1038/226376a0.
- Dvorak J., Terlizzi P., Zhang H.B., Resta P. The evolution of polyploidy wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*. 1993;36(1):21-31. DOI 10.1139/g93-004.
- Eilam T., Anikster Y., Millet E., Manisterski J., Feldman M. Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome*. 2008; 51(8):616-627. DOI 10.1139/G08-043.
- El-Rawy M.A., Hassan M.I. Assessment of genetic diversity in durum and bread wheat genotypes based on drought tolerance and SSR markers. *Plant Breed. Biotech.* 2021;9(2):89-103. DOI 10.9787/PBB.2021.9.2.89.
- Feldman M., Levy A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*. 2012;192(3):763-774. DOI 10.1534/genetics.112.146316.
- García C., Guichoux E., Hampe A. A comparative analysis between SNPs and SSRs to investigate genetic variation in a juniper species (*Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata*). *Tree Genet. Genomes*. 2018; 14:87. DOI 10.1007/s11295-018-1301-x.
- Gong F., Qi T., Zhang T., Lu Y., Liu J., Zhong X., He J., Li Y., Zheng Y., Liu D., Huang L., Wu B. Comparison of the agronomic, cytological, grain protein characteristics, as well as transcriptomic profile of two wheat lines derived from wild emmer. *Front. Genet.* 2022;12: 804481. DOI 10.3389/fgene.2021.804481.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 2014;345(6194):1251788. DOI 10.1126/science.1251788.
- Jaradat A.A. Wheat landraces: a mini review. *Emir. J. Food Agric.* 2013;25(1):20-29. DOI 10.9755/ejfa.v25i1.15376.
- Jlassi I., Bnejdi F., Saadoun M., Hajji A., Mansouri D., Ben-Attia M., El-Gazzah M., El-Bok S. SSR markers and seed quality traits revealed genetic diversity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Mol. Biol. Rep.* 2021;48(4):3185-3193. DOI 10.1007/s11033-021-06385-y.
- Jorgensen C., Luo M.-C., Ramasamy R., Dawson M., Gill B.S., Korol A.B., Distelfeld A., Dvorak J. A high-density genetic map of wild emmer wheat from the Karaca Dağ region provides new evidence on the structure and evolution of wheat chromosomes. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1798. DOI 10.3389/fpls.2017.01798.
- Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*. 2002; 160(4):1651-1659. DOI 10.1093/genetics/160.4.1651.
- Liu J., Huang L., Wang C., Liu Y., Yan Z., Wang Z., Xiang L., Zhong X., Gong F., Zheng Y., Liu D., Wu B. Genome-wide association study reveals novel genomic regions associated with high grain protein content in wheat lines derived from wild emmer wheat. *Front. Plant Sci.* 2019;10:464. DOI 10.3389/fpls.2019.00464.
- Liu J., Huang L., Li T., Liu Y., Yan Z., Tang G., Zheng Y., Liu D., Wu B. Genome-wide association study for grain micronutrient concentra-

- tions in wheat advanced lines derived from wild emmer. *Front. Plant Sci.* 2021;12:651283. DOI 10.3389/fpls.2021.651283.
- Maccaferri M., Ricci A., Salvi S., Milner S.G., Noli E., Martelli P.L., Casadio R., Akhunov E., Scalabrin S., Vendramin V., Ammar K., Blanco A., Desiderio F., Distelfeld A., Dubcovsky J., Fahima T., Faris J., Korol A., Massi A., Mastrangelo M.A., Morgante M., Pozniak C., N'Diaye A., Xu S., Tuberosa R. A high-density, SNP-based consensus map of tetraploid wheat as a bridge to integrate durum and bread wheat genomics and breeding. *Plant Biotechnol. J.* 2015; 13(5):648–663. DOI 10.1111/pbi.12288.
- Mattera M.G., Ávila C.M., Atienza S.G., Cabrera A. Cytological and molecular characterization of wheat-*Hordeum chilense* chromosome 7H<sup>th</sup> introgression lines. *Euphytica.* 2015;203:165–176. DOI 10.1007/s10681-014-1292-0.
- Naranjo T. Finding the correct pathner: the meiotic courtship. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:509073. DOI 10.6064/2012/509073.
- Nevo E., Chen G. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant Cell Environ.* 2010;33(4): 670–685. DOI 10.1111/j.1365-3040.2009.02107.x.
- Ohm J.B., Klindworth D.L., Hareland G.A., Faris J.D., Elias E.M., Xu S.S. Variation in kernel characteristics and protein molecular weight distribution of Langdon durum wild emmer wheat chromosome substitution lines. *J. Cereal Sci.* 2010;52(2):207–214. DOI 10.1016/j.jcs.2010.05.007.
- Orlovskaya O., Dubovets N., Solovey L., Leonova I. Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines derived from the cross of *Triticum aestivum* with *T. kiharae*. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1):201. DOI 10.1186/s12870-020-02407-2.
- Ozkan H., Levy A., Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell.* 2001;13(8):1735–1747. DOI 10.1105/TPC.010082.
- Peleg Z., Fahima T., Abbo S., Krugman T., Nevo E., Yakir D., Saranga Y. Genetic diversity for drought resistance in wild wheat and its ecogeographical association. *Plant Cell Environ.* 2005;28(2):176–191. DOI 10.1111/j.1365-3040.2005.01259.x.
- Peng J.H., Fahima T., Röder M.S., Huang Q.Y., Dahan A., Li Y.C., Grama A., Nevo E. High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Genetica.* 2000; 109(3):199–210. DOI 10.1023/a:1017573726512.
- Peng J.H., Sun D.H., Nevo D. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol. Breed.* 2011;28:281–301. DOI 10.1007/s11032-011-9608-4.
- Pestsova E., Ganal M.W., Röder M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome.* 2000;43(4):689–697. DOI 10.1139/gen-43-4-689.
- Petersen G., Seberg O., Yde M., Berthelsen K. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2006;39(1):70–82. DOI 10.1016/j.ympev.2006.01.023.
- Pour-Aboughadareh A., Pocza P., Etminan A., Jadidi O., Kianersi F., Shooshtari L. An analysis of genetic variability and population structure in wheat germplasm using microsatellite and gene-based markers. *Plants.* 2022;11(9):1205. DOI 10.3390/plants11091205.
- Riley R., Chapman V. Genetic control of cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. *Nature.* 1958;182:713–715. DOI 10.1038/182713a0.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998; 149(4):2007–2023. DOI 10.1093/genetics/149.4.2007.
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. *Funct. Integr. Genomics.* 2006;6(1):71–80. DOI 10.1007/s10142-005-0001-4.
- Singh N., Choudhury D.R., Singh A.K., Kumar S., Srinivasan K., Tyagi R.K., Singh N.K., Singh R. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. *PLoS One.* 2013;8(12):e84136. DOI 10.1371/journal.pone.0084136.
- Somers D.J., Isaac P., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(6):1105–1114. DOI 10.1007/s00122-004-1740-7.
- Surzhikov S.A., Knüpffer H., Kilian B. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome.* 2007;50(10):907–926. DOI 10.1139/G07-072.
- Tereba A., Konecka A. Comparison of microsatellites and SNP markers in genetic diversity level of two Scots pine stands. *Environ. Sci. Proc.* 2021;3(1):4. DOI 10.3390/IECF2020-07776.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science.* 2006;314(5803):1298–1301. DOI 10.1126/science.1133649.
- Wang S., Wong D., Forrest K., Allen A., Chao S., Huang B.E., Maccaferri M., ... Tuberosa R., Lawley C., Mikoulitch I., Cavanagh C., Edwards K.J., Hayden M., Akhunov E. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12(6):787–796. DOI 10.1111/pbi.12183.
- Wang Z., Huang L., Wu B., Hu J., Jiang Z., Hu J., Qi P., Zheng Y., Liu D. Characterization of an integrated active *Glu-1Aγ* allele in common wheat from wild emmer and its potential role in flour improvement. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(4):923. DOI 10.3390/ijms19040923.
- Xie W., Nevo E. Wild emmer: genetic resources, gene mapping and potential for wheat improvement. *Euphytica.* 2008;164:603–614. DOI 10.1007/s10681-008-9703-8.
- Xue F., Ji W., Wang C., Zhang H., Yang B. High-density mapping and marker development for the powdery mildew resistance gene *PmAS846* derived from wild emmer wheat (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(8):1549–1560. DOI 10.1007/s00122-012-1809-7.
- Zeng J., Cao W., Hucl P., Yang Y., Xue A., Chi D., Fedak G. Molecular cytogenetic analysis of wheat – *Elymus repens* introgression lines with resistance to Fusarium head blight. *Genome.* 2013;56(1):75–82. DOI 10.1139/gen-2012-0130.
- Zhang H., Guan H., Li J., Zhu J., Xie C., Zhou Y., Duan X., Yang T., Sun Q., Liu Z. Genetic and comparative genomics mapping reveals that a powdery mildew resistance gene *M3D232* originating from wild emmer co-segregates with an NBS-LRR analog in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(8):1613–1621. DOI 10.1007/s00122-010-1414-6.
- Zhou W., Jiang Y., Zhang W., Xu G., Rong J. Characterization of large chromosome segment introgressions from *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* into bread wheat with simple sequence repeat markers. *Crop Sci.* 2013;53(4):1555–1565. DOI 10.2135/cropsci2012.05.0287.

#### ORCID ID

O.A. Orlovskaya orcid.org/0000-0002-1187-1317  
I.N. Leonova orcid.org/0000-0002-6516-0545  
N.I. Dubovets orcid.org/0000-0002-5980-181X

**Благодарности.** Цитологический анализ интрогрессивных линий выполнен при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) (проект V18R-028). Анализ линий маркерами SSR и SNP проведен при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017 (ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.04.2023. После доработки 24.05.2023. Принята к публикации 26.05.2023.

# Genome-wide association study for charcoal rot resistance in soybean harvested in Kazakhstan

A. Zatybekov<sup>1</sup>, S. Abugalieva<sup>1</sup>, S. Didorenko<sup>2</sup>, A. Rsaliyev<sup>3</sup>, A. Maulenbay<sup>3</sup>, C. Fang<sup>4</sup>, Y. Turuspekov<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almalyk, Almaty Region, Kazakhstan

<sup>3</sup> Research Institute for Biological Safety Problems, Gvardeiskiy (Otar), Zhambyl Region, Kazakhstan

<sup>4</sup> School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, China

 yerlant@yahoo.com

**Abstract.** Charcoal rot (CR) caused by the fungal pathogen *Macrophomina phaseolina* is a devastating disease affecting soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) worldwide. Identifying the genetic factors associated with resistance to charcoal rot is crucial for developing disease-resistant soybean cultivars. In this research, we conducted a genome-wide association study (GWAS) using different models and genotypic data to unravel the genetic determinants underlying soybean resistance to charcoal rot. The study relied on a panel of 252 soybean accessions, comprising commercial cultivars and breeding lines, to capture genetic variations associated with resistance. The phenotypic evaluation was performed under natural conditions during the 2021–2022 period. Disease severity and survival rates were recorded to quantify the resistance levels in the accessions. Genotypic data consisted of two sets: the results of genotyping using the Illumina iSelect 6K SNP (single-nucleotide polymorphism) array and the results of whole-genome resequencing. The GWAS was conducted using four different models (MLM, MLM, FarmCPU, and BLINK) based on the GAPIT platform. As a result, SNP markers of 11 quantitative trait loci associated with CR resistance were identified. Candidate genes within the identified genomic regions were explored for their functional annotations and potential roles in plant defense responses. The findings from this study may further contribute to the development of molecular breeding strategies for enhancing CR resistance in soybean cultivars. Marker-assisted selection can be efficiently employed to accelerate the breeding process, enabling the development of cultivars with improved resistance to charcoal rot. Ultimately, deploying resistant cultivars may significantly reduce yield losses and enhance the sustainability of soybean production, benefiting farmers and ensuring a stable supply of this valuable crop.

Key words: soybean; charcoal rot; whole genome resequencing; GWAS; SNP; QTL.

**For citation:** Zatybekov A., Abugalieva S., Didorenko S., Rsaliyev A., Maulenbay A., Fang C., Turuspekov Y. Genome-wide association study for charcoal rot resistance in soybean harvested in Kazakhstan. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):565-571. DOI 10.18699/VJGB-23-68

# Полногеномный анализ ассоциации устойчивости к пепельной гнили сои, выращенной в Казахстане

A. Затыбеков<sup>1</sup>, С. Аbugалиева<sup>1</sup>, С. Дидоренко<sup>2</sup>, А. Рсалиев<sup>3</sup>, А. Мауленбай<sup>3</sup>, Ч. Фанг<sup>4</sup>, Е. Туруспеков<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, пос. Алмалыбак, Алматинская область, Казахстан

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, пос. Гвардейский (Отар), Жамбылская область, Казахстан

<sup>4</sup> Школа наук о жизни, Университет Гуанчжоу, Гуанчжоу, Китайская Народная Республика

 yerlant@yahoo.com

**Аннотация.** Пепельная гниль, вызываемая грибным патогеном *Macrophomina phaseolina*, представляет собой опасное заболевание, поражающее сою (*Glycine max* (L.) Merrill.) во всем мире. Выявление генетических факторов, связанных с устойчивостью к пепельной гнили, имеет важное значение для создания устойчивых к болезням сортов сои. Мы провели полногеномный анализ ассоциации (ПГАА) с использованием различных моделей и генотипических данных, чтобы найти генетические детерминанты, лежащие в основе устойчивости сои к пепельной гнили. В исследовании использовали коллекцию, состоящую из 252 образцов сои, включая коммерческие сорта и селекционные линии, для выявления генетических вариаций, связанных с устойчивостью. Фенотипическую оценку проводили в естественных условиях в период 2021–2022 гг. В работе регистрировали уровень заболевания и показатели выживаемости для количественной оценки уровней устойчивости образцов. Генотипические данные состояли из двух наборов: результаты генотипирования с применением технологии Illumina iSelect 6K SNP, и данные полногеномного ресеквенирования. Полногеномный анализ ассоциации был выполнен с помощью четырех различных моделей (MLM, MLM, FarmCPU и BLINK) на платформе GAPIT. В результате были идентифицированы SNP-маркеры 11 локусов количественных признаков, ассоциированных с устойчивостью к пепельной гнили. Гены-кандидаты в пределах идентифицированных геномных областей были изучены на предмет их функциональной аннотации и потенциальной роли в защитных реакциях растений. Результаты этого

исследования могут внести дополнительный вклад в разработку стратегий молекулярной селекции для повышения устойчивости сортов сои к пепельной гнили. Маркер-опосредованный отбор может быть эффективно применен для ускорения процесса селекции, что позволит создавать сорта с повышенной устойчивостью к пепельной гнили. Использование устойчивых сортов может значительно сократить потери урожая и повысить устойчивость производства сои, что принесет пользу фермерам и обеспечит стабильное производство этой ценной культуры.

Ключевые слова: соя; пепельная гниль; полногеномное ресеквенирование; ПГАА; SNP; ЛКП.

## Introduction

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) is one of the most important legumes in the world due to the high nutritional value and protein content of seeds (Pratap et al., 2016). According to the Agencies for Strategic Planning and Reforms of the Republic of Kazakhstan Bureau of National Statistics, soybean was grown on 127.7 thousand hectares in Kazakhstan in 2022 (<https://new.stat.gov.kz/ru/industries/business-statistics/stat-forrest-village-hunt-fish/publications/5099/>). To further develop the soybean industry in Kazakhstan, the Government of Kazakhstan has announced a new program known as “Northern Soybean” to expand the soybean area to 1.5 million hectares (<https://www.gov.kz/article/64601?lang=kk>).

The important factor severely limiting soybean productivity is its susceptibility to harmful fungal diseases (Wrather et al., 2010; Bandara et al., 2020). Strategies for the management of soybean fungal diseases include cultural methods, seed-applied fungicides, and biological controls, but these have not been effective or widely adopted, and have provided limited control (Akem, 1996; Hartman et al., 2015). Therefore, genetic resistance may be the most feasible and sustainable method by which to manage fungal diseases (Lin et al., 2022). Breeding for resistance is difficult because most diseases are quantitatively inherited and controlled by multiple genes. However, modern genomic methodologies may help elucidate resistance mechanisms and identify resistant genotypes to improve breeding programs (St. Clair, 2010). For instance, breeding projects can be coupled with genome-wide association studies (GWASs), as this approach can efficiently identify candidate genes for disease screening.

Genome-wide association studies are becoming a routine approach in the search for marker-trait associations (Korte, Farlow, 2013) and can be efficiently applied to assess genetic variations of important agronomic traits, including disease resistance (Iquiria et al., 2015). These studies use high-density single-nucleotide polymorphism (SNP) arrays and variable populations to enhance the mapping resolution, which drastically improves the identification of putative causal genes (Song et al., 2013; Zhang et al., 2015). Although there are possibilities in respect of GWASs for the prediction of false positive associations, applying variable statistical algorithms can be instrumental in controlling these. For instance, a mixed linear model (MLM) that uses population structure and kinship matrices will significantly regulate inflation (Kaler et al., 2020). However, this method may also remove true genes as background noise in certain studies of complex traits associated with the population structure. To overcome this obstacle, the Bayesian information and linkage disequilibrium iteratively nested keyway (BLINK) employs a multiple-loci test method along with a fixed-effect model (FEM), Bayesian information criteria, and linkage disequilibrium information

(Huang et al., 2019). Our previous GWAS of 182 soybean accessions for resistance to fungal diseases (Zatybekov et al., 2018) allowed the identification of 15 marker-trait associations (MTAs) for resistance to fusarium root rot (FUS, caused by *Fusarium* spp.), frogeye leaf spot (FLS, caused by *Cercospora sojina*), and brown spot (BS, caused by *Septoria glycines*).

In Kazakhstan, more than ten soybean fungal diseases have been identified (Mombekova et al., 2013; Didorenko et al., 2014; Zatybekov et al., 2018), and one category of these comprises root rot diseases (charcoal rot, phytophthora root rot, fusarium root rot, etc.). The expansion of these studies is an obvious necessity in order to examine the genetic background associated with the resistance to harmful pathogens in soybean. One of the local harmful root rot diseases is charcoal rot (CR) caused by *Macrophomina phaseolina*, a soil- and seed-borne polyphagous fungus (Paris et al., 2006).

Currently, only partial resistance has been recorded in soybean, while complete resistance to *M. phaseolina* has not been reported in any plant species (Paris et al., 2006; Pawlowski et al., 2015). In addition, it has been reported that no similar markers or genes have been found when comparing field and greenhouse studies, suggesting that CR resistance in soybean has a complex molecular mechanism. Therefore, the search for more valuable resistance sources from which to identify resistance genes should be continued. The main purpose of this study was to identify MTAs for charcoal rot resistance in a collection of 252 accessions from major soybean growing regions from around the world using the GWAS approach.

## Materials and methods

The soybean collection analyzed in this study consisted of 252 accessions, including 31 released cultivars and prospective breeding lines from Kazakhstan (Zatybekov et al., 2020). Accessions from 20 countries were represented in the collection and separated into five origin groups: Western and Eastern Europe, North America, East Asia, and Kazakhstan (Zatybekov et al., 2020).

The collection was assessed in the experimental plots of the Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing (south-eastern Kazakhstan) in the 2021–2022 period. Plants were grown in one-meter-long rows with a 30 cm distance between adjacent rows and 5 cm between plants within rows. The assessment of field resistance to CR was based on a generally accepted five-point scale: 1 – microsclerotia are not visible in the tissue (I-immune); 2 – very few microsclerotia are visible in the core, vascular tissue, or under the epidermis, and the vascular tissue has not changed color (R-resistant); 3 – vascular tissue is partially discolored, and microsclerotia partially cover the tissue (MR-moderately resistant); 4 – vascular tissue is discolored with numerous microsclerotia embedded in the tissue, and microsclerotia are also visible under the outer epi-

dermis in stem and root sections (MS-moderately susceptible); and 5 – vascular tissue darkened due to the large amount of microsclerotia both inside and outside the tissues of the stem and root (S-susceptible) (Mengistu et al., 2007). The field experiments for CR resistance were conducted in triplicate and in randomized order. The results were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 22.0.0.0) (<https://www.ibm.com/analytics/data-science/predictive-analytics/spss-statistical-software>) computer programs.

The genotyping data consisted of two sets of SNP data. The first set (Set 1) was developed using the soybean 6K SNP Illumina iSelect array (Song et al., 2013) at Traitgenetics GmbH (Gatersleben, Germany). DNA samples were extracted and purified from single seeds of individual cultivars using commercial kits (Qiagen, CA, USA). The DNA concentration for each sample was adjusted to 50 ng/μl. SNP genotype analysis was carried out using Illumina Genome Studio software (GS V2011.1). The second set (Set 2) was developed at the Department of the School of Life Sciences, Guangzhou University, China, using whole-genome resequencing (WGRS) technology based on the Illumina HiSeq X Ten system (Lu et al., 2020). For each of the accessions in the panel of 252, at least five μg of DNA was used to construct a sequencing library with an Illumina TruSeq DNA Sample Prep Kit, according to the manufacturer's instructions.

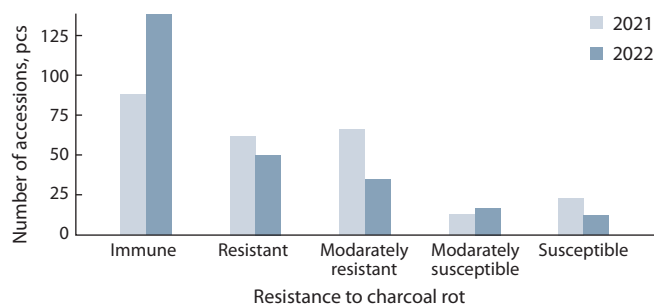
The SNP datasets were filtered using a 10 % cutoff for missing data, and markers with minor allele frequency  $\geq 0.05$  were considered for the genome-wide association studies. Numbers of hypothetical groups ranging from  $k = 1$  to 10 were assessed using 50,000 burn-in iterations followed by 100,000 recorded Markov-chain iterations. The sampling variance of the population structure inference was estimated for each  $k$  using STRUCTURE software (Pritchard et al., 2000) with five independent runs. The delta K value ( $\Delta K$ ) was estimated using Structure Harvester (Evanno et al., 2005). The Q-matrix was developed based on the final  $k$ -values. Population genetic analysis was conducted using two sets of SNP data to construct a neighbor-joining tree with TASSEL software and further visualization using the iTOL online platform (<https://itol.embl.de/>).

The GWAS for soybean resistance to CR in Southeast Kazakhstan was conducted using MLM (Yu et al., 2006), a multiple-locus mixed linear model (MLMM) (Segura et al., 2012), fixed and random model circulating probability unification (FarmCPU) (Liu et al., 2016), and BLINK models (Huang et al., 2019) using GAPIT V3 software (Wang, Zhang, 2021). The rMVP package (Yin et al., 2021) was used for the visualization with  $P \leq 0.0002$  thresholds. A QQ plot was applied to evaluate the distribution of observed  $p$ -values compared to the expected distribution under the null hypothesis of no association between genetic markers and the trait of interest (Ehret, 2010).

## Results

### Disease resistance

Field trial results obtained at the experimental stations of the Southeast region suggested a clear difference in the development of charcoal rot. During the two-year period, the spread and effect of CR pathogens on plants were stronger in 2021



**Fig. 1.** Resistance of the soybean collection to charcoal rot in the South-east region of Kazakhstan.

(Fig. 1, Supplementary Material 1)<sup>1</sup>. The results indicate that the group of susceptible accessions comprised 23 samples (9.1 %) in 2021 and 12 samples (4.8 %) in 2022 (see Fig. 1).

Five genotypes were susceptible to resistance to CR during the two years of the study. Among them were three accessions from East Asia, i.e., cultivars Jin nong 62, Dong doe 027, and Mei feng 18 from China, and line 1034 from Korea. In addition, two accessions from East Europe (Osobliva from Ukraine and CH 147020-1 from Belarus) were susceptible to charcoal rot.

### Genetic variation in the soybean collection based on two sets of SNP markers

The final data after filtering consisted of 4495 (Set 1) and 44,385 (Set 2) polymorphic SNPs. Set 1 consisted of 77.98 % transitions and 22.02 % transverse variants, and Set 2 comprised 71.88 % transitions and 28.12 % transverse variants. The average length of chromosomes was 47.4 Mb for both sets, and the average number of SNPs per chromosome was 222.1 for Set 1 and 2219.3 for Set 2. The chromosome length ranged from 37.3 Mb in Gm16 to 62.1 Mb in Gm18 for Set 1, and from 34.7 Mb in Gm11 to 58 Mb in Gm18 for Set 2. The number of markers per chromosome varied from 185 in Gm11 to 295 in Gm13 for Set 1, and from 1438 in Gm11 to 3438 in Gm18 for Set 2. The average density of the SNP map was one marker every 213 Kb for Set 1 and every 22 Kb for Set 2.

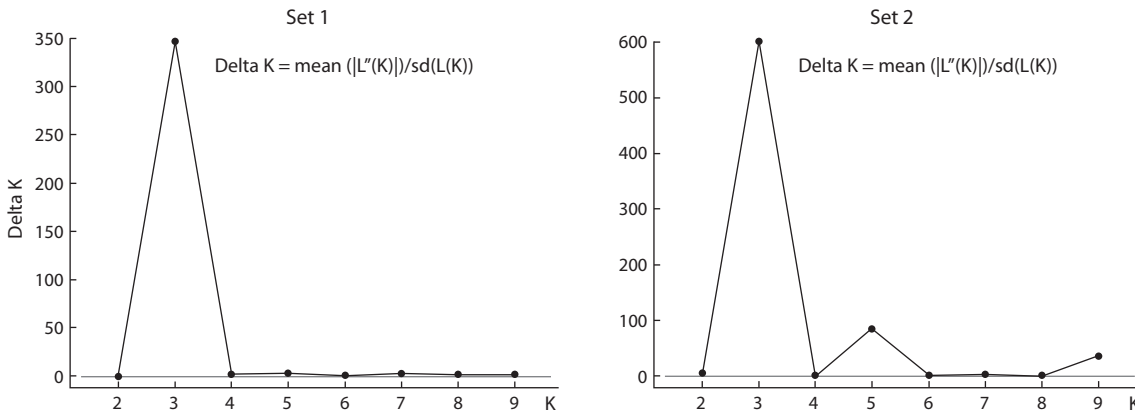
The Structure Harvester results divided the studied collection into three clusters based on data from Set 1 and Set 2 (Fig. 2).

No clear separation of accessions depending on the origin was recorded, regardless of the set chosen. The largest group of accessions was distributed in the third cluster, which consisted of 165 genotypes in Set 1 and 168 samples in Set 2. Based on two sets of genotyping data, a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method (Fig. 3). Population analysis based on resequencing data showed a clear division into four populations (see Fig. 3, Set 2).

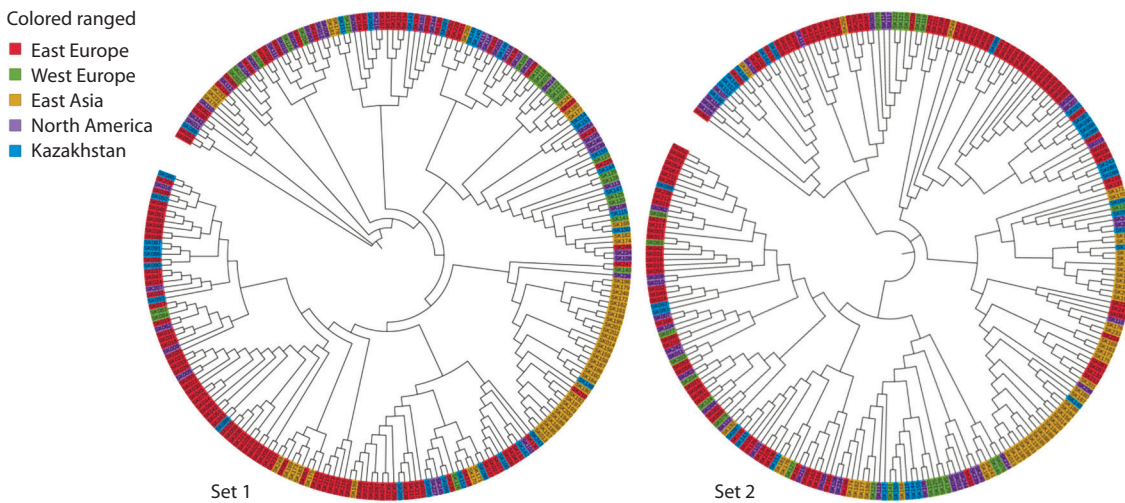
### Association mapping

The GWAS of soybean resistance to CR was conducted using two sets of genotypic data (Set 1 and Set 2) and four models (MLM, MLMM, FarmCPU, and BLINK). The results of the GWAS using four models are shown in Supplementary Material 2. The comparative results of the associations suggest that

<sup>1</sup> Supplementary Materials 1–4 are available in the online version of the paper: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx21.pdf>



**Fig. 2.** Determination of delta K ( $\Delta K$ ) using Structure Harvester software based on two genotypic datasets. Set 1 – data based on genotyping using Illumina iSelect array (4651 SNP); Set 2 – data based on resequencing technology (44,385 SNP).



**Fig. 3.** Neighbor-joining tree based on two sets of genotypic data. Set 1 – data based on genotyping using Illumina iSelect array (4651 SNP); Set 2 – data based on resequencing technology (44,385 SNP).

the most informative results were obtained using the MLM, FarmCPU, and BLINK models (Table 1).

The application of BLINK using Set 1 allowed the identification of five quantitative trait loci (QTLs) associated with CR resistance, while the usage of Set 2 expanded the detection to 11 QTLs that were significant at the threshold of  $P \leq 0.002$  (see Supplementary Material 3, Table 1). The QQ plot confirms the reliability of the associations (see Supplementary Material, 3, b).

The physical position of each critical SNP marker in the MTAs was overlaid with the positions of known QTLs ([https://soybase.org/search/qtllist\\_by\\_symbol.php](https://soybase.org/search/qtllist_by_symbol.php)) (Table 2). Particularly, the assessment of the 11 QTLs listed in Table 2 indicated that 8 of them were reported in published reports in respect of plant resistance studies.

The largest numbers of QTLs associated with CR resistance using Set 2 were identified in chromosomes 7, 9, and 15 (Supplementary Material 4). Analysis of the genome physical locations of associated SNP markers revealed that all identified SNPs were part of the coding DNA sequence (CDS) (Table 3).

**Table 1.** Comparison of identified numbers of SNPs and quantitative trait loci (QTLs) according to GWAS models based on two sets of genotypic data

Genotypic data	GWAS model	Number of identified SNP markers	Number of QTLs
Set 1	MLM	5	5
	MLMM	5	5
	FarmCPU	5	5
	BLINK	5	5
Set 2	MLM	61	11
	MLMM	63	11
	FarmCPU	63	11
	BLINK	63	11



**Table 2.** The list of identified QTLs using the BLINK model

QTL ID	SNP ID	Chr	Position	QTL interval	p-value			Allele	Effect	Known QTLs*
					2021	2022	Average			
qMac.ph 2-1	S02_330064	2	330064	230834-662455	1.6161E-04	5.8456E-04	4.6828E-06	A/G	0.337	-
qMac.ph 3-1	S03_35294437	3	35294437	34928316-35364002		9.8024E-05		A/G	0.436	SCN 33-7, 44-15
qMac.ph 7-1	S07_5459756	7	5459756	5459595-5459756			2.7346E-04	A/G	-0.338	Phytoph 14-8
qMac.ph 7-2	S07_15585048	7	15585048	15585048			1.1160E-04	A/G	0.364	Sclero 10-1
qMac.ph 8-1	S08_3858712	8	3858712	3858712	1.2103E-04			G/A	-0.437	SDS 13-13, 15-2, 16-3, Fus lesion length 1-1
qMac.ph 9-1	S09_7368126	9	7368126	7368126			2.2932E-04	A/T	0.483	Sclero 1-3
qMac.ph 9-2	S09_37287856	9	37287856	36928447-37712255	4.7031E-04		2.8502E-04	A/G	0.391	Sclero 8-3, SDS 18-3
qMac.ph 15-1	S15_9318442	15	9318442	8797665-9906427	8.3066E-05			G/A	0.449	Asian rust 2-4, Fus lesion length 1-4, SDS disease index 21-2
qMac.ph 15-2	S15_49773459	15	49773459	49772578-49773474	5.9168E-05		3.6647E-04	C/T	0.259	-
qMac.ph 16-1	S16_3274861	16	3274861	2706211-3726463	2.5021E-04			G/A	-0.545	-
qMac.ph 19-1	S19_46398331	19	46398331	45583506-46401031	1.5684E-04		3.9965E-04	A/C	0.344	Phytoph 14-8

\* Based on the QTL list on SoyBase ([https://soybase.org/search/qtl/submit\\_by\\_symbol.php](https://soybase.org/search/qtl/submit_by_symbol.php)).

**Table 3.** Physical positions of identified QTLs in the soybean genome

QTL ID	Chr	QTL position interval	Genes in the QTL interval	Peak genes	Annotation of peak genes
qMac.ph 2-1	2	230834-662455	Glyma_02G001800- Glyma_G006100	Glyma_02G002900 Glyma_02G002500*	Methyltransferase Protein argonaute 10
qMac.ph 3-1	3	34928316-35364002	Glyma_03G134100- Glyma_G137400	Glyma_03G137000 Glyma_03G135900*, Glyma_03G136400*	Magnesium chelatase NB-ARC domain-containing protein
qMac.ph 7-1	7	5459595-5459756	Glyma_07G061500	Glyma_07G061500	BAG domain-containing protein
qMac.ph 7-2	7	15585048	Glyma_07G132100	Glyma_07G132100	Kinesin-like protein
qMac.ph 8-1	8	3858712	Glyma_08G049400	Glyma_08G049400	RING-type E3 ubiquitin transferase
qMac.ph 9-1	9	7368126	Glyma_09G071600	Glyma_09G071600	Protein TIFY
qMac.ph 9-2	9	36928447-37712255	Glyma_09G146900- Glyma_G154100	Glyma_09G151300	Serine/threonine-protein kinase
qMac.ph 15-1	15	8797665-9906427	Glyma_15G112100- Glyma_G124700	Glyma_15G118800 Glyma_15G118400*, Glyma_15G124500*	CCAAT transcription factor HMA domain-containing protein, MLO-like protein
qMac.ph 15-3	15	49772578-49773474	Glyma_15G263900	Glyma_15G263900	Tubulin beta chain
qMac.ph 16-1	16	2706211-3726463	Glyma_16G027600- Glyma_G039700	Glyma_16G034900 Glyma_16G031700*, Glyma_16G033900*	Receptor-like serine/threonine-protein kinase AAA + ATPase domain-containing protein, ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase
qMac.ph 19-1	19	45583506-46401031	Glyma_19G198800- Glyma_G209400	Glyma_19G209300 Glyma_19G198800*, Glyma_19G198900*	PPR_long domain-containing protein Late embryogenesis abundant protein LEA-2 subgroup domain-containing protein

\* Genes associated with diseases resistance function.

Each SNP in an intergenic position was considered for possible functional annotation based on the proximity of closely located genes.

## Discussion

The analysis of soybean CR development in Southeast Kazakhstan revealed a strong environmental influence on the distribution of pathogens and plant tolerance to the disease. Previous CR resistance studies in soybean were unsuccessful in identifying major genes that completely resist this pathogen (Coser et al., 2017), indicating that the resistance is quantitative and may rely on the efficiency of minor QTLs. Therefore, searching for resistant genotypes and applying powerful genomic tools are the obvious priorities for successful CR resistance breeding in soybean. The current work was conducted to identify QTLs associated with CR resistance in soybean using a genome-wide association studies.

The study was based on using two genotyping sets (Set 1 and Set 2) that drastically differed in the number of SNPs in the same soybean collection. Set 1 included 4651 SNPs and was extensively used in our previous GWAS projects (Zatybekov et al., 2020), while Set 2 included 44,385 SNPs, which is roughly ten times higher than the number in Set 1. As expected, the power of the GWAS using Set 2 (11 QTLs) was higher than that of Set 1 (five QTLs) (see Table 1) and relied on WRGS technology, which allows more in-depth searching and discovery of new genes associated with agronomic traits, as well as the study of evolutionary mutations in the genome. Most of the identified statistically significant QTLs were detected using the BLINK and FarmCPU models, which were applied among four different statistical approaches, including MLM and MLMM. In this study, BLINK and FarmCPU were the most successful approaches (see Supplementary Material 2), and additional estimations, including QQ plots, confirmed that these models generally result in fewer false positives and identify more true positives (Huang et al., 2019).

Assessment of the identified QTL locations showed that, in most cases, they are distant from each other, or detected on different chromosomes. Analysis of the SNPs in the identified MTAs revealed nine proteins associated with the immune response to pathogens. The qMac.ph 3-1 interval contains two genes (*Glyma\_03G0135900* and *Glyma\_03G0136400*), both coding NB-ARC domain-containing protein, which is associated with resistance to fungal pathogens (Van Ooijen et al., 2008). The qMac.ph 15-1 interval contains gene *Glyma\_15G118400* coding HMA domain-containing protein, which is associated with regulation of the defense response to fungi.

In addition, the gene *Glyma\_15G124500*, which codes MLO-like protein associated with powdery-mildew resistance (Shen et al., 2012), is also located in this interval. The qMac.ph 16-1 interval contains two genes, *Glyma\_16G031700* and *Glyma\_16G033900*, associated with the defense response. The late embryogenesis abundant protein LEA-2 subgroup coding two genes, *Glyma\_19G198800* and *Glyma\_19G198900*, was located in an interval of qMac.ph 19-1 and is associated with disease resistance. These examples of SNPs in MTAs, including presumably newly identified genetic factors that have not been matched to previously reported factors in the

literature, require additional validation studies. Thus, the identified QTLs may facilitate the discovery of new genes for disease resistance and a better understanding of genotype × environment interaction patterns. The identified SNP markers (see Tables 2 and 3) for each of the detected QTLs of CR resistance can be efficiently used in marker-associated selection projects in soybean.

## Conclusion

Our GWAS of soybean resistance to CR has provided important insights into the genetic determinants underlying resistance to this devastating disease. By employing two sets of genotypic data with different SNP density levels and utilizing four GWAS models, we identified eleven QTLs that were statistically associated with CR resistance. The GWAS revealed the complexity of the genetic architecture underlying resistance to CR, indicating the involvement of multiple genes and molecular pathways. The identified genomic regions can serve as valuable targets for further functional validation and exploration of their specific roles in plant defense responses against *Macrophomina phaseolina*. Overall, the study represents a significant step in understanding the genetic basis of soybean resistance to charcoal rot. The knowledge gained from this research may further contribute to developing resilient soybean cultivars, ensuring a stable and sustainable supply of this essential crop while minimizing the economic and environmental impacts of charcoal rot.

## References

- Akem C.N. Management of Soybean Diseases. IITA Research Guide 40. Training Program. Ibadan, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture (IITA), 1996.
- Bandara A.Y., Weerasooriya D.K., Bradley C.A., Allen T.W., Esker P.D. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231141. DOI 10.1371/journal.pone.0231141.
- Coser S.M., Chowda Reddy R.V., Zhang J., Mueller D.S., Mengistu A., Wise K.A., Allen T.W., Singh A., Singh A.K. Genetic architecture of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance in soybean revealed using a diverse panel. *Front. Plant Sci*. 2017;8:1626. DOI 10.3389/fpls.2017.01626.
- Didorenko S.V., Sagitov A.O., Kudaibergenov M.S. Main diseases on crops of soybean and methods of dealing with them. *Agroaleem*. 2014;8(61):42-46. (in Russian)
- Ehret G.B. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr. Hypertens. Rep*. 2010;12:17-25. DOI 10.1007/s11906-009-0086-6.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol*. 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Hartman G.L., Rupe J.C., Sikora E.J., Domier L.L., Davis J.A., Steffey K.L. Compendium of Soybean Diseases and Pests. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2015. DOI 10.1094/9780890544754.
- Huang M., Liu X., Zhou Y., Summers R.M., Zhang Z. BLINK: A package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions. *GigaScience*. 2019;8(2):giy154. DOI 10.1093/gigascience/giy154.
- Iqura E., Humira S., Francois B. Association mapping of QTLs for sclerotinia stem rot resistance in a collection of soybean plant introductions using a genotyping by sequencing (GBS) approach. *BMC Plant Biol*. 2015;15:5. DOI 10.1186/s12870-014-0408-y.

- Kaler A.S., Gillman J.D., Beissinger T., Purcell L.C. Comparing different statistical models and multiple testing corrections for association mapping in soybean and maize. *Front. Plant Sci.* 2020;10:1794. DOI 10.3389/fpls.2019.01794.
- Korte A., Farlow A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods.* 2013;9:29. DOI 10.1186/1746-4811-9-29.
- Lin F., Chhakekar S.S., Vieira C.C., Da Silva M.P., Rojas A., Lee D., Liu N., Pardo E.M., Lee Y.-C., Dong Z., Pinheiro J.B., Ploper L.D., Rupe J., Chen P., Wang D., Nguyen H.T. Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. *Theor. Appl. Genet.* 2022; 135:3773-3872. DOI 10.1007/s00122-022-04101-3.
- Liu X., Huang M., Fan B., Buckler E.S., Zhang Z. Iterative usage of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. *PLoS Genet.* 2016;12(2):e1005767. DOI 10.1371/journal.pgen.1005767.
- Lu S., Dong L., Fang C., Liu S., Kong L., Cheng Q., Chen L., Su T., Nan H., Zhang D., Zhang L., Wang Z., Yang Y., Yu D., Liu X., Yang Q., Lin X., Tang Y., Zhao X., Yang X., Tian C., Xie Q., Yuan X., Tian Z., Liu B., Weller J.L., Kong F. Stepwise selection on homeologous *PRR* genes controlling flowering and maturity during soybean domestication. *Nat. Genet.* 2020;52(4):428-436. DOI 10.1038/s41588-020-0604-7.
- Mengistu A., Ray J.D., Smith J.R., Paris R.L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Sci.* 2007;47(6):2453-2461. DOI 10.2135/cropsci2007.04.0186.
- Mombekova G.A., Shemshurova O.N., Seitbattalova A.I., Aitkhozhina N.A., Bekmakhanova N.E. Phytopathogens of sugar beet and soybean cultivated in soil and climatic conditions of Almaty region. *Vestnik NAN RK = Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.* 2013;4:8-11. (in Russian)
- Paris R.L., Mengistu A., Tyler J.M., Smith J.R. Registration of soybean germplasm line DT97-4290 with moderate resistance to charcoal rot. *Crop Sci.* 2006;46(5):2324-2325. DOI 10.2135/cropsci2005.09.0297.
- Pawlowski M.L., Hill C.B., Hartman G.L. Resistance to charcoal rot identified in ancestral soybean germplasm. *Crop Sci.* 2015;55(3): 1230-1235. DOI 10.2135/cropsci2014.10.0687.
- Pratap A., Gupta S.K., Kumar J., Mehendi S., Pandey V.R. Soybean. In: *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production*. Ch. 12. Academic Press, 2016;293-315. DOI 10.1016/b978-0-12-801309-0.00012-4.
- Pritchard J.K., Stephens M., Rosenberg N.A., Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;67(1): 170-181. DOI 10.1086/302959.
- Segura V., Vilhjalmsson B., Platt A., Korte A., Seren U., Long Q., Nordborg M. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nat. Genet.* 2012;44(7):825-830. DOI 10.1038/ng.2314.
- Shen Q., Zhao J., Du C., Xiang Y., Cao J., Qin X. Genome-scale identification of MLO domain-containing genes in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genes Genet. Syst.* 2012;87(2):89-98. DOI 10.1266/ggs.87.89.
- Song Q., Hyten D.L., Jia G., Quigley C.V., Fickus E.W., Nelson R.L., Cregan P.B. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS One.* 2013;8(1):e54985. DOI 10.1371/journal.pone.0054985.
- St. Clair D.A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2010;48:247-268. DOI 10.1146/annurev-phyto-080508-081904.
- Van Ooijen G., Mayr G., Kasiem M.M.A., Albrecht M., Cornelissen B.J., Takken F.L. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *J. Exp. Bot.* 2008;59(6): 1383-1397. DOI 10.1093/jxb/ern045.
- Wang J., Zhang Z. GAPIT Version 3: boosting power and accuracy for genomic association and prediction. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2021;19(4):629-640. DOI 10.1016/j.gpb.2021.08.005.
- Wrather A., Shannon G., Balardin R., Carregal L., Escobar R., Gupta G.K., Ma Z., Morel W., Ploper D., Tenuta A. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Prog.* 2010;11(1). Online. DOI 10.1094/PHP-2010-0125-01-RS.
- Yin L., Zhang H., Tang Z., Xu J., Yin D., Zhang Z., Yuan X., Zhu M., Zhao S., Li X. rMVP: A memory-efficient, visualization-enhanced, and parallel-accelerated tool for genome-wide association study. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2021;19(4):619-628. DOI 10.1016/j.gpb.2020.10.007.
- Yu J., Pressoir G., Briggs W., Bi I., Yamasaki M., Doebley J., McMullen M., Gaut B., Nielson D., Holland J., Kresovich S., Buckler E. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 2006;38(2): 203-208. DOI 10.1038/ng1702.
- Zatybekov A., Abugaliev S., Didorenko S., Rsaliev A., Turuspekov Y. GWAS of a soybean breeding collection from South East and South Kazakhstan for resistance to fungal diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(5):536-543. DOI 10.18699/VJ18.392.
- Zatybekov A., Abugaliev S., Didorenko S., Turuspekov Y. Effect of population size on genome-wide association study of agronomic traits in soybean. *Proc. Latv. Acad. Sci.* 2020;74(4):244-251. DOI 10.2478/prolas-2020-0039.
- Zhang J., Song Q., Cregan P.B., Nelson R.L., Wang X., Wu J., Jiang G.L. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. *BMC Genomics.* 2015;16(1):217. DOI 10.1186/s12864-015-1441-4.

#### ORCID ID

A. Zatybekov orcid.org/0000-0003-4310-5753  
S. Abugaliev orcid.org/0000-0002-9748-507X  
S. Didorenko orcid.org/0000-0002-2223-0718

A. Rsaliev orcid.org/0000-0002-9921-6076  
A. Maulenbay orcid.org/0000-0001-9535-2997  
C. Fang orcid.org/0000-0003-0564-7586  
Y. Turuspekov orcid.org/0000-0001-8590-1745

**Acknowledgements.** The authors would like to acknowledge the funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan, under the science and technology program O.001 "Biological safety of the Republic of Kazakhstan: assessment of threats, scientific and technical basis for their prevention and elimination".

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

Received June 8, 2023. Revised July 11, 2023. Accepted July 24, 2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Исследование устойчивости клоновых подвоев яблони из коллекции Мичуринского государственного аграрного университета к мучнистой росе

И.Н. Шамшин<sup>1,2</sup>✉, М.Л. Дубровский<sup>1,2</sup>, А.А. Трифонова<sup>2</sup>, К.В. Борис<sup>2</sup>, А.М. Кудрявцев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ [ivan\\_shamshin@mail.ru](mailto:ivan_shamshin@mail.ru)

**Аннотация.** Клоновые подвои яблони являются основой современного интенсивного садоводства, они обеспечивают быстрое наращивание урожая и высокую технологичность возделывания плодовых деревьев. При производстве клоновых подвоев в условиях обильного увлажнения субстрата активно развивается возбудитель мучнистой росы – патогенный гриб *Podosphaera leucotricha* Salm., значительно снижающий продуктивность маточника. Использование устойчивых к мучнистой росе подвойных форм – наиболее целесообразный способ борьбы с этим заболеванием, позволяющий существенно сократить применение химических средств защиты растений. Для ускоренного поиска устойчивых форм разработаны молекулярные маркеры, ассоциированные с генами устойчивости. Однако для изучения клоновых подвоев эти маркеры ранее не применялись. Целью работы было изучение полевой устойчивости к мучнистой росе и выявление форм с генами устойчивости *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-w* и *Pl-d* в крупнейшей отечественной коллекции клоновых подвоев яблони Мичуринского государственного аграрного университета. Результаты трехлетней полевой оценки устойчивости 80 отобранных для анализа подвойных форм позволили выделить пять основных групп образцов: от неустойчивых до высокоустойчивых. Наиболее многочисленной была группа устойчивых форм, включающая 57 образцов. Поиск генов устойчивости проводили с помощью маркеров AT20 SCAR (ген *Pl-1*), OPU02 SCAR (ген *Pl-2*), EM DM01 (ген *Pl-d*) и EM M02 (ген *Pl-w*). Наибольшее распространение в изученной коллекции имеют гены *Pl-d* и *Pl-1*, обнаруженные у 33 (41.25 %) и 31 (38.75 %) образца соответственно. Ген *Pl-w* был выявлен только у двух форм, а при идентификации гена *Pl-2* с маркером OPU02 SCAR не найдено фрагмента ожидаемого размера. При этом 30 образцов с различным уровнем полевой устойчивости имеют два гена, *Pl-1* и *Pl-d*, а высокоустойчивые образцы G16 и 14-1 – комбинацию генов *Pl-d* и *Pl-w*. Эти образцы могут быть использованы в качестве доноров для создания новых клоновых подвоев яблони, несущих комплекс генов устойчивости к мучнистой росе.

Ключевые слова: клоновые подвои; *Podosphaera leucotricha* Salm.; молекулярные маркеры; гены устойчивости.

**Для цитирования:** Шамшин И.Н., Дубровский М.Л., Трифонова А.А., Борис К.В., Кудрявцев А.М. Исследование устойчивости клоновых подвоев яблони из коллекции Мичуринского государственного аграрного университета к мучнистой росе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):572-581. DOI 10.18699/VJGB-23-69

## Powdery mildew resistance of apple clonal rootstocks from the collection of the Michurinsk State Agrarian University

I.N. Shamshin<sup>1,2</sup>✉, M.L. Dubrovsky<sup>1,2</sup>, A.A. Trifonova<sup>2</sup>, K.V. Boris<sup>2</sup>, A.M. Kudryavtsev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ [ivan\\_shamshin@mail.ru](mailto:ivan_shamshin@mail.ru)

**Abstract.** Apple clonal rootstocks are the basis of modern intensive horticulture, providing a rapid increase in yield and convenience of fruit trees cultivation. Production of clonal rootstocks under high humidity often causes powdery mildew infection caused by the pathogenic fungus *Podosphaera leucotricha* Salm., which significantly reduces the productivity of stoolbed. Growing powdery mildew resistant genotypes is the most appropriate way to combat this disease and allows reducing the use of fungicides. To accelerate the search for resistant forms, molecular markers associated with resistance genes have been developed. However, these markers have not been used to study clonal rootstocks. The aims of the work were the field assessment of powdery mildew resistance of apple clonal rootstocks from the collection of the Michurinsk State Agrarian University and the screening of the collection for *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-w* and *Pl-d* resistance genes. The results of a three-year field evaluation of powdery mildew resistance of 80 rootstocks allowed us to distinguish five main groups ranging from very low to high resistance. A group of 57 accessions was classified as powdery mildew resistant. The search for resistance genes was performed using the AT20 SCAR (*Pl-1* gene), OPU02 SCAR (*Pl-2* gene), EM DM01 (*Pl-d* gene), and EM M02 (*Pl-w* gene) markers. The *Pl-d* and *Pl-1* genes identified

in 33 (41.25 %) and 31 (38.75 %) accessions, respectively, were the most common in the collection. The *Pl-w* gene was detected only in two accessions. Identification of the *Pl-2* gene with the OPU02 SCAR marker did not reveal a fragment of the expected size. Thirty accessions with different powdery mildew resistance scores had two genes, *Pl-1* and *Pl-d*, and highly resistant forms G16 and 14-1 had a combination of the *Pl-d* and *Pl-w* genes. These accessions can be used as donors of powdery mildew resistance for breeding new apple clonal rootstocks.

Key words: clonal rootstocks; *Podosphaera leucotricha* Salm.; molecular markers; resistance genes.

**For citation:** Shamshin I.N., Dubrovsky M.L., Trifonova A.A., Boris K.V., Kudryavtsev A.M. Powdery mildew resistance of apple clonal rootstocks from the collection of the Michurinsk State Agrarian University. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):572-581. DOI 10.18699/VJGB-23-69

## Введение

Мучнистая роса яблони – одно из основных вредоносных заболеваний, наносящих значительный ущерб современному интенсивному садоводству. Возбудителем является патогенный гриб *Podosphaera leucotricha* Salm. Болезнь особенно активно развивается в условиях влажной теплой погоды в молодых плодовых садах и питомниках. О наличии фитопатогена свидетельствует белый налет, образующийся на растении и со временем приобретающий бурый цвет. Поражению мучнистой росой подвержены все надземные части растения. В результате повреждения грибом опадают листья, происходят деформация и отмирание побегов, а поражение цветков снижает урожайность плодов (Козловская и др., 2018). В годы эпифитотий мучнистая роса может поражать до 100 % растений и приводить к потере более половины урожая. Для сокращения количества пораженных деревьев требуется обработка фунгицидами до 20 раз в год, что значительно увеличивает химическую нагрузку на сады (Holb et al., 2017; Höfer et al., 2021).

В нашей стране мучнистая роса широко распространена на территории Южного федерального округа (Якуба, 2018), где особенно развито садоводство интенсивного типа с использованием слаборослых клоновых подвоев. Клоновые подвои яблони благодаря высокой регенерационной способности побегов, их хорошей укореняемости и легкому вегетативному размножению являются одним из важнейших компонентов при получении посадочного материала, выполняя функции закрепления плодового дерева в почве (якорности), обеспечения его корневого питания и участия в управлении физиологическими процессами. В современных промышленных садах клоновые подвои играют ведущую роль в регулировании силы роста плодового дерева, сроков вступления в плодоношение, а также способствуют быстрому наращиванию урожая и формированию высоких товарно-потребительских качеств плодов. Использование слаборослых клоновых подвоев обуславливает повышение технологичности возделывания плодовых деревьев и ускоряет окупаемость затрат при закладке производственных насаждений.

При производстве клоновых подвоев в маточниках для высокой укореняемости побегов требуется обильное увлажнение субстрата, поэтому часто применяют систематическое спринклерное орошение. В условиях постоянной повышенной влажности воздуха это приводит к существенному развитию симптомов мучнистой росы на побегах маточных кустов, сопровождающемуся нарушением нормального функционирования фотосинтетического аппарата листьев и значительным снижением хозяйственной продуктивности маточника. В связи с этим

выделение устойчивых к мучнистой росе новых генотипов – актуальное направление в программах селекции клоновых подвоев яблони, реализуемых в различных странах мира.

Поиск источников устойчивости яблони к мучнистой росе ведется со второй половины XX в. На сегодняшний день установлен ряд источников генов устойчивости к мучнистой росе: ген *Pl-1* впервые обнаружен у дикорастущего вида *Malus × robusta*, *Pl-2* идентифицирован у *M. zumi* (Knight, Alston, 1968), *Pl-w* – у сорта White Angel (Gallott et al., 1985; Simon, Weeden, 1991), *Pl-d* – у гибридной формы D12 (Visser, Verhaegh, 1976) и *Pl-m* – у гибрида MIS (mildew immune selection) (Dayton, 1977).

Для поиска устойчивых к мучнистой росе форм разработаны и апробированы ряд маркеров данных генов. Так, на основе RAPD-маркера OPAT20 был создан и успешно апробирован SCAR-маркер гена *Pl-1*, а на базе RAPD-маркера OPU02 – SCAR-маркер гена *Pl-2* (Markussen et al., 1995; Gardiner et al., 2003). Кроме того, выявлены и валидированы однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), ассоциированные с *Pl-2* устойчивостью к мучнистой росе (Jansch et al., 2015; Chagné et al., 2019). На основании данных AFLP-маркирования были созданы SCAR-маркеры EM M01, EM M02 и EM DM01 генов *Pl-w* и *Pl-d* (Evans, James, 2003; James et al., 2004). Для идентификации гена *Pl-d* также применялись микросателлитные маркеры *CH03C02* и *CH01D03* (James et al., 2004).

Эти маркеры были успешно использованы для скрининга сортов яблони из крупнейших коллекций Германии (Höfer et al., 2021) и Чехии (Patzak et al., 2011), а также для изучения дикорастущих популяций *Malus orientalis* Ирана (Amirchakhmaghi et al., 2018). В нашей стране проведены исследования по распространению генов устойчивости к мучнистой росе у современных и староместных сортов яблони, а также дикорастущих видов рода *Malus* (Супрун и др., 2015; Лыжин, Савельева, 2020, 2021). Однако подвойные формы яблони практически не изучались с применением маркеров устойчивости к мучнистой росе.

Мичуринский государственный аграрный университет (ГАУ) – основоположник селекции клоновых подвоев в России и одно из ведущих учреждений в мире по данному направлению. На его базе собрана крупнейшая в нашей стране уникальная коллекция подвойных форм. Подвои селекции Мичуринского ГАУ активно используют в промышленных садах в России, странах Европы и США. Однако работ по изучению их устойчивости к мучнистой росе, в том числе с применением молекулярных маркеров, не проводилось. Такие исследования помогут оценить потенциал коллекционных образцов, установить генетиче-

ские источники устойчивости для создания новых форм подвоев с комплексной резистентностью к мучнистой росе.

Цель работы – изучение полевой устойчивости коллекции клоновых подвоев яблони Мичуринского ГАУ к мучнистой росе и выявление форм с генами устойчивости *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-w* и *Pl-d*.

## Материалы и методы

Объектами исследования были 80 форм клоновых подвоев яблони, включая 74 образца селекции Мичуринского ГАУ, три формы, полученные в других отечественных учреждениях (Б7-35, К-1, Урал-5), три подвоя, интродуцированных из других стран (М9 Т337, G16, Бабарабская яблоня). А в качестве положительных контролей наличия генов устойчивости к мучнистой росе *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-d* и *Pl-w* были взяты образцы дикорастущих видов яблони из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), сорт белорусской селекции Дьямент, а также сорт Эверест из коллекции Мичуринского ГАУ.

ДНК всех отобранных для анализа образцов получали из свежих молодых листьев с помощью наборов для выделения растительной ДНК Quick-DNA Plant/Seed Mini-prep Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя.

Для анализа генов устойчивости к мучнистой росе использовали следующие типы ДНК-маркеров: кодоминантный маркер AT20 SCAR (ген *Pl-1*) (Markussen et al., 1995), доминантные маркеры OPU02 SCAR (ген *Pl-2*) (Gardiner et al., 2003), EM DM01 (ген *Pl-d*) (James et al., 2004) и EM M02 (ген *Pl-w*) (Evans, James, 2003). Последовательности соответствующих праймеров и температуры отжига представлены в табл. 1.

Аmplification проводили в приборе SimpliAmp (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1.5 mM dNTP, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 пМ каждого праймера («Синтол», Россия), 1 ед. Taq-полимеразы и 1x стандартный ПЦР-буфер (Thermo Fisher Scientific, США). Для определения размера фрагментов использованы молекулярные маркеры GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific), 50bp ДНК маркер («Диалат Лтд», Россия) и Start 250 («Диэзм», Россия). После амплификации образцы разделяли путем электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия, затем анализировали в ультрафиолетовом свете и фотографировали.

Оценку устойчивости клоновых подвоев яблони к мучнистой росе осуществляли в течение трех лет (2020–2022 гг.) в полевых условиях в маточнике со спринклерным орошением для поддержания повышенной влажности субстрата по методу, изложенному в «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (Седов, Огольцова, 1999), с небольшими модификациями. Учет поражения выполняли по наличию на листовой пластинке следов поражения. Анализировали 10 побегов каждой формы подвоя. Степень устойчивости генотипов оценивали по пятибалльной шкале, где: 0 баллов – высокоустойчивая форма (ВУ, поражений не обнаружено), 0.1–1 балл – устойчивая форма (У, поражено до 1 % поверхности листа), 1.1–2 балла – среднеустойчивая (СУ, поражено до 10 % общей поверхности листовой пластинки), 2.1–3 балла – восприимчивая (В, поражено до 40 % поверхности листа), 3.1–5 баллов – неустойчивая форма (Н, поражено от 40 до 100 % листовой пластинки). Для каждого анализируемого генотипа подсчитывали среднее значение баллов за три года (табл. 2).

## Результаты

Все 80 подвойных форм яблони были проанализированы с применением маркеров четырех генов устойчивости к мучнистой росе *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-w* и *Pl-d* (см. табл. 2).

Ген *Pl-1* картирован в кластере генов устойчивости на хромосоме XII яблони (Dunemann et al., 2007). Для идентификации данного гена был использован SCAR-маркер AT20, который позволяет выявлять два фрагмента размером 450 и 500 п. н. Наличие фрагмента 450 п. н. характерно для устойчивых образцов (Markussen et al., 1995). В качестве положительного контроля для проведения реакции был взят дикорастущий вид *M. × robusta*, у которого впервые обнаружен данный ген.

С помощью маркера AT20 SCAR фрагмент 450 п. н. был найден у восьми изученных форм клоновых подвоев: 54-118, 2-9-94, 2-9-102, 2-12-36, 4-2-41, 9-1-2, 5-26-127 и 67-5(32). При этом данный фрагмент в комбинации с фрагментом 500 п. н. был выявлен еще у 23 образцов, а у оставшихся 49 образцов амплифицирован только фрагмент 500 п. н. (см. табл. 2). Пример идентификации гена *Pl-1* представлен на рис. 1.

Ген *Pl-2* локализован на хромосоме XI яблони. Для его идентификации использован маркер OPU02 SCAR (Gardiner et al., 2003). При проведении ПЦР о наличии доминантного аллеля гена *Pl-2* свидетельствует амплифи-

**Таблица 1.** Маркеры генов устойчивости к мучнистой росе, использованные в работе

Ген	Название маркера	Последовательности праймеров	Размер фрагмента, п. н.	Температура отжига праймеров, °С
<i>Pl-1</i>	AT20 SCAR	F ATCAGCCCCACATGAATCTCATACC R ACATCAGCCCTCAAAGATGAGAAGT	450/500	62
<i>Pl-2</i>	OPU02 SCAR	F CCGACCGATCAGGAATTGTCACCAG R TCGATTACTACTATGTACGGGAGCA	1700	62
<i>Pl-d</i>	EM DM01	F AGGATAATAATCTATCTTGTAAAGG R CCATTACGCCCAACGAGT	90	53
<i>Pl-w</i>	EM M02	F CTGCAGACTGTTTGTAAAGTTGG R AACTCCTTGATTCTCTATTGTT	250	56

**Таблица 2.** Образцы подвойных форм яблони, отобранные для анализа, и данные о разнообразии генов устойчивости *PI-1*, *PI-2*, *PI-d*, *PI-w* и результатах полевой оценки устойчивости к мучнистой росе

№ п/п	Название	Происхождение	AT20 (ген <i>PI-1</i> )		OPU02 (ген <i>PI-2</i> )	EM DM01 (ген <i>PI-d</i> )	EM M02 (ген <i>PI-w</i> )	Степень поражения листьев в маточнике мучнистой росой, балл	Степень устойчи- вости*
			450 п. н.	500 п. н.	1700 п. н.	90 п. н.	250 п. н.		
1	54-118	ПБ×13-14	+	-	-	+	-	0.3±0.05	У
2	57-490		+	+	-	+	-	0.4±0.03	У
3	62-396	13-14×ПБ	-	+	-	-	-	0.1±0.02	У
4	70-20-20	57-469×57-344	-	+	-	-	-	1.4±0.1	СУ
5	83-1-15	64-143×54-118	-	+	-	-	-	0.4±0.04	У
6	Малыш Будаговского (МБ)	57-344×57-490	-	+	-	-	-	0.1±0.02	У
7	Парадизка Будаговского (ПБ, В9)	М8×Красный штандарт	-	+	-	-	-	0.2±0.03	У
8	М9 (Т337)	Клон подвоя М9	-	+	-	-	-	0.9±0.1	У
9	2-3-2	82-27-6 св. опыление	+	+	-	+	-	0.2±0.03	У
10	2-3-3		+	+	-	+	-	0.7±0.06	У
11	2-3-8		+	+	-	+	-	0.3±0.02	У
12	2-3-14		+	+	-	+	-	0.4±0.03	У
13	2-3-17		-	+	-	-	-	4.2±0.2	Н
14	2-3-19		+	+	-	-	-	4.1±0.3	Н
15	2-3-44		+	+	-	+	-	4.5±0.2	Н
16	2-3-49		-	+	-	-	-	1.5±0.1	СУ
17	2-9-49	82-26-2 св. опыление	+	+	-	+	-	0.7±0.1	У
18	2-9-56		-	+	-	-	-	2.2±0.2	В
19	2-9-77		+	+	-	+	-	0.5±0.03	У
20	2-9-90		-	+	-	-	-	0.3±0.02	У
21	2-9-94		+	-	-	+	-	2.8±0.2	В
22	2-9-96		-	+	-	-	-	0.2±0.01	У
23	2-9-102		+	-	-	+	-	1.7±0.1	СУ
24	2-12-10	82-11-5 св. опыление	-	+	-	-	-	1.5±0.1	СУ
25	2-12-15		+	+	-	+	-	1.3±0.1	СУ
26	2-12-27		+	+	-	+	-	0.3±0.02	У
27	2-12-34		-	+	-	-	-	0.2±0.02	У
28	2-12-36		+	-	-	+	-	0.2±0.01	У
29	2-15-2	85-8-12 св. опыление	+	+	-	+	-	3.6±0.2	Н
30	2-15-15		+	+	-	+	-	2.8±0.1	В
31	3-4-7	62-396 св. опыление	-	+	-	-	-	0.8±0.1	У
32	3-10-3	82-11-2×Уэлси	-	+	-	-	-	0.5±0.04	У
33	4-2-3	82-52-6×82-26-2	-	+	-	-	-	0.3±0.02	У
34	4-2-50		+	+	-	+	-	0.4±0.04	У
35	4-6-5	83-11-10 св. опыление	+	+	-	+	-	0.3±0.02	У
36	5-21-27	82-27-6×Жигулевское	-	+	-	-	-	0.2±0.01	У
37	5-21-93		+	+	-	+	-	0.3±0.04	У
38	5-24-1	82-26-2×Орлик	-	+	-	-	-	0.2±0.02	У
39	5-27-1	Жигулевское×82-26-2	-	+	-	-	-	0.3±0.01	У
40	5-28-11	82-57-8× <i>Malus baccata</i> (L.) Borkh.	-	+	-	-	-	0.4±0.03	У
41	9-1-1	57-157×Строевское	-	+	-	-	-	0.3±0.02	У
42	9-1-2		+	-	-	+	-	2.1±0.2	В
43	9-1-3		-	+	-	-	-	4.6±0.3	Н

Окончание таблицы 2

№ п/п	Название	Происхождение	AT20 (ген <i>Pl-1</i> )		OPU02 (ген <i>Pl-2</i> )	EM DM01 (ген <i>Pl-d</i> )	EM M02 (ген <i>Pl-w</i> )	Степень поражения листьев в маточнике мучнистой росой, баллы	Степень устойчи- вости*
			450 п.н.	500 п.н.	1700 п.н.	90 п.н.	250 п.н.		
44	9-1-4	57-157 × Строевское	-	+	-	-	-	0.5 ± 0.03	У
45	9-1-5		-	+	-	+	-	0.4 ± 0.03	У
46	9-1-9		-	+	-	-	-	0.2 ± 0.01	У
47	5-26-127	Неизвестно	+	-	-	+	-	2.4 ± 0.2	В
48	57-146	ПБ св. опыление	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.02	У
49	70-6-8	54-83 × 57-344	+	+	-	+	-	0.3 ± 0.02	У
50	Бабарабская яблоня	<i>Malus turkmenorum</i> Juz. et M. Pop.	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.03	У
51	14-1	<i>Malus sieboldii</i> Rehd., св. опыление	-	+	1500 п.н.	+	+	0	ВУ
52	73-9-3	57-545 × 57-366	+	+	-	+	-	0.3 ± 0.03	У
53	62-223	Анока × ПБ	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.02	У
54	3-3-4	85-6-5 × Спартан	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.02	У
55	71-7-22	57-531 × 57-233	+	+	-	+	-	0.2 ± 0.02	У
56	71-3-88	58-257 × ПБ	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.04	У
57	Б7-35	М4 × М9	-	+	-	-	-	2.3 ± 0.1	В
58	71-3-137	58-257 × ПБ	-	+	-	-	-	0.4 ± 0.03	У
59	7-8-5 (Урал-5)	57-469 св. опыление	-	+	-	-	-	0.3 ± 0.03	У
60	К-1	Боровинка × М9	-	+	-	-	-	3.4 ± 0.2	Н
61	58-238	ПБ × Налив алый	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.02	У
62	71-3-49	58-257 × ПБ	-	+	-	-	-	0.3 ± 0.02	У
63	64-143	ПБ × 57-290	-	+	-	-	-	1.7 ± 0.1	СУ
64	71-3-150	58-257 × ПБ	-	+	-	-	-	0.3 ± 0.02	У
65	71-3-195		-	+	-	-	-	0.2 ± 0.03	У
66	85-2-11	3-4-98 × 54-118	+	+	-	+	-	0.3 ± 0.04	У
67	76-6-13	57-344 × 57-490	-	+	-	-	-	0.3 ± 0.04	У
68	G16	Ottawa 3 × <i>Malus floribunda</i> Siebold ex Van Houtte	-	+	1500 п.н.	+	+	0	ВУ
69	67-5(32)	54-83 св. опыление	+	-	-	+	-	1.2 ± 0.2	СУ
70	75-11-280	М9 св. опыление	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.03	У
71	57-491	ПБ × 13-14	+	+	-	+	-	0.4 ± 0.03	У
72	87-7-12	54-118 × ПБ	+	+	-	+	-	2.8 ± 0.2	В
73	75-12-23	Неизвестно	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.01	У
74	75-11-232	М9 св. опыление	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.01	У
75	76-3-6	М27 × ПБ	-	+	-	-	-	0.4 ± 0.03	У
76	86-6-12	Неизвестно	-	+	-	-	-	1.1 ± 0.1	СУ
77	85-11-9	70-5-10 × 54-118	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.01	У
78	69-6-217	ПБ × Китайка розовая	+	+	-	+	-	0.3 ± 0.02	У
79	69-28-11	58-257 × ПБ	-	+	-	-	-	0.2 ± 0.02	У
80	4-2-41	82-52-6 × 82-26-2	+	-	-	+	-	0.2 ± 0.02	У
81	<i>Malus × robusta</i> **(Carrière) Rehder (к43200)		+	-	-	-	-	-	-
82	<i>Malus zumi</i> (Matsum.) Rehder (к41272)		-	-	~2200 п.н.	-	-	-	-
83	Дьямент		-	-	-	+	-	-	-
84	Эверест		-	-	-	-	+	-	-

\* ВУ – высокоустойчивый; У – устойчивый; СУ – среднеустойчивый; В – восприимчивый; Н – неустойчивый.

\*\* Положительный контроль для генов: *Pl-1* – *M. robusta* (к43200); *Pl-2* – *M. zumi* (к41272); *Pl-d* – Дьямент; *Pl-w* – Эверест.



кация фрагмента размером 1700 п. н. (Gardiner et al., 2003). В качестве положительного контроля был взят дикорастущий вид *M. zumi*, у которого впервые обнаружен данный ген.

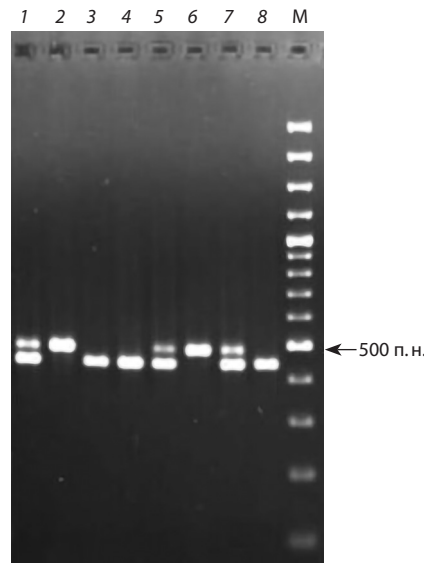
В результате анализа у образцов коллекции не выявлено ожидаемого фрагмента размером 1700 п. н. Однако у форм 14-1 и G16 амплифицирован фрагмент 1500 п. н., а у контрольного образца *M. zumi* получен фрагмент размером ~2200 п. н. (рис. 2).

Для идентификации гена *Pl-d*, локализованного на хромосоме XII яблони, использован доминантный SCAR-маркер EM DM01 (James et al., 2004). Ожидаемый размер ПЦР-продукта с данным маркером составляет 90 п. н. В качестве положительного контроля был взят сорт белорусской селекции Дьямент, для которого ранее было установлено наличие данного гена (Козловская и др., 2018). В изученной коллекции ген *Pl-d* идентифицирован у 33 из 80 анализируемых форм (см. табл. 2). Пример идентификации гена *Pl-d* приведен на рис. 3.

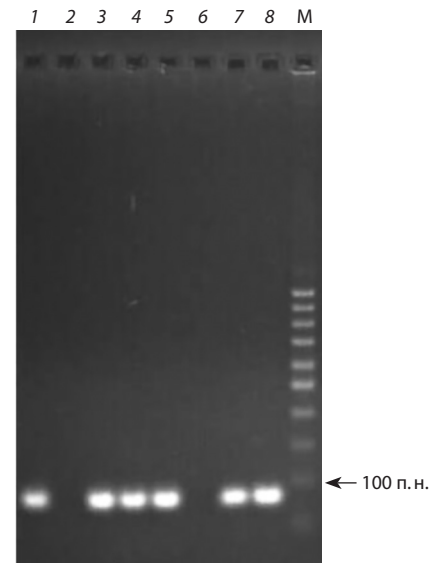
Ген *Pl-w* локализован на хромосоме VIII. Для его идентификации использовали SCAR-маркер EM M02 (Evans, James, 2003). О наличии гена *Pl-w* свидетельствует присутствие фрагмента 250 п. н. В качестве положительного контроля был взят сорт яблони Эверест, у которого ранее был идентифицирован ген *Pl-w* (Patzak et al., 2011). При анализе коллекции клоновых подвоев яблони с применением маркера EM M02 ген *Pl-w* обнаружен только у двух образцов, G16 и 14-1 (см. табл. 2, рис. 4).

В результате оценки полевой устойчивости клоновых подвоев яблони из коллекции Мичуринского ГАУ к мучнистой росе все изученные формы были разделены по степени устойчивости на пять основных групп: от высокоустойчивых до неустойчивых (рис. 5).

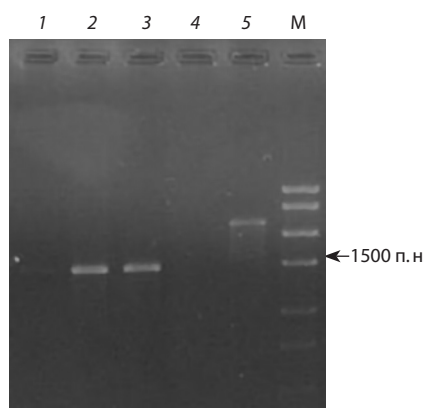
Показано, что 57 образцов устойчивы (0.1–1 балл) к мучнистой росе, что составляет 71.25 % от общего количества образцов выборки (см. рис. 5). В данной группе наименьший средний балл поражения мучнистой росой (0.1) отмечен у образцов 62-396 и Малыш Будаговского, а максимальный (0.9) – у подвоя М9 Т337 (см. табл. 2). Группа среднеустойчивых форм (1.1–2 балла) включает восемь образцов (10 %). Средний балл устойчивости у образ-



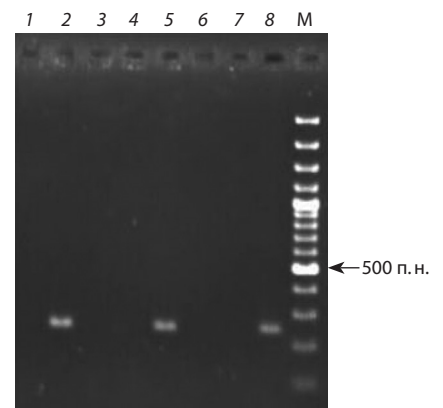
**Рис. 1.** Результаты идентификации гена *Pl-1* с маркером AT20 SCAR у клоновых подвоев яблони.  
1 – 57-490; 2 – ПБ; 3 – 54-118; 4 – 2-9-94; 5 – 2-12-27; 6 – 5-27-1; 7 – 2-3-19; 8 – *M. x robusta* κ43200. М – маркер GeneRuler 100 bp.



**Рис. 3.** Результаты идентификации гена *Pl-d* с маркером EM DM01 у клоновых подвоев яблони.  
1 – 54-118; 2 – 62-396; 3 – 2-3-8; 4 – 2-3-14; 5 – 2-12-15; 6 – 2-12-10; 7 – 57-490; 8 – Дьямент. М – 50 bp ДНК маркер.



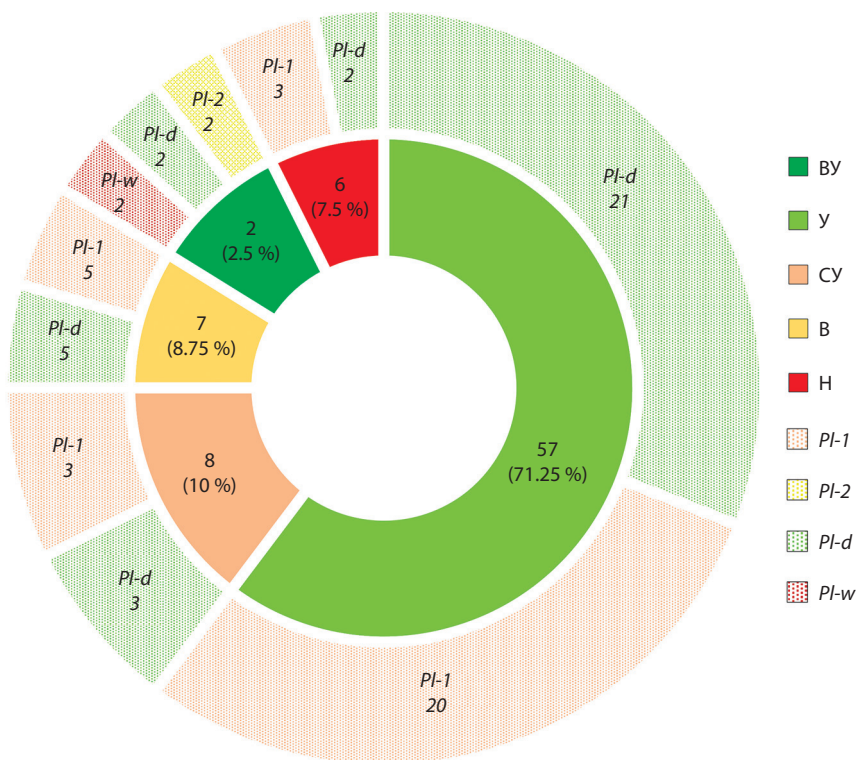
**Рис. 2.** Результаты идентификации гена *Pl-2* с маркером OPU02 SCAR у клоновых подвоев яблони.  
1 – 54-118; 2 – 14-1; 3 – G16; 4 – 9-1-2; 5 – *M. zumi* κ41272. М – маркер Start 250.



**Рис. 4.** Результаты идентификации гена *Pl-w* с маркером EM M02 у клоновых подвоев яблони.  
1 – 2-3-17; 2 – 14-1; 3 – 7-8-5; 4 – 9-1-2; 5 – G16; 6 – 5-27-1; 7 – 2-3-8; 8 – Эверест. М – маркер GeneRuler 100 bp.

цов данной группы варьировал от 1.1 у формы 86-6-12 до 1.7 у подвоев 2-9-102 и 64-143. Доля восприимчивых (2.1–3 балла) и неустойчивых (3.1–5 баллов) подвоев составила соответственно 8.75 % (от 2.1 у подвоя 9-1-2 до 2.8 у подвоев 2-9-94, 87-7-12 и 2-15-15) и 7.5 % (от 3.4 у К-1 до 4.6 у 9-1-3). Наименьшее количество образцов выявлено в группе высокоустойчивых форм (0 баллов), включающей гибридную форму 14-1 и подвой G16, поражение возбудителем мучнистой росы для них не зафиксировано (см. табл. 2, рис. 5).

Проанализировано распределение изученных генов устойчивости к мучнистой росе по группам образцов с различной полевой устойчивостью (см. рис. 5). Наибольшее распространение в коллекции имеют гены *Pl-d* и *Pl-1*. Так, ген *Pl-d* присутствовал у всех групп образцов, а ген *Pl-1* не обнаружен



**Рис. 5.** Доля образцов с различной степенью устойчивости к мучнистой росе в коллекции по результатам оценки полевой устойчивости.

Группы образцов по степени полевой устойчивости: ВУ – высокоустойчивые; У – устойчивые; СУ – среднеустойчивые; В – восприимчивые; Н – неустойчивые (внутренняя часть диаграммы). Количество образцов с генами устойчивости *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-w* и *Pl-d* в каждой группе (внешняя часть диаграммы).

только в группе высокоустойчивых образцов, в то время как ген *Pl-w*, напротив, был найден только у двух высокоустойчивых образцов, 14-1 и G16. Кроме того, только у данных образцов были выявлены специфические ПЦР-продукты 1500 п. н. с маркером гена *Pl-2* (см. рис. 2).

## Обсуждение

Анализ 80 клоновых подвоев яблони Мичуринского ГАУ с применением маркеров генов устойчивости к мучнистой росе *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-d* и *Pl-w* позволил впервые провести оценку варибельности данных генов у образцов коллекции.

Наиболее распространенными среди изученных образцов были гены *Pl-d* и *Pl-1*, идентифицированные у 33 (41.25 %) и 31 образца (38.75 %) соответственно (см. табл. 2). Ген *Pl-w* в изученной коллекции встречался значительно реже и выявлен только у форм G16 и 14-1 (см. табл. 2, рис. 4). Распространение изученных генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции, по-видимому, связано с родословными образцов, для создания которых использованы как дикорастущие виды *Malus*, так и современные и стародавние сорта яблони (см. табл. 2).

Известно, что дикорастущие виды яблони – наиболее перспективные источники генов устойчивости к болезням и вредителям для селекции, в том числе подвойных форм (Соломатин, 2018; Pereira-Lorenzo et al., 2018). Однако в селекции клоновых подвоев при первичном отборе гибридных семян выделяют генотипы с наиболее ценными хозяйственно-производственными признаками – хорошей способностью к вегетативному размножению и высокой укореняемостью, повышенной зимостойкостью корневой системы. Изучение устойчивости к фитопатогенам производится впоследствии среди выделенных подвойных форм.

При оценке полиморфизма коллекции по генам устойчивости к мучнистой росе следует отметить, что подвои яблони мало изучены с применением маркеров данных генов, а основная часть исследований была сосредоточена на изучении сортов яблони и дикорастущих видов *Malus*. Например, исследование с помощью маркера EM DM01 показало широкое распространение гена *Pl-d* среди старых и современных сортов яблони из коллекции Института плодоводства Республики Беларусь (Урбанович и др., 2010). При анализе 145 местных и старинных сортов яблони из чешской коллекции ген *Pl-d* был выявлен только у четырех образцов (Patzak et al., 2011). Исследование коллекции сортов яблони генбанка Дрездена-Пильница с использованием микросателлитного маркера гена *Pl-d* также показало малое распространение данного гена (Höfer et al., 2021).

Ген *Pl-d* встречается и у дикорастущих видов яблони. В результате изучения 67 форм дикорастущих видов рода *Malus* ген *Pl-d* идентифицирован у семи образцов, а для *M. sieversii* и *M. orientalis* обнаружен внутривидовой полиморфизм по данному гену (Лыжин, Савельева, 2021). В исследовании популяций *M. orientalis*, произрастающих на территории Ирана, также отмечается разнообразие по гену *Pl-d* (Amirchakhmaghi et al., 2018). Считается, что основной центр происхождения слаборослых клоновых подвоев – Закавказье, где они берут начало от дикорастущих видов (Будаговский, 1976; Соломатин, 2018). Наиболее распространенный вид яблони, произрастающий в данном регионе, – *M. orientalis*. Таким образом, распространение гена *Pl-d* у образцов коллекции может быть связано с происхождением подвоев от дикорастущих видов, в том числе *M. orientalis*, произрастающих на территории центра их происхождения. Другим возможным фактором наличия данного гена у анализируемых образцов является использование культурных сортов яблони в селекционной работе по созданию подвоев.

Второй по частоте встречаемости в коллекции – ген *Pl-1*. Как показывают предыдущие исследования, этот ген не имеет широкого распространения как среди местных сортов яблони, так и среди современных коммерческих (Урбанович и др., 2010; Patzak et al.,

2011; Супрун и др., 2015; Козловская и др., 2018; Лыжин, Савельева, 2020; Höfer et al., 2021). Однако ген *Pl-1* достаточно широко распространен у видов *Malus*. При анализе коллекции 67 дикорастущих форм яблони ген *Pl-1* был найден у 37.3 % образцов, в том числе и у образцов *M. × robusta* – вида, у которого этот ген был обнаружен впервые. При этом для некоторых видов показан внутривидовой полиморфизм по данному гену (Лыжин, Савельева, 2021). Наличие гена *Pl-1* у дикорастущих видов отмечено и в исследовании О.Ю. Урбанович с коллегами (2010). По-видимому, распространение гена *Pl-1* в коллекции клоновых подвоев яблони связано с присутствием в их родословных дикорастущих видов *Malus*.

Меньшее распространение в изучаемой коллекции имеет ген *Pl-w*, идентифицированный у двух форм подвоев с помощью маркера EM M02. Ген *Pl-w*, как показывает ряд ранее проведенных исследований, обеспечивает более высокий уровень резистентности, чем гены *Pl-1* и *Pl-2* (Simon, Weeden, 1991; Evans, James, 2003). Этот ген достаточно распространен среди дикорастущих видов *Malus*, но практически не встречается у сортов (Patzak et al., 2011; Козловская и др., 2018; Лыжин, Савельева, 2021).

Вероятно, именно наличие гена *Pl-w* обеспечивает высокую устойчивость у образцов G16 и 14-1, установленную при полевой оценке признака (см. табл. 2). По-видимому, это связано с их происхождением от дикорастущих видов. Так, подвой G16 американской селекции – производный от *M. floribunda*, а гибридная форма 14-1 селекции Мичуринского ГАУ – первое поколение от *M. sieboldii*. Ранее с использованием маркера EM M02 ген *Pl-w* был обнаружен у образцов *M. floribunda* и *M. sieboldii* (Лыжин, Савельева, 2021).

При анализе коллекции с применением маркера гена *Pl-2* OPU02 SCAR для двух образцов (G16 и 14-1) были получены фрагменты размером ~1500 п. н. (см. рис. 2), в то время как, по литературным данным, для доминантного аллеля гена *Pl-2* характерен фрагмент 1700 п. н. (Gardiner et al., 2003). Ранее с помощью маркера OPU02 SCAR ПЦР-продукт размером 1500 п. н. был найден у сорта Фаворит селекции Крымской опытной станции садоводства (Супрун и др., 2015). Устойчивость данного сорта к мучнистой росе позволила авторам предположить наличие у него неизвестных аллелей гена *Pl-2* или новых генов устойчивости. Это предположение может быть справедливо и для образцов G16 и 14-1, так как оба образца, по результатам полевой оценки, являются полностью устойчивыми к мучнистой росе, хотя также имеют гены *Pl-d* и *Pl-w* (см. табл. 2).

Известно, что ген *Pl-2* впервые идентифицирован у *M. zumi* (Knight, Alston, 1968). Однако у использованного в качестве положительного контроля для данного гена образца *M. zumi* из коллекции ВИР вместо ожидаемого фрагмента 1700 п. н. получен фрагмент ~2200 п. н. (см. рис. 2). Причиной подобных различий может быть внутривидовой полиморфизм, ранее отмеченный для дикорастущих видов *Malus* по другим генам устойчивости к мучнистой росе (Лыжин, Савельева, 2021). Кроме того, присутствие фрагмента ~2200 п. н. может быть связано с наличием у данного образца *M. zumi* другого гена устойчивости к мучнистой росе – *Pl-MIS* (Gardiner et al., 2003).

Результаты, полученные с помощью маркера OPU02 SCAR, не позволяют однозначно идентифицировать присутствие гена *Pl-2* по наличию целевого фрагмента 1700 п. н., что может быть связано с достаточно большим расстоянием (8.6 сМ) от маркера до гена (Gardiner et al., 2003). Поэтому для оценки наличия гена *Pl-2* в коллекции в дальнейшем целесообразно проведение с применением других известных маркеров данного гена, например SNP (Jänsch et al., 2015; Chagné et al., 2019).

В селекции на устойчивость к болезням, в том числе к мучнистой росе, перспективным подходом является объединение в одном генотипе нескольких генов устойчивости, так называемое «пирамидирование» генов. Полученные данные позволили выделить ряд форм клоновых подвоев яблони, представляющих интерес для селекции. Так, в изученной выборке 30 образцов имеют два гена устойчивости, *Pl-1* и *Pl-d*, а высокоустойчивые к мучнистой росе образцы G16 и 14-1 имеют гены *Pl-d*, *Pl-w*, а также специфичный фрагмент, обнаруживаемый с помощью маркера гена *Pl-2* (см. табл. 2). Это подтверждает то, что объединение нескольких генов устойчивости в одном генотипе может быть эффективно.

Тем не менее не у всех образцов с генами устойчивости к мучнистой росе была выявлена полевая устойчивость. Так, например, все восемь образцов, обладавших доминантным аллелем гена *Pl-1*, имели и ген *Pl-d*, однако уровень полевой устойчивости данных образцов варьировал от 0.2 баллов у подвоя 4-2-41 до 2.8 баллов у подвоя 2-9-94 (см. табл. 2). При этом образцы G16 и 14-1 с генами *Pl-d* и *Pl-w*, а также специфичным фрагментом, полученным с маркером гена *Pl-2*, были устойчивы и не имели признаков заражения (0 баллов).

Несоответствие полевой оценки и наличия генов устойчивости может быть обусловлено несколькими причинами. Для некоторых использованных в работе маркеров существуют противоречивые данные о связи с признаком. Так, ряд исследований не подтверждает корреляцию маркеров генов *Pl-1* AT20 SCAR и *Pl-d* EM DM01 с устойчивостью (Dunemann et al., 2004; Kellerhals et al., 2008; Урбанович и др., 2010).

Кроме того, для более точной оценки уровня устойчивости к мучнистой росе необходимы данные о расовом составе *P. leucotricha* или результатах оценки с применением метода искусственного заражения определенной расой патогена. При этом устойчивость, определяемая известными генами *Pl*, может быть преодолена, как, например, устойчивость, обусловленная геном *Pl-1* (Lesemann, Dunemann, 2006). К тому же, несмотря на значительный объем данных о последовательностях геномов яблони домашней и видов *Malus*, вероятно, что в настоящее время идентифицированы не все гены устойчивости к мучнистой росе и аллели известных генов устойчивости.

## Заключение

Таким образом, впервые проведена оценка полевой устойчивости 80 образцов коллекции клоновых подвоев яблони Мичуринского ГАУ к мучнистой росе и выявлены формы с генами устойчивости к этому заболеванию. Наиболее распространенными в коллекции были гены *Pl-d* и *Pl-1*. Ген *Pl-w* обнаружен только у двух форм, а гена *Pl-2* в коллек-

ции не найдено. При этом 32 образца имели комбинацию двух *Pl* генов. Наличие генов устойчивости к мучнистой росе у подвоев, по-видимому, связано с их родословными и происхождением от дикорастущих видов *Malus*. Сравнение результатов оценки полевой устойчивости с результатами молекулярного анализа показало, что наличие генов устойчивости не всегда соответствует уровню поражения. Так, гены *Pl-d* и *Pl-1* были идентифицированы как у устойчивых, так и у восприимчивых образцов, а ген *Pl-w* – только у высокоустойчивых образцов 14-1 и G16. Полученные данные могут быть использованы для селекции новых подвойных форм яблони, обладающих комбинацией генов устойчивости к мучнистой росе.

## Список литературы / References

- Будаговский В.И. Культура слаборослых плодовых деревьев. М., 1976.  
[Budagovskiy V.I. Culture of Dwarfing Fruit Trees. Moscow, 1976. (in Russian)]
- Козловская З.А., Кондратенко Ю.Г., Гашенко Т.А., Ярмолич С.А. Выявление новых комплексных источников устойчивости к болезням яблони с использованием молекулярных методов в Беларуси. *Садоводство и виноградарство*. 2018;5:23-29. DOI 10.31676/0235-2591-2018-5-23-29.  
[Kozlovskaya Z.A., Kondratsenok Ju.G., Gashenko T.A., Yarmolich S.A. Identification of new complex sources of resistance to apple diseases using molecular methods in Belarus. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2018;5:23-29. DOI 10.31676/0235-2591-2018-5-23-29. (in Russian)]
- Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Маркер-опосредованный скрининг устойчивых к мучнистой росе (ген *Pl-1*) генотипов яблони. *Вестн. Марийского гос. ун-та. Сер. Сельскохозяйственные науки. Экономические науки*. 2020;6(2):180-186. DOI 10.30914/2411-9687-2020-6-2-180-186.  
[Lyzhin A.S., Saveleva N.N. Marker-mediated screening of powdery mildew resistant (*Pl-1* gene) apple genotypes. *Vestnik Mariyskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Selskhozaystvennyye Nauki. Ekonomicheskie Nauki = Vestnik of Mari State University. Chapter: Agriculture. Economics*. 2020;6(2):180-186. DOI 10.30914/2411-9687-2020-6-2-180-186. (in Russian)]
- Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Полиморфизм дикорастущих видов рода *Malus* Mill. по генам устойчивости к мучнистой росе. *Изв. Нац. академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2021; 59(1):62-70. DOI 10.29235/1817-7204-2021-59-1-62-70.  
[Lyzhin A.S., Saveleva N.N. Polymorphism of wild species of *Malus* Mill. according to powdery mildew resistance genes. *Izvestiya Natsionalnoy Akademii Nauk Belarusi. Seriya Agrarnykh Nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series*. 2021;59(1):62-70. DOI 10.29235/1817-7204-2021-59-1-62-70. (in Russian)]
- Седов Е.Н., Огольцова Т.П. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел: ВНИИСПК, 1999.  
[Sedov E.N., Ogoltsova T.P. Program and Methodology of Variety Studies for Fruit, Berry, and Nut Crops. Orel: All-Russia Research Institute for Agricultural Biotechnology, 1999. (in Russian)]
- Соломатин Н.М. Генофонд вегетативно размножаемых форм яблони для улучшения сортамента подвоев, сырьевых и декоративных сортов в условиях ЦЧР: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. М., 2018.  
[Solomatina N.M. The gene pool of vegetatively propagated forms of apple trees to improve the assortment of rootstocks, stock and ornamental cultivars in the Central Chernozem Region: Dr. (Agric.) Dissertation. Moscow, 2018. (in Russian)]
- Супрун И.И., Токмаков С.В., Рисованная В.И., Володин В.А., Щербатко В.Д. Идентификация генов устойчивости яблони к мучнистой росе *Pl-1* и *Pl-2* и парше *Vf* и *Vm* у сортов яблони из коллекций генетических ресурсов Крымского полуострова. *Науч. труды СКЗНИИСиВ*. 2015;7:15-19.  
[Suprun I.I., Tokmakov S.V., Risovannaya V.I., Volodin V.A., Sherbatko V.D. Identification of apple tree *Pl1* and *Pl2* genes for resistance to mildew and *Vf* and *Vm* genes for resistance to scab in apple tree varieties from the collection of genetic resources of Crimea. *Nauchnye Trudy SKZNIISiV = Proceedings of the North Caucasian Research Institute for Horticulture and Viticulture*. 2015;7:15-19. (in Russian)]
- Урбанович О.Ю., Козловская З.А., Картель Н.А. Распространение генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси. *Молекуляр. и прикл. генетика*. 2010;11:20-25.  
[Urbanovich O., Kozlovskaya Z., Kartel N. Occurrence of mildew resistance genes in the collection of apple cultivars and species grown in Belarus. *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics*. 2010;11:20-25. (in Russian)]
- Якуба Г.В. Защита яблони от мучнистой росы в условиях погодных стрессов. *Защита и карантин растений*. 2018;7:44-46.  
[Yakuba G.V. Protection of apple tree from the powdery mildew under conditions of weather stresses. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2018;7:44-46. (in Russian)]
- Amirchakhmaghi N., Yousefzadeh H., Hosseinpour B., Espahbodi K., Aldaghi M., Cornille A. First insight into genetic diversity and population structure of the Caucasian wild apple (*Malus orientalis* Uglitzk.) in the Hyrcanian forest (Iran) and its resistance to apple scab and powdery mildew. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2018;65(4):1255-1268. DOI 10.1007/s10722-018-0611-z.
- Chagné D., Vanderzande S., Kirk C., Proffitt N., Weskett R., Gardiner S.E., Peace C.P., Volz R.K., Bassil N.V. Validation of SNP markers for fruit quality and disease resistance loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) using the OpenArray® platform. *Horti. Res.* 2019;6:30. DOI 10.1038/s41438-018-0114-2.
- Dayton D.F. Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha*. *Hortic. Sci.* 1977;12(3):225-226. DOI 10.21273/HORTSCI.12.3.225.
- Dunemann F., Urbanietz A., Gardiner S., Bassett S., Bassett H., Legg W., Rusholme R., Bus V., Ranatunga C. Marker assisted selection for *Pl-1* powdery mildew resistance in apple – old markers for a new resistance gene. *Acta Hort.* 2004;2:757-761. DOI 10.17660/ActaHortic.2004.663.137.
- Dunemann F., Peil A., Urbanietz A., Garcia-Libreros T. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pl1* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. *Plant Breed.* 2007;126(5):476-481. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01415.x.
- Evans K., James C. Identification of SCAR markers linked to *Pl-w* mildew resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.* 2003;106(7):1178-1183. DOI 10.1007/s00122-002-1147-2.
- Gallott J.C., Lamb R.C., Aldwinckle H.S. Resistance to powdery mildew from some small-fruited *Malus* cultivars. *Hortic. Sci.* 1985; 20(6):1085-1087. DOI 10.21273/HORTSCI.20.6.1085.
- Gardiner S., Murdoch J., Meech S., Rusholme R., Bassett H., Cook M., Bus V., Rikkerink E., Gleave A., Crowhurst R., Ross G., Warrington I. Candidate resistance genes from an EST database prove a rich source of markers for major genes conferring resistance to important apple pests and diseases. *Acta Hort.* 2003;622:141-151. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.622.12.
- Holb I.J., Abonyi F., Buurma J., Heijne B. On-farm and on-station evaluations of three orchard management approaches against apple scab and apple powdery mildew. *Crop Prot.* 2017;97:109-118. DOI 10.1016/j.cropro.2016.11.023.
- Höfer M., Flachowsky H., Schröpfer S., Peil A. Evaluation of scab and mildew resistance in the Gene Bank collection of apples in Dresden-Pillnitz. *Plants*. 2021;10(6):1227. DOI 10.3390/plants10061227.
- James C.M., Clarke J.B., Evans K.M. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. *Theor. Appl. Genet.* 2004;110(1):175-181. DOI 10.1007/s00122-004-1836-0.

- Jänsch M., Brogini G.A., Weger J., Bus V.G., Gardiner S.E., Bassett H., Patocchi A. Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Mol. Breed.* 2015;35:45. DOI 10.1007/s11032-015-0242-4.
- Kellerhals M., Patocchi A., Duffy B., Frey J. Modern approaches for breeding high quality apples with durable resistance to scab, powdery mildew and fire blight. In: Ecofruit-13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 18<sup>th</sup> February to 20<sup>th</sup> February 2008 at Weinsberg/Germany. Weinsberg, 2008;226-231.
- Knight R.L., Alston F.H. Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple. *Can. J. Genet. Cytol.* 1968;10(2): 294-298. DOI 10.1139/g68-041.
- Lesemann S., Dunemann F. Recent findings on the biodiversity of the apple powdery mildew pathogen. *Gesunde Pflanzen.* 2006;58:117-123. DOI 10.1007/s10343-005-0108-5.
- Markussen T., Krüger J., Schmidt H., Dunemann F. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene *P11* from *Malus robusta* in cultivated apple. *Plant Breed.* 1995; 114(6):530-534. DOI 10.1111/j.1439-0523.1995.tb00850.x.
- Patzak J., Paprštein F., Henychová A. Identification of apple scab and powdery mildew resistance genes in Czech apple (*Malus × domestica*) genetic resources by PCR molecular markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2011;47(4):156-165. DOI 10.17221/140/2011-CJGPB.
- Pereira-Lorenzo S., Fischer M., Ramos-Cabrer A.M., Castro I. Apple (*Malus* spp.) breeding: present and future. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.). *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits.* Vol. 3. Cham: Springer, 2018;3-29. DOI 10.1007/978-3-319-91944-7\_1.
- Simon C.J., Weeden N.F. Elucidation of crab apple lineage by direct examination of rDNA sequences. *Malus.* 1991;5:4-6.
- Visser T., Verhaegh J.J. Review of tree fruit breeding carried out at the Institute for Horticultural Plant Breeding at Wageningen from 1951–1976. In: *Proceedings of the Eucarpia Meeting of Tree Fruit Breeding.* Wageningen, 1976;113-132.

---

#### ORCID ID

I.N. Shamshin orcid.org/0000-0002-4464-1876  
M.L. Dubrovsky orcid.org/0000-0003-0883-2867  
A.A. Trifonova orcid.org/0000-0001-9618-5932  
K.V. Boris orcid.org/0000-0002-8479-4949  
A.M. Kudryavtsev orcid.org/0000-0001-6029-0730

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00326 (<https://rscf.ru/project/22-26-00326>).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.03.2023. После доработки 22.05.2023. Принята к публикации 24.05.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Устойчивость сортов мягкой пшеницы, возделываемых на территории Саратовской области, к возбудителям септориозных пятнистостей

Ю.В. Зеленева<sup>1</sup> ✉, Э.А. Конькова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

✉ zelenewa@mail.ru

**Аннотация.** Септориоз – одна из вредоносных болезней сортов пшеницы, возделываемых на территории Саратовской области. Это инфекционное заболевание грибной этиологии лимитирует показатели урожайности и быстро прогрессирует во многих регионах Российской Федерации. Целью исследований было оценить устойчивость перспективных и рекомендуемых для возделывания на территории Нижневолжского региона РФ сортов озимой и яровой мягкой пшеницы к возбудителям септориозных пятнистостей и изучить популяции *Parastagonospora nodorum* и *P. pseudonodorum*, распространенных на территории Саратовской области, по наличию генов-эффекторов. С применением молекулярных маркеров проведена идентификация генов, кодирующих некротрофные эффекторы (NEs), у 220 изолятов гриба *Parastagonospora* spp., полученных с сортообразцов озимой и яровой мягкой пшеницы, яровой твердой пшеницы, озимого тритикале и ярового овса. Среди изученных изолятов *P. nodorum* были как единичные гены *Tox1*, *Tox3* и *ToxA*, так и сочетания из двух генов в одном генотипе. В генотипе изолятов *P. pseudonodorum* не отмечено присутствие гена *ToxA*. Изучено 20 сортов озимой и яровой пшеницы на устойчивость к септориозным пятнистостям в лабораторных условиях и в поле в течение 2020–2022 гг. Было использовано три инокулюма, включающих изоляты *Zymoseptoria tritici*, *P. nodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*) и *P. pseudonodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*). Анализируемые сорта были охарактеризованы с помощью молекулярного маркера *Xfcp623*, диагностического для генов *Tsn1/tsn1*, контролирующего чувствительность к токсину гриба PtrToxA. Наибольший интерес представляют 11 генотипов пшеницы, которые показали устойчивость к одному, двум и трем видам – возбудителям септориоза (*Z. tritici*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*). Это сорта озимой мягкой пшеницы: Гостианум 237 (*tsn1*), Лютесценс 230 (*Tsn1*), Губерния (*Tsn1*), Подруга (*Tsn1*), Анастасия (*Tsn1*), Соседка (*Tsn1*) и яровой мягкой пшеницы: Фаворит (*tsn1*), Прохоровка (*tsn1*), Саратовская 70 (*tsn1*), Саратовская 73 (*tsn1*), Белянка (*tsn1*). Полученные результаты важны для повышения эффективности селекции на основе элиминации генотипов с доминантными аллелями *Tsn1*, чувствительными к грибу PtrToxA. Помимо хозяйственной ценности изученных сортов, их рекомендуется использовать в селекции на устойчивость к септориозной пятнистости. Ключевые слова: гены-эффекторы; ПЦР-диагностика; селекция пшеницы; септориозы; фитопатогенные грибы; PtrToxA; PtrTox1; PtrTox3.

**Для цитирования:** Зеленева Ю.В., Конькова Э.А. Устойчивость сортов мягкой пшеницы, возделываемых на территории Саратовской области, к возбудителям септориозных пятнистостей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):582-590. DOI 10.18699/VJGB-23-70

## Soft wheat cultivars grown in the Saratov region and their resistance to Septoria blotch

Yu.V. Zeleneva<sup>1</sup> ✉, E.A. Konkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

✉ zelenewa@mail.ru

**Abstract.** Septoria is one of the harmful diseases of wheat cultivars cultivated in the Saratov region. This infectious disease of fungal etiology limits yield indicators and rapidly progresses in many regions of the Russian Federation. The aim of the research was to assess the resistance of winter and spring wheat cultivars that are referred to as promising and recommended for cultivation in the Low Volga region of the Russian Federation to pathogens of Septoria, to study the populations of *Parastagonospora nodorum* and *P. pseudonodorum* in the territory of the Saratov region in order to detect the presence of effector genes. Using molecular markers, we performed the identification of genes encoding NEs in 220 *Parastagonospora* spp. fungal isolates obtained from 7 cultivars of soft winter wheat, 6 taken from the winter triticale, 5 from spring wheat, 3 from durum spring wheat and 1 from spring oats. Among the *P. nodorum* isolates studied, there were both single genes *Tox1*, *Tox3*, and *ToxA*, and combinations of two genes in one genotype. The presence of the *ToxA* gene was not noted in the genotype of *P. pseudonodorum* isolates. During 2020–2022, a collection of

winter and spring wheat cultivars was studied to detect resistance to Septoria blotch in field conditions (13 cultivars of winter wheat and 7 cultivars of spring wheat accordingly). The resistance of the cultivars was proven by laboratory evaluation. Three inoculums were used, including the isolates of *Z. tritici*, *P. nodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*), *P. pseudonodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*) mainly obtained from Saratov populations of 2022 (except for *P. pseudonodorum* with the *ToxA* gene). The tested cultivars were characterized using the *Xfcp623* molecular marker, diagnostic for *Tsn1/tsn1* genes, which controls sensitivity to the fungal toxin of PtrToxA. Of greatest interest are 11 wheat genotypes that showed resistance to one, two and three species which served as causative agents of Septoria blotch (*Zymoseptoria tritici*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*). These are the soft winter wheat cultivars Gostianum 237 (*tsn1*), Lutescens 230 (*Tsn1*), Guberniya (*Tsn1*), Podruga (*Tsn1*), Anastasia (*Tsn1*), Sosedka (*Tsn1*) and the soft spring wheat cultivars Favorit (*tsn1*), Prokhorovka (*tsn1*), Saratovskaya 70 (*tsn1*), Saratovskaya 73 (*tsn1*), Belyanka (*tsn1*). The results obtained are of interest as they might increase the efficiency of selection based on the elimination of genotypes with dominant *Tsn1* alleles sensitive to PtrToxA. In addition to the economic value of the cultivars studied, it is recommended to use them in breeding for resistance to Septoria blotch.

Key words: effector genes; PCR-diagnosis; wheat selection; Septoria blotch; phytopathogenic fungi; PtrToxA; PtrTox1; PtrTox3.

**For citation:** Zeleneva Yu.V., Konkova E.A. Soft wheat cultivars grown in the Saratov region and their resistance to Septoria blotch. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):582-590. DOI 10.18699/VJGB-23-70

## Введение

Саратовская область – крупный административный округ, в ее состав входят 37 муниципальных районов, распределенных по климатическим условиям между черноземными правобережными и степными засушливыми районами в Левобережье Волги. Различия в климатических условиях сказываются на урожайности сельскохозяйственных культур и поражении болезнями, среди которых доминирующее положение в фитопатогенном комплексе занимают септориозные и пиренофорозные пятнистости пшеницы. В годы эпифитотий, вызванных септориозами в разных регионах России, Северной Америки, Австралии и других частях мира, потери урожая могут превышать 30–40 % (Санин и др., 2018; Ficke et al., 2018).

Проводимый нами ежегодный мониторинг показывает, что в последние годы во многих регионах России, в том числе и в Саратовской области, в патогенном комплексе септориозных пятнистостей пшеницы доминирует вид *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvl. et Crous – возбудитель септориоза листьев пшеницы, тритикале, ячменя, ржи (Зеленева и др., 2022).

Реже отмечается вид *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley et Crous. Он паразитирует на листьях, стеблях, колосовых чешуях, осях пшеницы и других злаков (Пахолкова, 2003; Санин и др., 2018; Зеленева и др., 2022). Нередко также он поражает семена. Зерновка становится щуплой, неполноценной, снижается ее скорость прорастания. При сильном заражении происходят поражение и отмирание coleoptилей.

Еще один вид, *P. pseudonodorum*, имеет строгую специализацию к хозяину, паразитирует на пшенице. До недавнего времени данный вид считался пшеничной формой вида *P. avenae* (A.V. Frank) Quaedvl., Verkley et Crous: *P. avenae* f. sp. *triticea*. Но на основании изучения морфологии с применением методов многолокусной филогении в современной систематике вид *P. pseudonodorum* является одним из семи недавно описанных. Всего на настоящий момент по филогенетическому анализу выделено 26 видов *Parastagonospora* (Croll et al., 2021).

Грибы *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* известны своей способностью синтезировать некротрофные эффекторы

(necrotrophic effectors – NEs), в том числе специфичные к хозяину токсины (host selective toxins – HSTs), которые функционируют как факторы патогенности (Ciuffetti et al., 1997). Чувствительность к NEs не всегда приводит к восприимчивости пшеницы к возбудителю септориоза (van Schie, Takken, 2014; Viridi et al., 2016).

На сегодняшний день охарактеризовано в общей сложности девять взаимодействий в патосистеме пшеницы–*P. nodorum*: *Tsn1* – SnToxA (Friesen et al., 2009; Zhang et al., 2009; Faris et al., 2011); *Snn1* – SnTox1 (Shi et al., 2016b); *Snn2* – SnTox267 (Richards et al., 2022); *Snn3-B1* – SnTox3 (Shi et al., 2016a); *Snn3-D1* – SnTox3 (Zhang et al., 2011); *Snn4* – SnTox4 (Abeysekara et al., 2012); *Snn5* – SnTox5 (Sharma, 2019; Kariyawasam et al., 2022); *Snn6* – SnTox267 (Richards et al., 2022); *Snn7* – SnTox267 (Richards et al., 2022). Показано, что гены, кодирующие белки SnToxA, SnTox1, SnTox3, присутствуют в генотипе *P. pseudonodorum* (Hafez et al., 2020; Navathe et al., 2020).

К настоящему времени клонированы три гена-хозяина, включая *Tsn1* (Faris et al., 2010), *Snn1* (Shi et al., 2016b) и *Snn3-D1* (Zhang et al., 2011). А также пять генов гриба, кодирующих белки-эффекторы: SnToxA (Friesen et al., 2009), SnTox3 (Liu et al., 2009), SnTox1 (Liu et al., 2012), SnTox5 (Kariyawasam et al., 2022), и SnTox267 (Richards et al., 2022).

В последнее десятилетие в Саратовской области наблюдается увеличение агрессивности грибных болезней зерновых культур. Поэтому приоритетным направлением селекции пшеницы на иммунитет в Нижневолжском регионе были и остаются непрерывный поиск и использование новых эффективных генетических источников и доноров (Конькова и др., 2022). Данная работа проводится ежегодно на базе Федерального аграрного научного центра Юго-Востока (г. Саратов). С 2021 г. ведется поиск источников и доноров устойчивости к септориозу с использованием молекулярных технологий, что позволяет отбирать генотипы с определенными сочетаниями генов.

Цель нашей работы – оценить устойчивость перспективных и рекомендуемых для возделывания на территории Нижневолжского региона РФ сортов озимой и яровой мягкой пшеницы к возбудителям септориозных пят-

нистостей и изучить популяции *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, распространенных на территории Саратовской области, по наличию генов-эффекторов.

## Материалы и методы

Образцы пораженных растений были отобраны в 2021–2022 гг. на территории Саратовской области. Под инфекционным образцом понимали листья растений с хорошо выраженными симптомами септориоза, собранные на обследуемом поле по его диагонали через равные расстояния в определенное время (например, во время учета).

Для поиска образцов пораженных растений проводили обследование посевов в районах, указанных в табл. 1. Все образцы были собраны в фазу созревания, в стадию молочно-восковой спелости растений (75–85 по шкале Задокса). Листья с типичными внешними признаками септориоза гербаризировали, снабжали этикетками (указывали: место и дату учета, фазу, вид и сорт растения, информацию о симптомах болезни, технологии возделывания культуры, сведения о мерах защиты). В дальнейшем инфекционные образцы зерновых культур (листья) пшеницы, тритикале и овса анализировали в лабораторных условиях для установления видового состава возбудителей септориозных пятнистостей (Пыжикова и др., 1989).

Метеоусловия 2020–2022 гг. в регионе оказали благоприятное влияние на развитие возбудителей септориозных пятнистостей зерновых культур. По данным Саратовской метеостанции, в начале вегетационного периода за май месяц в среднем за три года выпадало 30.5 мм осадков. При умеренных температурах воздуха гидротермический коэффициент (ГТК) был достаточно высоким – 1.3. В июне количество осадков (34.5 мм) и ГТК (0.55) снижались. В середине вегетации, в июле, положение существенно улучшалось. Осадков выпало 97.2 мм, что значительно выше нормы, а ГТК был высоким и составлял 1.54. Это способствовало росту и развитию сельскохозяйственных растений и оказывало благоприятное влияние на развитие фитопатогенного комплекса. В августе осадков выпадало мало – 12.6 мм в среднем за три года. Отмечались повышенные температуры воздуха – число дней с максимальной температурой воздуха выше или равной 30 °С составляло 17. Гидротермический коэффициент за этот месяц тоже был крайне низким – 0.2, что свидетельствует о засушливых условиях.

Степень поражения инфекционного материала, отобранного для анализа, варьировала от 30 до 40 %. Со всех образцов инфекционного материала, находящихся в исследовании, выделялся вид *Z. tritici*. С некоторых образцов удалось получить моноконидиальные изоляты грибов рода *Parastagonospora* (см. табл. 1) (Пыжикова и др., 1989).

Образцы анализировали в лабораторных условиях для установления видового состава возбудителей септориозных пятнистостей. Результаты лабораторной диагностики видовой принадлежности возбудителя болезни подтверждали методом секвенирования с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология», ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии».

Проанализировано 220 моноконидиальных изолятов рода *Parastagonospora*, выделенных по 10 с каждого из 22 инфекционных образцов. Для оценки устойчивости к септориозным пятнистостям использовано 13 образцов озимой пшеницы (Гостианум 237, Лютеценс 230, Саратовская 8, Губерния, Мироновская 808, Донская безостая, Саратовская 90, Жемчужина Поволжья, Саратовская 17, Калач 60, Подруга, Анастасия, Соседка) и 7 образцов яровой пшеницы (Фаворит, Прохоровка, Юго-Восточная 2, Саратовская 70, Саратовская 73, Белянка, Лебедушка). Скрининг выполняли на опытных полях ФАНЦ Юго-Востока в условиях естественного инфекционного фона 2020–2022 гг. Применяли модифицированную и дополненную шкалу Саари–Прескотта (Коломиец и др., 2017). Все сорта были разделены на пять групп: RR – высокоустойчивые (поражаемость < 11 %); R – устойчивые (поражаемость 11–20 %); MS – умеренно восприимчивые (поражаемость 21–40 %); S – восприимчивые (поражаемость 41–70 %); HS – высоковосприимчивые (поражаемость 71–100 %).

Лабораторную оценку проводили на изолированных листьях, как описано Г.В. Пыжиковой и Е.В. Карасевой (1985). Использовали три инокулюма, включающих изоляты *Z. tritici*, *P. nodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*), *P. pseudonodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*). При инокуляции растений в лабораторных условиях использовали изоляты грибов саратовской популяции, выделенные с инфекционного материала 2022 г.: *Z. tritici*, 80-22-Z.t – хозяин яровая твердая пшеница, 80-22-Z.t – озимая мягкая пшеница, 95-22-Z.t – озимая пшеница; *P. nodorum*: 80-22-P.n. (*Tox3*) – хозяин яровая твердая пшеница, 101-22-P.n. (*ToxA*, *Tox3*) – яровая мягкая пшеница, 88-22-P.n. (*Tox1*, *Tox3*) – озимая пшеница; *P. pseudonodorum*: 72-22-P.ps. (*Tox1*, *Tox3*) – озимый тритикале, 89-22-P.ps. (*Tox1*). Наличие генов *Tox* в генотипах, использованных изолятов грибов *Parastagonospora* spp., определено нами впервые, результаты приводятся в настоящей работе. В инфекционный материал вида *P. pseudonodorum* был добавлен изолят тамбовской популяции 82-21-P.ps., генотип которого содержит *ToxA*. Этот изолят получен с яровой мягкой пшеницы Воронежская 20 в 2021 г. (Зеленева и др., 2022).

Геномную ДНК грибов выделяли из чистой культуры моноконидиальных изолятов, полученной на картофельно-глюкозном агаре, стандартным СТАВ-методом (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990). Этим же методом выделяли ДНК из молодых листьев 13 сортов озимой и 7 сортов яровой мягкой пшеницы.

Аmplification геномной ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси (2 мкл геномной ДНК (25 нг (допустимо от 2 до 50 нг)), 1 мкл каждого праймера (10 pM/мкл) («Евроген», Россия), 0.5 мкл смеси dNTPs mix (10 mM, водный раствор dCTP, dGTP, dTTP и dATP) (TransGen, Китай), 0.55 мкл MgCl<sub>2</sub> (100 mM), 0.5 мкл BioTaq ДНК полимеразы (5U, 5 ед/мкл) («Диалат Лтд.», Россия), 2.5 мкл 10X ПЦР-буфера, 17 мкл ddH<sub>2</sub>O).

Аmplification фрагменты разделяли методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле, в TBE буфере (pH 8.2), гель окрашивали бромистым этидием. Для оценки размера фрагментов использовали ДНК маркер Step100 plus («Биолабмикс», Россия).



**Таблица 1.** Происхождение проанализированных моноконидиальных изолятов *Parastagonospora* spp. в 2021–2022 гг.

№ п/п	Название изолята	Происхождение инфекционного образца/растение-хозяин
1	32-21-P.n.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимая мягкая пшеница Анастасия 51°34'28"N, 46°00'20"E
2	33-21-P.ps.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ яровая твердая пшеница, гибридная линия 51°34'38"N, 45°59'51"E
3	35-21-P.ps.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимый тритикале 51°34'31"N, 46°00'24"E
4	37-63-21-C-Pav.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ яровой овес Скакун 51°35'58"N, 46°02'36"E
5	80-22 P.n.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ яровая твердая пшеница, гибридная линия 51°35'58"N, 46°02'36"E
6	82-22 P.n.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ яровая твердая пшеница, гибридная линия 51°34'41"N, 45°59'54"E
7	86-22 P.n.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ яровая мягкая пшеница, интрогрессивная линия 51°34'47"N, 45°59'51"E
8	88-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Балтайский район/ озимая мягкая пшеница Саратовская 17 52°28'49"N, 46°33'40"E
9	91-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Балтайский район/ озимая мягкая пшеница Калач 60 52°28'21"N, 46°39'51"E
10	92-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Балашовский район/ озимая мягкая пшеница Левобережная 1 51°29'25"N, 43°27'13"E
11	93-22 P.n.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимая мягкая пшеница, гибридная линия 51°34'35"N, 45°59'53"E
12	98-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Аркадакский район/ озимая мягкая пшеница Калач 60 51°52'25"N, 43°35'04"E
13	101-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Ершовский район/ яровая мягкая пшеница Квартет 51°22'31"N, 48°12'18"E
14	259-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Ершовский район/ яровая мягкая пшеница Юго-Восточная 4 51°22'20"N, 48°12'35"E
15	260-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Аркадакский район/ яровая мягкая пшеница Квартет 51°52'20"N, 43°33'45"E
16	261-22 P.n.-1...10	Саратовская область, Пугачевский район/ яровая мягкая пшеница Юго-Восточная 2 52°02'30"N, 49°13'27"E
17	71-22-P.ps.-1...10	Саратовская область, Пугачевский район/ озимый тритикале 52°02'01"N, 49°18'05"E
18	72-22-P.ps.-1...10	Саратовская область, Балашовский район/ озимый тритикале 51°28'43"N, 43°17'04"E
19	73-22-P.ps.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимый тритикале 51°34'28"N, 46°00'24"E
20	74-22-P.ps.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимый тритикале 51°34'27"N, 46°00'27"E
21	76-22-P.ps.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимый тритикале 51°34'31"N, 46°00'28"E
22	89-22-P.ps.-1...10	Саратовская область, опытное поле ФАНЦ Юго-Востока/ озимая мягкая пшеница, гибридная линия 51°34'28"N, 46°00'20"E

Скрининг изолятов рода *Parastagonospora* на наличие генов-эффекторов *ToxA*, *Tox1* и *Tox3* был проведен при помощи полимеразной цепной реакции. Для получения статистически обоснованных результатов анализировали ДНК 10 моноконидиальных изолятов, полученных с каждого инфекционного образца (см. табл. 1). Всего про-

анализировано 220 проб ДНК. Список праймеров для ПЦР представлен в табл. 2.

Скрининг генотипов сортов пшеницы на присутствие доминантного или рецессивного гена (*Tsn1/tsn1*) проводили по методике с использованием ПЦР с парами праймеров *Xfcp623F/Xfcp623R* (Faris et al., 2010). Наличие про-

**Таблица 2.** Список праймеров для ПЦР

Локус	Праймер	Последовательность 5'–3'	Литературный источник	Размер ампликона, п. н.
<i>Tox1</i>	<i>SnTox1cF</i>	ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT	Gao et al., 2015	500
	<i>SnTox1cR</i>	TGTGGCAGCTAACTAGCACA		
<i>Tox3</i>	<i>SnTox3cF</i>	CTCGAACCCGTCGGACCCGGA		600
	<i>SnTox3cR</i>	CTCCCCCTCGTGGGATTGCCCATATG		
<i>ToxA</i>	<i>TA51F</i>	GCGTTCTATCCTCGTACTTC	Andrie et al., 2007	573
	<i>TA52R</i>	GCAATCTCCAATTTTCACG		
<i>Tsn1</i>	<i>Xfcp623F</i>	CTATTCGTAATCGTGCCTTCCG	Faris et al., 2010	380
	<i>Xfcp623R</i>	CSTTCTCTCTCACCGCTATCTCATC		

дукта амплификации маркера указывает на присутствие доминантного аллеля гена *Tsn1* (восприимчивость растения к белку-токсину гриба PtrToxA), отсутствие – на наличие рецессивного аллеля *tsn1* (устойчивость растения к PtrToxA).

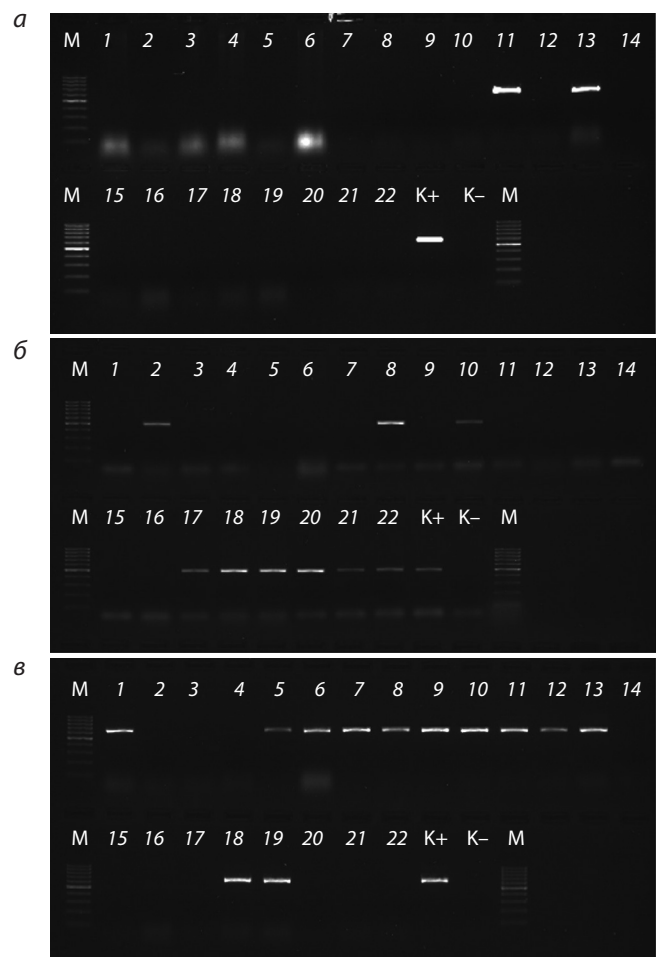
Статистическую обработку данных выполняли с помощью компьютерной программы STATISTICA 12. Рассчитывали среднее поражение листовой пластины септориозом при полевой оценке за период 2020–2022 гг., %; SD – стандартное отклонение (Std. Dev.). Для разделения изученных сортов пшеницы по устойчивости/восприимчивости к трем возбудителям септориоза использовали критерий *Q* Кохрена. Этот критерий применяли для проверки значимого различия между фитопатологическими оценками сортов пшеницы.

## Результаты

Молекулярный скрининг изучаемого материала (220 ДНК-проб, полученных от 130 моноконидиальных изолятов вида *P. nodorum*, 80 *P. pseudonodorum* и 10 – *P. avenae*) позволил выявить как единичные гены, кодирующие NEs, так и их сочетания в одном генотипе (рис. 1, Приложение 1)<sup>1</sup>.

Ген *ToxA* обнаружен среди моноконидиальных изолятов вида *P. nodorum* (93-22-Р.п.-1...10), полученных из листьев гибридной линии озимой мягкой пшеницы с опытного поля ФАНЦ Юго-Востока и из инфекционного материала яровой мягкой пшеницы Квартет (110-22-Р.п.-1...10) из Ершовского района Саратовской области (см. рис. 1, а).

В результате молекулярного скрининга ген *Tox1* был выявлен среди изолятов, полученных с четырех сортообразцов пшеницы и пяти – тритикале. Наличие гена отмечено у изолятов *P. nodorum* с сортообразцов озимой мягкой пшеницы Саратовская 17 (88-22-Р.п.-1...10) и Левобережная 1 (92-22-Р.п.-1...10) из Балашовского района. Наличие гена *SnTox1* отмечено у моноконидиальных изолятов *P. pseudonodorum*, выделенных с инфекционного материала из гибридных линий яровой твердой пшеницы (33-21-Р.п.-1...10) и озимой мягкой пшеницы (89-22-Р.п.-1...10) из опытного поля ФАНЦ Юго-Востока, а также из сортообразцов озимого тритикале из Пугачевского района (71-22-Р.п.-1...10), Балашовского района (72-22-Р.п.-1...10) и с опытного поля ФАНЦ Юго-Восто-



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации, полученная с помощью маркеров, специфичных для генов *ToxA*, *Tox1* и *Tox3* *Parastagonospora* spp. из саратовской популяции.

а – *ToxA*, размер ампликона 573 п. н.; б – *Tox1*, размер ампликона 500 п. н.; в – *Tox3*, размер ампликона 600 п. н. М – маркер Step100 plus («Биолаб-микс»). Номера индексов, присвоенные образцам, коррелируют с индексами в табл. 1.

ка (73-22-Р.п.-1...10; 74-22-Р.п.-1...10; 76-22-Р.п.-1...10) (см. рис. 1, б).

Наличие гена *Tox3* установлено среди изолятов вида *P. pseudonodorum*, полученных из растительных образцов озимого тритикале из Балашовского района и опыт-

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:  
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx22.pdf>

**Таблица 3.** Интенсивность поражения листовыми болезнями сортов яровой и озимой мягкой пшеницы

№ п/п	Название сорта	Полевая фитопатологическая оценка сортов (2020–2022 гг.), %		Лабораторная оценка на изолированных листьях, %					
		Mean score ± SD	Фенотип	<i>Z. tritici</i>		<i>P. nodorum</i> (ToxA, Tox1, Tox3)		<i>P. pseudonodorum</i> (ToxA, Tox1, Tox3)	
				Mean score ± SD	Фенотип	Mean score ± SD	Фенотип	Mean score ± SD	Фенотип
Пшеница мягкая озимая ( <i>Triticum aestivum</i> L.)									
1	Гостианум 237 ( <b>tsn1</b> )	22 ± 11.6	MS	18 ± 7.6	R	30 ± 0	MS	23 ± 2.7	MS
2	Лютесценс 230 ( <i>Tsn1</i> )	17 ± 10.4	R	16 ± 5.5	R	29 ± 2.2	MS	29 ± 2.2	MS
3	Саратовская 8 ( <i>Tsn1</i> )	18 ± 13.7	R	29 ± 2.2	MS	36 ± 5.5	MS	36 ± 5.5	MS
4	Губерния* ( <i>Tsn1</i> )	9 ± 6.1	RR	5 ± 0.9	RR	38 ± 4.5	MS	34 ± 5.5	MS
5	Мироновская 808* ( <b>tsn1</b> )	15 ± 5	R	47 ± 4.5	S	36 ± 5.5	MS	32 ± 4.5	MS
6	Донская безостая* ( <i>Tsn1</i> )	25 ± 5	MS	30 ± 10	MS	36 ± 5.5	MS	40 ± 0	MS
7	Саратовская 90* ( <i>Tsn1</i> )	27 ± 5.8	MS	28 ± 2.7	MS	38 ± 4.5	MS	40 ± 0	MS
8	Жемчужина Поволжья* ( <i>Tsn1</i> )	27 ± 5.8	MS	40 ± 0	MS	40 ± 0	MS	40 ± 0	MS
9	Саратовская 17* ( <i>Tsn1</i> )	40 ± 10	S	41 ± 2.2	S	34 ± 5.5	MS	40 ± 0	MS
10	Калач 60* ( <i>Tsn1</i> )	16 ± 13.5	R	21 ± 5.5	MS	40 ± 0	MS	22 ± 4.5	MS
11	Подруга* ( <i>Tsn1</i> )	11 ± 6.9	R	15 ± 7.1	R	30 ± 0	MS	20 ± 0	R
12	Анастасия* ( <i>Tsn1</i> )	10 ± 8.7	RR	5 ± 0	RR	19 ± 2.2	R	14 ± 5.5	R
13	Соседка ( <i>Tsn1</i> )	13 ± 10.4	R	7 ± 2.7	RR	30 ± 0	MS	20 ± 2.7	R
Пшеница мягкая яровая ( <i>Triticum aestivum</i> L.)									
14	Фаворит* ( <b>tsn1</b> )	4 ± 1.2	RR	4 ± 1.1	RR	36 ± 5.5	MS	10 ± 0	R
15	Прохоровка* ( <b>tsn1</b> )	4 ± 1.2	RR	18 ± 2.7	R	40 ± 0	MS	28 ± 4.5	MS
16	Юго-Восточная 2* ( <b>tsn1</b> )	52 ± 12.6	S	50 ± 0	S	22 ± 4.5	MS	40 ± 0	MS
17	Саратовская 70* ( <b>tsn1</b> )	8 ± 2.9	RR	12 ± 2.7	R	23 ± 2.7	MS	22 ± 2.7	MS
18	Саратовская 73* ( <b>tsn1</b> )	8 ± 5.8	RR	20 ± 10	R	16 ± 2.2	R	18 ± 2.7	R
19	Белянка* ( <b>tsn1</b> )	15 ± 5	R	14 ± 1.1	R	24 ± 5.5	MS	12 ± 2.7	R
20	Лебедушка* ( <i>Tsn1</i> )	33 ± 5.8	MS	32 ± 4.5	MS	21 ± 2.2	MS	36 ± 5.5	MS

\* Сорт допущен к возделыванию на территории Нижневолжского региона РФ (8-й регион).

ного поля ФАНЦ Юго-Востока (72-22-Р.п.-1...10, 73-22-Р.п.-1...10 соответственно). Присутствие гена *Tox3* отмечено у изолятов, выделенных с озимой пшеницы сорта Анастасия (32-21-Р.п.-1...10), Саратовская 17 (88-22-Р.п.-1...10), Калач 60 (91-22-Р.п.-1...10; 98-22-Р.п.-1...10), Левобережная 1 (92-22-Р.п.-1...10), гибридной линии (93-22-Р.п.-1...10); с яровой пшеницы гибридных линий (80-22-Р.п.-1...10; 82-22-Р.п.-1...10), интрогрессивной линии (86-22-Р.п.-1...10), с сорта Квартет (101-22-Р.п.-1...10) (см. рис. 1, в).

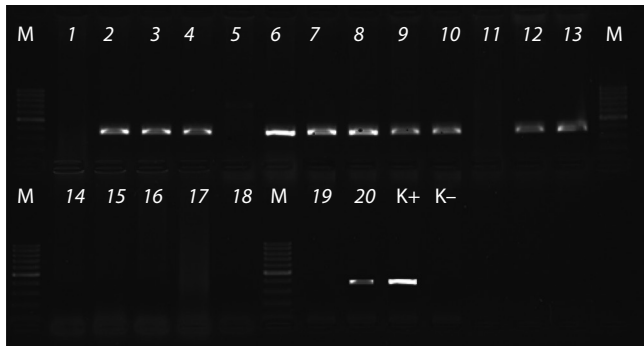
В ходе трехлетних испытаний на естественном инфекционном фоне были выделены сорта, проявившие устойчивость или слабую восприимчивость к септориозным пятнистостям (табл. 3).

Генотипирование сортов пшеницы с использованием молекулярного маркера было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсину PtrToxA. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п. н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину PtrToxA у 12 сортов озимой мягкой пшеницы: Лютесценс 230, Саратовская 8,

Губерния, Донская безостая, Саратовская 90, Жемчужина Поволжья, Саратовская 17, Калач 60, Подруга, Анастасия, Соседка и одного сорта яровой мягкой пшеницы, Лебедушка. Генотипы двух сортов озимой мягкой пшеницы: Гостианум 237 и Мироновская 808, шести сортов яровой мягкой пшеницы: Фаворит, Прохоровка, Юго-Восточная 2, Саратовская 70, Саратовская 73 и Белянка, являются носителями рецессивного аллеля гена *tsn1* и имеют защиту на генетическом уровне от PtrToxA (рис. 2, см. табл. 3).

Проведено лабораторное испытание сортов к трем возбудителям септориозных пятнистостей, характерным для региона: *Z. tritici*, *P. nodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*), *P. pseudonodorum* (*ToxA*, *Tox1*, *Tox3*). Для инокуляции использовали инфекционный материал региональных популяций 2022 г. (см. табл. 3).

При заражении образцов пшеницы видом *Z. tritici* хорошо проявили себя сорта: Губерния, Анастасия, Соседка, Фаворит. Их степень поражения в среднем не превышала 7%, они вошли в группу высокоустойчивых сортов (RR). Степень поражения видом *Z. tritici* сортов Гостианум, Лютесценс 230, Подруга, Прохоровка, Саратовская 70, Са-



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации гена *Tsn1* у сортов озимой и яровой мягкой пшеницы (размер ампликона 380 п. н.).

Номера, указанные для образцов, соответствуют списку сортов в табл. 3 (положительный контроль (К+) – сорт Glenlea, отрицательный контроль (К-) – линия 6В365).

ратовская 73, Беянка не превысила 20 %, что позволило отнести эти сорта в группу устойчивых (R).

Устойчивость к *P. nodorum* подтвердили два сорта: Анастасия и Саратовская 73, к *P. pseudonodorum* – шесть сортов: Подруга, Анастасия, Соседка, Фаворит, Саратовская 73 и Беянка.

При применении статистического метода корреляционного анализа установлена слабая прямая взаимосвязь между показателями наличия гена *Tsn1* в генотипе сорта пшеницы и интенсивностью поражения его видами *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, содержащими ген *ToxA* в изолятах, вошедших в состав инокулюма (коэффициент корреляции равен 0.3 и 0.2 соответственно).

Отмечена сильная прямая корреляция между показателями общей степени поражения септориозом листовой пластины в поле и степенью поражения образцов пшеницы *Z. tritici* (0.8) и *P. pseudonodorum* (0.7) в лаборатории. Показатели степени поражения сортов пшеницы *Z. tritici* имели прямую взаимосвязь со степенью поражения *P. pseudonodorum* (0.77), *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* (0.4), *Z. tritici* и *P. nodorum* (0.2).

Критерий Кохрена, *Q*, позволил разделить изученные сорта пшеницы на четыре группы по устойчивости к трем патогенам: 1 – отсутствие устойчивости к возбудителям септориоза; 2 – устойчивость к одному виду; 3 – устойчивость к двум видам; 4 – устойчивость к трем видам-возбудителям. Значение коэффициента  $Q = 36.35$  при уровне значимости  $p$  меньше 0.009 говорит о том, что сорта достоверно отличались друг от друга по устойчивости/восприимчивости к возбудителям септориоза *Z. tritici*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*. Результаты теста представлены в табл. 4 и Приложении 2.

## Обсуждение

Септориозы – опасные заболевания пшеницы, они являются одними из наиболее вредоносных на полях Саратовской области. В 2017 г. на посевах озимой пшеницы зафиксирована сильная эпифитотия септориоза (поражение составило до 67 %). В 2018–2019 гг. интенсивность поражения *Z. tritici* была не более 25 %. Поражение септориозом, превысившее порог 40 %, отмечено в 2020 г. – 45 % и в 2021 г. – 41 % (Конькова и др., 2022).

**Таблица 4.** Непараметрический статистический анализ показателей фитопатологической оценки сортов к возбудителям септориоза

Сорт	Q-критерий Кохрена. Изучена устойчивость к трем фитопатогенам у 20 сортов пшеницы (df = 19); $Q = 36.35$ ; $p < 0.009$
Название фитопатогена, к которому проявлена устойчивость	
Пшеница мягкая озимая ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	
Гостианум 237, Лютесценс 230, Губерния	<i>Z. tritici</i>
Подруга, Соседка	<i>Z. tritici</i> , <i>P. pseudonodorum</i>
Анастасия	<i>Z. tritici</i> , <i>P. nodorum</i> , <i>P. pseudonodorum</i>
Пшеница мягкая яровая ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	
Прохоровка, Саратовская 70	<i>Z. tritici</i>
Фаворит	<i>Z. tritici</i> , <i>P. nodorum</i>
Беянка	<i>Z. tritici</i> , <i>P. pseudonodorum</i>
Саратовская 73	<i>Z. tritici</i> , <i>P. nodorum</i> , <i>P. pseudonodorum</i>

Предложенное исследование – одно из первых в данном регионе. Оно включает в себя комплексный скрининг районированных и перспективных сортов озимой и яровой мягкой пшеницы, а также молекулярный анализ на присутствие генов, кодирующих NEs в популяциях фитопатогенов и генов в растительных генотипах, контролирующей устойчивость к болезни.

В ходе проведенных исследований показано, что среди генотипов изученных изолятов *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* саратовской популяции была широкая представленность генов *Tox1* и *Tox3*, тогда как ген *ToxA* зафиксирован только у изолятов 93-22-Р.н.-1...10 и 101-22-Р.н.-1...10 вида *P. nodorum*. Полученные результаты согласуются с зарубежными публикациями (Richards et al., 2022), сообщающими, что распространенность генов *Tox267* и *Tox1* значительно выше, чем *ToxA*, в генотипах популяций *P. nodorum*, территориально отдаленных от российских.

Известно, что *P. nodorum* является донором гена *ToxA* для *Pyrenophora tritici-repentis*. Эти два вида имеют общий токсин PtrToxA (Ciuffetti et al., 1997). Недавно ген *ToxA* был идентифицирован у гриба, вызывающего пятнистости пшеницы, – *Bipolaris sorokiniana* (McDonald et al., 2017; Friesen et al., 2018). Это означает, что сорта озимой пшеницы Гостианум 237 (*tsn1*), Мироновская 808 (*tsn1*) и яровой пшеницы Фаворит (*tsn1*), Прохоровка (*tsn1*), Юго-Восточная 2 (*tsn1*), Саратовская 70 (*tsn1*), Саратовская 73 (*tsn1*), Беянка (*tsn1*) защищены от токсина гена *ToxA* сразу четырех опасных фитопатогенов: *P. tritici-repentis*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*, *B. sorokiniana*.

В работе Н.М. Коваленко с коллегами (2022) показаны результаты идентификации аллеля *Tsn1/tsn1* с использованием молекулярного маркера *Xfcp623* у 35 сортов ози-

мой и 31 сорта яровой пшеницы, впервые включенных в Государственный реестр селекционных достижений в 2018–2020 гг. Из них только 9 сортов озимой и 4 сорта яровой пшеницы несли *Tsn1*, что говорит о восприимчивости к PtrToxA, тогда как остальные сорта имеют защиту от токсина на генетическом уровне. Считаем это большим достижением отечественной селекции. В работе T.L. Friesen с коллегами (2018) отмечается, что поддержание *tsn1* в генотипах допущенных к возделыванию сортов пшеницы не только обеспечивает селективное преимущество перед патогенами, которые в настоящее время являются переносчиками *ToxA*, но также может оказывать селекционное давление на новые или более подходящие патогены, приобретающие *ToxA* посредством горизонтального переноса.

### Заключение

Таким образом, с использованием молекулярных маркеров проведена идентификация генов, кодирующих NES у двух видов, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, популяций Саратовской области. У моноконидиальных изолятов отмечались как единичные гены *Tox1*, *Tox3* и *ToxA*, так и сочетания по два гена в одном генотипе. По наличию характерного продукта амплификации можно предположить наличие двух NES генов, *ToxA* и *Tox3*, у моноконидиальных изолятов *P. nodorum* 93-22-P.n.-1...10 и 101-22-P.n.-1...10; *Tox1* и *Tox3* – у изолятов 88-22-P.n.-1...10, 92-22-P.n.-1...10, 72-22-P.ps.-1...10; одного гена, *Tox1*, в генотипах изолятов 33-21-P.n.-1...10, 71-22-P.ps.-1...10, 89-22-P.ps.-1...10; гена *Tox3* – в генотипах 32-21-P.n.-1...10; 80-22-P.n.-1...10, 82-22-P.n.-1...10, 86-22-P.n.-1...10; 91-22-P.n.-1...10; 98-22-P.n.-1...10 и 73-22-P.ps.-1...10.

Коллекция из 20 сортов (16 районированных и 4 перспективных) была изучена на устойчивость/восприимчивость к возбудителям септориоза на опытном поле ФАНЦ Юго-Востока в период 2020–2022 гг., а также в лабораторных условиях. У сортов проведен скрининг методом ПЦР на присутствие доминантного или рецессивного гена (*Tsn1/tsn1*), контролирующего чувствительность к токсину гриба PtrToxA. Таким образом, наибольший интерес представляют 11 сортов, обладающих устойчивостью как к одному, так и к двум или трем видам фитопатогенов (*Z. tritici*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*). Это сорта саратовской селекции: Анастасия (*Tsn1*), Белянка (*tsn1*), Госстианум 237 (*tsn1*), Губерния (*Tsn1*), Лютеценс 230 (*Tsn1*), Подруга (*Tsn1*), Прохоровка (*tsn1*), Саратовская 70 (*tsn1*), Саратовская 73 (*tsn1*), Соседка (*Tsn1*) и Фаворит (*tsn1*).

### Список литературы / References

Зеленева Ю.В., Аблова И.Б., Судникова В.П., Мохова Л.М., Конькова Э.А. Видовой состав возбудителей септориозов пшеницы в европейской части России и идентификация генов-эффекторов *SnToxA*, *SnTox1* и *SnTox3*. *Микология и фитопатология*. 2022; 56(6):441-447. DOI 10.31857/S0026364822060113.  
[Zeleneva Yu.V., Ablova I.B., Sudnikova V.P., Mokhova L.M., Konkova E.A. Species composition of wheat septoria pathogens in the European part of Russia and identifying *SnToxA*, *SnTox1* and *SnTox3* effector genes. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2022;56(6):441-447. DOI 10.31857/S0026364822060113. (in Russian)]  
Коваленко Н.М., Шайдаук Е.Л., Гуляева Е.И. Характеристика устойчивости районированных сортов мягкой пшеницы к воз-

будителю желтой пятнистости. *Биотехнология и селекция растений*. 2022;5(2):15-24. DOI 10.30901/2658-6266-2022-2-03.

[Kovalenko N.M., Shaydayuk E.L., Gulyaeva E.I. Characterization of commercial common wheat cultivars for resistance to tan spot causative agent. *Biotechnologiya i Selektiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2022;5(2):15-24. DOI 10.30901/2658-6266-2022-2-03. (in Russian)]

Коломиец Т.М., Пахолкова Е.В., Дубовая Л.П. Отбор исходного материала для создания сортов пшеницы с длительной устойчивостью к септориозу. М.: Печатный город, 2017.

[Kolomiets T.M., Pakholkova E.V., Dubovaya L.P. Selection of Starting Material for the Creation of Wheat Cultivars with Long-term Resistance to Septoria. Moscow: Pechatnyy gorod Publ., 2017. (in Russian)]

Конькова Э.А., Лящева С.В., Сергеева А.И. Скрининг мировой коллекции озимой мягкой пшеницы по устойчивости к листовым болезням в условиях Нижнего Поволжья. *Зерновое хозяйство России*. 2022;14(2):36-40. DOI 10.31367/2079-8725-2022-80-2-36-40.

[Konkova E.A., Lyashcheva S.V., Sergeeva A.I. Screening of the world winter bread wheat collection for leafstem disease resistance in the Lower Volga Region. *Zernovoe Khozyajstvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2022;14(2):36-40. DOI 10.31367/2079-8725-2022-80-2-36-40. (in Russian)]

Пахолкова Е.В. Септориоз зерновых культур в различных регионах Российской Федерации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Большие Вяземы, 2003.

[Pakholkova E.V. Septoria disease of grain crops in various regions of the Russian Federation: Cand. Sci. (Biol). Dissertation. Bol'shiye Vyazemy, 2003. (in Russian)]

Пыжикова Г.В., Карасева Е.В. Методика изучения возбудителей септориоза на изолированных листьях пшеницы. *С.-х. биология*. 1985;12:112-114.

[Pyzhikova G.V., Karaseva E.V. Methods of studying Septoria on isolated wheat leaves. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1985;12:112-114. (in Russian)]

Пыжикова Г.В., Санина А.А., Супрун Л.М., Курахтанова Т.И., Гогава Т.И., Мепаришвили С.У., Анциферова Л.В., Кузнецов Н.С., Игнатов А.Н., Кузьмичев А.А. Методы оценки устойчивости селекционного материала и сортов пшеницы к септориозу. М., 1989.

[Pyzhikova G.V., Sanina A.A., Suprun L.M., Kurakhtanova T.I., Gogava T.I., Meparishvili S.U., Antsiferova L.V., Kuznetsov N.S., Ignatov A.N., Kuzmichev A.A. Methods for Assessing the Resistance of Breeding Material and Wheat Cultivars to Septoria. Moscow, 1989. (in Russian)]

Санин С.С., Ибрагимов Т.З., Стрижекозин Ю.А. Метод расчета потерь урожая пшеницы от болезней. *Защита и карантин растений*. 2018;1:11-15.

[Sanin S.S., Ibragimov T.Z., Strizhekozin Yu.A. Method for calculating wheat yield losses diseases. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2018;1:11-15. (in Russian)]

Abeysekara N.S., Faris J.D., Chao S., McClean P.E., Friesen T.L. Whole-genome QTL analysis of *Stagonospora nodorum* blotch resistance and validation of the SnTox4-*Snn4* interaction in hexaploid wheat. *Phytopathology*. 2012;102(1):94-104. DOI 10.1094/PHYTO-02-11-0040.

Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology*. 2007;97(6):694-701. DOI 10.1094/PHYTO-97-6-0694.

Ciuffetti L.M., Tuori R.P., Gaventa J.M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell*. 1997;9(2):135-144. DOI 10.1105/tpc.9.2.135.

Croll D., Crous P.W., Pereira D., Mordecai E.A., McDonal B.A., Brunner P.C. Genome-scale phylogenies reveal relationships among *Parastagonospora* species infecting domesticated and wild grasses. *Persoonia*. 2021;46:116-128. DOI 10.3767/persoonia.2021.46.04.

Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12(1):13-15.

- Faris J.D., Zhang Z., Lu H.J., Lu S.W., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(30):13544-13549. DOI 10.1073/pnas.1004090107.
- Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector *SnToxA* among isolates is correlated with levels of disease in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011;24(12):1419-1426. DOI 10.1094/MPMI-04-11-0094.
- Ficke A., Cowger C., Bergstrom G., Brodal G. Understanding yield loss and pathogen biology to improve disease management: Septoria nodorum blotch – a case study in wheat. *Plant Dis.* 2018;102(4):696-707. DOI 10.1094/PDIS-09-17-1375-FE.
- Friesen T.L., Chu C.G., Liu Z.H., Xu S.S., Halley S., Faris J.D. Host-selective toxins produced by *Stagonospora nodorum* confer disease susceptibility in adult wheat plants under field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(8):1489-1497. DOI 10.1007/s00122-009-0997-2.
- Friesen T.L., Holmes D.J., Bowden R.L., Faris J.D. *ToxA* is present in the U.S. *Bipolaris sorokiniana* population and is a significant virulence factor on wheat harboring *Tsn1*. *Plant Dis.* 2018;102(12):2446-2452. DOI 10.1094/PDIS-03-18-0521-RE.
- Gao Y., Faris J.D., Liu Z., Kim Y.M., Syme R.A., Oliver R.P., Xu S.S., Friesen T.L. Identification and characterization of the *SnTox6-Snn6* interaction in the *Parastagonospora nodorum* – wheat pathosystem. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015;28(5):615-625. DOI 10.1094/MPMI-12-14-0396-R.
- Hafez M., Gourlie R., Despains T., Turkington T.K., Friesen T.L., Aboukhaddour R. *Parastagonospora nodorum* and related species in Western Canada: genetic variability and effector genes. *Phytopathology.* 2020;110(12):1946-1958. DOI 10.1094/PHYTO-05-20-0207-R.
- Kariyawasam G.K., Richards J.K., Wyatt N.A., Running K.L.D., Xu S.S., Liu Z., Borowicz P., Faris J.D., Friesen T.L. The *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector *SnTox5* targets the wheat gene *Snn5* and facilitates entry into the leaf mesophyll. *New Phytol.* 2022;233(1):409-426. DOI 10.1111/nph.17602.
- Liu Z., Faris J.D., Oliver R.P., Tan K.C., Solomon P.S., McDonald M.C., McDonald B.A., Nunez A., Lu S., Rasmussen J.B., Friesen T.L. *SnTox3* acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the *Snn3* gene. *PLoS Pathog.* 2009;5(9):e1000581. DOI 10.1371/journal.ppat.1000581.
- Liu Z., Zhang Z., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon P.S., Lu S., Shelver W.L., Xu S., Friesen T.L. The cysteine rich necrotrophic effector *SnTox1* produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1*. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002467. DOI 10.1371/journal.ppat.1002467.
- McDonald M.C., Ahren D., Sempendorfer S., Milgate A., Solomon P.S. The discovery of the virulence gene *ToxA* in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Mol. Plant Pathol.* 2017;19:432-439. DOI 10.1111/mpp.12535.
- Navathe S., Yadav P.S., Chand R., Mishra V.K., Vasistha N.K., Meher P.K., Joshi A.K., Gupta P.K. *ToxA-Tsn1* interaction for spot blotch susceptibility in Indian wheat: an example of inverse gene-for-gene relationship. *Plant Dis.* 2020;104(1):71-81. DOI 10.1094/PDIS-05-19-1066-RE.
- Richards J.K., Kariyawasam G.K., Seneviratne S., Wyatt N.A., Xu S.S., Liu Z., Faris J.D., Friesen T.L. A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* *SnTox267* effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat. *New Phytol.* 2022;233(1):427-442. DOI 10.1111/nph.17601.
- Sharma S. Genetics of Wheat Domestication and *Septoria Nodorum* Blotch Susceptibility in Wheat. Fargo, North Dakota: North Dakota State University, 2019.
- Shi G., Zhang Z., Friesen T.L., Bansal U., Cloutier S., Wicker T., Rasmussen J.B., Faris J.D. Marker development, saturation mapping, and high-resolution mapping of the Septoria nodorum blotch susceptibility gene *Snn3-B1* in wheat. *Mol. Genet. Genom.* 2016a;291(1):107-119. DOI 10.1007/s00438-015-1091-x.
- Shi G., Zhang Z., Friesen T.L., Raats D., Fahima T., Brueggeman R.S., Lu S., Trick H.N., Liu Z., Chao W., Frenkel Z., Xu S.S., Rasmussen J.B., Faris J.D. The hijacking of a receptor kinase-driven pathway by a wheat fungal pathogen leads to disease. *Sci. Adv.* 2016b;2(10):e1600822. DOI 10.1126/sciadv.1600822.
- van Schie C.C., Takken F.L. Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014;52:551-581. DOI 10.1146/annurev-phyto-102313-045854.
- Virdi S.K., Liu Z., Overlander M.E., Zhang Z., Xu S.S., Friesen T.L., Faris J.D. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and Septoria nodorum blotch. *G3 (Bethesda).* 2016;6(12):4139-4150. DOI 10.1534/g3.116.036525.
- Zhang Z., Friesen T.L., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. *Mol. Breeding.* 2009;23:35-49. DOI 10.1007/s11032-008-9211-5.
- Zhang Z., Friesen T.L., Xu S.S., Shi G., Liu Z., Rasmussen J.B., Faris J.D. Two putatively homoeologous wheat genes mediate recognition of *SnTox3* to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum*. *Plant J.* 2011;65(1):27-38. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2010.04407.x.

#### ORCID ID

Yu.V. Zeleneva orcid.org/0000-0001-9716-288X  
E.A. Konkova orcid.org/0000-0001-8607-2301

**Благодарности.** Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-76-30005.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.04.2023. После доработки 28.06.2023. Принята к публикации 29.06.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Развитие селекции яровой твердой пшеницы в России (странах бывшего СССР), результаты и перспективы

П.Н. Мальчиков<sup>1,2</sup>✉, М.Г. Мясникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, п. г. т. Безенчук, Самарская область, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
✉ [sagrs-mal@mail.ru](mailto:sagrs-mal@mail.ru)

**Аннотация.** В статье представлен исторический обзор введения в культуру, распространения и селекции яровой твердой пшеницы в степных и лесостепных регионах Евразии (страны бывшего СССР – Россия, Украина, Казахстан). Приведены подходы и методология улучшения твердой пшеницы по периодам научной селекции. Рассматриваются особенности реализации программ и расширения масштабов селекции во время организации селекционных станций в начале XX в., после завершения Великой Отечественной войны, во второй половине XX в. и в настоящее время. Представлена характеристика по основным признакам и свойствам созданных в разные периоды сортов. Анализируются достижения классической селекционной методики путем сравнения старых и новых сортов. Дана оценка эффективности и темпов селекции в разных регионах России. Приведены результаты и методы селекции на урожайность, устойчивость к засухе, болезням листьев (*Stagonospora nodorum* Berk., *Septoria tritici* (Roeb. et Desm.), *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Pyrenophora tritici repentis* (Died.) Drechs., *Fusarium* sp., *Puccinia titicina* Eriks., *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks., *Blumeria graminis* (DC.) f. sp. *tritici* Em. Marchal.), патогенам зерна *Ustilago tritici* (Pers.) Rostr.) и патогенам, вызывающим потемнение зародыша и эндосперма (*B. sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Alternaria tenuis* (Nees et Fr.), *Alternaria triticina* (Prasada & Prabhu)), вредителям (*Cephus pygmeus* Lens, *Osinosoma frit* L., *Mayetiola destructor* (Say)), по качеству зерна (содержание белка, желтых пигментов, реологические свойства теста, устойчивость к прорастанию) и конечных продуктов. Оцениваются перспективы применения в ближайшем будущем молекулярных маркеров в селекции по ряду признаков.

Ключевые слова: твердая пшеница; Евразийский регион; сорт; история селекции; темпы селекции; устойчивость; патоген; урожайность; качество; белок; клейковина; пигменты; маркеры.

**Для цитирования:** Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Развитие селекции яровой твердой пшеницы в России (странах бывшего СССР), результаты и перспективы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):591-608. DOI 10.18699/VJGB-23-71

## Development, results and prospects of the spring durum wheat breeding in Russia (post-Soviet states)

P.N. Malchikov<sup>1,2</sup>✉, M.G. Myasnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Samara Federal Research Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Samara Scientific Research Agriculture Institute named after N.M. Tulajkov, Bezenchuk, Samara region, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
✉ [sagrs-mal@mail.ru](mailto:sagrs-mal@mail.ru)

**Abstract.** The article outlines a brief historical background on the introduction to cultivation, distribution and breeding of spring durum wheat in the steppe and forest-steppe regions of Eurasia (the countries of the former USSR: Russia, Ukraine, and Kazakhstan). The approaches and methodology for improving durum wheat during certain scientific selection periods are given. The features of the selection program implementation and the breeding scale expansion during the creation of breeding stations at the beginning of the 20th century, after the end of the Great Patriotic War, in the second half of the 20th century, and at present are considered. A characteristic according to the main features and properties of varieties created in different periods is given. The achievements of the classical breeding method by comparing old and new varieties are analyzed. The efficiency and rate of wheat selection by periods in different regions of Russia is estimated. The results and methods of breeding for yield, resistance to drought, leaf diseases (*Stagonospora nodorum* Berk., *Septoria tritici* (Roeb. et Desm.), *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Pyrenophora tritici repentis* (Died.) Drechs., *Fusarium* sp., *Puccinia titicina* Eriks., *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks., *Blumeria graminis* (DC.) f. sp. *tritici* Em. Marchal), grain pathogens *Ustilago tritici* (Pers.) Rostr.) and pathogens causing darkening of the coracule and endosperm (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Alternaria tenuis* (Nees et Fr.), *Alternaria triticina* (Prasada & Prabhu)), pests (*Cephus pygmeus* Lens, *Osinosoma frit* L., *Mayetiola destructor* (Say)), grain quality

(protein content, amount of yellow pigments, dough rheology, sprouting resistance) and end products are presented. The prospects for the molecular marker application for a number of traits in breeding in the near future are given.

Key words: durum wheat; Eurasian region; variety; breeding history; breeding rates; crop resistance; pathogen; yield; quality; protein; gluten; pigments; markers.

**For citation:** Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Development, results and prospects of the spring durum wheat breeding in Russia (post-Soviet states). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023; 27(6):591-608. DOI 10.18699/VJGB-23-71

## Введение

Твердая пшеница имеет большое значение в производстве и потреблении специфических продуктов питания (макаронные изделия, крупы, хлеб) с длительным периодом хранения, обладающих высокой питательной ценностью, пользующихся спросом почти во всех регионах мира. Основными производителями твердой пшеницы (в млн т) являются: Европейский союз – около 9.0 (в том числе Италия – 4.3; Франция – 1.9; Греция – 1.1; Испания – 1.0), Канада – 5.2; Турция – 3.7; США – 2.3; Казахстан, Сирия, Алжир – по 2.2; Марокко – 1.8; Мексика – 1.5; Тунис – 1.0 (Eurostat, 2019). В России внутреннее потребление зерна твердой пшеницы составляет около 1.0 млн т в год, в том числе 0.2 импортируется, в основном из Казахстана (Groshev, 2019). Значительное сокращение посевных площадей (от 20 млн га в 1990 г. до 0.45 млн га в 1994 г.) и производства зерна твердой пшеницы в России произошло при переходе от плановой экономики к рыночной в 90-е годы XX в. (рис. 1).

Снижение уровня производства твердой пшеницы можно объяснить более высокой конкурентоспособностью культур озимого (озимая мягкая пшеница, озимая рожь) и ярового сева (ячмень, яровая мягкая пшеница) по отношению к твердой пшенице, которая в России представлена главным образом сортами ярового образа жизни. Она выращивается без орошения в условиях резко континентального засушливого климата с годовым количеством осадков от 250 до 450 мм в год. Биотические стрессы включают вредителей (тля, клопы, трипсы, злаковые мухи, хлебный пилильщик) и патогены (гельминтоспориозная и фузариозная пятнистости листьев, септориоз, мучнистая роса, стеблевая и в отдельные годы бурая ржавчина). Эффект вредоносности патогенов в эпифитотийные годы может достигать уровня потерь урожая от сильной засухи (Васильчук, 2001; Рсалиев и др., 2020; Tajibayev et al., 2021). Основные проблемы в селекции яровой твердой пшеницы

в России связаны с поиском и реализацией возможности уменьшения действия этих лимитирующих факторов среды и улучшением качества зерна и конечных продуктов.

## Предыстория культуры твердой пшеницы

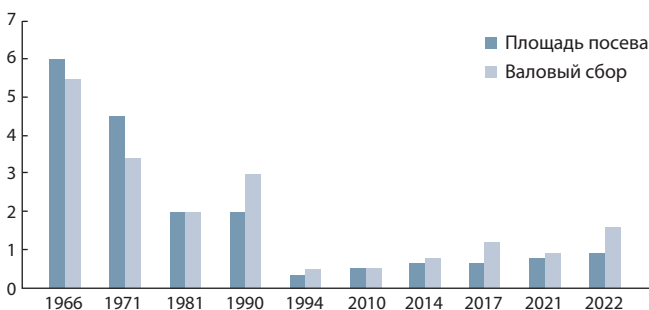
На территории бывшего СССР тетраплоидная пшеница в виде полбы *T. dicoccum* Schrank ex Schübler возделывалась в районах современных регионов Хмельницкой области Украины и Азербайджана – в IV и II тысячелетии до н. э. соответственно. Появление непосредственно твердой пшеницы (*T. durum* Desf.) отмечено в IX в. в Сумской области современной Украины (Голик В.С., Голик О.В., 2008). Затем с XVI–XVIII вв. она широко распространяется в степных и лесостепных регионах России – Центрально-Черноземная область, Поволжье, Северный Кавказ, Урал, Западная Сибирь, Украина и Западный Казахстан (Голик В.С., Голик О.В., 2008; Гончаров, 2012). Возделывались здесь местные сорта – популяции (ландрасы): Белотурка, Кубанка, Гарновка, Арнаутка и др.

В течение нескольких веков по мере освоения новых земель площадь возделывания ландрасов возрастала, параллельно формировались региональные биотипы, которые сохраняли первоначальное (в момент интродукции) название (например, Кубанка), но приобретали в процессе длительной репродукции со сменой доминирующих в популяции разновидностей, региональные особенности. Поэтому в коллекции российских генетических ресурсов Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) представлено несколько Кубанок, Белотурок и др., с приставкой к названию региона происхождения.

## Научная селекция: развитие сети селекционных учреждений, общая методология и результаты селекции с начала XX в. до настоящего времени

Архивные документы департамента земледелия России (Германцев, Ильина, 2019) содержат доклад от 1848 г. о семеноводстве, где приводятся данные о том, что крестьяне Саратовского Заволжья (Новоузенский уезд) для посева отбирали лучшие колосья, т. е. проводили улучшающий массовый отбор. Стекловидность зерна и высокое содержание белка в нем были основными достоинствами российской твердой пшеницы. В конце XIX в. итальянская и французская макаронная промышленность работала исключительно на русской твердой пшенице (Шехурдин, 1961).

Научные подходы к ведению сельского хозяйства и улучшению растений формировались в опытных учреждениях Российской империи с момента открытия Горьгорецкого института земледелия с опытным полем в 1840 г.,



**Рис. 1.** Динамика посевных площадей (млн га) и валовых сборов зерн (млн т) твердой пшеницы в России, 1966–2022 гг.

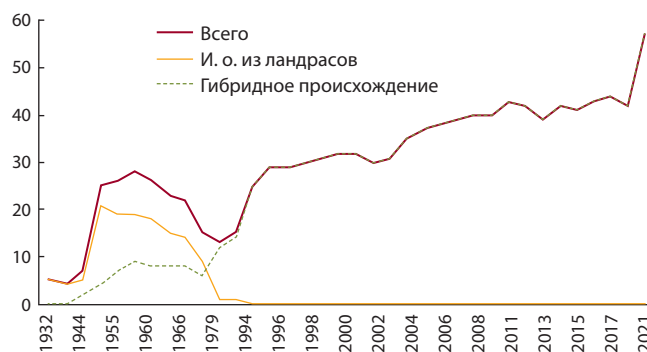


Рижской опытной станции в 1864 г. и Петровской сельскохозяйственной академии в 1867 г. К 1917 г. в России функционировало около 400 опытных учреждений, в том числе 44 опытные станции. Изучение твердой пшеницы было сосредоточено на опытных станциях в степных регионах Украины, Поволжья, Южного Урала, Сибири и Казахстана. Научная селекция этой культуры началась в 1909 г. на Краснокутской селекционной станции в Саратовском Заволжье – центре производства наиболее качественной и востребованной в то время твердой пшеницы. Затем к селекции приступили на Саратовской (1911 г.) и Безенчукской (1912 г.) опытных станциях, расположенных также в Поволжье. В это же время В.В. Таланов начал селекцию твердой пшеницы на Екатеринославской опытной станции (Украина) и продолжил ее на Западно-Сибирской опытной станции.

Одной из главных задач, поставленных, в частности, перед Краснокутской селекционной станцией, Новоузенским уездным земством, было выведение более урожайных сортов (Германцев, Ильина, 2019). Проблемы качества зерна, выращенного в Поволжье, не существовало, так как любое его количество потреблялось рынками России и Европы (Чехович, 1924). Селекционной работой на Краснокутской станции руководил К.Ю. Чехович, который позднее продолжил ее на Безенчукской опытной станции. Под его руководством были организованы сбор и изучение местных образцов твердой пшеницы из Самарской, Саратовской, Оренбургской, Кубанской и Уральской областей.

Первыми сортами в системе государственного сортоиспытания в 1924 г. (Государственная сортоиспытательная сеть при Наркомземе РСФСР) были: Кубанка 5, Гордеиформе 10, Гордеиформе 432, Гордеиформе 189, Мелянопус 69, Гордеиформе 111, Мелянопус 209, Гордеиформе массового отбора А.И. Носатовского, Арнаутка Кочина, Mindum (отбор из Арнаутки Миннесотской опытной станции США), оригинаторами которых были восемь селекционных учреждений (Таланов, 1926). В период с конца 1920-х до середины 1930-х годов Мелянопус 69, Гордеиформе 189, Гордеиформе 10, Гордеиформе 432, Гордеиформе 27 были допущены к использованию и получили наибольшее распространение в СССР (Таланов, 1926). Сорта Мелянопус 69 и Гордеиформе 189 занимали 2.7 и 0.35 млн га посевов в СССР соответственно. Третьим по распространению был сорт Гордеиформе 10 – 0.25 млн га. Мелянопус 69 и Гордеиформе 189 созданы отбором из местных сортов Новоузенского уезда Самарской губернии и Уральской области соответственно. По свидетельству В.В. Таланова (1926), отбор провел в 1911 г. К.Ю. Чехович. После многолетнего изучения под руководством академика П.Н. Константинова они были рекомендованы для использования в крестьянских хозяйствах.

Морфологическое и ботаническое разнообразие местных сортов твердой пшеницы требовало объяснения. По мнению К.Ю. Чеховича (1924), было необходимо решение ряда вопросов по физиологии, чтобы селекция имела планомерный характер. Наиболее успешно работа велась методами аналитической селекции на исходном материале местных сортов. Несмотря на ее результативность, во всех селекционных учреждениях были сформированы коллекции сортов из разных эколого-географических групп,



**Рис. 2.** Динамика количества сортов твердой пшеницы в СССР (1932–1991 гг.) и в России (1992–2021 гг.), в том числе полученных отбором из ландрасов и методом гибридизации.

которые включали во внутривидовые и межвидовые скрещивания. Эффективность селекции увеличилась после пополнения генетических ресурсов экспедициями Н.И. Вавилова, открытия им центров происхождения культурных растений, обоснования системного подхода к поиску и изучению исходного материала. Селекция с применением гибридизации была успешнее при работе с мягкой пшеницей. Сорта гибридного происхождения стали доминировать среди коммерческих сортов мягкой пшеницы в середине 1930-х годов, среди сортов твердой пшеницы – к началу 1970-х годов (рис. 2).

Это объясняется стремлением государственных органов управления и хозяйствующих субъектов получить высокий результат по урожайности и валовому сбору зерна, что успешно достигалось при возделывании мягкой пшеницы и концентрировалось на ней внимание селекционеров. Доминирование в СССР в 1950-е годы теории Т.Д. Лысенко также снизило эффективность селекции, в том числе твердой пшеницы. В военное время (1941–1945 гг.) многие селекционные учреждения оккупированных областей либо прекратили свою деятельность, либо были эвакуированы, при этом часть селекционного материала была утеряна (Голик В.С., Голик О.В., 2008). Учреждения, находившиеся в тылу, из-за нехватки средств и персонала сократили исследования и объемы селекционной работы. Тем не менее в 1954 г. в каталог коммерческих сортов яровой твердой пшеницы СССР было включено 25 сортов (Каталоги..., 1954–1992). Доминировали среди них отборы из ландрасов – 21 сорт. Наибольшее распространение, так же как и в 1930-е годы, имели сорта Краснокутской селекционной станции – Мелянопус 1932, Мелянопус 69, Гордеиформе 189, из них Мелянопус 1932 создан от скрещивания ландрасов, Мелянопус 26 – от скрещивания Мелянопус 69/Мелянопус 1932.

В течение 40 лет сорта Краснокутской селекционной станции удерживали монополию, занимая в отдельные годы 86.0 % посевов твердой пшеницы в СССР (Германцев, Ильина, 2019). Мелянопус 69 почти 30 лет на мировом рынке являлся эталоном качества зерна (Шехурдин, 1961; Соратники Николая Ивановича Вавилова..., 1994). Значительное распространение имели сорта Гордеиформе 432, Гордеиформе 5695 (Институт Юго-Востока, Саратов), Леукурум 33 (Безенчукская ОС).

В Казахстане были районированы сорта местной селекции Акмолинка 5 с высоким качеством и устойчивостью к патогенам, вызывающим черный зародыш (Дорофеев и др., 1987), и Кустанайская 14. На Северном Кавказе реализован устойчивый к шведской мухе сорт Краснодарская 362 (Краснодарская ОС), полученный от скрещивания Гордеиформе 10 с образцом из Алжира, на Украине значительное распространение (0.9 млн га) в 1950–1960-е годы имел сорт Народная – отбор из местного сорта на Харьковской селекционной станции.

В середине 1960-х годов в СССР было районировано 23 сорта твердой пшеницы (Каталоги..., 1954–1992). Из них 15 – это отборы из ландрасов, 8 – отборы из гибридных популяций. Основные площади товарных посевов занимали сорта Мелянопус 1932 и Мелянопус 26 Краснокутской селекционной станции. В 1957 г. был районирован сорт Харьковская 46, созданный Украинским НИИ растениеводства селекции и генетики (УНИИРСИГ) от скрещивания линии 34-5129 (межвидовой гибрид *T. turgidum*/*T. dicoccum*), предположительно, или с алжирской твердой пшеницей из коллекции ВИР, или с линией Харьковской станции. Обе версии подтвердить не удалось из-за потери во время Великой Отечественной войны (1941–1945 гг.) первичной документации (Голик В.С., Голик О.В., 2008). Сорт отличался продуктивностью, отзывчивостью на благоприятные условия среды, был достаточно устойчив к засухе, выделялся по содержанию белка и клейковины. К 1969 г. в СССР он занял основные площади под твердой пшеницей – 4.9 млн га (Голик В.С., Голик О.В., 2008).

В Среднем Поволжье были районированы сорта Куйбышевской (Безенчукской) ОС – Безенчукская 102 (1962 г.) и Безенчукская 105 (1965 г.). В родословной обоих сортов есть линия Леукурум Б-40, полученная от скрещивания Мелянопус 212 и Гордеиформе 1717 – межвидового гибрида ландрасов мягкой и твердой пшеницы. Наибольшее практическое значение имел сорт Безенчукская 105 (Благонадеждина, 1968), который проявил хорошую комбинационную способность, особенно перспективными оказались скрещивания с Харьковской 46, гибридные популяции на их основе с большой частотой давали трансгрессии по адаптивности в регионе Среднего Поволжья и Урала (сорта Оренбургская 2, Оренбургская 10, Безенчукская 182, Безенчукский янтарь и их потомки).

В 1962 г. районирован сорт Красноярского НИИСХ Ракета, полученный от межвидовой гибридизации Гордеиформе 27\*2/Забайкальская полба, который был хорошим компонентом для гибридизации. Он входит в родословную двух коммерческих сортов с высоким содержанием желтых пигментов в зерне – Саратовская золотистая и Светлана (Васильчук, 2001; Мальчиков, Мясникова, 2020).

В следующее десятилетие (1969–1979) количество районированных сортов яровой твердой пшеницы в СССР сократилось до 13 (Каталоги..., 1954–1992). В их числе было всего два сорта негибридного происхождения, один из них – сорт Народная на Украине, другой – Шавпха местная – в Грузии. Сокращение общего количества сортов можно объяснить высоким уровнем продуктивности и конкурентоспособности во всех регионах Харьковской 46. Локальное значение имели сорта: Зерноградская 39, Крас-

нодарская 362 и Мелянопус 7 на Северном Кавказе; Краснокутка 6, Мелянопус 26, Леукурум 43, Саратовская 40, Саратовская 41 – в Поволжье; Народная и Накат – на Украине.

В каталог районированных сортов СССР 1985 г. включено 15 сортов твердой пшеницы, 5 из них – с 1979 г.: Алмаз (Сибирского НИИСХ), Алтайка (Алтайского НИИ земледелия и селекции), Безенчукская 139 (Куйбышевского НИИСХ), Оренбургская 2 (Оренбургского НИИСХ), Харьковская 3 (УНИИРСИГ). В этот же период потерял коммерческое значение сорт Народная, последний, полученный отбором из ландраса. Наиболее популярным был сорт Безенчукская 139, в годы максимального распространения он занимал 1.5 млн га. В Сибири сорт Алмаз, отличавшийся высоким содержанием белка и качеством макарон, высевался на 0.25–0.35 млн га. Засухоустойчивый и продуктивный сорт Оренбургская 2 распространился в Уральском регионе (Долгалев, Тихонов, 2005). Харьковскую 3 возделывали в условиях орошения в Нижнем Поволжье.

В следующем десятилетии (1986–1995) было создано 18 сортов, что составило 62.1 % от общего числа допущенных к использованию в Российской Федерации. Их оригинаторами были 10 учреждений: восемь – из России, по одному – из Украины и Казахстана (Каталоги..., 1954–1992; Государственные реестры..., 1993–2022). Наибольшее распространение по числу регионов допуска имели сорта: Безенчукская 182 (Самарский НИИСХ) – 5, Краснокутка 10 (Краснокутская селекционная станция) – 5, Харьковская 23 (УНИИРСИГ) – 4, Светлана (НИИСХ ЦЧО) – 4, Оренбургская 10 (Оренбургский НИИСХ) – 4, Саратовская золотистая (НИИСХ Юго-Востока) – 3, Воронежская 7 (НИИСХ ЦЧО) – 2, Омский рубин (Сибирский НИИСХ) – 2. К сортам широкого ареала относятся: Безенчукская 182, Оренбургская 10, Краснокутка 10, Харьковская 23, Светлана, Саратовская золотистая. Первые два сорта хорошо адаптированы к условиям в Среднем Поволжье, на Урале и Центральном Черноземье. Краснокутка 10 с высоким накоплением белка и клейковины в зерне отличается высокой засухоустойчивостью в Нижнем Поволжье. Харьковская 23 широко использовалась в Центральном Черноземье и на Урале.

В этот период в НИИСХ Юго-Востока под руководством Н.С. Васильчука (2001) была разработана программа по селекции высококачественных сортов, внедрены и усовершенствованы методики оценки индекса желтизны крупки, макарон, оценки реологических свойств теста с применением миксографа, фаринографа, SDS седиментации и кулинарных свойств макаронных изделий. В этом же учреждении был создан сорт Саратовская золотистая, значительно превосходивший по концентрации желтых пигментов в зерне все предыдущие сорта.

С 1996 по 2006 г. в России были допущены к использованию 18 новых сортов яровой твердой пшеницы (Государственные реестры..., 1993–2022). Эти сорта созданы в: Сибирском НИИСХ – 4, Алтайском НИИСХ – 3, НИИСХ Юго-Востока – 3, Самарском НИИСХ – 2, Башкирском НИИСХ – 1, Северо-Донецкой опытной станции – 1, Краснодарском НИИСХ – 1. Два сорта, Безенчукская степная и Степь 3, были допущены к использованию в

трех регионах. Несмотря на сокращение посевов твердой пшеницы в стране активно использовался в этот период сорт Безенчукская степная, занимавший в отдельные годы 120 тыс. га.

С развитием региональной селекции стала проявляться специализация сортов по эколого-географическим зонам (Розова и др., 2017). Условная граница биотипной специализации в России обозначилась на территории Уральского региона, где в той или иной степени конкурентоспособны сорта, происходящие из всех шести крупных агроэкологических зон (Северный Кавказ, Центральное Черноземье, Нижнее Поволжье, Среднее Поволжье, Урал, Сибирь). Увеличилось количество сортов с высоким содержанием желтых пигментов в зерне и высоким качеством клейковины. В течение 2007–2016 гг. по всем регионам России было допущено к использованию 22 новых сорта, т.е. темпы селекции в среднем составили 2.2 сорта в год, что значительно превосходит все предшествующие периоды селекции твердой пшеницы. В 2016 г. в Государственном реестре (Государственные реестры..., 1993–2022) общее количество сортов яровой твердой пшеницы возросло до 42.

Процесс увеличения количества используемых сортов можно рассматривать как движение по пути создания и диверсификации сортовых систем. Это подтверждается как количеством результативных селекционных учреждений – 11, так и их географией – от Иркутска до Краснодара. Наряду с традиционно высокорослыми были зарегистрированы сорта: короткостебельные – Безенчукская 209 и Рустикано, и среднерослые – Безенчукская 210, Безенчукская золотистая, Лилек, Омская янтарная. По продолжительности вегетационного периода различия между биотипами: скороспелыми (Краснокутка 13, Николаша) и позднеспелыми (Омский изумруд, Омский корунд), по дате колошения при испытании в Среднем Поволжье составили 10–12 дней.

Продолжало увеличиваться количество сортов с высоким (на уровне Саратовской золотистой) содержанием желтых пигментов в зерне. Сорт Безенчукская золотистая превысил этот уровень на 25.0 %, достигая значений 8.5–9.0 ppm (Мальчиков, Мясникова, 2020). Были созданы новые сорта, стабильно формирующие высококачественную клейковину: Безенчукская 209, Безенчукская нива, Безенчукская золотистая, Луч 25, Аннушка, Крассар, Лилек, Николаша. Селекционеры Алтайского НИИСХ создали сорт Солнечная 573, который сочетает два трудно комбинируемых свойства – высокую урожайность в регионах допуска (Западная и Восточная Сибирь) с высоким содержанием белка. В Европейской части страны получено семь сортов (Безенчукская 205, Безенчукская 210, Безенчукская нива, Безенчукская золотистая, Донская элегия, Марина, Мелодия Дона), которые допущены к использованию в Уральском регионе. В Сибири были районированы сорта только местной селекции.

За последние шесть лет (2017–2022) создано 20 новых сортов (Государственные реестры..., 1993–2022), – 3.3 в год, т.е. темпы селекции увеличились по отношению к предыдущему периоду. Среди них преобладали сорта, рекомендованные для использования в одном регионе, – 18 или 90.0 %, что является продолжением тенденции, определившейся на предыдущих этапах, – постепенное

увеличение доли сортов локального значения и региональной диверсификации сортовых систем. Специализацию сортовых систем на этом этапе подтверждает резкое увеличение числа короткостебельных сортов, несущих ген *RhtB1b*. Триада, СИ АТЛАНТ, СИ НИЛО и Тессадур рекомендованы для Центрально-Черноземного региона, Бурбон и Никола – для Уральского региона. Эти сорта устойчивы к полеганию, имеют высокий потенциал продуктивности, реализованный в системе Государственного сортоиспытания, в частности, по сортам Триада и СИ НИЛО получено 8.96 и 8.98 т/га зерна соответственно.

Среднерослый стебель имеют сорта: Безенчукская крепость, Кремень и Меляна. Первый включен в реестр по Средневолжскому и Уральскому регионам, оба последних сорта – только по Уральскому региону. Сорт Безенчукская крепость отличается устойчивостью к мучнистой росе, бурой ржавчине, твердой головне и накапливает в зерне почти такое же количество желтых пигментов, как сорт Безенчукская золотистая. Сорт Таганрог, полученный ООО «Агролига Центр Селекции Растений» на основе базового генотипа Самарского НИИСХ (1469Д-59) методом беккроссирования на сорт из США Kofa (донор высокого качества клейковины) и отбора с применением молекулярных маркеров, устойчив к листовым пятнистостям, мучнистой росе, хлебному пилюльщику, отличается высоким содержанием желтых пигментов и качеством клейковины. Сорт Шукшинка районирован на Урале, в Восточной, Западной Сибири; Оазис – в Западной и Восточной Сибири и Омский коралл – в Западной Сибири.

Сорта Оазис и Омский коралл – среднепоздние, высокорослые, но устойчивые к полеганию, с реализованным потенциалом урожайности зерна 5.7–6.2 т/га. Сорт Шукшинка – среднепоздний, среднерослый, устойчив к полеганию, имеет хорошие и отличные макаронные качества, максимальная урожайность 7.28 т/га. Два сорта, Ясенка и Ярина, были допущены к использованию в Северо-Кавказском регионе, устойчивы к засухе и полеганию, пыльной головне, отличаются крупным выполненным зерном и хорошим качеством макарон, вполне конкурентоспособны в Поволжье и на Урале.

### Исходный материал и методы создания генетической изменчивости

В начале научной селекции местные сорта были основным исходным материалом, они состояли из смесей разновидностей и биотипов. Их изучение проводилось в соответствии с внутривидовой классификацией культурных растений Ф.К. Кёрнике (1873), J. Percival (1921), основанной на хорошо различимых признаках колоса и зерна. Впоследствии Н.И. Вавилов (1940) предложил эколого-географический принцип, сочетающий систематизацию разновидностей, по Ф.К. Кёрнике (1873), с разделением всего многообразия на эколого-географические группы. Адекватность такого деления ландрасов и стародавних гексаплоидных сортов пшеницы была подтверждена результатами их кластеризации на основе распределения маркеров SSR и RAPD по эколого-географическим группам (Митрофанова, 2012).

Обособление евразийских сортов твердой пшеницы (Россия, Украина, Казахстан) степного и лесостепного эко-

типов от групп твердой пшеницы из Средиземноморья и Ближнего Востока подтверждается распространением различных групп аллелей глиадинкодирующих локусов среди ландрасов этих регионов (Кудрявцев и др., 2014). Отбор из ландрасов, который применялся во всех селекционных учреждениях, оказался эффективным. В гибридизации сначала превалировали межвидовые скрещивания твердой пшеницы (*T. durum* Desf.) с мягкой (*T. aestivum* L.) и полбой (*T. dicoccum* Schuebl.), затем внутривидовые с привлечением исходного материала из разных эколого-географических групп и других стран.

Ландрасы Белотурка и Сивоуска входят в родословные 53 и 41 % районированных сортов соответственно, что указывает на эволюционный характер селекции с улучшением генетических систем адаптивности. Большое значение имели дериваты, полученные от скрещивания твердой пшеницы с полбой. Сорт Харьковская 46, созданный в результате межвидовой гибридизации *T. dicoccum*, *T. turgidum* и *T. durum*, вошел в родословную 85 % сортов, включенных в 2004 г. в Госреестр России (Мартынов и др., 2005). Сорт Ракета, полученный с привлечением образца *T. dicoccum* из Забайкалья через сорта Саратовская золотистая, Светлана, в настоящее время входит в родословную 36.0 % коммерческих сортов России. Образец к-46995 *T. dicoccum* (ВИР), входящий в родословную сорта Памяти Чеховича, участвовал в происхождении семи сортов, включенных в Госреестр за последние восемь лет (Государственные реестры..., 1993–2022). На всех этапах селекции для гибридизации использовали мягкую пшеницу. В настоящее время 32.7 % коммерческих сортов имеют среди предков мягкую пшеницу.

В качестве источника устойчивости к патогенам в гибридизацию привлекался вид *T. timopheevii* Zhuk. В реестре охраняемых на 2022 г. сортов было три сорта, несущих транслокацию на хромосоме 6В от *T. timopheevii*, обеспечивающую устойчивость к мучнистой росе (Мальчиков и др., 2015). В 1970-е годы в Краснодаре с участием *T. timopheevii* был создан коммерческий сорт Мелянопус 7.

С 1930-х годов наряду с межвидовыми и внутривидовыми скрещиваниями для создания гибридных популяций привлекали иностранные сорта. Широко включались в скрещивания сорта: WSMP-13 (США), Leucurum 983 (Италия). Сорт WSMP-13 (США) через селекционную линию Самарского НИИСХ Гордеиформе 740 входит в родословную 12 современных сортов. В НИИСХ Юго-Востока и Федеральном научном центре зерна им. П.П. Лукьяненко используется генофонд из международного центра ICARDA, США и Канады – сорта Аннушка и Крассар получены с привлечением американского сорта Medora, сорт Лилек несет гены американской линии AWII/SbI 4. Омский корунд, Омский коралл выведены от скрещивания с генотипами: к-47117, T 1004 =POD 11/Yazi 1 (СИММУТ). При создании короткостебельных сортов Безенчукская 209 и Триада донорами гена *Rht1b* были сорта Соссогит 71 и Anser 10 (СИММУТ). В настоящее время для гибридизации широко используется сорт Памяти Чеховича, несущий ген редукции высоты растений от сорта Ahninga (СИММУТ). В Федеральном Ростовском АНЦ для индуцирования генетической изменчивости применяются химический мутагенез и гибридизация с иностранными сортами Wells,

Wascana. В результате созданы сорта Новодонская, Вольнодонская, Донская элегия.

Основным методом индукции генетической изменчивости твердой пшеницы в России и странах бывшего СССР является гибридизация внутри вида и между видами. Некоторые ученые отводят гибридизации определяющую роль и оценивают ее вклад в результативность селекционного процесса до 60.0 % (Vedder, 1992). Используемые подходы при подборе родительских компонентов для гибридизации соответствуют трем принципам, предложенным С. Бороевичем (1984), – сорта, признака, гена.

Принципы сорта и признака в отечественной литературе обычно не разделяются. В этом случае сорта, отобранные для гибридизации, характеризуются по всему спектру селекционных признаков (Васильчук, 2001; Евдокимов и др., 2022). При этом выделяется этап пребридинговой селекции, или целенаправленного создания промежуточных форм с целью ступенчатой гибридизации (Шехурдин, 1961; Васильчук, 2001). Эти принципы (сорта, признака) подбора родительских компонентов широко применяются в селекции по количественным признакам, устойчивости к засухе и высоким температурам. Методы, основанные на принципе гена, используются при беккроссировании – переносе генов в конкретный генофон; аккумуляции – объединении в одном генотипе генов, детерминирующих разные признаки; «пирамидировании» – объединении двух и более генов, детерминирующих один признак. Принцип гена применяется в селекции на устойчивость к патогенам, длине и выполненности соломины, активности ферментов, признакам, тесно сцепленным с биохимическими или ДНК-маркерами.

### Генетическое разнообразие коммерческих сортов

Процесс увеличения однородности в сортовых популяциях нежелателен, так как повышает вероятность быстрого развития эпифитотий, распространения вредителей и уязвимости используемых сортов к воздействию других экстремальных факторов среды на большой территории (Jacques et al., 2014). Генеалогический анализ сортов, районированных на территории России в 1929–2004 гг. на основе коэффициентов родства, показал увеличение генетического разнообразия. В то же время зафиксирована генетическая эрозия местного материала – количество российских оригинальных предков современных сортов уменьшилось на 20 %. В целом за этот период нижний порог генетического разнообразия во всех региональных селекционных центрах не достиг критического уровня, соответствующего сходству полусибсов (коэффициент родства,  $r$ , варьировал от 0.18 до 0.23 по селекционным центрам; для полусибсов  $r = 0.25$ ) (Мартынов и др., 2005). Однозначных тенденций изменения генетического разнообразия по аллелям глиадинкодирующих локусов в течение четырех исторических (во времени) этапов эволюции сортовой популяции яровой твердой пшеницы не обнаружено (см. таблицу).

Постоянство аллельного состава в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-B2* установлено для первого (1929–1950) и второго (1951–1980) этапов. У сортов второго этапа значительно возросло число аллелей в локусе *Gli-A2*, что

Индексы генетического разнообразия Нея яровой твердой пшеницы из России и бывшего СССР по четырем глиадинкодирующим локусам в историческом разрезе (по: Кудрявцев и др., 2014)

Локус	Индексы генетического разнообразия по периодам районирования сортов			
	1929–1950	1951–1980	1980–2000	2001–2012
<i>Gli-A1</i>		0.64	0.12	0.09
<i>Gli-B1</i>	0.55	0.58	0.69	0.68
<i>Gli-A2</i>	0.58	0.77	0.63	0.58
<i>Gli-B2</i>	0.82	0.80	0.86	0.74
Среднее	0.68	0.70	0.58	0.52

привело к некоторому увеличению коэффициента генетического разнообразия в целом по четырем локусам от 0.68 до 0.70. На следующих этапах эта тенденция сменилась на противоположную. Значительное сужение разнообразия произошло на третьем (локусы *Gli-A1*, *Gli-A2*) и особенно четвертом этапе – наиболее сильно по локусу *Gli-A1*. Существенное уменьшение коэффициента разнообразия на четвертом этапе произошло также в локусах *Gli-A2* и *Gli-B2*, которое было постоянным в течение всего XX в. Стабильный по составу аллелей *Gli-B1* включает с частотой 0.46 аллель *c*, который содержит электрофоретический компонент  $\gamma$ -45, являющийся маркером генов, детерминирующих формирование высококачественной клейковины.

Очевидно, что интенсивно ведущаяся в настоящее время селекция высококачественных сортов может привести к моноаллельному состоянию локуса и сужению генетического разнообразия создаваемых сортов. Эту негативную тенденцию можно преодолеть путем привлечения разнообразного в генетическом отношении исходного материала, идентификацией новых аллелей и интенсификацией создания сортов в региональных селекционных центрах (Кудрявцев и др., 2014).

### Результаты селекции на урожайность

В литературе имеется информация о результатах изучения увеличения урожайности в селекционных учреждениях Поволжья (НИИСХ Юго-Востока, Самарский НИИСХ) и Западной Сибири (Омский АНЦ, ФГБНУ ФАНЦА). В Самарском НИИСХ достаточно точно генетическая составляющая урожайности определяется с момента регулярных испытаний сорта Леукурум 33 в 1930-х годах. Этот сорт, отнесенный ко второму этапу селекции в Среднем Поволжье (Мальчиков, Мясникова, 2015), вплоть до завершения в 1958 г. испытаний сорта первого этапа – Гордеиформе 189, превысил его на 23.6 %. Если принять величину 5.0 % в качестве минимальной разницы по урожайности Гордеиформе 189 и ландрасов, то вклад селекции в увеличение урожайности в Среднем Поволжье при создании сорта Леукурум 33 составляет 28.5 %, или 0.8 % в год.

Селекционный вклад при создании сортов Безенчукская 105 (1965 г.) и Харьковской 46 (1968 г.) увеличился на 5 %, но при этом темпы прироста за счет селекции с 1912 г. уменьшились до 0.6 % в год, в период с 1948 по 1965 г. – до 0.26 %. Основной вклад в увеличение урожай-



Рис. 3. Общий и генетический тренд (отношение показателей пяти лучших селекционных линий к показателям сорта 5-го этапа селекции Безенчукской 182) урожайности твердой пшеницы за последние 15 лет, 2007–2021 гг.

ности сортов 2–3-го этапов селекции был связан с улучшением выживаемости растений к моменту созревания.

На следующих этапах – создание Безенчукской 139 (4-й этап 1980 г.), Безенчукской 182 (5-й этап 1993 г.), генетический тренд урожайности относительно сорта 3-го этапа, Харьковской 46, составил 10.1 %, относительно сорта 4-го этапа, Безенчукская 139, – 15.7 %, при темпах селекции 0.84 и 1.12 % в год соответственно (Мальчиков, Мясникова, 2015).

Наиболее часто генотипическая дисперсия урожайности сортов 3–6-го этапов была связана с изменчивостью признаков продуктивности колоса и морфофизиологических признаков – высоты растений и уборочного индекса ( $K_{хоз}$ ) – 65.5 и 31.1 % случаев соответственно. За последние 15 лет (2007–2021) на фоне общего роста урожайности твердой пшеницы в конкурсном сортоиспытании наблюдается увеличение темпов селекционного улучшения (рис. 3). Увеличение роста урожайности от сорта Безенчукская 182 с 1993 до 2021 г. составило 28.5 %, или 0.95 % в год.

Таким образом, за 110 лет селекции твердой пшеницы в Самарском НИИСХ генетический прогресс урожайности составил 0.80 % в год, или 87.7 % за весь период, в том числе по этапам селекции (сортосмены): 1–2-й этапы – 28.5 %, 3-й – 5 %, 4-й – 10.0 %, 5-й – 15.7 %, 6-й этап – 28.5 %.

В НИИСХ Юго-Востока в XX в. (1929–1999 гг.) от момента создания сорта Гордеиформе 432 (отбор из местной Белотурки) генетический прогресс урожайности составил 54 % (Васильчук, 2001), в XXI в. (2000–2017 гг.) он возрос на 22 % и составил 73.0 %, или 0.79 % в год в целом за весь период селекции (Гапонов и др., 2017). Селекционный прогресс по урожайности был связан в первую очередь с увеличением крупности зерна, числа продуктивных стеблей и уборочного индекса ( $K_{хоз}$ ). Не удалось повысить число колосков в колосе, число зерен в колосе и колоске, за исключением некоторых сортов. Прогнозируется, что кардинальных изменений габитуса растений (снижение высоты растений) не предвидится (Васильчук, 2001; Гапонов и др., 2017).

Первым сортом яровой твердой пшеницы, созданным на Западно-Сибирской станции (Омский АНЦ), был Гордеиформе 10 (Таланов, 1926). Он был районирован в 1929 г. и до 1960 г. оставался основным сортом в регионе. Ему на смену пришел сорт Харьковская 46, который в лесостепной зоне превосходил Гордеиформе 10 на 10 % (Савицкая и др., 1980). В 1979 г. был районирован сорт Алмаз. В Сибири и Казахстане он превысил по урожайности Харьковскую 46 на 0.23 т/га, или на 9.7 %. В течение следующих 20 лет были созданы Омский рубин (1991 г.), Ангел (1997 г.) и Омская янтарная (1999 г.). Тренд урожайности за этот период (от сорта Алмаз до Омской янтарной), по результатам многолетнего изучения в Омском АНЦ (Евдокимов и др., 2021), составил 0.6 т/га, или 22.5 %, т. е. 1.07 % в год.

Сорта последнего периода селекции (2000–2021 гг.) в Омском АНЦ, Омский изумруд и Омский коралл, по урожайности зерна превысили Омскую янтарную на 18.4 и 19.2 %, т. е. темпы селекции составили около 0.9 % в год (Евдокимов и др., 2020). Общий прирост селекционного улучшения урожайности, если вести отчет от сорта Гордеиформе 10, составляет 61 %, или 0.67 % в год. Рост продуктивности сортов в процессе селекции в Омском АНЦ шел по пути улучшения числа продуктивных стеблей на 1 м<sup>2</sup> и числа зерен в колосе. Масса зерновки изменилась незначительно (Евдокимов и др., 2021).

В Алтайском НИИСХ (ФГБНУ ФАНЦА) селекция яровой твердой пшеницы началась в 1929 г., после организации Барнаульской опытной станции, но планомерная и широкомасштабная работа ведется с 1970 г. За 50 лет было создано 10 коммерческих сортов. Увеличение урожайности от сорта Харьковская 46 – основного стандарта в 1970-е годы – до современных сортов составил 0.39–0.79 т/га, или 14–29 %, темпы селекции на урожайность – 0.38–0.58 % в год (Розова и др., 2017). Общего тренда изменения элементов урожайности не обнаружено, за исключением тенденции увеличения массы зерновки на всех этапах. В то же время большинство сортов всех этапов селекции формировали более крупное зерно, отдельные сорта превосходили Харьковскую 46 по числу зерен в колосе и  $K_{хоз}$ .

Таким образом, селекция яровой твердой пшеницы на урожайность в основных селекционных центрах России ведется достаточно эффективно, темп увеличения ее в зависимости от селекционного центра составляет 0.58–0.80 % в год.

## Селекция сортов, устойчивых к патогенам и вредителям

В начале селекционной работы с яровой твердой пшеницей в СССР (России) большое внимание уделялось созданию сортов, устойчивых к пыльной головне (*Ustilago tritici* (Pers.) Rostr.), что объясняется распространением ее в регионах возделывания, повышенной видовой восприимчивостью твердой пшеницы к патогену и ухудшением качества конечных продуктов, произведенных из зараженного зерна. В 1920–1940-е годы устойчивыми на инфекционном фоне были Гордеиформе 10, Мелянопус 69, Ракета, Гордеиформе 27 (Шестакова, Вьюшков, 1975). На их основе были получены высокоустойчивые сорта Безенчукская 121, Безенчукская 139, Светлана, Валентина, Безенчукская 205, Триада и др. В настоящее время среди сортов, включенных в Госреестр России, устойчивые составляют около 40 %, что в сочетании с применением системных протравителей семян эффективно сдерживает развитие этого патогена (Вьюшков, 2004).

Наиболее вредоносными болезнями, паразитирующими на твердой пшенице в Евразии, являются листовые пятнистости: *Stagonospora nodorum* Berk., *Septoria tritici* (Roeb. et Desm.), *Bipolaris sorokiniana* Sacc., *Pyrenophora tritici-repentis*, *Fusarium* sp. (Койшибаев, 2018). Селекция на устойчивость к этим патогенам носит региональный характер. Полной устойчивости или иммунитета у сортов твердой и мягкой пшеницы к пятнистостям листьев нет (Lamari et al., 1989). В исследовании С.Г. Чу с коллегами (2008) только 25 из 132 образцов твердой пшеницы имели высокий уровень или частичную устойчивость к *P. tritici-repentis* и *Stagonospora nodorum* Berk. Высокий уровень частичной устойчивости к *P. tritici-repentis* (Tan spot) и *S. nodorum* Berk. выявлен у синтетической гексаплоидной пшеницы (SHW) и мягкой пшеницы (Xu et al., 2004; Singh P.K. et al., 2006). Устойчивые источники гексаплоидной пшеницы и диких сородичей могут быть потенциально использованы для улучшения твердой пшеницы (Singh P.K. et al., 2006).

В системе КАСИБ идентифицированы следующие образцы твердой пшеницы, высокоустойчивые в полевых условиях к патогенам листовых пятнистостей: 1693d-71, 2021d-1, Гордеиформе 1591-21 (Самарский НИИСХ), Д-2165 (НИИСХ Юго-Востока), Гордеиформе 08-107-5, Гордеиформе 178-05-02, Гордеиформе 05-42-12 (Омский АНЦ) (Рсалиев и др., 2020; Gulyaeva et al., 2020). Значительная часть сортов твердой пшеницы, включенных в Госреестр России по описанию авторов и результатам изучения в Госсортесети, проявляют устойчивость (R), среднюю устойчивость (MR) или среднюю восприимчивость (MS) к этим патогенам. Достаточно эффективный отбор по устойчивости подтвержден низкой частотой встречаемости доминантного аллеля гена восприимчивости к *P. tritici-repentis* *Tsn1*. Среди 43 изученных сортов он идентифицирован только у двух – Сояна и Гордеиформе 08-25-2 (Рсалиев и др., 2020).

Сорта твердой пшеницы из России и Казахстана достаточно устойчивы к бурой ржавчине (*P. triticina* Eriks.), это подтверждает тезис о том, что устойчивость к этому патогену твердой пшеницы выше, чем мягкой (Ordoñez, Kolmer, 2007). Большинство сортов твердой пшеницы,

включенных в Госреестр России, обладает полевой устойчивостью к бурой ржавчине. В годы ее эпифитотий сорта с таким типом устойчивости снижают урожай, массу зерновки и ее выполненность, но значительно меньше восприимчивых. Сорта с полевой устойчивостью целесообразно иметь в степных регионах с сухим климатом, где вредоносность бурой ржавчины невелика (Крупнов, 2016). Для регионов с повышенным уровнем годовых осадков (> 450 мм) целесообразно применение иммунных сортов (тип иммунитета 0-1). Донорами генов устойчивости (иммунитет с типом 0-1) являются сорта Самарского НИИСХ Марина и Леукурум 1750, линии, выделившиеся, по данным полевой оценки в питомнике КАСИБ, на естественном инфекционном фоне в двух экопунктах (Омск, Южный Казахстан), – Каргала 223, Гордеиформе 178-05-2, Гордеиформе 05-42-12 и Триада.

Результаты мультипатогенного теста показали отсутствие в российском и казахстанском селекционном материале генов *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*. Применение молекулярных маркеров не выявило генов *Lr1*, *Lr3a*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37* (Gulyaeva et al., 2020). В Испании также не идентифицировали какой-либо известный ген *Lr* в коллекции сортов твердой пшеницы (Martínez et al., 2007). Из всех известных генов устойчивости к бурой ржавчине только *Lr14*, *Lr23*, *Lr61* и *Lr 79* произошли от твердой пшеницы и полбы (McIntosh et al., 2013). В связи с этим неясно, имеет ли твердая пшеница те же гены устойчивости в геномах А и В, которые идентифицированы в мягкой пшенице, или же эти гены совершенно различны (Gulyaeva et al., 2020).

В настоящее время в связи с изменением климата есть опасность распространения и усиления вредоносности стеблевой ржавчины (*P. graminis* f. sp. *tritici*) в степных регионах Урала, Поволжья и Сибири (Gulyaeva et al., 2020; Евдокимов и др., 2022). Анализ периодичности распространения патогена показывает, что твердая и мягкая пшеницы в мире очень уязвимы к вспышкам стеблевой ржавчины. Появление и распространение расы Ug99 и ее высоковирулентного штамма ТТКСК, преодолевающего большинство генов устойчивости, требует особого внимания селекционеров, генетиков и фитопатологов (Singh R.P. et al., 2015).

По данным Госкомиссии по испытанию и охране селекционных достижений, из 63 сортов, включенных в Госреестр России, 14 на естественном инфекционном фоне проявили устойчивость от средней (MR) до высокой (R). К высокоустойчивым отнесены коммерческие сорта: Триада, Лилек, Омская степная, Омский коралл, Омский изумруд. Устойчивыми в средней степени были: Николаша, Никола, Целинница, Таганрог, Безенчукская 210, Безенчукская крепость, Безенчукская юбилейная, Безенчукская 205, Тессадур. Источники устойчивости – внутривидовая изменчивость и интрогрессия генетического материала от других видов, прежде всего *T. dicoccum*, *T. timopheevii*, *T. aestivum*. В частности, линии НТ-7, НТ-10 и НТ-12, высокоустойчивые к стеблевой ржавчине, полученные отбором в поколении F3BC1 Шортандинская 71/Оренбургская 2//*T. timopheevii* к-38555/Шортандинская 71, используются в качестве исходного материала

(Козловская и др., 1990). Устойчивость полученных линий хорошо наследуется и контролируется группами из 3–4 генов с проявлением полного доминирования, неполного доминирования, рецессивного контроля устойчивости (Хлебова, Барышева, 2016).

В Западной Сибири на генетическом материале мягкой пшеницы из СИММУТ на естественном инфекционном фоне в течение 2018–2019 гг. установлена высокая устойчивость к популяции стеблевой ржавчины генов *Sr23*, *Sr31*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr40* и комбинаций генов *Sr6*, *Sr24*, *Sr36* и *IRS-Am*, *Sr21*, *Sr31* (Евдокимов и др., 2022). Следовательно, в популяции стеблевой ржавчины нет соответствующих аллелей вирулентности.

В этих же исследованиях также определена высокая устойчивость сортов Триада, Омский коралл, Odisseo, средняя восприимчивость была отмечена у Омского изумруда и Луч 25. Большинство коммерческих сортов из России и Казахстана очень чувствительны к расе Ug99, что было определено в испытаниях на естественном фоне в Кении (Shamanin et al., 2016). В то же время удалось идентифицировать среди селекционного материала генотипы, устойчивые к Ug99, из них три образца (Гордеиформе 178-05-02, Гордеиформе 05-42-12 и Триада) были устойчивы или умеренно устойчивы в Казахстане и России. Реакция стеблевой ржавчины на этих сортах в Кении и Казахстане была сходной. В Западной Сибири (Омск, Барнаул, 2017–2018 гг.) степень поражения была выше. Ученые GRRC (Global Rust Reference Center) обнаружили, что расы *P. graminis* из Омска имеют необычные паттерны вирулентности по сравнению с Ug99 и расами из других регионов (Hovmøller et al., 2017).

Эпифитотии мучнистой росы (*Blumeria graminis*) в евразийских регионах с жарким климатом, где в основном возделывается яровая твердая пшеница, имеют место быть. Объясняется это коротким инкубационным периодом патогена, который при среднесуточной температуре от 20 до 24 °С колеблется в пределах 2.8–3.5 дня (Фиссюра и др., 1987), что при наличии инфекции обеспечивает ее быстрое распространение. Эпифитотии мучнистой росы негативно влияют на качество зерна, снижаются содержание белка, клейковины, масса и выполненность зерновки (Долгалев, Тихонов, 2005). В связи с этим устойчивые сорта включены в Госреестр России и Казахстана, в том числе по степным регионам с жарким климатом.

Из 61 сорта яровой твердой пшеницы, включенного в Госреестр России, 18 проявляют высокую устойчивость (R, RMR) к мучнистой росе. Анализ родословных этих сортов указывает на различные источники устойчивости, в том числе на основе генетической изменчивости *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. timopheevii*. В частности, сорта Безенчукская крепость и Таганрог, устойчивые к мучнистой росе, несут транслокацию от *T. timopheevii* на хромосоме 6В в диапазоне микросателлитных маркеров *Xgwm518* и *Xgwm1076* (Мальчиков и др., 2015). В Самарском НИИСХ получены линии 1438Д-13 (доноры устойчивости – *T. timopheevii*, *T. durum*), 1389ДА-1, 1477Д-4 (доноры устойчивости – *T. durum*, *T. dicoccum*) с иммунитетом к мучнистой росе (Мальчиков и др., 2015).

Зерно, большое «черным зародышем», – основная причина наличия спексов (темных вкраплений) в крупке,

что снижает цветность и в целом питательные качества макаронных изделий (Васильчук, 2001). Черный зародыш появляется вследствие заражения патогенами *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Alternaria tenuis* (Fr.), *A. tritici-na* (Pers.) зерна в период налива (Conner, 1987).

Предположение о том, что крупнозерные сорта более восприимчивы, не подтвердилось. В процессе селекции получены устойчивые сорта с разной массой зерновки. В условиях Алтайского края к устойчивым отнесены следующие сорта: Салют Алтая, Памяти Янченко, Алтайский янтарь, Солнечная 573, Ангел, Омский изумруд, 1480d-2, Луч 25, Харьковская 46, Донская элегия, Оренбургская 10 (Барышева и др., 2016). В Самарском НИИСХ (Мальчиков и др., 2022) также идентифицированы устойчивые сорта: Харьковская 46, Безенчукская 139, Безенчукская 182, Марина, Таганрог, 1963Д-71, 2021Д-1, Гордеиформе 910, Гордеиформе 08-25-2, Гордеиформе 08-107-5, Меляна. В качестве исходного материала предложены высокоустойчивые генотипы твердой пшеницы из Италии: ISD19, ISD20, ISD22, Achille, Grecalle, Odisseo и Австрии: Duroflaus и Duromax.

Значительный урон урожаю и качеству зерна твердой пшеницы в Евразии наносят вредители. Очаговый характер распространения с редким проявлением признаков эпизоотии в отдельных регионах имеют пиявица, хлебные жуки, трипсы, клоп черепашка. Снижение вредоносности этих вредителей обеспечивается агротехническими методами. Селекция на устойчивость к гессенской, шведской мухам и хлебному пилильщику ведется достаточно эффективно (Вьюшков, 2004).

Устойчивость к гессенской мухе находится под контролем блока доминантных генов  $H_1-H_{24}$  и нескольких рецессивных генов (McIntosh et al., 2013). Сортная популяция твердой пшеницы в России имеет достаточную концентрацию этих генов. Генетика устойчивости к шведской мухе менее изучена, но современные сорта твердой пшеницы проявляют относительную устойчивость к вредителю – повреждение редко достигает 11–15 % (Благонадеждина, 1968). Харьковская 46 и Безенчукская 139 оцениваются как генетические доноры устойчивости к шведской мухе (Вьюшков, 2004).

Система контроля селекционного материала в питомниках и статистический анализ сортовой изменчивости позволяют создавать слабо повреждаемые сорта. Устойчивость к хлебному пилильщику обеспечивает выполненность соломины паренхимной тканью. Высокая наследуемость признака и контроль системой доминантных генов во взаимодействии с генами-ингибиторами и антиингибиторами формирования сердцевинки стебля (Мальчиков, Мясникова, 2008) определяют эффективность отбора сортов с полностью или частично выполненной соломиной. Отсутствие негативных эффектов генов, контролирующей выполненность соломины, на продукционный процесс и качество зерна позволяет широко использовать их в селекции для всех регионов (Мальчиков, Мясникова, 2008), в том числе на юге степной зоны (Крючков, 2006). Среди допущенных к использованию сортов твердой пшеницы на 2022 г. четыре имеют полностью выполненную соломинку, 36 – в средней степени и 21 сорт – с половой соломиной (Государственные реестры..., 1993–2022).

## Селекция на засухоустойчивость

Созданию засухоустойчивых сортов большое значение придавал Н.И. Вавилов (1935). Само свойство засухоустойчивости рассматривалось им как динамичное, зависящее от времени, продолжительности действия стресса и периода онтогенеза растений. По его мнению, засухоустойчивость не является специфическим признаком, постоянно и неизменно присущим тому или иному сорту (Вавилов, 1935). Тем не менее П.Н. Константинов (1923) отметил наиболее значимые признаки, определяющие засухоустойчивость, – развитие корневой системы и скороспелость. Впоследствии П.А. Генкель (1982) выделил следующие факторы засухоустойчивости: 1) устойчивость цитоплазмы к обезвоживанию и перегреву; 2) ритм развития; 3) развитие корневой системы; 4) потенциальная продуктивность.

По мнению В.А. Кумакова (1985), слабая устойчивость цитоплазмы снижает агрономическую засухоустойчивость. Физиологическая (цитоплазматическая, клеточная) устойчивость рассматривается селекционерами как основа для роста корней в почве с низкой влажностью (Кумаков, 1985; Васильчук, 2001). Более сильное, чем у мягкой пшеницы, ингибирование засухой деления клеток в зонах апикальных меристем у твердой пшеницы – основная причина снижения у нее фертильности колосьев и кущения (Кумаков, 1985).

Селекция яровой твердой пшеницы в России и странах СНГ в течение длительного периода (50–112 лет) ведется в степных регионах в условиях значительного давления засухи. За это время прошли циклы естественного и искусственного отборов десятки тысяч гибридных комбинаций и миллионы селекционных линий. Современные сорта в условиях засухи превосходят по урожайности зерна ландрасы – в 2 раза, первые селекционные сорта – в 1.5–1.8 раза (Гапонов и др., 2017).

Засухоустойчивость сортов определяется степенью приспособленности к региональной динамике метеофакторов вегетационного периода. Краснокутская селекционная станция ведет селекцию самых скороспелых сортов в СНГ. Это объясняется высокой вероятностью развития в данной зоне весенне-летней засухи с высокими температурами. Скороспелые сорта, формирующие приемлемый урожай за счет осенне-зимних осадков, являются здесь целесообразным агроэкоотбором. Скороспелость должна сочетаться с мощной корневой системой (Константинов, 1923), что в связи с сокращением общего периода роста представляет собой сложную задачу для селекции. Необходимо учитывать уменьшение размеров корневой системы, вызванное негативным эффектом доминантного аллеля гена *Vrn-A1* (Smirnova, Pshenichnikova, 2021).

Сорта селекции НИИСХ Юго-Востока также в основном относятся к скороспелому биотипу, они, как и краснокутские сорта, обладают высокой полевой засухоустойчивостью и хорошо приспособлены к условиям Нижнего Поволжья. Значительным успехом в селекции засухоустойчивых сортов этих учреждений следует считать сорта Краснокутка 13, Николаша и Саратовская золотистая. Первые два сочетают это свойство со скороспелостью, третий в отдельные годы выделяется высокой жаростойкостью, имеет хорошую сортообразующую способность



в Среднем Поволжье и на Урале (Мальчиков, Мясникова, 2015). Среди сортов Поволжья выделен кластер признаков, тесно и положительно связанный с урожайностью в условиях засухи: число зерен в колосе, азотный уборочный индекс ( $K_{\text{хоз}}$ ) растения, функция роста колоса в цветении, вынос азота и фосфора в период от цветения до созревания, площадь листьев главного побега в кушение (Мальчиков, Мясникова, 2015).

Связь выноса макроэлементов, и в первую очередь фосфора, с урожайностью в засуху можно интерпретировать как следствие более энергичного роста корневой системы и ее активности у засухоустойчивых сортов (Reynolds et al., 2012). В Самарском НИИСХ по результатам многолетних исследований выделены засухоустойчивые сорта, которые широко используются в селекции в качестве исходного материала: Памяти Чеховича, Безенчукская 205, Безенчукская золотистая, Марина, Безенчукская 207, 653д-53, 1368д-18, 2034д-41 (Самарский НИИСХ), к-16441 (Saada – Марокко), Д2017/Карасу//Д2043 (НИИСХ Юго-Востока). В системе КАСИБ из 154 генотипов в течение 2000–2015 гг. выделены 34 засухоустойчивых образца, некоторые из них впоследствии были районированы в засушливых регионах (Евдокимов и др., 2017).

В Ростовском АНЦ успешная селекция на засухоустойчивость ведется с применением химического мутагенеза в сочетании с гибридизацией (Кадушкина и др., 2016). Сорта этого учреждения – Донская элегия, Мелодия Дона и Донелла М – имеют высокую засухоустойчивость в Южном регионе и Поволжье. Высокая засухоустойчивость сортов НЦ Зерна им. П.П. Лукьяненко – Ясенка, Ядрица и Ярина, ФГБНУ ФАНЦА – АТП Прима, АТП Партнер, Шукшинка – проявилась в Среднем Поволжье в системе экологического испытания. В Оренбургском НИИСХ было установлено, что засухоустойчивые сорта твердой пшеницы являются эффективным компонентом ресурсосберегающих технологий, компенсируя их негативные эффекты, связанные в отдельных случаях с переуплотнением почвы и снижением плодородия (Бесалиев, Крючков, 2014).

М.Р. Reynolds с коллегами (2012) в концепции физиологической селекции в качестве основных компонентов сложного свойства «засухоустойчивость» выделили:  $CTV/CTG$  – температура листовой поверхности на стадиях вегетативного роста и налива зерна;  $GC$  – покров почвы при образовании урожая;  $ANT$  – количество дней до цветения;  $CAR$  – концентрация каротиноидов в листьях;  $TE$  – эффективность транспирации по дискриминации изотопов углерода;  $WSC$  – концентрация сахаров в стебле сразу после цветения;  $HI$  – индекс урожая.

Параметры  $CTV/CTG$  и  $TE$  в значительной степени детерминируются глубиной проникновения и активностью корневой системы, диаметром ксилемы и плотностью устьиц. Этот комплекс позволяет извлекать воду из почвы, поддерживать нормальную транспирацию и фотосинтез. На мягкой пшенице были описаны гены  $TaMOR$ ,  $TaERs$ , первый – фактор транскрипции, активируемый ауксином, влияет на рост и число корней, второй (включает  $TaER-1$ ,  $TaER-2$ ) увеличивает плотность устьиц и их проводимость, уменьшает размер эпидермальных клеток и  $TE$ , что положительно влияет на фотосинтез и накопление биомассы растений в условиях засухи.

Изучение генов и факторов транскрипции, ортологичных структурам других видов (арабидопсис, рис, кукуруза), позволит понять механизмы засухо-жаростойкости пшеницы (Kulkarni et al., 2017). В.А. Драгавцев с коллегами (2017) предложили использовать в селекции засухоустойчивых сортов подходы на основе эколого-генетической теории организации количественных признаков. По этим представлениям, засухоустойчивость входит в генетико-физиологическую систему адаптивности и включает 22 компонентных признака. Ускорение селекции на засухоустойчивость предполагает идентификацию физиологических особенностей сортов, созданных в селекционных центрах, расположенных в регионах, отличающихся типами доминирующих засух и динамикой метеофакторов в онтогенезе растений. Знание конкретных физиологических, эпигенетических и биохимических компонентов засухоустойчивости в перспективе позволит не только в процессе рекомбинантной селекции получать трансгрессивные формы, но и маркировать соответствующие QTL для формирования технологии маркер-ассоциированной селекции. Для каждой агроэкологической зоны необходимо определить параметры морфотипов, комплексные основным типам засухи.

### Селекция сортов с укороченной соломиной

Селекция короткостебельных сортов яровой твердой пшеницы, проведенная в бывшем СССР в 1970-е годы, не имела успеха (Вьюшков, 2004; Голик В.С., Голик О.В., 2008). Основная причина неудачи – низкая адаптивность доноров короткостебельности, что было отнесено к эффектам морфофизиологической структуры короткостебельности. В связи с этим селекционеры НИИСХ Юго-Востока пришли к выводу о бесперспективности этого направления. Устойчивость к полеганию в засушливых зонах предполагается улучшать путем увеличения прочности стебля (Васильчук, 2001). Однако выгода снижения высоты растений не ограничивается только повышением устойчивости к полеганию, низкорослые сорта отличаются высоким выходом зерна из общей биомассы и потенциалом продуктивности, что подтверждает история селекции пшеницы в XX в. во многих странах.

В России гены низкорослости используются в селекции озимой мягкой и твердой пшеницы. Значительно сложнее их применение в селекции яровой пшеницы, страдающей от засухи сильнее озимой пшеницы. Перспективными оказались создание короткостебельных аналогов российских сортов и изучение генов на материале изогенных линий (Гуркин, 1984; Вьюшков, 2004). По экспрессии на высоту растений в Поволжье изученные гены распределяются в следующем порядке:  $Rht\ 14 > RhtB1b > RhtAz > RhtAhn$ . Ген  $Rht\ 14$  признан неперспективным из-за сильных негативных эффектов на адаптивность. Ген  $RhtB1b$  снижал высоту растений на 40 %, массу 1000 зерен – на 9 %; увеличивал озерненность колоса на 17 %, общую кустистость – на 15 %,  $K_{\text{хоз}}$  (выход зерна из общей надземной массы) – на 11 %. Гены  $RhtAz$  и  $RhtAhn$  снижали высоту растений на 17 и 12 % соответственно. Эффекты последних генов на элементы продуктивности были незначительными (Гуркин, 1984; Вьюшков, 2004).

А.А. Альдеров (2001) на Дагестанской опытной станции ВИР интрогрессировал в *T. durum* гены, контролирующие низкорослость, от диплоидного вида *T. sinskajae* (*SIS2*), от гексаплоидного вида *T. aestivum* – Tom Pouce (*Rht 3*) и от *T. dicoccum* – к-25459 (*rhtx 1*, *rhtx 2*). Использование этих генов рекомендовано на Северном Кавказе. В Самарском НИИСХ на основе аналога Харьковской 46 (ген *RhtAhn*) был получен засухоустойчивый сорт Памяти Чеховича, который передал свои свойства, в том числе ген редукции высоты растений, сортам Безенчукская 210, Безенчукская золотистая, 1368Д-18, Безенчукский подарок (Самарский НИИСХ), Шукшинка, АТП Прима (ФГБНУ ФАНЦА), Кремень (ФНЦ БСТ РАН). Ген *RhtB1b* был введен в коммерческие сорта Безенчукская 209 и Триада.

В этот же период были районированы короткостебельные иностранные сорта: Си Нилло, Си Атланта, Тессадур. Аналогичный фенотип имеют сорта Бурбон и Никола, созданные на генетическом материале из Италии. Сорта Безенчукская 209 и Триада имеют достаточный уровень засухоустойчивости и могут быть использованы при интенсивных технологиях возделывания в степных регионах России с засушливым климатом. Таким образом, целенаправленная и многолетняя работа с носителями генов редукции высоты растений позволила создать конкурентоспособные низкорослые/среднерослые сорта и перейти к формированию новых морфофизиологических типов яровой твердой пшеницы в различных регионах России.

### Селекция по признакам качества зерна

В конце XIX–начале XX в. качество российской твердой пшеницы на европейском рынке было вне конкуренции (Чехович, 1924). В то время основными критериями качества зерна были: стекловидность, содержание белка, выполненность, масса зерновки и ее цвет. В 1929 г. в Саратове А.И. Марушев (1968) приступил к изучению, помимо этих признаков, хлебопекарных свойств, силы муки (клейковины), прочности, цвета макарон, разваримости, потере сухих веществ при их варке. Эти параметры легли в основу как для оценки сортов в селекционных центрах и в Госкомиссии, так и для формирования ГОСТа по классификации качества твердой пшеницы. В настоящее время классность определяется по стекловидности, натуре зерна, наличию зерен с черным зародышем, количеству и качеству клейковины (по прибору ИДК-1), числу падения.

В конце 1980-х годов Н.С. Васильчук (2001) предложил оценивать качество сортов твердой пшеницы по группам признаков: 1) определяемые на зерне (стекловидность, масса 1000 зерен, натура, цвет, зольность, число падения, содержание белка); 2) определяемые на крупке: число спексов, цвет, содержание желтых пигментов, активность окислительных ферментов; 3) реологические свойства теста – SDS седиментация, параметры, определяемые на миксографе, фаринографе, альвеографе, глютوماتике, глютанографе, электрофорез блоков глиадина и глютеина, ДНК-маркеры); 4) кулинарные свойства макаронных изделий (цвет, прочность сухих и вареных изделий, разваримость, количество сухих веществ в варочной воде).

Наиболее сложными для отбора являются содержание белка и клейковины, отрицательно коррелирующие с

урожаем, массой 1000 зерен и натурой зерна. В процессе длительной селекции эти противоречия обострились. Обнаружение в Израиле дикой крупнозерной полбы *T. dicoccoides* (FA-15-3) с высоким содержанием белка и маркирование соответствующего локуса *QGpc.ndsu-6Bb* на коротком плече хромосомы 6В в районе *Xabg387-6B-Xmwg 79-6B*, где расположены 11 маркеров (Jorra et al., 1997), позволили идентифицировать локусы высокого содержания белка *Gpc* в коллекциях диких видов, местных и селекционных сортов. В России многие сорта твердой пшеницы имеют в родословной Харьковскую 46 и ее сестринскую линию Харьковскую 51, созданные с привлечением для гибридизации образца *T. dicoccum*, либо другие сорта, предками которых являются образцы *T. dicoccum*, *T. timopheevii*, что предполагает определенную вероятность наличия у них эффективных генов *Gpc*.

Изучение 38 сортов твердой пшеницы, созданных в разных эколого-географических зонах в течение трех лет в четырех пунктах (Безенчук, Курган, Барнаул, Актюбинск), позволило определить следующие эволюционные тенденции урожайности и белковистости зерна: 1) увеличение содержания белка в зерне при сохранении интенсивности и адаптивности продукционного процесса на уровне предыдущих этапов селекции (сорт Солнечная 573); 2) значительное и стабильное улучшение урожайных свойств в процессе селекции не сопровождается значимым снижением содержания белка в зерне (сорт Безенчукская крепость); 3) значительное и стабильное улучшение урожайных свойств в процессе селекции сопровождается значимым снижением содержания белка в зерне (сорта Безенчукская нива, Безенчукская 210) (Мясникова и др., 2019).

Значительные усилия селекционеров были направлены, помимо содержания белка и клейковины, на улучшение качества клейковины. А.И. Марушев (1968) установил связь прочности и варочных свойств макарон с хлебопекарными свойствами и силой муки. Сила муки не всегда определяла хлебопекарные качества твердой пшеницы, в то же время она была более тесно связана с прочностью и варочными свойствами макарон. Также была установлена возможность сочетания хороших макаронных и хлебопекарных качеств у твердой пшеницы. В НИИСХ Юго-Востока такими сортами были Гордеиформе 432, Мелянопус 26, Саратовская 34. Впоследствии возможность создания сортов твердой пшеницы с хорошими хлебопекарными свойствами показали В.С. Голик и О.В. Голик (2008). К аналогичному выводу пришли канадские селекционеры, они обосновали целесообразность селекции сортов твердой пшеницы двойного назначения.

Большое значение для селекции сортов твердой пшеницы с высоким качеством клейковины имело открытие R. Damidaux с коллегами (1978) двух компонентов  $\gamma$ -глиадина, обозначенных как  $\gamma$ -42 и  $\gamma$ -45, которые оказались маркерами слабой и сильной клейковины соответственно. В настоящее время известно, что сильная клейковина генотипов  $\gamma$ -45 функционально обеспечивается специфической группой субъединиц глютеина с низкой молекулярной массой (LMW), обозначенных как LMW-2, тесно сцепленная с *Gli-B1<sup>d</sup>c* ( $\gamma$ -45) (Pogna et al., 1988). Сначала были идентифицированы генотипы *Gli-B1<sup>d</sup>c* ( $\gamma$ -45)/LMW-2

с белым колосом. Впоследствии А.М. Кудрявцев (1994) в сорте Харьковская 3 с красным зерном выделил два биотипа,  $\gamma$ -45 и  $\gamma$ -42. Генотипы твердой пшеницы LMW-2 имеют широкий диапазон прочности клейковины, но они почти всегда по хлебопекарным качествам превосходят генотипы LMW-1 ( $\gamma$ -глиадин 42) (Kosmolak et al., 1980). Доказательств того, что более «сильные» генотипы LMW-2 лучше по качеству макаронных изделий, чем более «слабые» генотипы LMW-1, нет (Marchylo et al., 2001). Тем не менее сильная клейковина при содержании ее в сыром виде 28.0–35.0 % имеет высокие технологические свойства при изготовлении макарон – дает плотное, вязкое тесто, хорошо поддающееся формовке, упругое, немнущееся, нелипкое при экструзии макаронных изделий (Марушев, 1968; Савицкая и др., 1980).

В настоящее время установлено, что качество клейковины твердой пшеницы определяется в основном пятью локусами, два из них, *Glu-A1* и *Glu-B1*, контролируют синтез высокомолекулярных глютенинов (HMW-GS), три, *Glu-A3*, *Glu-B2*, *Glu-B3*, – низкомолекулярных глютенинов (LMW-GS). В локусе *Glu-B1* положительный эффект на качество клейковины (по SDS-тесту) установлен для аллелей: *b* (7+8), *d* (6+8), *z* (7+15), *ch* (7+12), в локусе *Glu-B3* – для аллеля *a* (2+4+15+19), в локусе *Glu-A3* – для аллелей *a* (6), *c* (6+10), *d* (6+11), *e* (11). Сочетание различных аллелей в локусах образует более 40 гаплотипов (Ronchallo et al., 2021). Очевидно, что изучение новых сортовых коллекций позволит идентифицировать новые аллели и определить их влияние на качество клейковины. В России изучен полиморфизм глиадинкодирующих локусов на материале коллекций исторических и современных сортов. У 46.0 % сортов, включенных в Госреестр России на 2014 г., обнаружен блок *Gli-B1<sup>d</sup>c* ( $\gamma$ -45)/LMW-2, что предполагает большую эффективность селекции высококачественных сортов.

Если судить по генеалогии допущенных к использованию в России на 2022 г. сортов, можно предположить, что количество сортов с высоким качеством клейковины (возможно, имеющих LMW-2) увеличилось. Отбор по качеству клейковины с конца 1980-х годов ведется по параметрам ИДК (индекс деформации клейковины), SDS седиментации, миксографа, фаринографа. В НИИСХ Юго-Востока усовершенствовали оценку сортов по SDS седиментации (микроседиментация), предложили расширить 8-балльную шкалу миксограммы сначала до 9-балльной (Васильчук, 2001) и затем до 10-балльной шкалы (Гапонов и др., 2020), что было связано с необходимостью отбора высококачественных сортов, которые в местных условиях формируют сверхпрочную клейковину, не укладывающуюся в параметры 8-балльной шкалы. Оценка качества клейковины проводится дополнительно на приборах глотоматик и глотограф (Гапонов и др., 2020). Самарским НИИСХ и ООО «Агролига Центр Селекции Растений» с применением биохимического маркера *Glu-B1*(7+8) и молекулярных маркеров микросателлитной группы *SSR* – *Single Sequence Repeat* (*Barc148*) и *SNP* – *Single Nucleotide Polymorphism* (*BM140362*), сцепленных с генами высокомолекулярных глютенинов на хромосоме 1A, были созданы два сорта, Таганрог и Алазар (Шевченко и др., 2019).

В перспективе предполагается на основе обширных исследований по фенотипированию и генотипированию качества клейковины коллекций и коммерческих сортов твердой пшеницы, адаптированных к условиям среды в различных агроэкологических зонах России, широкое применение по этим признакам технологии маркер-ассоциированной селекции.

Значительный прогресс в селекции достигнут по содержанию желтых пигментов в зерне. Этот признак является количественным и находится под контролем генов с сильными аддитивными эффектами. Соответствующие QTL распределены по всем хромосомам генома твердой пшеницы. Вариация признака на 60 % определяется двумя QTL, расположенными на хромосомах 7AL и 7BL (Elouafi et al., 2001; N'Diaye et al., 2017). Первые селекционные сорта (созданные в 1920–1940-е гг.), Гордеиформе 432, Мелянопус 69, Гордеиформе 189, Гордеиформе 675, Мелянопус 26, накапливают в зерне 3.6–5.0 ppm желтых пигментов. Этот же уровень или несколько выше имели сорта 1960–1980 гг. Харьковская 46, Безенчукская 105, Безенчукская 139. Сорта Светлана (1987 г.) и Саратовская золотистая (1993 г.) накапливали в зерне 6–6.5 и 7–7.5 ppm соответственно, что превосходит уровень первого сорта научной селекции, Гордеиформе 432, на 25–55 %.

Среди сортов, районированных с 2016 г., заметно выделяются Безенчукская золотистая (8.5–9.0 ppm), Безенчукская крепость и Тамара (7.5–8.5 ppm). Концентрация желтых пигментов в зерне этих сортов превышает показатель Гордеиформе 432 на 65–85 %. Все генотипы иностранного происхождения по величине признака при изучении в селекционных центрах России уступали этим сортам. Кроме значительного содержания желтых пигментов в зерне, в среднем по ряду экспериментов в различных средах сорта Безенчукская золотистая, Безенчукская крепость, Безенчукская 210 и Саратовская золотистая отличались оптимальной реакцией адаптивности, стабильности и отзывчивости на среду процессов накопления пигментов. Эти генотипы наиболее целесообразно использовать для формирования популяций и создания рекомбинантных инбредных линий с последующим картированием соответствующих QTL и создания технологии маркер-ассоциированной селекции по этому признаку (Мальчиков, Мясникова, 2020).

Таким образом, большинство современных сортов яровой твердой пшеницы превосходят сорта первых этапов селекции по содержанию желтых пигментов в зерне, реологическим свойствам теста и кулинарным качествам макаронных изделий, прежде всего по цвету и прочности вареных макарон.

## Заключение

История выращивания твердой пшеницы на территории России и бывшего СССР охватывает много веков и связана с распространением земледелия в степных районах Кубани, Поволжья, Сибири и Казахстана. В настоящее время в России засевают ежегодно около 0.8 млн га, что значительно меньше, чем в период плановой экономики. Научная селекция твердой пшеницы ведется с 1909 г. Результаты изучения увеличения урожайности в процессе

селекции в зависимости от периода и региона составляют 0.26–1.0 % в год, вполне сравнимы с аналогичными результатами в других странах, имеющих длительную историю селекции твердой пшеницы. Генетическое ядро современных сортов сформировалось на основе местных сортов твердой пшеницы, их гибридизации с *T. aestivum* L. и *T. dicoccum* Shuebl. Положительный эффект имело привлечение исходного материала из других стран, которое увеличилось в последнее время.

Несмотря на большое количество лабораторий, ведущих селекцию твердой пшеницы в России, и разнообразный исходный материал, имеют место снижение разнообразия по аллелям глиадинкодирующих локусов и эрозия оригинальных российских предков у современных сортов. Значительные достижения были в селекции на устойчивость к пыльной головне (в настоящее время 40 % коммерческих сортов устойчивы) и наиболее вредоносным патогенам, вызывающим пятнистости листьев в Евразии (*Stagonospora nodorum* Berk., *Septoria tritici* (Roeb. et Desm.), *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *P. tritici-repentis*, *Fusarium* sp.). Для регионов с повышенным уровнем годовых осадков наряду с полевой устойчивостью рекомендованы иммунные к бурой ржавчине (*Puccinia triticina*) сорта (тип иммунности 0-1), созданные в России и Казахстане. По данным Госкомиссии по испытанию и охране селекционных достижений, 14 из 63 сортов, включенных в Госреестр России, на естественном инфекционном фоне показали устойчивость к *P. graminis* f. sp. *tritici* от средней до высокой.

Эффективно ведется селекция сортов, устойчивых к *B. graminis* (DC.) f. sp. *tritici* Em. Marchal., – 30 % сортов проявляют высокую устойчивость к этому патогену и патогенам, вызывающим почернение зародыша и эндосперма. Сортная популяция твердой пшеницы в России имеет достаточную концентрацию доминантных ( $H_1$ – $H_{24}$ ) и рецессивных генов, определяющих устойчивость к гессенской мухе. Большинство российских сортов твердой пшеницы имеют относительную устойчивость к шведской мухе – повреждение редко достигает 11–15 %.

Селекция на засухоустойчивость носит региональный характер, т.е. засухоустойчивые биотипы формируются в зависимости от количества осадков, величины температуры и их динамики в регионах. Созданы сорта с генами редукции высоты растений – *Rht Ahn* (Безенчукская золотистая, Безенчукская 210, Безенчукский подарок, Шукшинка, АТП Прима) и *Rht1b* (Безенчукская 209 и Триада), адаптированные к степным засушливым зонам.

Улучшение качества зерна, помимо физических свойств, ведется по содержанию белка, желтым пигментам и качеству клейковины. Сложные для одновременной селекции признаки «содержание белка (клейковины)» и «урожайность» в процессе селекции эволюционировали в следующей степени сопряженности: 1) увеличение концентрации белка при сохранении урожайности; 2) снижение концентрации белка при значительном увеличении урожайности; 3) увеличение урожайности при сохранении концентрации белка. Концентрация желтых пигментов в зерне современных сортов превышает показатель первого селекционного сорта Гордеиформе 432 на 65–85 %. Значительное улучшение качества клейковины в процессе селекции произо-

шло по параметрам: ИДК, SDS седиментации, параметрам миксографа, фаринографа, индекса глютена. По результатам электрофореза глиадиновой фракции запасных белков выявлено наличие у 50 % коммерческих сортов низкомолекулярного компонента глютенина второго типа (LMW-2), функционально связанного с формированием высококачественной клейковины.

В ближайшей и среднесрочной перспективе классические селекционные подходы по-прежнему будут играть важную роль в улучшении твердой пшеницы. Достижения в области секвенирования ДНК и других технологий, таких как биоинформатика, статистика и другие научные области, могут помочь селекционерам повысить эффективность и скорость селекционного процесса. Использование новых технологий молекулярной биологии имеет большое значение, но их применение необходимо сочетать с надежными и обширными испытаниями в реальных полевых условиях.

## Список литературы / References

- Альдеров А.А. Генетика короткостебельных тетраплоидных пшениц. СПб.: ВИР, 2001.
- [Aldеров А.А. Genetics of Short-stem Tetraploid Wheats. St. Petersburg: VIR Publ., 2001. (in Russian)]
- Барышева Н.В., Розова М.А., Зиборов А.И., Хлебцова Л.П., Крайнов А.П. Устойчивость генотипов твердой пшеницы к черному зародышу. *Acta Biologica Sibirica*. 2016;2(4):45-51.
- [Barysheva N.V., Rozova M.A., Ziborov A.I., Khlebцова L.P., Krainov A.P. Durum wheat resistance to black point. *Acta Biologica Sibirica*. 2016;2(4):45-51. (in Russian)]
- Бесалиев И.Н., Крючков А.Г. К оценке экологической пластичности сортов яровой твердой пшеницы в связи с приемами основной обработки. *Бюлл. Оренб. науч. центра УрО РАН*. 2014;4:3.
- [Besaliev I.N., Kryuchkov A.G. To the assessment of ecological plasticity spring durum wheat cultivars in hosting bases tillage. *Bulleten' Orenburgskogo Nauchnogo Centra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2014;4:3. (in Russian)]
- Благонадеждина О.А. Результаты работы по селекции яровой твердой пшеницы в условиях сухого земледелия. В: Сборник НИР Куйбышевской (Безенчукской) с.-х. опытной станции. Куйбышев, 1968;24-30.
- [Blagonadezhkina O.A. The results of spring durum wheat breeding under the conditions of dry farming. In: Collection of Research Works of the Kuybyshev (Bezenchuk) Agricultural Station. Kuybyshev, 1968;24-30. (in Russian)]
- Бороевич С. Принципы и методы селекции растений. М.: Колос, 1984.
- [Borovich S. Principles and Methods of Plant Breeding. Moscow: Kolos Publ., 1984. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. Т. 2. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935;3-214.
- [Vavilov N.I. Scientific Foundations of Wheat Breeding. Moscow; Leningrad: Selkhozgiz Publ., 1935;3-214. (in Russian)]
- Васильчук Н.С. Селекция яровой твердой пшеницы. Саратов: Новая газета, 2001.
- [Vasil'chuk N.S. Spring Durum Wheat Breeding. Saratov: Novaya Gazeta Publ., 2001. (in Russian)]
- Вьюшков А.А. Селекция яровой пшеницы в Среднем Поволжье. Самара: ООО «СамЛЮКС», 2004.
- [Vyushkov A.A. Spring Wheat Breeding in the Middle Volga Region. Samara: SamLUX Publ., 2004. (in Russian)]
- Гапонов С.Н., Шутарева Г.И., Попова В.М., Цетва Н.М., Паршикова Т.М. Результаты селекции яровой твердой пшеницы для за-

- сушливого Поволжья. *Аграр. вестн. Юго-Востока*. 2017;1(16): 16-17.
- [Gaponov S.N., Shutareva G.I., Popova V.M., Tsetva N.M., Parshikova T.M. Breeding results of spring durum wheat for the arid Volga region. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka = Agrarian Reporter of South East*. 2017;1(16):16-17. (in Russian)]
- Гапонов С.Н., Шутарева Г.И., Цетва Н.М., Цетва И.С., Милованов И.В. Усовершенствование метода реологической оценки качества зерна в селекции яровой твердой пшеницы. *Зерновое хозяйство России*. 2020;1(67):49-53. DOI 10.31367/2079-8725-2020-67-1-49-53.
- [Gaponov S.N., Shutareva G.I., Tsetva N.M., Tsetva I.S., Milovanov I.V. Improvement of the method of rheological assessment of grain quality in the spring wheat breeding. *Zernovoye Khozyaystvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2020;1(67):49-53. DOI 10.31367/2079-8725-2020-67-1-49-53. (in Russian)]
- Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М.: Наука, 1982.
- [Genkel P.A. Physiology of Heat and Drought Tolerance in Plants. Moscow: Nauka Publ., 1982. (in Russian)]
- Германцев Л.А., Ильина Т.Ф. Селекция яровой твердой пшеницы на Краснокутской станции 1909–2018 гг. *Аграр. вестн. Юго-Востока*. 2019;1:4-9.
- [Germantsev L.A., Ilyina T.F. Breeding spring durum in Krasnokutskoy Station, 1909–2018. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka = Agrarian Reporter of South-East*. 2019;1:4-9. (in Russian)]
- Голик В.С., Голик О.В. Селекция *Triticum durum* Desf. Харьков: Магда ЛТД, 2008.
- [Golik V.S., Golik O.V. The Breeding of *Triticum durum* Desf. Khar'kov: Magda LTD Publ., 2008. (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012.
- [Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheats and their Related Species. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2012. (in Russian)]
- Государственные реестры селекционных достижений, допущенных к использованию. Сорта растений. Министерство сельского хозяйства России, 1993–2022.
- [State Registers of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Plant Varieties. Ministry of Agriculture of Russia, 1993–2022. (in Russian)]
- Грошев С.В. Твердая пшеница ждет твердого решения. *Крестьянин*. 2020;50:10-11.
- [Groshev S.V. Hard wheat is waiting for a firm decision. *Krest'yanin = The Farmer*. 2020;50:10-11. (in Russian)]
- Гуркин Н.А. Действие гена низкорослости на яровую твердую пшеницу. В: Физиологические и генетические основы селекции. Саратов, 1984;137-143.
- [Gurkin N.A. The effect of the short stature gene on spring durum wheat. In: Physiological and Genetic Fundamentals of Breeding. Saratov, 1984;137-143. (in Russian)]
- Долгалев М.П., Тихонов М.П. Адаптивная селекция яровой пшеницы в Оренбургском Приуралье. Оренбург: ИПК ГОУ ОГУ, 2005.
- [Dolgalev M.P., Tikhonov M.P. Adaptive Breeding of Spring Wheat in the Orenburg Cis-Ural Region. Orenburg, 2005. (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчанинова О.Д., Шитова И.П., Мережко А.Ф., Филатенко А.А. Пшеницы мира. Л.: Агропромиздат, 1987.
- [Dorofeev V.F., Udachin R.A., Semenova L.V., Novikova M.V., Gradchaninova O.D., Shitova I.P., Merezko A.F., Filatenko A.A. Wheats of the World. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1987. (in Russian)]
- Драгавцев В.А., Михайленко И.М., Проскуряков М.А. Неканонический подход к решению задачи наследственного повышения засухоустойчивости у растений (на примере хлебных злаков). *С.-х. биология*. 2017;52(3):487-500. DOI 10.15389/agrobiol.2017.3.487rus.
- [Dragavtsev V.A., Mikhailenko I.M., Proskuryakov M.A. On how we can non-canonically increase hereditary drought resistance in plants (by an example of cereals). *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(3):487-500. DOI 10.15389/agrobiol.2017.3.487rus. (in Russian)]
- Евдокимов М.Г., Юсов В.С., Моргунов А.И., Зеленский Ю.И. Засухоустойчивый генотип твердой яровой пшеницы, идентифицированный в многолетних испытаниях питомников казахстанско-сибирской селекции пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(5):515-522. DOI 10.18699/VJ17.23-о.
- [Evdokimov M.G., Yusov V.S., Morgunov A.I., Zelensky Yu.I. Drought tolerance gene pool in developing adaptive varieties of durum wheat identified in study nurseries under the Kazakhstan-Siberian program. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(5):515-522. DOI 10.18699/VJ17.23-о. (in Russian)]
- Евдокимов М.Г., Белан И.А., Юсов В.С., Ковтуненко А.Н., Росеева Л.П. Адаптивный потенциал сортов пшеницы (озимой, яровой мягкой, яровой твердой) селекции Омского аграрного научного центра. *Достижения науки и техники АПК*. 2020;34(10):9-15. DOI 10.24411/0235-2451-2020-11001.
- [Evdokimov M.G., Belan I.A., Yusov V.S., Kovtunencko A.N., Rosseeva L.P. Adaptive potential of wheat varieties (winter, common and durum spring wheat) selected in the Omsk Agricultural Scientific Centre. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2020;34(10):9-15. DOI 10.24411/0235-2451-2020-11001. (in Russian)]
- Евдокимов М.Г., Юсов В.С., Пахотина И.В. Основные тенденции урожайности и качества зерна твердой пшеницы в условиях южной лесостепи Западной Сибири. *Вестник КрасГАУ*. 2021;169(4):33-41. DOI 10.36718/1819-4036-2021-4-33-41.
- [Evdokimov M.G., Yusov V.S., Pakhotina I.V. The main trends in yield and quality of grain of durum spring wheat in the southern forest steppe of Western Siberia. *Vestnik KrasGAU = Bulletin of KSAU*. 2021;169(4):33-41. DOI 10.36718/1819-4036-2021-4-33-41. (in Russian)]
- Евдокимов М.Г., Юсов В.С., Кирьякова М.Н., Мешкова Л.В., Пахотина И.В., Глушаков Д.А. Перспективные генетические источники для селекции яровой твердой пшеницы в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7):609-621. DOI 10.118699/VJGB-22-75.
- [Evdokimov M.G., Yusov V.S., Kiryakova M.N., Meshkova L.V., Pakhotina I.V., Glushakov D.A. Promising genetic sources for the creation of varieties of durum spring wheat in Western Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):609-621. DOI 10.118699/VJGB-22-75. (in Russian)]
- Кадушкина В.П., Грабовец А.И., Коваленко С.А. Результаты использования химического мутагенеза при селекции яровой твердой пшеницы. *Достижения науки и техники АПК*. 2016;2:82-84.
- [Kadushkina V.P., Grabovets A.I., Kovalenko S.A. Results of chemical mutagenesis in breeding of spring durum wheat. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-industrial Complex*. 2016;2:82-84. (in Russian)]
- Каталоги районированных сортов в СССР и России. М.: Колос, 1954–1992.
- [Catalogs of Released Varieties in the USSR and Russia. Moscow: Kolos Publ., 1954–1992. (in Russian)]
- Козловская В.Ф., Григорьева Л.П., Шатилова Н.В. Использование межвидовой гибридизации для создания источников устойчивости пшеницы к стеблевой ржавчине. *С.-х. биология*. 1990;1:65-71.
- [Kozlovskaya V.F., Grigoryeva L.P., Shatilova N.V. Using interspecific hybridization for the development of new donors of stem rust resistance in wheat. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1990;1:65-71. (in Russian)]
- Койшибаев М. Болезни пшеницы. ФАО. Анкара, 2018.
- [Koishibaev M. Diseases of Wheat. FAO. Ankara, 2018. (in Russian)]

- Константинов П.Н. К борьбе с засухами в Поволжье. Покровск: Унзере Виртшафт, 1923.  
[Konstantinov P.N. To Combat Droughts in the Volga Region. Pокrovsk: Unsere Wirtschaft Publ., 1923. (in Russian)]
- Крупнов В.А. Стратегия и технология селекции пшеницы на расоспецифическую устойчивость к листовой ржавчине в Поволжье. *Аграр. вестник Юго-Востока*. 2016;14-15(1-2):22-26.  
[Krupnov V.A. Strategy and technology of wheat breeding for race-specific leaf rust resistance in the Volga region. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka = Agrarian Reporter of South-East*. 2016;14-15(1-2):22-26. (in Russian)]
- Крючков А.Г. Основные принципы и методология агроэкологического районирования зерновых культур в степи Южного Урала. М.: Колос, 2006.  
[Kryuchkov A.G. Basic Principles and Methodology of Agroecological Zoning of Grain Crops in the Steppe of the Southern Urals. Moscow: Kolos Publ., 2006. (in Russian)]
- Кудрявцев А.М. Генетика глиадина яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.). *Генетика*. 1994;30(1):77-84.  
[Kudryavtsev A.M. Genetics of gliadin in spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Genetika = Genetics*. 1994;30(1):77-84. (in Russian)]
- Кудрявцев А.М., Дедова Л.В., Мельник В.А., Шишкина А.А., Упельник В.П., Новосельская-Драгович А.Ю. Генетическое разнообразие современных российских сортов яровой и озимой твердой пшеницы по глиадинкодирующим локусам. *Генетика*. 2014;50(5):554-559. DOI 10.7868/S0016675814050099.  
[Kudryavtsev A.M., Dedova L.V., Melnik V.A., Shishkina A.A., Upelnik V.P., Novoselskaya-Dragovich A.Y. Genetic diversity of modern Russian durum wheat cultivars at the gliadin-coding loci. *Russ. J. Genet.* 2014;50(5):483-488. DOI 10.1134/S1022795414050093.]
- Кумаков В.А. Физиологическое обоснование моделей сортов пшеницы. М.: Колос, 1985.  
[Kumakov V.A. Physiological Grounds of Models of Wheat Varieties. Moscow: Kolos Publ., 1985. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Наследование выполненности соломины у *Triticum durum* Desf. *Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. Спец. выпуск: Развитие научного наследия академika Н.М. Тулайкова*. 2008;133-141.  
[Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Inheritance of straw solidness in *Triticum durum* Desf. *Izvestiya Samarskogo Nauchnogo Centra RAN. Spets. Vypusk: Razvitiye Nauchnogo Naslediya Akademika N.M. Tulaykova = Proceedings of the Samara Scientific Center of the RAS. Special Issue: Development of the Scientific Heritage of Academician N.M. Tulaykov*. 2008;133-141. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Формирование ассоциаций генов, контролируемых общих гомеостаз и элементы продуктивности твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(3):323-332. DOI 10.18699/VJ15.042.  
[Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Formation of gene associations that code for general homeostasis and performance components of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(3):323-332. DOI 10.18699/VJ15.042. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Содержание желтых пигментов в зерне твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): биосинтез, генетический контроль, маркерная селекция. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):501-511. DOI 10.18699/VJ20.642.  
[Malchikov P.N., Myasnikova M.G. The content of yellow pigments in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grains: biosynthesis, genetic control, marker selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):501-511. DOI 10.18699/VJ20.642. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г., Леонова И.Н., Салина Е.А. Интрогрессия устойчивости к мучнистой росе (*Blumeria graminis* DC. f. *tritici*) от *Triticum timopheevii* Zhuk. и *Triticum dicoccum* Shuebl. в геном *Triticum durum* Desf. *Зерновое хозяйство России*. 2015;2:63-67.  
[Malchikov P.N., Myasnikova M.G., Leonova I.N., Salina E.A. Introgression of stability to powdery mildew (*Blumeria graminis* DC. f. *tritici*) from *Triticum timopheevii* Zhuk. and *Triticum dicoccum* Shuebl. in genome *Triticum durum* Desf. *Zernovoye Khozyaystvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2015;2:63-67. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Чахеева Т.В., Мясникова М.Г. Исходный материал яровой твердой пшеницы для селекции сортов, устойчивых к патогенам, вызывающим почернение зародыша зерна. *Рос. с.-х. наука*. 2022;5:13-18. DOI 10.31857/S2500262722050039.  
[Malchikov P.N., Chakheeva T.V., Myasnikova M.G. Source material of spring durum wheat for breeding varieties resistant to pathogens that cause blackening of the grain germ. *Russian Agricultural Sciences*. 2022;48(6):446-453. DOI 10.3103/S106836742206009X]
- Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Пухальский А.В. Анализ генетического разнообразия сортов яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.), районированных на территории России в 1929–2004 гг. *Генетика*. 2005;41(10):1358-1368.  
[Martynov S.P., Dobrotvorskaya T.V., Pukhalskiy A.V. Analysis of the genetic diversity of spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars released in Russia in 1929–2004. *Russ. J. Genet.* 2005;41(10):1113-1122. DOI 10.1007/s11177-005-0208-4.]
- Марушев А.И. Качество зерна пшениц Поволжья. Саратов, 1968.  
[Marushev A.I. Grain Quality in Volga Wheats. Saratov Publ., 1968. (in Russian)]
- Митрофанова О.П. Генетические ресурсы пшеницы в России: состояние и предселекционное изучение. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):10-20.  
[Mitrofanova O.P. Wheat genetic resources in Russia: current status and pre-breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):10-20. (in Russian)]
- Мясникова М.Г., Мальчиков П.Н., Шаболкина Е.Н., Сидоренко В.С., Тугарева Ф.В., Розова М.А., Чахеева Т.В., Цыганков В.И. Изменение содержания белка в зерне пшеницы твердой яровой в процессе селекции высокоурожайных сортов. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2019;4(32):112-119. DOI 10.24411/2309-348X-2019-11141.  
[Myasnikova M.G., Malchikov P.N., Shabolkina E.N., Sidorenko V.S., Tugareva F.V., Rozova M.A., Chakheeva T.V., Tsyganov V.I. Changes of protein content in spring durum wheat grain during the breeding of high-yield varieties. *Zernobobovyye i Krupanye Kul'tury = Legumes and Groat Crops*. 2018;4(32):112-119. DOI 10.24411/2309-348X-2019-11141. (in Russian)]
- Розова М.А., Зиборов А.И., Егизарян Е.Е. Экологические, генетические и эволюционные аспекты варьирования урожайности и ее структурных элементов у сортообразов яровой твердой пшеницы в условиях приобской лесостепи Алтайского края. *Вестн. Алт. гос. агр. ун-та*. 2017;157(11):5-13.  
[Rozova M.A., Ziborov A.I., Yegizaryan E.E. Ecologic, genetic and evolutionary aspects of variation of yield and its components in spring durum wheat genotypes under the conditions of the Altai region's the Ob river forest-steppe. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agrarian University*. 2017;157(11):5-13. (in Russian)]
- Рсалиев А.С., Гульязева Е.И., Мальчиков П.Н., Шайдаюк Е.Л., Коваленко Н.М., Яковлева Д.Р., Байгутов М.Ж. Устойчивость перспективных образцов яровой твердой пшеницы к листовым болезням. *Вестник зацеты растений*. 2020;103(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2020-103-2-13334.  
[Rsaliyev A.S., Gulyaeva E.I., Malchikov P.N., Shaydayuk E.L., Kovalenko N.M., Yakovleva D.R., Baigutov M.Zh. Resistance of perspective spring durum wheat accessions to foliar diseases. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2020;103(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2020-103-2-13334. (in Russian)]
- Савицкая В.А., Синицын С.С., Широков А.И. Твердая пшеница в Сибири. М.: Колос, 1980.

- [Savitskaya V.A., Sinitsyn S.S., Shirokov A.I. Durum Wheat in Siberia. Moscow: Kolos Publ., 1980. (in Russian)]
- Смирнова О.Г., Пшеничникова Т.А. Взаимосвязь между генетическим статусом локуса *Vrn-1* и размерами корневой системы у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):805-811. DOI 10.18699/VJ21.093. [Smirnova O.G., Pshenichnikova T.A. The relationship between the genetic status of the *Vrn-1* locus and the size of the root system in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):805-811. DOI 10.18699/VJ21.093. (in Russian)]
- Соратники Николая Ивановича Вавилова: Исследователи генетических ресурсов растений. Редкол.: В.А. Драгавцев (отв. ред.) и др. СПб.: ВИР, 1994. [Dragavtsev V.A. (Ed.) Companion of Nikolai Ivanovich Vavilov. Plant Gene Pool Researchers. St. Petersburg: VIR Publ., 1994. (in Russian)]
- Таланов В.В. Сорты яровой пшеницы по данным сети государственного сортоиспытания НКЗ РСФСР за 1924 и 1925 гг. Л., 1926. [Talanov V.V. The Best Varieties of Spring Wheats According to the State Variety Testing Network of the People's Commissariat of Agriculture of the RSFSR in 1924 and 1925. Leningrad, 1926. (in Russian)]
- Фиссора Н.И., Бессемельцев В.И., Терехов В.И., Афонин С.П. Зависимость инкубационного периода мучнистой росы пшеницы от метеорологических факторов. *С.-х. биология*. 1987;8:50-53. [Fissyura N.I., Bessemeltsev V.I., Terekhov V.I., Afonin S.P. Dependence of the incubation period of wheat powdery mildew on weather factors. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya* = *Agricultural Biology*. 1987;8:50-53. (in Russian)]
- Хлебова Л.П., Барышева Н.В. Генетический контроль устойчивости к стеблевой ржавчине у интрогрессивных линий твердой пшеницы, производимой *Triticum timopheevii* Zhuk. *Биол. вестн. Мелитопол. гос. пед. ун-та им. Богдана Хмельницкого*. 2016;6(3):121-131. DOI 10.15421/201678. [Khlebova L.P., Barysheva N.V. Genetic control of resistance to stem rust in durum wheat introgressive lines derived from *Triticum timopheevii* Zhuk. *Biologicheskii Vestnik Melitopol'skogo Gosudarstvennogo Pedagogicheskogo Universiteta im. Bogdana Khmel'niitskogo* = *Biological Bulletin of Bogdan Khmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University*. 2016;6(3):121-131. DOI 10.15421/201678. (in Russian)]
- Чехович К.Ю. Селекционный отдел Безенчукской опытной станции. В: Селекция и семеноводство в СССР. М., 1924;86-96. [Chekhovich K.Yu. The breeding department of the Bezenchuk Experimental Station. In: Breeding and Seed Production in the USSR. Moscow, 1924;86-96. (in Russian)]
- Шевченко С.Н., Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г., Натолы В., Чахеева Т.В. Ускоренное создание с помощью методов геномной селекции высококачественных аналогов, адаптированных к условиям Среднего Поволжья. *Достижения науки и техники АПК*. 2019;33(12):38-42. DOI 10.24411/0235-2451-2019-11207. [Shevchenko S.N., Malchikov P.N., Myasnikova M.G., Natoli V., Chakheeva T.V. Accelerated development of high-quality analogues of durum wheat genotypes adapted to the Middle Volga conditions using genomic selection methods. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK* = *Achievements of Science and Technology in Agro-industrial Complex*. 2019;33(12):38-42. DOI 10.24411/0235-2451-2019-11207. (in Russian)]
- Шестакова А.П., Вьюшков А.А. Изучение исходного материала яровой пшеницы по устойчивости к пыльной головне и его селекционное использование. В: Наука и эффективность сельскохозяйственного производства. Куйбышев, 1975;89-99. [Shestakova A.P., Vyushkov A.A. Study of spring wheat source material for resistance to loose smut and its breeding use. In: Science and Efficiency of Agricultural Production. Kuybyshev, 1975;89-99. (in Russian)]
- Шехурдин А.П. Селекция и семеноводство яровой пшеницы на Юго-Востоке. М.: Колос, 1961. [Shekhurdin A.P. Breeding and Seed Production of Spring Wheat in the Southeast Region. Moscow: Kolos Publ., 1961. (in Russian)]
- Chu C.G., Friesen T.L., Faris J.D., Xu S.S. Evaluation of seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in tetraploid wheat. *Crop Sci*. 2008;48(3):1107-1116. DOI 10.2135/cropsci2007.09.05.16.
- Conner R.L. Influence of irrigation timing on black point incidence in soft white spring wheat. *Can. J. Plant Pathol*. 1987;9(4):301-306. DOI 10.1080/07060668709501861.
- Damidaux R., Autran J.C., Grinac P., Feillet P. Mise en evidence de relation application en selection entre electrophoregramme des gliadines et les proprietes viscoelastiques du gluten du *Triticum durum* Desf. *C. R. Acad. Sci. Series D*. 1978;287:701-704.
- Elouafi I., Nachit M.M., Martin L.M. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Hereditas*. 2001;135(2-3):255-261. DOI 10.1111/j.1601-5223.2001.t01-1-00255.x.
- Eurostat. Agriculture and Agri-Food Canada. Area, Yield, and Production of Canadian Principal Field Crops Report. 2019. Available online: <https://agriculture.canada.ca/en/sector/crops/reports-statistics>.
- Gulyaeva E., Yusov V., Rosova M., Malchikov P., Shaydayuk E., Wanyera R., Morgunov A., Yskakova G., Rsaliev A. Evaluation of resistance of spring durum wheat germplasm from Russia and Kazakhstan to fungal foliar pathogens. *Cereal Res. Commun*. 2020;48(1):71-79. DOI 10.1007/s42976-019-00009-9.
- Hovmøller M.S. GRRC report: Samples of stem rust infected wheat from Russia. 2017. Available online: [https://agro.au.dk/fileadmin/Country\\_report\\_Russia\\_-\\_August2017.pdf](https://agro.au.dk/fileadmin/Country_report_Russia_-_August2017.pdf).
- Joppa L.R., Du C., Hart G.E., Harland G.A. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci*. 1997;37(5):1586-1589. DOI 10.2135/CROPSCI1997.0011183X003700050030X.
- Körnische F.K. Systematische Übersicht der Cerealien und Monocarpischen Leguminosen. Popelsdorf, 1873.
- Kosmolak F.G., Dexter J.E., Matsuo R.R., Lessle D., Marchylo B.A. A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregrams. *Can. J. Plant Sci*. 1980;60(2):427-432. DOI 10.4141/CJPS80-064.
- Kulkarni M., Soolanayakanahally R., Ogawa S., Uga Y., Selvaraj M.G., Kagale S. Drought response in wheat: Key genes and regulatory mechanisms controlling root system architecture and transpiration efficiency. *Front. Chem*. 2017;5:106. DOI 10.3389/fchem.2017.00106.
- Lamari L., Bernier C.C. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: host-specificity, significance in disease, and inheritance of host reaction. *Phytopathology*. 1989;79:740-744. DOI 10.1094/Phyto-79-740.
- Marchylo B.A., Dexter J.E., Clarke F.N., Clarke J.M., Preston K.R. Relationships among bread-making quality, gluten strength, physical dough properties, and pasta cooking quality for some Canadian durum wheat genotypes. *Can. J. Plant Sci*. 2001;81(4):611-620. DOI 10.4141/P00-13.
- Martínez F., Sillero J.C., Rubiales D. Resistance to leaf rust in cultivars of bread wheat and durum wheat grown in Spain. *Plant Breed*. 2007;126(1):13-18. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01287.x.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubkovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium, 8-13 September 2013; Yokohama, Japan. Springer Open, 2013.
- N'Diaye A., Haile J.K., Cory A.T., Clarke F.R., Clarke J.M., Knox R.E., Pozniak C.J. Single marker and haplotype-based association analysis of semolina and pasta colour in elite durum wheat breeding lines using a high-density consensus map. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170941. DOI 10.1371/journal.pone.0170941.
- Ordóñez M.E., Kolmer J.A. Virulence phenotypes of a worldwide collection of *Puccinia triticina* from durum wheat. *Phytopathology*. 2007;97:344-351.

- Percival J. The Wheat Plant. A Monograph. London, 1921.
- Pogna N., Lafiandra D., Feillet P., Autran J.C. Evidence for a direct causal effect of low molecular weight subunits of glutenins on gluten viscoelasticity in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 1988;7(3):211-214. DOI 10.1016/S0733-5210(88)80001-8.
- Reynolds M.P., Pask A.J.D., Mullan D.M. (Eds.). *Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation*. Mexico, D.F.: CIMMYT, 2012.
- Ronchallo P.F., Guzman C., Larsen A.O., Achilli A.L., Dreisigsker S., Molfese E., Astiz V., Echenique V. Allelic variation at gluten loci (*Glu-1*, *Glu-2*, and *Glu-3*) in worldwide durum wheat collection and its effect quality attributes. *Foodes.* 2021;10(11):2845. DOI 10.3390/foods10112845.
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgounov A.I. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica.* 2016;212(2): 287-296. DOI 10.1007/s10681-016-1769-0.
- Singh P.K., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Elias E.M., Hughes G.R. Identification of new sources of resistance to tan spot, *Stagonospora nodorum* blotch, and *Septoria tritici* blotch of wheat. *Crop Sci.* 2006;46(5):2047-2053. DOI 10.2135/cropsci2005.12.0469.
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Lagudah E.S., Ayliffe M.A., Bhavani S., Rouse M.N., Pretorius Z.A., Szabo L.J., Huerta-Espino J., Basnet B.R., Lan C., Hovmöller M.S. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology.* 2015;105(7):872-884. DOI 10.1094/PHYTO-01-15-0030-FI.
- Tajibayev D., Yusov V.S., Chudinov V.A., Malchikov P.N., Rozova M.A., Shamanin V.P., Shtpelev S.S., Sharma R., Tsygankov V.I., Morgunov A.I. Genotype by environment interactions for spring durum wheat in Kazakhstan and Russia. *Ecol. Genet. Genom.* 2021; 21:100099. DOI 10.1016/j.egg. 2021.100099.
- Vavilov N.I. *The New Systematics of Cultivated Plants*. Oxford: The Clarendon Press, 1940.
- Vedder C. *Dier Trennung von Kornproteinen mit Hilfe der Elektrophorese als Hilfsmittel bei Elternwahl und Selektion in der Selbstbefruchterzuchtung am Beispiel des Winterweizens: Inaugural-Diss.* Bonn, 1992.
- Xu S.S., Friesen T.L., Mujeeb-Kazi A. Seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in synthetic hexaploid wheats. *Crop Sci.* 2004;44(6):2238-2245. DOI 10.2135/cropsci2004.2238.

---

#### ORCID ID

P.N. Malchikov [orcid.org/0000-0002-2141-6836](https://orcid.org/0000-0002-2141-6836)  
M.G. Myasnikova [orcid.org/0000-0002-7224-0308](https://orcid.org/0000-0002-7224-0308)

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-16-00041 (<https://rscf.ru/project/23-16-00041/>).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.05.2023. После доработки 09.07.2023. Принята к публикации 11.07.2023.



# Estimation of genetic components, heterosis and combining ability of elite Pakistani wheat varieties for yield attributing traits and stripe rust response

M.S. Ahmed<sup>1,2</sup>✉, M. Qamar<sup>1</sup>, S. Waqar<sup>1</sup>, A. Naeem<sup>2</sup>, R.A. Javaid<sup>1</sup>, S.K. Tanveer<sup>1</sup>, I. Hussain<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wheat Program, Crop Sciences Institute, National Agricultural Research Center, Islamabad, Pakistan

<sup>2</sup>Rice Program, Crop Sciences Institute, National Agricultural Research Center, Islamabad, Pakistan

✉ shahzad@parc.gov.pk

**Abstract.** Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a staple food and major source of dietary calories in Pakistan. Improving wheat varieties with higher grain yield and disease resistance is a prime objective. The knowledge of genetic behaviour of germplasm is key. To achieve this objective, elite wheat varieties were crossed in 4 by 3, line × tester design, and tested in 2019 in a triplicate yield trial to estimate genetic variance, general and specific combining ability, mid-parent heterosis and stripe rust (*Puccinia striiformis* L.). High grain 3358 kg·ha<sup>-1</sup> was recorded in F<sub>1</sub> hybrid (ZRG-79×PAK-13). Analysis of variance (ANOVA) revealed significant genotypic variance in grain yield. Broad sense heritability (H<sup>2</sup>) was recorded in the range of 28 to 100 %. General combining ability (GCA) significant for grain yield in parents except FSD-08 and PS-05 was recorded, while specific combining ability (SCA) was recorded to be highly significant for grain yield only in two crosses (ZRG-79×NR-09 and ZRG-79×PAK-13). Mid-parent heterosis was estimated in the range of -28 to 62.6 %. Cross combinations ZRG-79×PAK-13 depicted highly significant mid-parent heterosis (62.6 %). Highly significant correlation was observed among spike length, spikelets per spike, plant height and 1000-grain weight. Rust resistance index was recorded in the range of 0 to 8.5. These findings suggest exploitation of GCA for higher grain yield is important due to the presence of additive gene action and selection in the filial generations will be effective with improved rust resistance, while cross combinations ZRG-79×PAK-13 high GCA are best suited for hybrid development.

Key words: wheat; combining ability; mid-parent heterosis; stripe rust; rust resistance index.

**For citation:** Ahmed M.S., Qamar M., Waqar S., Naeem A., Javaid R.A., Tanveer S.K., Hussain I. Estimation of genetic components, heterosis and combining ability of elite Pakistani wheat varieties for yield attributing traits and stripe rust response. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):609-622. DOI 10.18699/VJGB-23-72

## Анализ генетических компонент, гетерозиса и комбинационной способности пакистанских элитных сортов пшеницы по признакам урожайности и устойчивости к желтой ржавчине

М.Ш. Ахмед<sup>1,2</sup>✉, М. Камар<sup>1</sup>, С. Вакар<sup>1</sup>, А. Наим<sup>2</sup>, Р.А. Джавайд<sup>1</sup>, С.Х. Танвир<sup>1</sup>, И. Хусейн<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Программа по выращиванию пшеницы, Институт растениеводства, Национальный исследовательский центр сельского хозяйства, Исламабад, Пакистан

<sup>2</sup>Программа по выращиванию риса, Институт растениеводства, Национальный исследовательский центр сельского хозяйства, Исламабад, Пакистан

✉ shahzad@parc.gov.pk

**Аннотация.** Пшеница (*Triticum aestivum* L.) – основной пищевой и кормовой продукт на территории Пакистана. Одной из приоритетных задач является работа по улучшению сортов пшеницы, отличающихся более высокой урожайностью зерна и устойчивостью к заболеваниям. Ключевым фактором такой работы стало изучение генетического разнообразия сортового материала. С этой целью были оценены показатели урожайности у потомства, полученного от скрещивания четырех элитных сортов пшеницы с тремя тестерными линиями. На основе проведенного анализа получены данные о генетической дисперсии, общей и специфической комбинационной способности, гетерозисе и степени устойчивости к желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* L.). Высокая урожайность зерна (3358 кг/га) была отмечена среди растений первого поколения от скрещивания ZRG-79×PAK-13. Дисперсионный анализ (ANOVA) выявил статистически достоверную генотипическую дисперсию по данному признаку. Значение показателя наследуемости (H<sup>2</sup>) фиксировалось в диапазоне от 28 до 100 %. Выявленная общая комбинационная способность (ОК) по признаку «урожайность зерна» была статистически достоверной для всех родительских сортов, кроме FSD-08 и PS-05, в то время как специфическая комбинационная способность (СК) по данному признаку оказалась высокодостоверной только для гибридных растений от двух скрещиваний: ZRG-79×NR-09 и ZRG-79×PAK-13. Величина гетерозиса составила от -28 до 62.6 %. В комбинациях скрещивания ZRG-79×PAK-13 была показана высокодостоверная величина гетерозиса (62.6 %). Наблюдалась высокодо-

стоверная корреляция по признакам «длина колоса», «число колосков в колосе», «высота растения» и «масса 1000 зерен». Значение индекса устойчивости к ржавчине изменялось в диапазоне от 0 до 8.5. На основании полученных результатов сделаны следующие выводы: 1) учет ОКС важен при отборе на более высокую урожайность зерна, обусловленную действием аддитивных генов; 2) отбором в дочерних поколениях обеспечится повышенная устойчивость к ржавчине; 3) комбинации скрещивания ZRG-79 × ПAK 13 с высокой ОКС лучше всего подойдут для создания гибридных сортов.

Ключевые слова: пшеница; комбинационная способность; гетерозис; желтая ржавчина злаков; индекс устойчивости к ржавчине.

## Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is an important cereal crop worldwide playing a crucial role in the daily dietary and nutritional requirement not only for human beings but also for animals. It is the major food for one third of world population and its chief use is the flour for making bread. It is grown around all continents. Increasing human population, climate change and global pandemics have an overwhelming impact on food security, especially wheat on crop with current inadequate genetic improvement of wheat to meet future demand. In Pakistan, wheat is grown in an area of 9.2 million ha with the production of around 25.5 m tonnes (FAOSTAT, 2016) and hardly meets the total requirement of the country. But this figure is continuously under fluctuation because of stagnant yield of cultivars, disease impact, drought, and floods. Apart from these factors, injudicious selection of parental selection for a breeding program without prior knowledge of genetic behaviour in germplasm and lack of indigenous breeding programs for genetic improvement of wheat is another constraint in the yield.

Genetic recombination in germplasm by hybridization is a robust conventional breeding tool for obtaining transgressive segregants and genetic variation, which provides means of selection of ideotypes. Gene action and combining ability analysis are a most reliable biometric procedure for the study of genetic behaviour of yield and yield-related components (Rashid et al., 2007). General combining ability is the average performance of genotypes in a series of cross combinations, while specific combining ability is the performance of a particular genotype in a specific cross combination. Mode of selection depends based on genetic action in traits of interest (Arzu, 2017).

In self-pollinated crops, especially in wheat, plant breeders are usually interested in selection of segregants having additive gene action with high specific combining ability. Additive gene action boosts yield and yield components by cumulative addition of genes. Dominance genetic variance exploits heterosis in cross combinations and specific combining ability provides the presence of dominant or non-additive gene action in a particular trait (Kaushik, 2019) and provides optimal parental identification (Fakthongphan et al., 2016). Equal magnitude of both general and specific combining ability in a breeding population means preponderance of both additive and dominant genes for the traits of interest; selection in this case is most effective for variety development (Ahmad et al., 2012). The term combining ability was first introduced and further refined as general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) by Sprague and Tatum (1942). GCA distinguishes between the mean performances of parents in cross combinations while SCA is the deviation of individual crosses from the average performance of the pa-

rents involved. GCA and SCA represent the additive and non-additive portions of genotypic variance respectively (Hallauer et al., 1988). The estimates from GCA and SCA provide an assessment of relative merits of the individual genotypes in cross combinations to guide selection and testing schemes. Thus, line × tester analysis is among the genetic-statistical approaches developed to assist in selection of parents based on their combining ability and the potential to produce promising segregating populations (Okello et al., 2006). According to GCA and SCA impacts, positive values are desirable for most crop plants characteristics, such as growth and yield-related attributes. Negative GCA and SCA impacts, on the other hand, are desirable for characters where minimum values are essential and appealing, such as early flowering.

Heterosis is a phenomenon where  $F_1$  hybrids are superior in traits as compared to their parental genotypes. There are several theories that explain the genetic basis of heterosis, including over-dominance, dominance, and genetic balance. The over-dominance theory of heterosis, first proposed by Shull and East (1908), suggests that heterozygous individuals, since they carry two different alleles, have an advantage over homozygous individuals as they carry two identical alleles for a particular gene. This advantage is thought to mean that the two different alleles can supplement with each other, leading to a vigorous phenotype in  $F_1$  hybrids. The dominance theory, presented by Jones (1917), suggests that hybrid vigour is caused by dominant alleles that are more valuable than the recessive alleles. According to this theory,  $F_1$  hybrids accede two copies of the dominant allele, resulting in a vigorous phenotype. The third heterosis theory is the “Lerner’s genetic balance theory”, suggested by Lerner (1954), that describes that heterosis is the result of a balance between the expression of genes that promote growth and those that hamper growth. In  $F_1$  hybrids, the expression of growth-promoting genes is increased, whereas the expression of growth-retarding genes is decreased, leading to better growth and development.

Heterotic studies for increasing wheat grain yield have been an interest of early wheat researchers. Mid-parent heterosis is the percent of the increase or decrease in the  $F_1$  value as compared to the average value of both parents for any metric trait. In the early green revolution era Pal and Alam (1938) reported mid-parent heterosis (MPH) in wheat. After the green revolution and introduction of semi-dwarf wheat varieties, various wheat researchers reported MPH heterosis in wheat (i. e., Knott, 1965; Shamsuddin, 1985; Uddin et al., 1992). Barbosa-Neto et al. (1996) reported MPH in soft red winter wheat in the range of –20 to 57 %. Liu et al. (1999), Dreisgacker et al. (2005), Basnet et al. (2019) reported MPH in CIMMYT wheat varieties in the range of 9.5 to 14 %.

Wheat crop faces numerous challenges that cause yield losses, including stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*),

which is a major disease in areas where cool to mild warm temperature prevails during the months of February and March in the wheat-growing season. Under conducive environmental conditions, disease causes yield losses ranging from 10 to 70 % depending upon susceptibility of genotypes (Raza et al., 2018). Development of cultivars containing genetic resistance is the most cost-effective and environmentally friendly strategy to mitigate yield losses by stripe rust (Ali Y. et al., 2020). Stripe rust spores continue to mutate and evolve new virulent races causing damage to previously resistant cultivars (Chen et al., 2010). Wheat crop in Pakistan has faced severe damage caused by stripe rust pathogen in recent years (Ali Y. et al., 2020). Due to climate change and rapid mutation in stripe rust pathogen, new races overwintering on alternative host barberry in hilly areas at high altitudes evolve (Figueroa et al., 2020). Under these circumstances, the already resistant genotypes become susceptible (Javaid et al., 2018).

There are two types of resistance mechanism against rust pathogens in wheat, vertical resistance, and horizontal resistance. Vertical resistance is conferred by a single gene to a specific pathogenic race of rust, while horizontal resistance involves the use of multiple genes that provide broad spectrum disease resistance against multiple pathogenic races of rust. There are several resistance genes present in the Pakistani bread wheat varieties that confer resistance against yellow rust, which include *Yr5*, *Yr10*, *Yr15*, *Yr17*, and *Yr18*. Qamar et al. (2014) reported *Lr34/Yr18* gene complex that confers broad spectrum resistance against yellow rust and leaf rust in most of Pakistani wheat varieties. Intikhab et al. (2021) reported the presence of *Lr46/Yr29* gene complex in Punjab-2011 and Pirsabak-2005 cultivars that confer resistance against stripe rust. Khan S.N. et al. (2022) reported the presence of *Yr17* and *Yr5* gene complex in Pakistani wheat varieties Punjab-2011 and Pirsabak-2005. Utilization of these resistance sources in the breeding program for development of varieties resistant against stripe rust is an ultimate objective to ensure high yield on sustainable basis.

Various biometrical techniques and breeding designs are used for genetic evaluation and genetic behaviour of germplasm to be utilized in crop breeding programs, but line × tester analysis is an efficient mating design providing reliable information about GCA and SCA that ultimately depicts the mode of gene action in a particular trait (Fellahi et al., 2013). GCA and SCA are important to apprehend the genetic architecture of quantitative traits and create the road map for initiation of an efficient breeding program (Fasahat et al., 2016).

Several studies investigating the GCA and SCA effects have been conducted in wheat. Zhao et al. (2013) reported significant effects for both GCA and SCA for yield and its components and inferred that selecting parental genotypes with high GCA and SCA effects could lead to the development of high-yielding wheat hybrids. Similarly, researchers assessed the GCA and SCA effects in spring wheat and durum wheat F<sub>1</sub> hybrids by using line × tester model for combining ability estimate and concluded that GCA effects were more important than SCA effects for grain yield and yield-related traits, and selection of parental genotypes with high GCA effects could increase the prospective yield of wheat hybrids (Iqbal A. et al., 2017; Ishaq et al., 2018; Dragov, 2022). They found that both GCA and SCA effects were significant for grain yield

and its components and suggested that selecting parents with high GCA and SCA effects could lead to the development of high-yielding wheat hybrids. Selecting parents with high GCA and SCA effects can improve the yield potential and disease resistance of wheat hybrids, and the use of line × tester designs can provide valuable information about the genetic effects of parents and their hybrids.

The objectives of this study is to elucidate the general and specific combining ability, heterotic potential, and stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) resistance behaviour of indigenous elite wheat varieties and their breeding population.

## Material and methods

**Experimental site and plant material.** The research was carried out at the experimental site of a wheat research program, National Agricultural Research Center, Islamabad Pakistan (Latitude: 33.71° N, Longitude: 73.06° E, Elevation: 683 m) during 2017–2018 wheat growing season. The soil type of the site is clay loam from 0 to 20 cm, and at the 20–40 cm depth it is moderate clay loam. Five widely adopted approved wheat varieties were used as lines (Faisalabad-2008, Punjab-2011, Pirsabak-2005, Miraj-2008 and Zargoan-79) and three widely adopted, registered and approved varieties for rainfed areas of Pakistan were used as a tester, namely, NARC-2009, Pakistan-2013 and Borlaug-2016 (Table 1). These testers are widely adopted and due to their ability to withstand rainfed and drought-prone areas of Pakistan their leaves have the ability to stay green during high terminal heat and drought stress.

**Field experiment and crossing scheme.** Eight parents were hybridized to produced 15 F<sub>1</sub> cross combinations according to line × tester crossing fashion as described by Kempthorne (1957) during 2017–2018 wheat growing season and crossing was conducted during March 2018. 15 cross combinations and seven parents were planted in Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications during 2018–2019 wheat growing season. In every replication, parents and F<sub>1</sub> hybrids were sown in 1 m length with row-to-row spacing 25 cm and plant-to-plant spacing 15 cm. The experiment was conducted in an irrigated field and a total of 6 irrigations were applied after sowing to harvesting time. Recommended doses of fertilizers, i. e. 120 kg N · ha<sup>-1</sup> and 80 kg P · ha<sup>-1</sup>, were applied. Half of the fertilizers were used at the time of soil preparation, the second half was applied at the time of tillering, and weedicides (Ally Max™ Syngenta and Axial™ Syngenta) were used for eradication of broad leaves and narrow leaves weeds respectively according to the doses mentioned by the manufacturer. Herbicide was applied before the jointing stage of the crop. Leaf area was measured when leaves were fully turgid and green.

**Data collection.** Grain yield and some yield-related parameters were measured in parents and hybrid combinations. Grain yield per plant was measured in grams and 1000-grain weight was measured after counting 500 grains of each wheat grain sample on a counting tray once and the second sample was repeated for the other 500 grains.

Canopy temperature was measured by using a portable thermal gun (Model: AG-42, Telatemp Crop, CA). Readings for canopy temperature were taken at three Feeks stages (Large, 1954) like booting, kernel water ripening and grain milking stages (Feeks 10, 10.5.4 and 11.2). All readings were

**Table 1.** Details of wheat parents used in the study and their pedigree/parentage, year of release and parental Institute

Parents	Codes	Pedigree	Institute	Year of release	Area of adoptability	
Lines	Faisalabad-2008	FSD-08	PBW-65/2*PASTOR	AARI, Faisalabad, Punjab	2008	Irrigated/rainfed
	Punjab-2011	PB-11	AMSEL/ATTILA//INQUILAB-91/(SIB)PEWEE		2011	Irrigated
	Pirsabak-2005	PS-05	MUNIA/CHORLITO//AMSEL	CCRI, Pirsabak, KPK	2005	Irrigated/rainfed
	Miraj-2008	MRJ-08	SPARROW/INIA//V-7394/WL-711-3/(SIB)BAGULA	AARI, Faisalabad, Punjab	2008	Irrigated
	Zargoan-79	ZRG-79	CORRECAMINOS/INIA-66/3/TOBARI-66/CENTRIFEN//BLUEBIRD/4/SIETE-CERROS-66	WRI, Quetta Baluchistan	1979	Irrigated/rainfed
Testers	NARC-2009	NR-09	INQALAB 91*2/TUKURU	Wheat Program, NARC, Islamabad	2009	Rainfed
	Pakistan-2013	PAK-13	MEX94.27.1.20/3/SOKOLL//ATTILA/3*BCN		2013	Rainfed
	Borlaug-2016	BOR-16	SOKOLL/3/PASTOR//HXL7573/2*BAU		2016	Irrigated/rainfed

taken at the angle of 30° and above 50 cm of the crop canopy, avoiding land temperature by pointing thermal gum only at the canopy. The observations were taken between 11:00 am and 14:00 pm under stagnant air conditions and clear sky as described by (Reynolds et al., 1998). Observations for Normalized difference vegetative index (NDVI) were recorded 50 cm above the canopy by using a hand-held Green Seeker with an optical sensor unit (Model: 505, CA, USA) at three stages of booting and grain filling between 11:00 hours to 14:00 hours with clear sky (Sultana et al., 2014). Values of NDVI range from -1 (NDVI value usually in the water) to +1 (the strongest green vegetative stage) (Kumar, Silva, 1973).

**Statistical analysis.** Data for other traits (days to 50 % heading, plant height, number of tillers per plant, peduncle length, spike length, days to maturity, number of spikelets per spike, number of grains per spike) were recorded from 6 randomly selected plants. Data recorded were arranged in mean data and subjected to Analysis of Variance (ANOVA) according to Steel and Torrie (1980) and Line × Tester analysis, according to Kempthorne (1957), combining ability and gene action were studied (Singh R.K., Chaudhary, 1977) by using R Package agricolae (De Mendiburu, Simon, 2015; The R Project..., 2017). Genotypic variance and phenotypic variance were estimated as mentioned by Almutairi (2022) in MS Excel 2016, by using the following formula:

$$\text{Genotypic variance } (\sigma^2_g) = \frac{\text{Mean square genotypes (MSG)} - \text{mean square error (MSE)}}{\text{Reps (r)}}$$

$$\text{Phenotypic variance } (\sigma^2_{ph}) = \sigma^2_g + \sigma^2_e,$$

$$\text{Environmental variance } (\sigma^2_e) = \text{Mean square error (MSE)}.$$

Environmental variance was estimated according to Comstock and Robinson (1952). Broad sense heritability was calculated by using the following formula as described by Burton and Devane (1953):

$$\text{Broad sense heritability } (H^2) = \sigma^2_g / \sigma^2_{ph}.$$

Heterosis was estimated in percentage increase or decrease of the F<sub>1</sub> hybrids value over mid-parental value by following the formula as described by Fonseca and Patterson (1968):

$$\text{Mid-Parent Heterosis (\%)} = \frac{(F_1 \text{ hybrid} - \text{Mid-parent})}{\text{Mid-parent}} \times 100.$$

**Disease observations and scoring.** Observations for stripe rust were recorded at the time of appearance of disease and data were recorded when rust pathogen was fully developed on leaves of a susceptible check cultivar and leaves' surface was fully covered with rust's spores. Disease observation was recorded in three replicates of each parental line and F<sub>1</sub> hybrids according to the Cobb Scale method as described by Peterson et al. (1948). The severity of disease was expressed as the percentage of leaf area covered, and 0 % score was given when there was no infection on the leaf and 100 % score was considered when the leaf area was fully covered with rust spores and infection. Readings of percent severity were recorded with the following descriptions for scoring and response values: (R, resistant = 0.2; S, susceptible = 0.3; MR, moderately resistant = 0.4; MRMS, moderately resistant to moderately susceptible = 0.6; MS, moderately susceptible = 0.8; MSS, moderately susceptible to susceptible = 0.9; S, Susceptible = 1.0), response values, coefficient of infection (CI), average coefficient of infection (ACI), country average relative percentage attack (CARPA) and rust resistance index (RRI) according to Akhtar et al. (2002). The following formula was used for the calculation of RRI:

$$\text{RRI} = \frac{100 - \text{CARPA}}{100} \times 9.$$

RRI was calculated by considering the scale of 0 to 9 from CARPA, where 0 represents a most susceptible genotype and 9 represents a highly resistant response of the genotype to rust pathogen.

## Results and discussion

### Analysis of variance (ANOVA)

Analysis of variance (ANOVA) results presented in Table 1 show that the lines (female) had statistically significant differences for all the trails. The testers (male) showed statistical differences for days to heading, plant height, peduncle length, spike length, days to maturity, grains per spike, 1000-grain weight and grain yield, while non-significant results for flag leaf area, tillers per plant and spikelets per spike were shown. Interaction of line × tester was significant in case of plant height, flag leaf area, peduncle length, days to maturity, grains per spike and 1000-grain weight. Parents (male and

female) used in this study provided a broad range of expression for various characters as shown in Table 2. There were significant differences ( $p \leq 0.05$ ) among the means of genotypes (Table 3) for days to heading (DH), highly significant ( $p \leq 0.01$ ) for plant height (PH), flag leaf area (FLA), tillers per plant (TPP), peduncle length (PL), spikelets per spike (SPS), days to maturity (DM), grains per spike (GPS), thousand grain weight (TGW), grain yield (GY) and NDVI value.

The values for days to heading (DH) were maximum in the tester (male) PAK-13 (119 days) and minimum in the lines (female) PB-11, PS-05 and MRJ-08 (117 days). DH are the key indicator of earliness in crop production. Plant breeders are keen to create new varieties of wheat genotypes with early maturity. So, early heading is a desirable trait. Delayed heading leads to a reduction in yield (Ullah et al., 2018) and early heading increases the grain filling duration, which ultimately results in high yield (Iqbal A. et al., 2017). Plant height (PH) was the highest in the female parent FSD-08 (103 cm) and the lowest in the male parent NR-09 (83 cm). Minimum PH is preferred due to expected lodging losses. Similarly, the tester NR-09 (83 cm) can be assessed for developing drought tolerant variety with reduced plant height for future breeding programs. Likewise, minimum flag leaf area (FLA) is also desirable for drought tolerance due to reduced transpiration losses from a reduced area exposed to sunlight. The testers (male) PAK-13 and BOR-16 showed the minimum values of flag leaf area: 29.57 and 29.83 cm<sup>2</sup>, respectively. Peduncle length was longest in the female parent PS-05 (16.67 cm) and shortest in the male parent NR-09 (7.20 cm). PS-05 produced the maximum grain yield (2531.8 kg · ha<sup>-1</sup>) while minimum grain yield (1696.1 kg · ha<sup>-1</sup>) was recorded in ZRG-79.

#### Mean performance of parents and their cross combinations

Mean performance for line, testers and cross combinations for days to maturity (DH) ranged from 117 to 119 days. The parental lines FSD-08, PB-11, PS-05, MRJ-08, ZRG-79 and BOR-16 were revealed to have 117 DH, while NR-09 and PAK-13 had 118 and 119 days to heading, respectively (see Table 2). Among F<sub>1</sub> hybrids Zargoan-79 × Pakistan-2013 had 119 days for heading while the rest of the cross combinations showed 117 DH. The grand means for parents, crosses, lines and testers were 117.67, 117.56, 117.27 and 118.33, respectively. The coefficient of variance 0.67 % obtained for DH was also in the acceptable range.

Average minimum plant height was recorded in NARC-2009 (83 cm) followed by cross combination of Punjab-2011 × Pakistan-2013 (86 cm), and maximum plant height of 104 cm was recorded in the cross-combination Faisalabad-2008 × Borlaug-2016 followed by one of parent viz. Faisalabad-2008 (103 cm). Grand mean, coefficient of variance (CV) and least significant variance (LSD) for plant height of lines, testers and their parental combinations was revealed to be 95.92 cm, 3.64 and 5.73, respectively.

The cross-combination Punjab-2011 × Pakistan-2013 showed minimum value (26.8 cm<sup>2</sup>) for flag leaf area followed by the lines Pakistan-2013 (29.5 cm<sup>2</sup>) and Borlaug-2016 (29.8 cm<sup>2</sup>). Maximum leaf area was recorded in the line Punjab-2011 (39.2 cm<sup>2</sup>) followed by the F<sub>1</sub> combination, Faisalabad-2008 × Pakistan-2013 (36.9 cm<sup>2</sup>). Grand mean, CV, LSD and standard error for leaf area of lines, testers and

cross combinations was recorded as 10.46, 5.7 and 2.0 cm<sup>2</sup> respectively.

Maximum 13 tillers per plant (TPP) was recorded in the tester Pakistan-2013 followed by 12.3 tillers in Borlaug-2016 while minimum 7.6 tillers were observed in the female parent Punjab-2011 followed by Pirsabak-2005 (8.33). In the cross combinations a maximum of 10 tillers was recorded in Punjab-2011 × NARC-2009 and Miraj-2008 × NARC-2009 and grand mean for TTP was recorded as 9.49 with CV, LSD and SE 11.66, 3.61 and 1.27 respectively.

Maximum peduncle length was observed in the line Pirsabak-2005 while minimum peduncle length was recorded in the tester parent NARC-2009. Grand mean for peduncle length was observed to be 11.96 cm with CV 9.7 % and LSD ( $\alpha$  0.05) value 1.9.

Mean performance for spike length (SL) was observed 12.36 cm in parents and their cross combinations. Maximum SL was observed in cross combinations Miraj-2008 × Pakistan-2013 followed by Miraj-2008 × Borlaug-2016, but minimum SL was observed in the parental line Faisalabad-2008.

Grand mean for spikelets per spike (SPS) for parents and cross combination was recorded as 20.33 with a maximum of 21.9 spikelets observed in Pakistan-2013 in addition to the F<sub>1</sub> hybrid combination of Miraj-2008 × Pakistan-2013 and in the Pirsabak-2005 × Pakistan-2013. Grains per spike (GPS) was recorded maximum in parental line Punjab-2011. Average thousand grain weight was calculated to be 34.52 with higher TGW in Faisalabad-2008 (43.73 g) and the cross combination of Faisalabad-2008 × Pakistan-2013 (43.53 g), and lower value for TGW was depicted by the parental line NARC-2009 (22.47 g). Average grain yield was obtained in all the parents and cross combinations (2344.5 kg · ha<sup>-1</sup>), while average GY was higher in crosses as compared to the parents' grain yield, the maximum was recorded in the cross combination ZRG-79 × PAK-13 (3358 kg · ha<sup>-1</sup>), followed by PB-11 × NR-09 (2820 kg · ha<sup>-1</sup>), while minimum grain yield was recorded in the cross combination of ZRG-79 × NR-09 (1372 kg · ha<sup>-1</sup>).

Maximum normalized differences in vegetative index (NDVI) value was observed in the parental line PS-05 (0.73) followed by PB-11 × PAK-13 and PS-05 × NR-09 with the same value. Average NDVI value for parents and crosses was revealed to be 0.67; lines, testers and crosses also contained similar values for NDVI.

There were significant differences among the means of crosses combinations for almost all the traits studies except DH, TPP and SL. The lines (female parents) also depicted highly significant differences in all the parameters under consideration except SL. The testers (male parents) also revealed highly significant differences for all the traits except for FLA, SL, SPS, and NDVI. Interaction of lines × testers depicted highly significant differences in their mean performance for the traits of PH, FLA, PL, DM, GPS, TGW and NDVI value.

#### Estimates of genetic variance components

Estimation of genotypic variance, phenotypic variance, environmental variance, variance due to general combining ability, variance due to specific combining ability and variance due to GCA over SCA is mentioned in Table 4.

**Table 2.** Mean performance of lines, testers, and their cross combinations under rainfed conditions

Entries	DH	PH	FLA	TPP	PL	SL	SPS	DM	GPS	TGW	GY	NDVI	CT
FSD-08	117.67 <sup>bc</sup>	103 <sup>ab</sup>	32.33 <sup>bcdef</sup>	9.00 <sup>bc</sup>	16.13 <sup>ab</sup>	10.77 <sup>f</sup>	19.20 <sup>de</sup>	15.6 <sup>abc</sup>	47.90 <sup>abcde</sup>	43.73 <sup>a</sup>	2123.4 <sup>bcde</sup>	0.63 <sup>abc</sup>	25.45 <sup>a</sup>
PB-11	117.00 <sup>c</sup>	99 <sup>abcd</sup>	39.20 <sup>a</sup>	7.67 <sup>c</sup>	13.63 <sup>cde</sup>	12.57 <sup>abcdef</sup>	19.03 <sup>de</sup>	15.4 <sup>bcdef</sup>	57.47 <sup>ab</sup>	36.87 <sup>cd</sup>	2139.7 <sup>bcde</sup>	0.65 <sup>abc</sup>	24.40 <sup>a</sup>
PS-05	117.00 <sup>c</sup>	98 <sup>bcdef</sup>	33.70 <sup>abcde</sup>	8.33 <sup>c</sup>	16.67 <sup>a</sup>	13.33 <sup>abcd</sup>	21.87 <sup>a</sup>	15.3 <sup>efgh</sup>	53.33 <sup>abcd</sup>	36.33 <sup>cd</sup>	2531.8 <sup>abcd</sup>	0.73 <sup>a</sup>	24.70 <sup>a</sup>
MRJ-08	117.00 <sup>c</sup>	97 <sup>cdef</sup>	32.27 <sup>bcdef</sup>	10.00 <sup>ab</sup>	14.23 <sup>bcd</sup>	11.57 <sup>def</sup>	18.77 <sup>de</sup>	15.3 <sup>defgh</sup>	48.00 <sup>abcde</sup>	36.67 <sup>cd</sup>	1916.9 <sup>cde</sup>	0.64 <sup>abc</sup>	25.20 <sup>a</sup>
ZRG-79	117.67 <sup>ab</sup>	93 <sup>fgh</sup>	32.73 <sup>bcde</sup>	9.33 <sup>bc</sup>	12.33 <sup>defg</sup>	13.57 <sup>ab</sup>	21.53 <sup>abc</sup>	15.5 <sup>abcde</sup>	42.67 <sup>de</sup>	28.60 <sup>hij</sup>	1696.1 <sup>cde</sup>	0.63 <sup>abc</sup>	24.75 <sup>a</sup>
NR-09	118.33 <sup>ab</sup>	83 <sup>j</sup>	32.67 <sup>bcde</sup>	11.00 <sup>abc</sup>	7.20 <sup>j</sup>	11.90 <sup>bcdef</sup>	20.80 <sup>abcd</sup>	15.5 <sup>abcde</sup>	39.57 <sup>e</sup>	22.47 <sup>k</sup>	2165.8 <sup>bcde</sup>	0.63 <sup>abc</sup>	24.60 <sup>a</sup>
PAK-13	119.00 <sup>c</sup>	91 <sup>ghi</sup>	29.57 <sup>ef</sup>	13.00 <sup>a</sup>	10.67 <sup>ghi</sup>	12.67 <sup>abcde</sup>	21.90 <sup>a</sup>	15.6 <sup>ab</sup>	53.23 <sup>abcd</sup>	33.60 <sup>def</sup>	2433.4 <sup>abcde</sup>	0.71 <sup>abc</sup>	25.20 <sup>a</sup>
BOR-16	117.67 <sup>ab</sup>	91 <sup>ghi</sup>	29.83 <sup>ef</sup>	12.33 <sup>abc</sup>	9.90 <sup>hi</sup>	13.80 <sup>a</sup>	21.80 <sup>ab</sup>	15.7 <sup>a</sup>	53.67 <sup>abcd</sup>	27.20 <sup>ij</sup>	2248.6 <sup>abcde</sup>	0.64 <sup>abc</sup>	25.10 <sup>a</sup>
FSD-08 × NR-09	117.00 <sup>c</sup>	94 <sup>defgh</sup>	35.27 <sup>abcde</sup>	8.67 <sup>c</sup>	11.20 <sup>fgh</sup>	12.13 <sup>abcdef</sup>	19.90 <sup>abcde</sup>	15.3 <sup>defgh</sup>	50.57 <sup>abcde</sup>	32.60 <sup>efg</sup>	2542.9 <sup>abcd</sup>	0.71 <sup>abc</sup>	24.90 <sup>a</sup>
FSD-08 × PAK-13	117.67 <sup>ab</sup>	93 <sup>efgh</sup>	36.90 <sup>ab</sup>	8.33 <sup>c</sup>	12.47 <sup>defg</sup>	12.70 <sup>abcde</sup>	19.67 <sup>bcde</sup>	15.4 <sup>bcdef</sup>	49.00 <sup>abcde</sup>	36.80 <sup>cd</sup>	3054.9 <sup>ab</sup>	0.64 <sup>abc</sup>	25.50 <sup>a</sup>
FSD-08 × BOR-16	117.00 <sup>c</sup>	104 <sup>a</sup>	30.63 <sup>cdef</sup>	8.67 <sup>c</sup>	15.33 <sup>abc</sup>	11.67 <sup>cdef</sup>	17.90 <sup>e</sup>	15.4 <sup>bcdef</sup>	46.20 <sup>abcde</sup>	43.53 <sup>a</sup>	2512.6 <sup>abcd</sup>	0.68 <sup>abc</sup>	25.55 <sup>a</sup>
PB-11 × NR-09	117.33 <sup>ab</sup>	89 <sup>hij</sup>	33.37 <sup>bcde</sup>	10.00 <sup>ab</sup>	13.10 <sup>def</sup>	11.67 <sup>cdef</sup>	18.77 <sup>de</sup>	15.2 <sup>gh</sup>	44.43 <sup>cde</sup>	30.00 <sup>ghi</sup>	2820.3 <sup>abc</sup>	0.64 <sup>abc</sup>	25.25 <sup>a</sup>
PB-11 × PAK-13	118.33 <sup>c</sup>	86 <sup>l</sup>	26.77 <sup>f</sup>	9.00 <sup>bc</sup>	8.90 <sup>j</sup>	11.57 <sup>def</sup>	19.67 <sup>bcde</sup>	15.5 <sup>abcde</sup>	50.57 <sup>abcde</sup>	25.27 <sup>kl</sup>	2572.0 <sup>abcd</sup>	0.73 <sup>ab</sup>	25.10 <sup>a</sup>
PB-11 × BOR-16	117.00 <sup>c</sup>	98 <sup>bcdef</sup>	33.53 <sup>abcde</sup>	8.33 <sup>c</sup>	11.47 <sup>fgh</sup>	12.80 <sup>abcde</sup>	20.80 <sup>abcd</sup>	15.1 <sup>h</sup>	50.33 <sup>abcde</sup>	37.87 <sup>bc</sup>	1595.6 <sup>de</sup>	0.66 <sup>abc</sup>	25.60 <sup>a</sup>
PS-05 × NR-09	117.00 <sup>c</sup>	99 <sup>abcd</sup>	30.50 <sup>cdef</sup>	8.00 <sup>c</sup>	12.77 <sup>def</sup>	11.67 <sup>cdef</sup>	19.90 <sup>abcde</sup>	15.4 <sup>cdefg</sup>	55.43 <sup>abc</sup>	38.60 <sup>bc</sup>	2430.4 <sup>abcde</sup>	0.73 <sup>a</sup>	25.85 <sup>a</sup>
PS-05 × PAK-13	117.00 <sup>c</sup>	99 <sup>abcde</sup>	29.93 <sup>def</sup>	9.00 <sup>bc</sup>	11.47 <sup>fgh</sup>	13.43 <sup>abc</sup>	21.90 <sup>a</sup>	15.5 <sup>abcd</sup>	47.10 <sup>abcde</sup>	35.07 <sup>cdef</sup>	2735.3 <sup>abc</sup>	0.64 <sup>abc</sup>	25.55 <sup>a</sup>
PS-05 × BOR-16	117.00 <sup>c</sup>	100 <sup>abcd</sup>	33.17 <sup>bcde</sup>	8.67 <sup>c</sup>	12.20 <sup>efg</sup>	12.23 <sup>abcdef</sup>	20.33 <sup>abcd</sup>	15.2 <sup>fgh</sup>	52.33 <sup>abcd</sup>	37.67 <sup>bc</sup>	2355.7 <sup>abcde</sup>	0.67 <sup>abc</sup>	25.55 <sup>a</sup>
MRJ-08 × NR-09	117.67 <sup>c</sup>	99 <sup>abcdef</sup>	33.00 <sup>bcde</sup>	10.33 <sup>abc</sup>	12.97 <sup>def</sup>	11.47 <sup>ef</sup>	19.47 <sup>cde</sup>	15.2 <sup>gh</sup>	53.43 <sup>abcd</sup>	37.53 <sup>bc</sup>	2424.0 <sup>abcde</sup>	0.66 <sup>abc</sup>	25.25 <sup>a</sup>
MRJ-08 × PAK-13	118.33 <sup>c</sup>	96 <sup>defg</sup>	33.87 <sup>abcde</sup>	9.67 <sup>abc</sup>	9.67 <sup>hi</sup>	13.90 <sup>a</sup>	21.90 <sup>a</sup>	15.4 <sup>bcdef</sup>	56.43 <sup>abc</sup>	31.93 <sup>fgh</sup>	2559.8 <sup>abcd</sup>	0.67 <sup>abc</sup>	24.80 <sup>a</sup>
MRJ-08 × BOR-16	117.67 <sup>c</sup>	96 <sup>defg</sup>	36.77 <sup>ab</sup>	10.33 <sup>abc</sup>	10.10 <sup>hi</sup>	12.57 <sup>abcdef</sup>	21.47 <sup>abc</sup>	15.6 <sup>abc</sup>	54.13 <sup>abcd</sup>	35.47 <sup>cdef</sup>	1700.3 <sup>cde</sup>	0.60 <sup>c</sup>	25.70 <sup>a</sup>
ZRG-79 × NR-09	117.67 <sup>c</sup>	100 <sup>abcd</sup>	35.63 <sup>abcde</sup>	8.67 <sup>c</sup>	10.57 <sup>ghi</sup>	11.90 <sup>bcdef</sup>	20.57 <sup>abcd</sup>	15.5 <sup>abcde</sup>	58.13 <sup>a</sup>	35.53 <sup>cde</sup>	1372.9 <sup>e</sup>	0.62 <sup>bc</sup>	25.90 <sup>a</sup>
ZRG-79 × PAK-13	119.00 <sup>c</sup>	96 <sup>defg</sup>	35.87 <sup>abc</sup>	8.00 <sup>c</sup>	9.77 <sup>hi</sup>	11.57 <sup>def</sup>	20.77 <sup>abcd</sup>	15.6 <sup>abc</sup>	47.57 <sup>abcde</sup>	29.93 <sup>ghi</sup>	3358.4 <sup>a</sup>	0.63 <sup>abc</sup>	24.50 <sup>a</sup>
ZRG-79 × BOR-16	117.67 <sup>c</sup>	102 <sup>abc</sup>	34.50 <sup>abcde</sup>	9.00 <sup>bc</sup>	12.23 <sup>efg</sup>	12.90 <sup>abcde</sup>	19.67 <sup>bcde</sup>	15.4 <sup>bcdef</sup>	45.90 <sup>bcde</sup>	40.80 <sup>ab</sup>	2631.4 <sup>abcd</sup>	0.68 <sup>abc</sup>	23.70 <sup>a</sup>
Grand Mean	117.59	95.92	33.17	9.49	11.96	12.36	20.33	15.425	51.01	34.52	2344.5	0.67	25.13
Mean of parents	117.67	94.54	32.81	10.17	12.60	12.52	20.61	15.492	49.60	33.18	2156.96	0.66	25.12
Mean of crosses	117.56	96.82	33.36	9.13	11.61	12.28	20.18	15.389	51.77	35.24	2431.07	0.67	25.14
Mean of lines	117.27	98.13	34.11	9.00	14.60	12.36	20.08	15.427	49.87	36.44	2081.58	0.6553	25.37
Mean of testers	118.33	88.55	30.64	12.11	9.26	12.79	21.50	15.600	48.82	27.75	2282.60	0.6800	24.70
CV (%)	0.67	3.64	10.46	11.66	9.71	8.97	6.56	0.64	3.84	6.31	23	2.13	1.00
LSD (α 0.05)	1.28	5.73	5.70	3.61	1.90	1.82	2.19	2.17	12.04	3.58	564.35	0.11	
SE	0.45	2.01	2.00	1.27	0.67	0.64	0.77	0.57	1.13	1.26	399.06	0.0082	-1.0
SED	0.64	2.19	1.64	0.90	0.95	0.91	1.09	0.80	1.60	1.78	0.85	0.0116	-1.0

Note. Hereinafter: DH, days to heading; PH, plant height; cm; FLA, flag leaf area, cm<sup>2</sup>; TPP, tillers per plant; PL, peduncle length, cm; SL, spike length, cm; SPS, spikelets per spike; DM, days to maturity; GPS, grains per spike; TGW, 1000-grain weight; GY, grain yield per plant, kg · ha<sup>-1</sup>; NDVI, normalized difference in vegetative index, and CT, canopy temperature, °C.

**Table 3.** ANOVA for line × tester (including parents) mean squares for morpho-physiological and agronomic traits under rainfed conditions

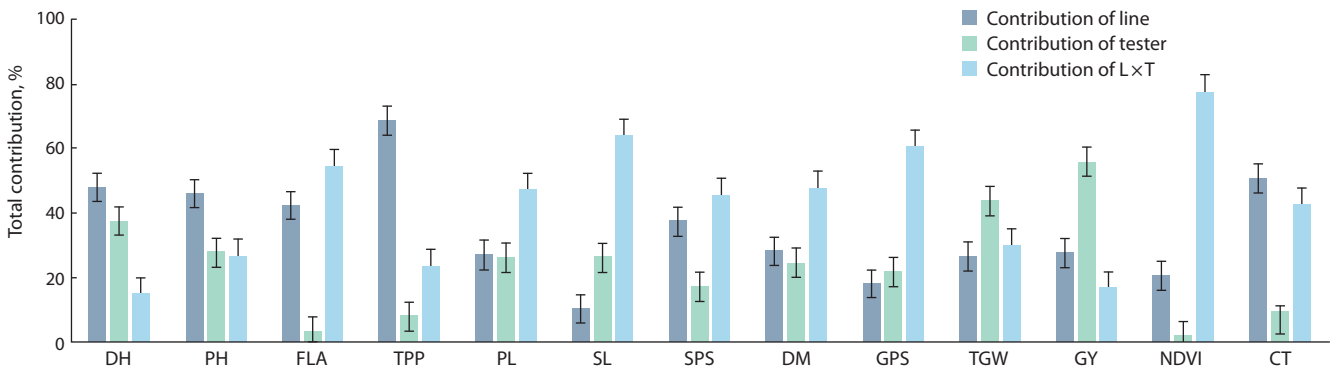
SOV	DF	DH	PH	FLA	TPP	PL	SL	SPS	DM	GPS	TGW	GY	NDVI	CT
Reps	2	1.49 <sup>ns</sup>	15.50 <sup>**</sup>	2.04 <sup>ns</sup>	0.71 <sup>**</sup>	1.19 <sup>ns</sup>	6.33 <sup>**</sup>	1.56	1.62 <sup>ns</sup>	2.95 <sup>ns</sup>	54.27 <sup>**</sup>	453264.39 <sup>ns</sup>	0.0003 <sup>ns</sup>	-0.000 <sup>ns</sup>
Genotypes	22	1.21 <sup>*</sup>	84.36 <sup>**</sup>	24.66 <sup>**</sup>	5.00 <sup>**</sup>	15.94 <sup>**</sup>	2.17 <sup>ns</sup>	4.30 <sup>**</sup>	6.04 <sup>**</sup>	88.94 <sup>**</sup>	88.01 <sup>**</sup>	664369.03 <sup>*</sup>	0.0037 <sup>**</sup>	0.8471 <sup>ns</sup>
Crosses	14	1.13 <sup>ns</sup>	68.04 <sup>**</sup>	24.12 <sup>**</sup>	1.42 <sup>ns</sup>	8.32 <sup>**</sup>	1.68 <sup>ns</sup>	3.67 <sup>*</sup>	5.70 <sup>**</sup>	79.98 <sup>**</sup>	65.28 <sup>**</sup>	468535.90 <sup>*</sup>	0.0034 <sup>**</sup>	0.5088 <sup>**</sup>
Lines (c)	4	1.89 <sup>*</sup>	109.59 <sup>**</sup>	35.73 <sup>**</sup>	3.41 <sup>*</sup>	7.83 <sup>**</sup>	0.61 <sup>ns</sup>	4.79 <sup>*</sup>	5.61 <sup>**</sup>	50.64 <sup>**</sup>	60.72 <sup>**</sup>	907796.47 <sup>**</sup>	0.0024 <sup>**</sup>	0.9032 <sup>ns</sup>
Testers (c)	2	2.96 <sup>*</sup>	131.49 <sup>**</sup>	5.55 <sup>ns</sup>	0.80 <sup>ns</sup>	15.22 <sup>**</sup>	3.09 <sup>ns</sup>	4.45 <sup>ns</sup>	9.76 <sup>*</sup>	121.92 <sup>**</sup>	199.70 <sup>**</sup>	915502.50 <sup>*</sup>	0.0005 <sup>ns</sup>	0.2435 <sup>**</sup>
L × T (c)	8	0.29 <sup>ns</sup>	31.41 <sup>**</sup>	22.96 <sup>**</sup>	0.58 <sup>ns</sup>	6.84 <sup>**</sup>	1.87 <sup>ns</sup>	2.91 <sup>ns</sup>	4.73 <sup>**</sup>	84.16 <sup>**</sup>	33.95 <sup>**</sup>	135237.50 <sup>ns</sup>	0.0046 <sup>**</sup>	0.3779 <sup>ns</sup>
Parents	7	1.52 <sup>*</sup>	117.42 <sup>**</sup>	28.60 <sup>**</sup>	10.48 <sup>**</sup>	31.29 <sup>**</sup>	3.34 <sup>*</sup>	5.75 <sup>**</sup>	5.21 <sup>**</sup>	109.12 <sup>**</sup>	136.61 <sup>**</sup>	1138947.60 <sup>*</sup>	0.0050 <sup>**</sup>	1.6434 <sup>**</sup>
Lines (p)	4	0.40 <sup>ns</sup>	41.77 <sup>**</sup>	28.52 <sup>**</sup>	3.17 <sup>*</sup>	9.62 <sup>**</sup>	4.21 <sup>*</sup>	6.67 <sup>*</sup>	3.73 <sup>**</sup>	92.32 <sup>**</sup>	86.18 <sup>**</sup>	907796.47 <sup>**</sup>	0.0054 <sup>**</sup>	0.3848 <sup>**</sup>
Testers (p)	2	1.33 <sup>ns</sup>	69.44 <sup>**</sup>	9.21 <sup>ns</sup>	3.11 <sup>ns</sup>	9.95 <sup>**</sup>	2.74 <sup>ns</sup>	1.11 <sup>ns</sup>	2.33 <sup>ns</sup>	192.89 <sup>**</sup>	93.66 <sup>**</sup>	915502.50 <sup>**</sup>	0.0049 <sup>**</sup>	3.7200 <sup>ns</sup>
L vs. T	1	6.40 <sup>**</sup>	516.00 <sup>**</sup>	67.68 <sup>**</sup>	54.44 <sup>**</sup>	160.67 <sup>**</sup>	1.03 <sup>ns</sup>	11.34 <sup>*</sup>	16.90 <sup>**</sup>	8.80 <sup>ns</sup>	424.24 <sup>**</sup>	135237.47 <sup>ns</sup>	0.0034 <sup>**</sup>	2.52 <sup>ns</sup>
C vs. P	1	0.19 <sup>ns</sup>	81.41 <sup>**</sup>	4.69 <sup>ns</sup>	16.71 <sup>**</sup>	15.11 <sup>**</sup>	0.92 <sup>ns</sup>	2.96 <sup>ns</sup>	16.53 <sup>**</sup>	73.20 <sup>**</sup>	66.21 <sup>**</sup>	83982.72 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0095 <sup>ns</sup>
Error	44	0.61	7.20	4.02	1.23	1.35	1.23	1.78	0.97	3.83	4.74	477623.54	0.0002	0.00

Note. SOV, source of variation; DF, degree of freedom. \* Significant at  $p < 0.05$ , \*\* significant at  $p < 0.01$ , <sup>ns</sup> significant at  $p > 0.05$ .

**Table 4.** Estimates of genetic components of variance and degree of dominance of yield attributing traits under rainfed conditions

SOV	DH	PH	FLA	TPP	PL	SL	SPS	DM	GPS	TGW	GY	NDVI	CT
$\sigma^2_g$	0.20	25.72	6.88	1.26	4.86	0.31	0.84	1.69	28.37	27.76	62,248	0.00	0.28
$\sigma^2_p$	0.40	28.12	8.22	1.67	5.31	0.72	1.43	2.01	29.65	29.34	221,456	0.00	0.28
$\sigma^2_e$	0.20	2.40	1.34	0.41	0.45	0.41	0.59	0.32	1.28	1.58	159,207	0.00	0.00
H <sup>2</sup> , %	49.59	91.47	83.70	75.40	91.53	43.32	58.60	83.94	95.69	94.61	28.11	94.59	100
$\sigma^2_{gca}$	0.03	1.29	0.04	0.03	0.05	-0.01	0.03	0.03	-0.15	1.11	11,783.28	0.00	0.00
$\sigma^2_{sca}$	-0.12	9.14	6.13	-0.07	1.99	0.22	0.70	1.32	26.81	10.60	58,407.31	0.00	0.13
$\sigma^2_{sca}/\sigma^2_{gca}$	-0.25	0.14	0.01	-0.43	0.03	-0.05	0.04	0.02	-0.01	0.10	0.20	0.00	0.00

Note.  $\sigma^2_g$ , genotypic variance;  $\sigma^2_p$ , phenotypic variance;  $\sigma^2_e$ , environmental variance; H<sup>2</sup>, broad sense heritability;  $\sigma^2_{gca}$ , general combining ability variance;  $\sigma^2_{sca}$ , specific combining ability variance.



**Fig. 1.** Proportional contribution of lines, testers, and their interactions to total variance under rainfed conditions.

Here and in Figure 3: DH, days to heading; PH, plant height, cm; FLA, flag leaf area, cm<sup>2</sup>; TPP, tillers per plant; PL, peduncle length, cm; SL, spike length, cm; SPS, spikelets per spike; DM, days to maturity; GPS, grains per spike; TGW, 1000-grain weight; GY, grain yield per plant, kg·ha<sup>-1</sup>; NDVI, normalized difference in vegetative index, and CT, canopy temperature, °C.

Phenotypic variance was depicted more as compared to genotypic variance in some traits, i.e. PH, FLA, SL, DM, and GY, while only GY showed high environmental variance. Broad sense heritability ( $H^2$ ) was estimated in the range of 28.11 % (GY) to 100 % (CT). PH, PL, GPS, TGW, NDVI value and CT showed broad sense heritability of more than 91 %, while DH and GY depicted less heritability. The traits with high genetic variance, low environmental variance and high broad sense heritability have preponderance of additive genes and these are stable characters and selection in the filial generations can be made by keeping eye on these traits. Grain yield (GY) and DH attained low broad sense heritability and showed that environmental influence is more important for the expression of these traits. Selection in the filial generation should be made for these traits by considering disease incidence and drought proxy parameters, i.e. NDVI and CT values.

#### Proportional contribution of lines, testers, and their interactions to total variance

Proportional contribution of total variance for yield and yield-related metric traits for lines, testers and their cross combinations was estimated (Fig. 1). For DH, PH, TPP and CT it was recorded to be higher as compared to the testers and combinations of both lines and testers. Contribution of L x T to total variance was recorded as high in FLA, PL, SL, SPS, DM, GPS and NDVI value, while variance contribution of testers to TGW and GY was estimated higher as compared to the lines and L x T combinations.

#### General combining ability

General combining ability (GCA) estimates for all the traits are given in Table 5. Both positive and negative GCA effects were observed for lines and testers. For DH, the value of GCA effects ranged between 0.00 and 0.56. As a good general combiner, significant positive (0.56) and negative (-0.56) GCA effects were observed for lines Zargoan-79 and Pirsabak-2005, respectively. Similarly, in the testers, positive and significant (0.51) GCA effect was observed for Pakistan-2013 only (see Table 5). Patel et al. (2020) demonstrated ( $p \leq 0.01$ ) significant negative and desirable GCA effects in lines and non-additive gene action was primarily involved in days to heading.

For plant height, negative general combining ability effects are more important since more emphasis is placed upon selection for short stature in segregating the population because it ultimately turns out that a short stature line is more responsive to fertilizer and tolerant to lodging. In this study, GCA effects ranged between -5.82 and 3.24 for PH. Significant positive (3.07) and negative (-5.82) GCA effects were observed for the lines Pirsabak-2005 and Punjab-2011, respectively. Similarly, highly significant positive (3.24) was estimated for the tester BOR-16 and highly significant but negative (-2.56) GCA effects were observed for the testers PAK-13, respectively. These results are in accordance with the results of (Singh S. et al., 2003; Gorjanović, Kraljević-Balalić, 2007).

For flag leaf area (FLA), negative general combining ability effects are more important because FLA is much influenced by transpiration losses due to disclosure to sunlight, which eventually affects the grain yield. Hence, more emphasis is retained on the selection of genotypes with smaller FLA. From that, among the female parents, Pirsabak-2005 and Punjab-2011 showed a highly significant negative GCA effect: -2.16 and -2.10, respectively. On the other side, no significant GCA effects were observed among the testers for FLA. These results confirm the findings of (Saeed A. et al., 2001; Arshad, Chowdhry, 2002; Chowdhary et al., 2007).

In case of tillers per plant (TPP), GCA effects ranged between -0.58 and 0.98. As a good general combiner, highly significant positive (0.98) GCA effects were observed only for the line MRJ-08 while there were no significant GCA effects among the testers for TPP. To begin with, TPP is a significant yield-boosting characteristic that contributes to increased grain yield. A higher number of tillers per plant confirms optimal plant populations and as a result higher grain yield (Tilley et al., 2019). For this point of view, the female line MRJ-08 showed better performance. These findings are in accordance with the results of (Iqbal M.M., 2007; Khan A. et al., 2020; Rashmi et al., 2020).

GCA effects ranging between -1.16 and 1.39 were observed for peduncle length (PL). Highly significant positive (1.39) and negative (-0.76) GCA effects were observed for the lines (female) FSD-08 and ZRG-09, respectively. In the same way, highly significant positive (0.65) and negative (-1.16) GCA effects were observed for the testers BOR-16 and PAK-13,



respectively. Likewise, in PH, shorter PL is preferred because an increase in PL ultimately increases the PH and we prefer a plant with short stature. In current study, two female parents, ZRG-79 (–0.76) and MRJ-08 (–0.70), showed negative general combining ability. Also, one male parent, PAK-13, showed superior general combining ability for this trait. So, it can be concluded that the above-mentioned parents are desirable for use in the breeding program. The findings of (Sharma, Garg, 2005) supported the results.

Greater spike length (SL) and larger number of spikelets per spike (SPS) are essential for enhanced yield. Among parents, one line (female), MRJ-08, showed significant positive values (0.77) for SPS. One tester, Pakistan-2013, exhibited high GCA for SPS. These results were quite close to the findings of (Awan et al., 2005; Sharma, Garg, 2005; Hassan et al., 2007). Number of grains per spike (GPS) is also an important factor for enhanced grain yield. Therefore, positive GCA effects are more important due to positive contribution of grain yield. Among male parents, only NR-09 showed positive and higher values (3.26) of GCA effects for GPS. Among female parents, MRJ-08 and PS-05 showed positive and higher values, i. e. 2.90 and 2.02 respectively. It should be noted that values of male parents were higher than those of female parents. These findings match with the results of (Saeed A. et al., 2001; Ahmadi et al., 2003; Saeed M.S. et al., 2005; Hassan et al., 2007). These results are different from the findings of Nazir et al. (2005).

For grain yield per plant (GY), only one female parent MRJ-08, and among the male parents, BOR-16 and NR-09, exhibited positive general combining ability effects. Similar results were also found by (Malik et al., 2005).

### Specific combining ability

Specific combining ability (SCA) estimates for all the traits are given in Table 6. Both positive and negative SCA effects were observed among the crosses.

As for SCA effects for DH, all the fifteen crosses were of non-significant nature with positive and negative magnitude (see Table 6). The result indicates the involvement of both additive and non-additive genetic effects in the inheritance of DH, with greater proportion of additive genetic effect. Lines with maximum SCA effects can be used in development of hybrid cultivars. Only six among fifteen crosses depicted negative SCA effects for plant height. If parents with tallness are the ideal ones, then the crosses FSD-08 × NR-09, FSD-08 × PAK-13, PB-11 × NR-09, PB-11 × PAK-13, PS-05 × BOR-16 and MRJ-08 × BOR-16 would be considered good. However, the remaining crosses exhibited higher SCA effects. These findings confirmed the results of (Arshad, Chowdhry, 2002; Hasnain et al., 2006; Chowdhary et al., 2007). Furthermore, non-additive type of gene action is detected for PH and supported by (Babar et al., 2022). Also, our results concur with Ali F.K.H. and Abdulkhaleq (2019) for plant height.

GCA effects for flag leaf area range from negative –3.80 to positive 3.33. Roughly 50 % of the crosses showed smaller values of SCA effects for flag leaf area, which is desirable. As less flag leaf area is required for drought tolerance, the crosses with significant SCA effects, i. e. FSD-08 × BOR-16 and PB-11 × PAK-13 may be used in a future breeding program because they have high negative SCA values contribut-

ing towards minimum FLA. However, the remaining crosses exhibited higher positive SCA effects for FLA. Comparable results have also been stated by (Saeed A. et al., 2001; Arshad, Chowdhry, 2002; Chowdhary et al., 2007).

Negative SCA effects are needed to reduce the peduncle length (PL). In this study, two crosses showed significantly negative SCA effects. FSD-08 × NR-09 and MRJ-08 × BOR-16 are the best hybrids for reduced PL. Similar results were reported by (Chowdhary et al., 2007).

In case of spike length (SL), all the fifteen crosses were of non-significant nature with positive and negative magnitude (see Table 6). For a number of SPS, positive specific combining ability effects were shown in 6 out of 15 crosses but only two crosses, FSD-08 × NR-09 and PB-11 × BOR-16, have significant GCA effects. These hybrids performed best and can be suggested for future breeding programs. These results are in the conformity with those of (Mahantashivayogayya et al., 2004).

For grain yield per plant, SCA effects found varied much among crosses. The poorest cross with respect to SCA for grain yield per plant was ZRG-79 × PAK-13 whereas the cross that appeared to be the best and the most promising specific combination was ZRG-79 × NR-09. Positive specific combining ability effects were displayed in 8 out of 15 crosses. But only ZRG-79 × NR-09 showed such significant positive effects among crosses. Similar results were also reported by (Saeed A. et al., 2001).

### Mid-parent heterosis estimation for grain yield

Mid-parental heterosis (MPH) for GY was estimated for 15 F<sub>1</sub> hybrids (Fig. 2). F<sub>1</sub> hybrids ZRG-79 × PAK-13 showed higher mid-parental value (62 %) followed by FSD-08 × PAK-13, ZRG-79 × BOR-16, and PB-11 × NR-09, which revealed mid-parent heterosis value above 30 % (34, 33, 31 % respectively). Cross combinations PS-05 × PAK-13, MRJ-08 × NR-09, MRJ-08 × PAK-13, FSD-08 × NR-09 depicted mid-parental heterosis value more than 15 %. Three cross combinations, ZRG-79 × NR-09, MRJ-08 × BOR-16 and PB-11 × BOR-16, depicted negative heterosis.

Cross combinations with more than 30 % mid-parental heterosis can be used in hybrid breeding in wheat. Heterotic studies for increasing wheat grain yield has been an interest of early wheat researchers. Pal and Alam (1938) reported mid-parent heterosis in the pre-green revolution era. After the introduction of semi-dwarf wheat in the post-green revolution era, various wheat researchers reported mid-parent heterosis in wheat, i. e. (Knott, 1965; Shamsuddin, 1985; Uddin et al., 1992). Barbosa-Neto et al. (1996) reported MPH in red soft winter wheat in the range of –20 to 57 %. Liu et al. (1999), Dreisigacker et al. (2005), Basnet et al. (2019) studied MPH in CIMMYT wheat varieties and reported MPH in the range of 9.5 to 14 %. Parental lines and tester used in present studies have CIMMYT background and the majority of the genotypes exhibited similar results for MPH. However, crosses combination ZRG-79 × PAK-13 has one indigenous parent ZRG-79 and exhibited a high percentage of MPH. These finding can demonstrate that crosses among parents with CIMMYT background have low heterotic potential and additive gene action governed the GY potential in these cross combinations and selection in the filial generation will be key for transgressive

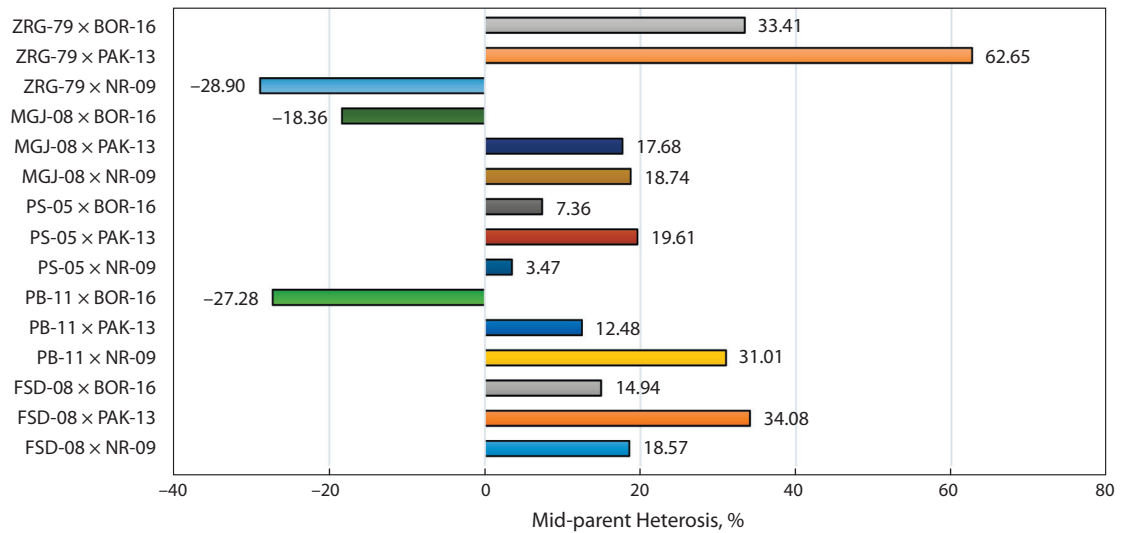
**Table 5.** General combining ability effects of wheat genotypes, lines and testers for yield and its components under rainfed conditions

Entries	DH	PH	FLA	TPP	PL	SL	SPS	DM	GPS	TGW	GY	NDVI	CT
<b>Lines</b>													
FSD-08	-0.33 <sup>ns</sup>	0.40 <sup>ns</sup>	0.91 <sup>ns</sup>	-0.58 <sup>ns</sup>	1.39 <sup>**</sup>	-0.11 <sup>ns</sup>	-1.02 <sup>**</sup>	-0.11 <sup>ns</sup>	-0.96 <sup>ns</sup>	2.40 <sup>**</sup>	-0.37 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>*</sup>	-0.29 <sup>**</sup>
PB-11	-0.00 <sup>ns</sup>	-5.82 <sup>**</sup>	-2.10 <sup>**</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	-0.46 <sup>ns</sup>	-0.27 <sup>ns</sup>	-0.43 <sup>ns</sup>	-1.11 <sup>**</sup>	-2.77 <sup>**</sup>	-4.20 <sup>**</sup>	-2.70 <sup>**</sup>	0.01 <sup>*</sup>	-0.29 <sup>**</sup>
PS-05	-0.56 <sup>*</sup>	3.07 <sup>**</sup>	-2.16 <sup>**</sup>	-0.36 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>	2.02 <sup>**</sup>	1.87 <sup>**</sup>	0.65 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>*</sup>	-0.08 <sup>**</sup>
MRJ-08	0.33 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	1.27 <sup>ns</sup>	0.98 <sup>**</sup>	-0.70 <sup>*</sup>	0.37 <sup>ns</sup>	0.77 <sup>*</sup>	0.11 <sup>ns</sup>	2.90 <sup>**</sup>	-0.26 <sup>ns</sup>	3.24 <sup>**</sup>	-0.01 <sup>**</sup>	0.29 <sup>**</sup>
ZRG-79	0.56 <sup>*</sup>	2.29 <sup>**</sup>	2.08 <sup>**</sup>	-0.24 <sup>ns</sup>	-0.76 <sup>*</sup>	-0.16 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	1.11 <sup>**</sup>	-1.20 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	-0.82 <sup>*</sup>	-0.02 <sup>**</sup>	0.37 <sup>**</sup>
SE	0.2689	0.6645	0.7139	0.2981	0.3122	0.3671	0.3036	0.2934	0.6438	0.4877	0.3223	0.0050	0.0000
<b>Testers</b>													
NR-09	-0.22 <sup>ns</sup>	-0.69 <sup>ns</sup>	0.25 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>*</sup>	-0.51 <sup>ns</sup>	-0.46 <sup>ns</sup>	-0.62 <sup>*</sup>	3.26 <sup>**</sup>	-0.39 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>*</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>**</sup>
PAK-13	0.51 <sup>*</sup>	-2.56 <sup>**</sup>	-0.69 <sup>ns</sup>	-0.27 <sup>ns</sup>	-1.16 <sup>**</sup>	0.36 <sup>ns</sup>	0.60 <sup>*</sup>	0.91 <sup>**</sup>	-1.23 <sup>*</sup>	-3.44 <sup>**</sup>	-1.89 <sup>**</sup>	-0.00 <sup>ns</sup>	-0.06 <sup>**</sup>
BOR-16	-0.29 <sup>ns</sup>	3.24 <sup>**</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>*</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	-0.14 <sup>ns</sup>	-0.29 <sup>ns</sup>	-2.03 <sup>**</sup>	3.83 <sup>**</sup>	1.25 <sup>**</sup>	-0.00 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>**</sup>
SE	0.21	0.51	0.55	0.23	0.24	0.28	0.24	0.23	0.50	0.38	0.25	0.00	0.00

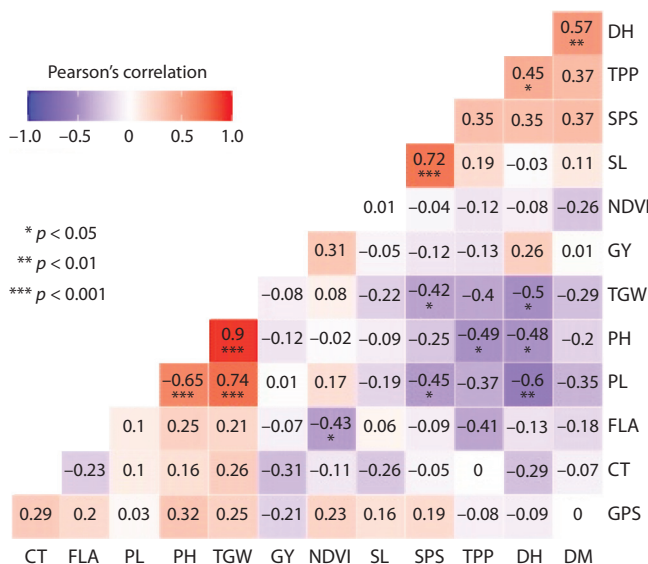
**Table 6.** Specific combining ability effects of 15 wheat crosses for yield and related traits under rainfed conditions

Crosses	DH	PH	FLA	TPP	PL	SL	SPS	DM	GPS	TGW	GY	NDVI	CT
FSD-08 × NR-09	0.00 <sup>ns</sup>	-2.20 <sup>*</sup>	0.75 <sup>ns</sup>	-0.02 <sup>ns</sup>	-2.31 <sup>**</sup>	0.48 <sup>ns</sup>	1.20 <sup>*</sup>	-0.16 <sup>ns</sup>	3.16 <sup>**</sup>	-4.66 <sup>**</sup>	-1.67 <sup>**</sup>	0.03 <sup>**</sup>	0.45 <sup>**</sup>
FSD-08 × PAK-13	-0.07 <sup>ns</sup>	-1.33 <sup>*</sup>	3.33 <sup>*</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	-0.09 <sup>ns</sup>	-0.69 <sup>ns</sup>	-0.58 <sup>ns</sup>	2.60 <sup>**</sup>	1.07 <sup>ns</sup>	-0.03 <sup>**</sup>	-0.39 <sup>**</sup>
FSD-08 × BOR-16	0.07 <sup>ns</sup>	3.53 <sup>**</sup>	-4.08 <sup>**</sup>	-0.02 <sup>ns</sup>	1.68 <sup>**</sup>	-0.66 <sup>ns</sup>	-1.11 <sup>*</sup>	0.84 <sup>ns</sup>	-2.58 <sup>*</sup>	2.06 <sup>*</sup>	0.60 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	-0.07 <sup>**</sup>
PB-11 × NR-09	0.00 <sup>ns</sup>	-1.64 <sup>*</sup>	1.86 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	1.44 <sup>*</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	-0.52 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	-7.83 <sup>**</sup>	-0.66 <sup>ns</sup>	-0.77 <sup>ns</sup>	-0.04 <sup>**</sup>	0.20 <sup>**</sup>
PB-11 × PAK-13	0.27 <sup>ns</sup>	-2.11 <sup>*</sup>	-3.80 <sup>**</sup>	-0.40 <sup>ns</sup>	-1.10 <sup>ns</sup>	-0.80 <sup>ns</sup>	-0.68 <sup>ns</sup>	0.98 <sup>ns</sup>	4.80 <sup>**</sup>	-2.34 <sup>**</sup>	0.37 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>**</sup>	-0.04 <sup>**</sup>
PB-11 × BOR-16	-0.27 <sup>ns</sup>	3.76 <sup>**</sup>	1.93 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	-0.34 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	1.20 <sup>*</sup>	-1.16 <sup>*</sup>	3.03 <sup>*</sup>	3.00 <sup>**</sup>	0.40 <sup>ns</sup>	-0.01 <sup>ns</sup>	-0.17 <sup>**</sup>
PS-05 × NR-09	0.22 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	-0.95 <sup>ns</sup>	-0.58 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	-0.27 <sup>ns</sup>	-0.35 <sup>ns</sup>	0.73 <sup>ns</sup>	4.72 <sup>**</sup>	1.88 <sup>*</sup>	-0.42 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>**</sup>	-0.01 <sup>**</sup>
PS-05 × PAK-13	-0.51 <sup>ns</sup>	2.67 <sup>*</sup>	-0.57 <sup>ns</sup>	0.82 <sup>ns</sup>	0.48 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	0.59 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>	-5.46 <sup>**</sup>	1.40 <sup>ns</sup>	0.78 <sup>ns</sup>	-0.03 <sup>**</sup>	0.10 <sup>**</sup>
PS-05 × BOR-16	0.29 <sup>ns</sup>	-2.80 <sup>*</sup>	1.52 <sup>ns</sup>	-0.24 <sup>ns</sup>	-0.60 <sup>ns</sup>	-0.37 <sup>ns</sup>	-0.23 <sup>ns</sup>	-1.27 <sup>*</sup>	0.74 <sup>ns</sup>	-3.27 <sup>**</sup>	-0.36 <sup>ns</sup>	-0.00 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>**</sup>
MRJ-08 × NR-09	-0.00 <sup>ns</sup>	2.47 <sup>*</sup>	-1.61 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	1.55 <sup>**</sup>	-0.67 <sup>ns</sup>	-1.02 <sup>ns</sup>	-1.38 <sup>*</sup>	-4.49 <sup>**</sup>	2.94 <sup>**</sup>	0.92 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	-0.03 <sup>**</sup>
MRJ-08 × PAK-13	-0.07 <sup>ns</sup>	1.67 <sup>*</sup>	-0.07 <sup>ns</sup>	-0.18 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>ns</sup>	0.90 <sup>ns</sup>	0.35 <sup>ns</sup>	-0.58 <sup>ns</sup>	3.00 <sup>*</sup>	0.40 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>**</sup>	0.18 <sup>**</sup>
MRJ-08 × BOR-16	0.07 <sup>ns</sup>	-4.13 <sup>**</sup>	1.69 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	-1.46 <sup>*</sup>	-0.23 <sup>ns</sup>	0.67 <sup>ns</sup>	1.96 <sup>**</sup>	1.49 <sup>ns</sup>	-3.34 <sup>**</sup>	-1.01 <sup>ns</sup>	-0.03 <sup>**</sup>	-0.10 <sup>**</sup>
ZRG-79 × NR-09	-0.22 <sup>ns</sup>	1.24 <sup>ns</sup>	-0.06 <sup>ns</sup>	0.31 <sup>ns</sup>	-0.80 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>	0.69 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	4.44 <sup>**</sup>	0.50 <sup>ns</sup>	1.94 <sup>**</sup>	-0.03 <sup>**</sup>	-0.56 <sup>**</sup>
ZRG-79 × PAK-13	0.38 <sup>ns</sup>	-0.89 <sup>ns</sup>	1.12 <sup>ns</sup>	-0.29 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	-0.91 <sup>ns</sup>	-0.17 <sup>ns</sup>	-0.24 <sup>ns</sup>	-1.77 <sup>ns</sup>	-2.05 <sup>*</sup>	-2.32 <sup>**</sup>	-0.01 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>**</sup>
ZRG-79 × BOR-16	-0.16 <sup>ns</sup>	-0.36 <sup>ns</sup>	-1.06 <sup>ns</sup>	-0.02 <sup>ns</sup>	0.72 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	-0.52 <sup>ns</sup>	-0.38 <sup>ns</sup>	-2.67 <sup>*</sup>	1.55 <sup>ns</sup>	0.38 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>**</sup>	0.42 <sup>**</sup>
SE	0.47	1.15	1.24	0.52	0.54	0.64	0.53	0.51	1.12	0.84	0.56	0.01	0.00

\* Significant at  $p < 0.05$ ; \*\* significant at  $p < 0.01$ ; <sup>ns</sup> significant at  $p > 0.05$ .



**Fig. 2.** Estimation of mid-parent heterosis for grain yield (GY) as a percentage increase or decrease in the F<sub>1</sub> hybrids compared to mid-parental value.



**Fig. 3.** Correlation study among yield and related traits of eight parents and 15 wheat crosses under rainfed conditions.

segregants, but in case of crosses among indigenous parents and genotypes with a CIMMYT parent it will be good source of hybrid breeding.

**Correlation study of agronomic traits**

Correlation study among yield and related traits under rainfed conditions of eight parents and 15 wheat crosses is mentioned in Figure 3. High significance was observed between PH and TGW with the value of 0.9 ( $p < 0.001$ ), SL and SPS had a correlation coefficient value of 0.72 ( $p < 0.001$ ) followed by DH and DM with 0.57 ( $p < 0.01$ ). PL also showed highly significant and positive correlation with TGW and PH (0.74 and 0.65 respectively,  $p < 0.001$ ). PL and TGW also revealed significant but negative correlation with DH -0.6 and -0.5, respectively ( $p < 0.01$ ).

Positive and significant correlation among PH and PL with TGW showed that the higher the plant height the higher the thousand grain weight and peduncle length. Careful consideration should be made while selecting the genotypes with stiff and strong stem girth to avoid lodging. Correlation between SL and SPS revealed that an increase in spike length leads to an increase in spikelets per spike, genotypes with long spikes will be a good selection criterion for increasing yield due to the increase in number of spikelets per spike. Positive and significant correlation among DH and DM depicted that genotypes with early DH would mature earlier, so selection of genotypes with early flowering is good for early maturity and short duration variety development. Significant but negative correlation between TGW and DH indicated that a delay in days to flowering leads to a reduced TGW and *vice versa*. TGW showed negative correlation with TPP and these findings are in line with the results of Almutairi (2022). Low correlation of GY with other parameters in wheat was also reported by Gowda et al. (2010).

**Stripe rust responses of parental lines and their cross combinations**

The response to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on parental lines used in the study and their offspring (crosses) is recorded for disease scoring, coefficient of infection (CI), average coefficient of infection (ACI), country average relative percentage attack (CARPA) and rust resistance index (RRI) (Table 7). All the parental lines showed moderate resistant (MR) to highly resistant (R) reaction against stripe rust (*Pst*). The female parents (lines) FSD-08, PB-11, PS-05, MRJ-08 and ZRG-79 showed 20M, 20M, 5M, 30M and 40M scores respectively, while the pollen parents (testers) viz. PAK-13, BOR-16 and NR-09 depicted 10MR, 5R and 40M response against stripe rust. All these parents showed a slow rusting response against rust pathogen that is under the control of multiple genes.

Cross combinations of these parental lines showed a varied response, moderately resistant to moderately susceptible reac-

**Table 7.** Response of parental genotypes and their cross combinations against stripe rust infection under rainfed conditions

Parents and their crosses	Stripe rust observations			CI total	ACI	CARPA	RRI
	Rep-1	Rep-2	Rep-3				
FSD-08	20M	20M	30M	42	14.0	35.90	<b>5.8</b>
PB-11	20M	30M	40S	70	23.3	59.83	3.6
PS-05	5M	5R	5MR	7	2.0	5.13	<b>8.5</b>
MRJ-08	30M	50MS	50MSS	103	34.3	88.03	1.1
ZRG-79	40M	5MS	60S	88	29.3	75.21	2.2
PAK-13	10MR	20MR	20MR	20	6.7	17.09	<b>7.5</b>
BOR-16	5R	10MR	20MR	13	4.3	11.11	<b>8.0</b>
NR-09	40M	40M	40M	72	24.0	61.54	3.5
FSD-08 × PAK-13	20M	30MS	40M	60	20.0	51.28	4.4
FSD-08 × BOR-16	20M	30MS	40M	60	20.0	51.28	4.4
FSD-08 × NR-09	30MSS	30MR	60S	99	33.0	84.62	1.4
PB-11 × PAK-13	20M	4MS	30MS	39	13.1	33.50	<b>6.0</b>
PB-11 × BOR-16	20M	30R	30M	36	12.0	30.77	<b>6.2</b>
PB-11 × NR-09	30MSS	60MSS	40MSS	117	39.0	100	0.0
PS-05 × PAK-13	10MR	50MSS	30MR	61	20.3	52.14	4.3
PS-05 × BOR-16	10MR	10MR	10MR	12	4.0	10.26	<b>8.1</b>
PS-05 × NR-09	5MR	40M	30M	44	14.7	37.61	<b>5.6</b>
MRJ-08 × PAK-13	30M	5R	10M	25	8.3	21.37	<b>7.1</b>
MRJ-08 × BOR-16	20M	10M	10M	72	24.0	61.54	3.5
MRJ-08 × NR-09	40MS	40S	30MS	96	32.0	82.05	1.6
ZRG-79 × PAK-13	20MS	40MS	30MSS	75	25.0	64.10	3.2
ZRG-79 × BOR-16	20MS	30MSS	30MSS	70	23.3	59.83	3.6
ZRG-79 × NR-09	30M	30MSS	30MSS	72	24.0	61.54	3.5

Note. R, resistant; S, susceptible; MR, moderately resistant; MS, moderately susceptible; MSS, moderately susceptible to susceptible; CI, coefficient of infection; ACI, average coefficient of infection; CARPA, country average relative percentage attack; RRI, relative rust index.

tion against stripe rust. The F<sub>1</sub> hybrids combinations PS-05 × PAK-13, PS-05 × BOR-16 and PS-05 × NR-09 showed 10MR, 10MR and 5MR reaction, the crosses FSD-08 × PAK-13, FSD-08 × BOR-16, PB-11 × PAK-13, PB-11 × BOR-16, and MRJ-08 × BOR-16 showed 20M reaction, the cross combination MRJ-08 × PAK-13 showed 30M reaction, while the rest of the crosses showed moderately susceptible to susceptible reaction against stripe rust.

Average coefficient of infection (ACI) for the parents PS-05, PAK-13, BOR-16 and FSD-08 was recorded as 2.0, 6.7, 4.3 and 14.0 respectively and these varieties revealed a very good level of resistance against stripe rust. Rust resistance index (RRI) of these parents was also high (ranged 5.8 to 8.5), which indicated a good resistance response of these varieties. Among the cross combinations, PS-05 × BOR-16, MRJ-08 × PAK-13, PB-11 × BOR-16, PB-11 × PAK-13 and PS-05 × NR-09 depicted ACI values of 4.0, 8.3, 12.0, 13.1, and 14.7, respectively. These F<sub>1</sub> hybrids had a resistant response to stripe rust. RRI value of the F<sub>1</sub> hybrids (PS-05 × BOR-16, MRJ-08 × PAK-13, PB-11 × BOR-16, PB-11 × PAK-13 and PS-05 × NR-09) was higher (ranging from 5.6 to 8.1).

The higher the RRI value and the lower the ACI value means of genotypes with a resistant response to the disease pathogen and under the influence of slow rusting genes, the

slower the disease progress and the lesser the yield losses. Genotypes with higher RRI values (>5.0) represent moderately resistant to highly resistant response against rust pathogen. The parental genotypes viz. PS-05, PAK-13 and BOR-16 had higher values for RRI (8.5, 7.5 and 8.0 respectively) showing a highly resistant response against stripe rust pathogen. Cross combinations revealed an intermediate response against stripe rust as compared to parents, especially testes, and resistant genes are under the control of additive gene action. These results indicate that repeated backcross can be a better strategy for accumulation of resistant genes in these cross combinations. Selection in these cross combinations by following backcrosses with recurrent parents is efficient for disease resistance in the filial generations. These results are very much in line with the findings of Afzal et al. (2009) and Mahmoud et al. (2015).

## Conclusion

According to these findings, it can be concluded that higher general combining ability and low broad sense heritability for grain yield suggest the presence of additive genes, and exploitation of general combining ability for high grain yield is important due to presence of additive gene action, and selection in the filial generations and family rows will be effective.

For development of heterotic population, it is important to exploit specific combining ability for dominant gene action by crossing indigenous genotypes with exotic germplasm with improved rust resistance, which will be a useful future breeding strategy.

## References

- Afzal S.N., Haque M.I., Ahmedani M.S., Munir M., Firdous S.S., Rauf A., Ahmad I., Rattu A.R., Fayyaz M. Resistance potential of wheat germplasm (*Triticum aestivum* L.) against stripe rust disease under rainfed climate of Pakistan. *Pak. J. Bot.* 2009;41(3):1463-1475.
- Ahmad M.W., Ahmed M.S., Tahir H.N. Combining ability analysis for achene yield and related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Chil. J. Agric. Res.* 2012;72(1):21-26. DOI 10.4067/S0718-58392012000100004.
- Ahmadi J.A., Zali A., Yazdi-Samadi B., Talaie A., Ghannadha M.R., Saeidi A. A study of combining ability and gene effect in bread wheat under drought stress condition by diallel method. *Iranian J. Agric. Sci.* 2003;34(1):1-8.
- Akhtar M.A., Ahmad I., Mirza J.I., Rattu A.R., Hakro A.A., Jaffery A.H. Evaluation of candidate lines against stripe and leaf rusts under national uniform wheat and barley yield trial 2000–2001. *Asian J. Plant Sci.* 2002;1:450-453. DOI 10.3923/ajps.2002.450.453.
- Ali F.K.H., Abdulkhaleq D.A. Inheritance of some growth and yield traits in bread wheat using line × tester analysis. *J. Zankoy Sulaimani.* 2019;21(2):131-149. DOI 10.17656/jzs.10763.
- Ali Y., Khan M.A., Hussain M., Sabir W., Atiq M., Aatif H.M., Ahmad S., Ijaz M., Ahmad J.N. Virulence analysis of leaf and stripe rust populations in Pakistan through avirulence to virulence formula. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 2020;53(17-18):844-855. DOI 10.1080/03235408.2020.1802565.
- Almutairi M.M. Genetic parameters estimation for some wild wheat species and their F<sub>1</sub> hybrids grown in different regions of Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 2022;29(1):521-525. DOI 10.1016/j.sjbs.2021.09.015.
- Arshad M., Chowdhry M.A. Impact of environment on the combining ability of bread wheat genotypes. *Pak. J. Biol. Sci.* 2002;5(12):1316-1320. DOI 10.3923/pjbs.2002.1316.1320.
- Arzu K. Gene action and combining ability in line × tester population of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turk. J. Field Crops.* 2017;22(2):197-203. DOI 10.17557/tjfc.356216.
- Awan S.I., Malik F.A., Siddique M. Combining ability analysis in intervarietal crosses for component traits in hexaploid wheat. *J. Agric. Soc. Sci.* 2005;1(4):316-317.
- Babar M., Ullah H., Afridi K., Raza H., Ali S., Ali M., Subhan G., Khan J., Khan H. Line × tester analysis for combining ability and identification of gene action in F<sub>2</sub> populations of bread wheat. *Int. J. Agric. Biol.* 2022;27(6):381-392. DOI 10.17957/IJAB/15.1938.
- Barbosa-Neto J., Sorrells M., Cisar G. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetic relationship. *Genome.* 1996;39(6):1142-1149. DOI 10.1139/g96-144.
- Basnet B.R., Crossa J., Dreisigacker S., Pérez-Rodríguez P., Manes Y., Singh R.P., Rosyara U.R., Camarillo-Castillo F., Murua M. Hybrid wheat prediction using genomic, pedigree, and environmental covariables interaction models. *Plant Genome.* 2019;12(1):180051. DOI 10.3835/plantgenome2018.07.0051.
- Burton G., Devane H. Estimating heritability in tall fescue (*Festuca arundinacea*), from replicated clonal material. *Agron. J.* 1953;45(10):478-481. DOI 10.2134/agronj1953.00021962004500100005x.
- Chen X., Penman L., Wan A., Cheng P. Virulence races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in 2006 and 2007 and development of wheat stripe rust and distributions, dynamics, and evolutionary relationships of races from 2000 to 2007 in the United States. *Can. J. Plant. Pathol.* 2010;32(3):315-333. DOI 10.1080/07060661.2010.499271.
- Chowdhary M.A., Sajad M., Ashraf M.I. Analysis on combining ability of metric traits in bread wheat, *Triticum aestivum*. *J. Agric. Res.* 2007;45(1):11-17.
- Comstock R., Robinson H. Genetic parameters, their estimation and significance. In: Proceedings of the Sixth International Grassland Congress (Pennsylvania, August 17–23, 1952). Pennsylvania: State College, 1952;248-291.
- De Mendiburu F., Simon R. Agricole – ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology. *PeerJ PrePrints.* 2015;3:e1404v1. DOI 10.7287/peerj.preprints.1404v1.
- Dragov R.G. Combining ability for quantitative traits related to productivity in durum wheat. *Vavilov J. Genet. Breed.* 2022;26(6):515-523. DOI 10.18699/VJGB-22-63.
- Dreisigacker S., Melchinger A., Zhang P., Ammar K., Flachenecker C., Hoisington D., Warburton M.L. Hybrid performance and heterosis in spring bread wheat, and their relations to SSR-based genetic distances and coefficients of parentage. *Euphytica.* 2005;144:51-59. DOI 10.1007/s10681-005-4053-2.
- Fakhongphan J., Graybosch R.A., Baenziger P.S. Combining ability for tolerance to pre-harvest sprouting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 2016;56(3):1025-1035. DOI 10.2135/cropsci2015.08.0490.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome (Italy): FAOSTAT, 2016.
- Fasahat P., Rajabi A., Rad J.M., Derera J. Principles and utilization of combining ability in plant breeding. *Biom. Biostat. Int. J.* 2016;4(1):1-22. DOI 10.15406/bbij.2016.04.00085.
- Fellahi Z.E.A., Hannachi A., Bouzourour H., Boutekrab A. Line × tester mating design analysis for grain yield and yield related traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Agron.* 2013;2013:201851. DOI 10.1155/2013/201851.
- Figuroa M., Dodds P.N., Henningsen E.C. Evolution of virulence in rust fungi – multiple solutions to one problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2020;56:20-27. DOI 10.1016/j.pbi.2020.02.007.
- Fonseca S., Patterson F.L. Hybrid vigour in seven parent diallel crosses in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 1968;8(1):85-89. DOI 10.2135/cropsci1968.0011183X000800010025x.
- Gorjanović B.M., Kraljević-Balalić M.M. Inheritance of plant height, spike length and number of spikelets per spike in durum wheat. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad.* 2007;112:27-33. DOI 10.2298/ZMSPN0712027G.
- Gowda M., Kling C., Würschum T., Liu W., Maurer H.P., Hahn V., Reif J.C. Hybrid breeding in durum wheat: heterosis and combining ability. *Crop Sci.* 2010;50(6):2224-2230. DOI 10.2135/cropsci2009.10.0637.
- Hallauer A.R., Carena M.J., Miranda Filho J.D. Quantitative Genetics in Maize Breeding: Handbook of plant breeding. Springer, 1988.
- Hasnain Z., Abbas G., Saeed A., Shakeel A., Muhammad A., Rahim M.A. Combining ability for plant height and yield related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Res.* 2006;44(3):167-173.
- Hassan G., Muhammad F., Afridi S.S., Khalil I.H. Combining ability in F<sub>1</sub> generations of diallel cross for yield components in wheat. *Sarhad J. Agric.* 2007;23(4):937-942.
- Intikhab A., Awan S.I., Mur L.A.J., Saeed M.S., Ahmed M.S. Molecular and phenotypic analysis of bread wheat varieties in relation to durable rust resistance. *Int. J. Agric. Biol.* 2021;26(2):329-336. DOI 10.17957/IJAB/15.1841.
- Iqbal A., Khalil I.H., Shah S.M., Kakar A.M.S. Estimation of heritability, genetic advance and correlation for morphological traits in spring wheat. *Sarhad J. Agric.* 2017;33(4):674-679. DOI 10.17582/journal.sja/2017/33.4.674.679.
- Iqbal M.M. Combining ability analysis in wheat. *Pak. J. Agric. Sci.* 2007;44(1):1-5.
- Ishaq M., Ahmad G., Afridi K., Ali M., Khan T.U., Shah I.A., Ahmad B., Ahmad N., Ahmad I., Saleem A., Miraj M. Combining abi-

- lity and inheritance studies for morphological and yield contributing attributes through line  $\times$  tester mating design in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pure Appl. Biol.* 2018;7(1):160-168.
- Javaid M.M., Zulkifal M., Ali Y., Mehmood A., Ahmed J., Hussain M., Muhammad F., Sabir W., Tanveer M.H., Yasin O. Impact of environmental and pathogenic variability on breaking of host rust resistance in wheat cultivars under changing climatic conditions. *Adv. Zool. Bot.* 2018;6(1):31-40. DOI 10.13189/azb.2018.060104.
- Jones D.F. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1917;3(4):310-312. DOI 10.1073/pnas.3.4.310.
- Kaushik P. Line  $\times$  tester analysis for morphological and fruit biochemical traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) using wild relatives as testers. *Agronomy.* 2019;9(4):185. DOI 10.3390/agronomy9040185.
- Kempthorne O. An Introduction to Genetic Statistics. New York: John Wiley and Sons, 1957.
- Khan A., Ahmad M., Shah M.K.N., Ahmed M. Genetic manifestation of physio-morphic and yield related traits conferring thermotolerance in wheat. *Pak. J. Bot.* 2020;52(5):1545-1552. DOI 10.30848/PJB2020-5(27).
- Khan S.N., Hassan G., Khan M.R., Facho Z.H., Singh D., Sandhu K.S., Sanaullah M., Imtiaz M., Ali S. Field assessment and molecular markers-based characterization of yellow rust resistance in wheat hybrid progenies. *J. Anim. Plant Sci.* 2022;32(1):127-137. DOI 10.36899/JAPS.2022.1.0409.
- Knott D.R. Heterosis in seven wheat hybrids. *Can. J. Plant Sci.* 1965; 45:499-501.
- Kumar R., Silva L. Light ray tracing through a leaf cross section. *Appl. Opt.* 1973;12(12):2950-2954. DOI 10.1364/AO.12.002950.
- Large E.C. Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. *Plant Pathol.* 1954;3(4):128-129. DOI 10.1111/j.1365-3059.1954.tb00716.x.
- Lerner I.M. Genetic Homeostasis. New York: John Wiley and Sons, 1954.
- Liu Z., Pei Y., Pu Z. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breed.* 1999;118(2):119-123. DOI 10.1046/j.1439-0523.1999.118002119.x.
- Mahantashivayogayya K., Hanchinal R., Salimath P. Combining ability in dicoccum wheat. *Karnataka J. Agric. Sci.* 2004;17(3):451-454.
- Mahmoud A.F., Hassan M.I., Amein K.A. Resistance potential of bread wheat genotypes against stripe rust disease under Egyptian climate. *Plant Pathol. J.* 2015;31(4):402-413. DOI 10.5423/PPJ.OA.12.2014.0127.
- Malik M.F.A., Awan S.I., Ali S. Genetic behaviour and analysis of quantitative traits in five wheat genotypes. *J. Agric. Soc. Sci.* 2005; 1(4):313-315.
- Nazir S., Khan A.S., Ali Z. Combining ability analysis for yield contributing traits in bread wheat. *J. Agric. Soc. Sci.* 2005;1:129-132.
- Okello D.K., Manna R., Imanyowoha J., Pixley K., Edema R. Agronomic performance and breeding potential of selected inbred lines for improvement of protein quality of adapted Ugandan maize germplasm. *African Crop Sci. J.* 2006;14(1):37-47.
- Pal B., Alam N. The effect of certain external factors upon the manifestation of hybrid vigour in wheat. *Proc. Indian Acad. Sci.* 1938;7: 109-124. DOI 10.1007/BF03051095.
- Patel P.U., Patel B.C., Sidapara M.P., Sharma D.D. Combining ability and gene action studies for yield and its component traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2020;9:2463-2469.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 1948;26(5):496-500. DOI 10.1139/cjr48c-033.
- Qamar M., Ahmad S.D., Rabbani M.A., Shinwari Z.K., Iqbal M. Determination of rust resistance genes in Pakistani bread wheats. *Pak. J. Bot.* 2014;46(2):613-617.
- Rashid M., Cheema A.A., Ashraf M. Line  $\times$  tester analysis in Basmati rice. *Pak. J. Bot.* 2007;39(6):2035-2042.
- Rashmi K., Prasad L.C., Prasad R., Thakur P., Chandra K. Inheritance study of yield traits and spot blotch disease resistance in wheat under epiphytotic environment. *Plant Arch.* 2020;20(2):6590-6594.
- Raza W., Ghazanfar M.U., Rehman A.U., Fayyaz M. Screening of wheat germplasm against stripe rust disease under field conditions in Pakistan. *Plant Prot.* 2018;2(3):87-92.
- Reynolds M.P., Singh R.P., Ibrahim A., Ageeb O.A.A., Larque-Saavedra A., Quick J.S. Evaluating the physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments. *Euphytica.* 1998;100:85-94. DOI 10.1023/A:1018355906553.
- Saeed A., Chowdhry M.A., Saeed N., Khaliq I., Johar M.Z. Line  $\times$  tester analysis for some morpho-physiological traits in bread wheat. *Int. J. Agric. Biol.* 2001;3(4):444-447.
- Saeed M.S., Chowdhry M.A., Ahsan M. Genetic analysis for some metric traits in *Aestivum* species. *Asian J. Plant Sci.* 2005;4(4):413-416. DOI 10.3923/ajps.2005.413.416.
- Shamsuddin A.K. Genetic diversity in relation to heterosis and combining ability in spring wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1985;70:306-308.
- Sharma A., Garg D. Combining ability over environments in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Maharashtra Agric. Univ.* 2005; 30(2):153-156.
- Shull G.H., East E.M. The composition of a field of maize. *J. Hered.* 1908;4(1):296-301. DOI 10.1093/jhered/os-4.1.296.
- Singh R.K., Chaudhary B.D. Biometrical Methods in Quantitative Genetic Analysis. New Delhi: Kalyani Publ., 1977.
- Singh S., Singh L., Singh D., Kumar R. Combining ability in common wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in sodic soil. *Progress. Agric.* 2003;3:78-80.
- Sprague G.F., Tatum L.A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. *Agron. J.* 1942;34(10):923-932.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. Principles and Procedures of Statistics. New York: McGraw Hill Book Company Inc., 1980.
- Sultana S.R., Ali A., Ahmad A., Mubeen M., Zia-Ul-Haq M., Ahmad S., Ercisli S., Jaafar H.Z. Normalized Difference Vegetation Index as a tool for wheat yield estimation: a case study from Faisalabad, Pakistan. *Sci. World J.* 2014;2014:725326. DOI 10.1155/2014/725326.
- The R Project for Statistical Computing. A language and environment for statistical computing R foundation for Statistical Computing Department of Agronomy, Faculty of Agriculture of the University of the Free State. Vienna, Austria, 2017. www.r-project.org.
- Tilley M.S., Heiniger R.W., Crozier C.R. Tiller initiation and its effects on yield and yield components in winter wheat. *Agron. J.* 2019;111(3):1323-1332. DOI 10.2134/agronj2018.07.0469.
- Uddin M.N., Ellison F.W., O'Brien L., Latter B.D.H. Heterosis in F<sub>1</sub> hybrids derived from crosses of adapted Australian wheats. *Aust. J. Agric. Res.* 1992;43(5):907-919. DOI 10.1071/AR9920907.
- Ullah N., Ullah H., Afridi K., Alam M., Jadoon S.A., Khan W.U., Ahmad M., Uddin H. Genetic variability, heritability and correlation analysis among morphological and yield traits in wheat advanced lines. *Biol. Divers. Conserv.* 2018;11(1):166-180.
- Zhao Y., Zeng J., Fernando R., Reif J.C. Genomic prediction of hybrid wheat performance. *Crop Sci.* 2013;53(3):802-810. DOI 10.2135/cropsci2012.08.0463.

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

Received January 2, 2023. Revised March 9, 2023. Accepted March 9, 2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Пребридинговые исследования устойчивой к листовой ржавчине *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624

С.Н. Сибикеев<sup>1</sup>✉, И.Г. Адонина<sup>2, 3</sup>, А.Е. Дружин<sup>1</sup>, О.А. Баранова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное аграрное научное учреждение Юго-Востока, Саратов, Россия

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

<sup>3</sup> Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ sibikeyev\_sergey@mail.ru

**Аннотация.** Вид *Triticum timopheevii* Zhuk. привлекает внимание селекционеров мягкой пшеницы высоким иммунитетом к возбудителю листовой ржавчины. Однако интрогрессии от этого вида в *T. aestivum* L. мало используются в практической селекции. В представленном исследовании изучена агрономическая ценность *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624 по сравнению с родительскими сортами Саратовская 68, Добрыня и сортом-стандартом Фаворит в течение 2017–2022 гг. Интрогрессии от *T. timopheevii* у Л624 выявлены с помощью метода FISH с зондами pSc119.2, pAs1 и Spelt1, а также микросателлитных маркеров *Xgwm312*, *Xgpm4480* и *Xksum73*. Обнаружены транслокации 2AS.2AL-2A<sup>1</sup>L и в длинном плече хромосомы 2D. Линия Л624 высокоустойчива к *Puccinia triticina* как на фоне естественной эпифитотии, так и в лабораторных условиях. С использованием ПЦР-анализа с ДНК-маркером гена *LrTt1* (*Xgwm312*) установлена его неидентичность *Lr*-гену(ам) у линии Л624. По данным пятилетнего изучения, урожайность зерна у Л624 была в среднем выше, чем у сортов Фаворит и Добрыня, но ниже, чем у сорта Саратовская 68. По массе 1000 зерен Л624 уступала реципиентам и была одного уровня с сортом-стандартом Фаворит. Интрогрессии от *T. timopheevii* у Л624 увеличили содержание белка в зерне по сравнению с сортами Саратовская 68 и Фаворит, но с сортом Добрыня оно было на одном уровне. В целом по показателям качества муки и хлеба линия Л624 не уступила сортам-реципиентам, а по объему и пористости хлеба превзошла Саратовскую 68. В то же время Л624 превышала сорт-стандарт Фаворит по упругости теста, отношению упругости теста к растяжимости и силе муки. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать предположение, что интрогрессии в хромосомах 2A и 2D у линии Л624 не ухудшают хлебопекарные свойства.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* линия; 2AS.2AL-2A<sup>1</sup>L транслокация; устойчивость к листовой ржавчине; влияние на продуктивность и качество зерна.

**Для цитирования:** Сибикеев С.Н., Адонина И.Г., Дружин А.Е., Баранова О.А. Пребридинговые исследования устойчивой к листовой ржавчине *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):623-632. DOI 10.18699/VJGB-23-73

## Prebreeding studies of leaf rust resistant *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* line L624

S.N. Sibikeev<sup>1</sup>✉, I.G. Adonina<sup>2, 3</sup>, A.E. Druzhin<sup>1</sup>, O.A. Baranova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ sibikeyev\_sergey@mail.ru

**Abstract.** *Triticum timopheevii* Zhuk. attracts the attention of bread wheat breeders with its high immunity to the leaf rust pathogen. However, introgressions from this species in *Triticum aestivum* L. are little used in practical breeding. In the presented study, the agronomic value of *T. aestivum*/*T. timopheevii* line L624 was studied in comparison with the parent cultivars Saratovskaya 68, Dobrynya and the standard cultivar Favorit during 2017–2022. Introgressions from *T. timopheevii* in L624 were detected by the FISH method with probes pSc119.2, pAs1 and Spelt1, as well as microsatellite markers *Xgwm312*, *Xgpm4480* and *Xksum73*. Translocations of 2AS.2AL-2A<sup>1</sup>L and on 2DL were detected as well. Line L624 is highly resistant to *Puccinia triticina* both under the background of natural epiphytotics and under laboratory conditions. PCR analysis with the DNA marker of the *LrTt1* gene (*Xgwm312*) revealed that it is not identical to the *Lr* gene(s) in L624. According to a five-year study, the grain yield of L624 was, on average, higher than that of Favorit and Dobrynya, but lower than that of Saratovskaya 68. Line L624 had a lower weight of 1000 grains than the recipients, and was at the same level with the standard cultivar Favorit. Introgressions from *T. timopheevii* in L624 increased the grain protein content by comparison with Saratovskaya 68 and Favorit, but it was at the same level as

in Dobrynya. As for parameters of flour and bread, L624 was not inferior to the recipient cultivars, but by volume and porosity of bread, it surpassed Saratovskaya 68. Moreover, L624 surpassed Favorit by the elasticity of the dough, the ratio of the elasticity of the dough to the extensibility and the strength of the flour. Thus, the results obtained suggest that introgressions in chromosomes 2A and 2D in L624 do not impair baking properties.

Key words: *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* line; 2A5.2AL-2A<sup>4</sup>L translocation; leaf rust resistance; impact on productivity and grain quality.

**For citation:** Sibikeev S.N., Adonina I.G., Druzhin A.E., Baranova O.A. Prebreeding studies of leaf rust resistant *Triticum aestivum*/*T. timopheevii* line L624. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):623-632. DOI 10.18699/VJGB-23-73

## Введение

Листовая ржавчина пшеницы (возбудитель гриб *Puccinia triticina* Eriks.) остается одним из вредоносных заболеваний как в России, так и за рубежом. Несмотря на то что для ряда зерносеющих регионов России значение этой болезни снизилось, потери от нее достаточно велики (Gulyaeva et al., 2021). Создание устойчивых сортов мягкой пшеницы позволяет экологически безопасно избегать экономически значимого повреждения растений этим возбудителем болезни. Резистентность к *P. triticina* у мягкой пшеницы контролируется генами *Lr*. К настоящему времени идентифицировано 82 гена *Lr* (McIntosh et al., 2022), но большинство из них преодолены патогеном. В целом в российских сортах мягкой пшеницы используются гены: *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37* и *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2*, *LrSp*. Эти гены используются в различных комбинациях, но непреодоленные гены лишь *LrSp*, *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2* (Gulyaeva et al., 2021).

Узость генетического разнообразия по эффективным генам устойчивости к возбудителю листовой ржавчины преодолевается привлечением в гибридизацию видов, родственных мягкой пшенице. Так, 39 из 82 идентифицированных генов *Lr* перенесены от «дикарей» (McIntosh et al., 2013, 2018, 2022). Среди видов, источников эффективных генов резистентности, особое место занимает *Triticum timopheevii* Zhuk. (A<sup>1</sup>A<sup>4</sup> GG, 2n = 28). Этот вид привлекает селекционеров своей уникальной высокой устойчивостью к комплексу заболеваний. Как в России, так и за рубежом предпринимались многочисленные попытки переноса генов устойчивости к патогенам от *T. timopheevii* в мягкую и твердую пшеницу путем прямой гибридизации с последующим беккроссированием на культурные виды (Allard, Shands, 1954; Jørgensen, Jensen, 1972; Скурыгина, 1984; Tomar et al., 1988; Козловская и др., 1990; Budashkina, Kalinina, 2001; Brown-Guedria et al., 2003; Singh et al., 2017).

Кроме того, в качестве промежуточной формы – «моста» – были созданы синтетические аллоплоидные формы от скрещивания *T. timopheevii* с *Aegilops tauschii* Coss. В итоге были получены формы с 2n = 42 и геномным составом A<sup>1</sup>A<sup>4</sup>GGDD – *T. kiharae* Dorof. et Migusch. (Дорофеев и др., 1979) и синтетик д-ра Савова (Leonova et al., 2007). При схожей гибридизации с естественным мутантом *T. timopheevii* – *T. militinae* Zhuk. et Migusch. была создана синтетическая форма *Triticum miguschovae* (Жиров, Терновская, 1984).

В дальнейшем при скрещивании мягкой пшеницы с этими синтетиками был получен ряд линий, устойчивых к возбудителям листовой и стеблевой ржавчины. Так, в

Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) получен набор устойчивых к патогенам линий в генотипе сорта Саратовская 29, так называемые С29 иммунные (С29им), а также сорт яровой мягкой пшеницы Памяти Майстренко (Laikova et al., 2013).

Но, несмотря на многочисленность исследований, идентифицировано всего лишь два гена *Lr* от *T. timopheevii*: *Lr18* в транслокации 5BS.5BL-5G#1L и *Lr50*, локализованный на 2BL (McIntosh et al., 2013). Кроме того, в “Catalogue of Genes Symbols for Wheat” (McIntosh et al., 2013) указаны три гена *Lr* со временным (лабораторным) обозначением *LrTt1*, локализованных в хромосоме 2A, *LrTt2* – в 5BL (Leonova et al., 2004, 2010), *LrSelG12* – в хромосоме 3BL (Singh et al., 2017). Таким образом, список генов *Lr* от *T. timopheevii* небольшой.

Эффективность этих генов различна. Так, к гену *Lr18* имеется вирулентность у возбудителя листовой ржавчины в Германии, Швейцарии, России (McIntosh et al., 1995; Sibikeev и др., 2020), этот ген больше используется в Австралии (McIntosh et al., 1995). К гену *Lr50* в стадии проростков вирулентны расы MBRL и PNMQ, но он защищает на стадии взрослых растений в Канзасе и Техасе (Brown-Guedria et al., 2003). Ген *LrTt1* эффективен в проростковой фазе развития (Leonova et al., 2004), а *LrTt2* и *LrSelG12* – как у проростков, так и у взрослых растений (Leonova et al., 2010; Singh et al., 2017).

Однако практическая селекция пшеницы показала малое использование этих генов в коммерческих сортах. Только *Lr18* нашел применение в Австралии в сорте Timbera и его производных и в сорте Sabikei и его производных (McIntosh et al., 2013). Одна из причин незначительного использования интрогрессий с генами устойчивости к листовой ржавчине от *T. timopheevii* – их недостаточное пребридинговое исследование, что приводит к осторожности в их применении селекционерами из-за опасения сцеплений с генами, отрицательно влияющими на хозяйственно ценные признаки.

Цель наших исследований – по результатам изучения яровой *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии L624 выявить ее перспективность для практической селекции как по эффективности против *P. triticina*, так и по влиянию на продуктивность зерна и качество муки и хлеба.

## Материалы и методы

Использованы следующие генотипы: 1) сорта-реципиенты яровой мягкой пшеницы Саратовская 68 (С68), Добрыня и сорт-стандарт Фаворит; 2) *T. aestivum*/*T. timopheevii* линия L624 = Саратовская 68 /*T. timopheevii* \*4//Добрыня. Сорта Саратовская 68 и Добрыня различаются между со-



бой по морфотипу, наличию разных генов *Lr* и качеству муки и теста. Первый сорт – остистый, краснозерный, белоколосый, высокорослый, среднеспелый, восприимчив к возбудителю листовой ржавчины, содержит неэффективный ген *Lr10* (Гулятьева и др., 2020), по качеству муки и хлеба относится к категории ценных пшениц.

Второй сорт – безостый, краснозерный, белоколосый, высокорослый, среднеспелый, по качеству муки и хлеба относится к категории сильных пшениц. Сорт Добрыня содержит 7DS-7DL-7Ac#1L транслокацию от *Agropyron elongatum* (Host) Beauv. с генами устойчивости к листовой и стеблевой ржавчине *Lr19/Sr25*. Эти гены резистентности преодолены патогенами в Среднем и Нижнем Поволжье, Центральном и Центрально-Черноземном районах России (Sibikeev et al., 1996; Баранова и др., 2021).

Сорт-стандарт Фаворит – безостый, краснозерный, белоколосый, высокорослый, среднеспелый, по качеству муки и хлеба относится к категории ценных пшениц. Сорт устойчив к возбудителям листовой ржавчины и мучнистой росы и характеризуется замещением хромосомы 6D мягкой пшеницы на 6Ag<sup>1</sup> хромосому от *A. intermedium* (Host) Beauv. (Sibikeev et al., 2017).

При создании линии Л624 для скрещиваний использовали образец *T. timopheevii* неизвестного происхождения, любезно предоставленный д-ром С.А. Степановым (Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов). *T. aestivum*/T. *timopheevii* линия Л624 получена от прямого скрещивания сорта С68 (материнская форма) с *T. timopheevii* с последующим четырехкратным беккроссированием на сорт Добрыня. Так как С68 восприимчив к возбудителю листовой ржавчины, а Добрыня несет преодоленный ген *Lr19*, то при беккроссировании основным критерием отбора была устойчивость к *P. triticina*. Для этого при искусственном заражении *P. triticina* использована популяция патогена с высоким присутствием патотипа *pp19*, вирулентного к *Lr19*. Стабильная по устойчивости к патогену линия была выделена из шестого поколения после последнего скрещивания.

Исследования можно условно разделить на три этапа. Первый этап – оценка на устойчивость линии Л624 к возбудителю листовой ржавчины в полевых условиях – в фазе молочно-восковой спелости (селекционный посев ФАНЦ Юго-Востока, условия сильной эпифитотии патогена в 2017 г. и средней – в 2022 г.) и в лабораторных условиях – в фазе проростков (третьего листа) в 2018–2020 гг. Основные различия в популяциях *P. triticina* 2017 и 2022 гг. в том, что у последней уменьшился процент присутствия патотипа *pp19*, вирулентного к гену *Lr19*. В полевых условиях степень устойчивости оценивалась по шкале А.Р. Roelfs с коллегами (1992), где R – устойчивость, MR – умеренная устойчивость, MS – умеренная восприимчивость и S – восприимчивость. Степень поражения ржавчиной (%) была оценена согласно шкале R.F. Peterson с коллегами (1948).

Для лабораторной оценки использовали сборные саратовские популяции *P. triticina* с искусственно увеличенным присутствием патотипа *pp19*, вирулентного к гену *Lr19*. Проростки (фаза трех листьев), выращенные в сосудах с почвой, опрыскивали водной суспензией спор

популяции с добавлением детергента Твин 80. Концентрация суспензии составляла 1 мг инокулюма на 1 мл воды. После заражения растений создавали темновую стадию на 20 ч со 100 % относительной влажностью, затем выращивали проростки при температуре 20–22 °С, фотопериод: 16 ч день/8 ч ночь.

Тип реакции пшеницы на патоген определяли по шкале Е.В. Mains и Н.С. Jackson (1926), где: 0 – отсутствие симптомов; 0; – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом; 3 – пустулы среднего размера без некроза; 4 – крупные пустулы без некроза; X – пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы. Растения, поражение которых составляло 0–2 балла, относили к устойчивым (R), а 3, 4 и X (S) – к восприимчивым.

Второй этап – цитогенетическая оценка *T. aestivum*/T. *timopheevii* линии Л624. Целью цитогенетического анализа интрогрессивной линии были выявление чужеродного генетического материала и определение его состояния в реконструированном геноме мягкой пшеницы в виде дополненных или замещенных хромосом, транслокаций. Это позволило оценить стабильность наследования целевого признака – устойчивости к *P. triticina*.

Препараты митотических хромосом готовили из меристемы корней проростков в соответствии с методикой (Badaeva et al., 2017). Для анализа кариотипа линии Л624 применили метод FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация) с помощью зондов на основе различных повторяющихся последовательностей. Зонд pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) локализуется в основном на хромосомах генома В мягкой пшеницы, а pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) – главным образом на хромосомах генома D. Одновременное использование этих проб позволяет идентифицировать все хромосомы геномов В и D, некоторые хромосомы генома А (Schneider et al., 2003). Кроме того, по локализации сигналов гибридизации с зондом pSc119.2 можно идентифицировать хромосомы генома G *T. timopheevii* (Jiang, Gill, 1994).

Повторяющаяся последовательность Spelt1 выделена из геномной ДНК *A. speltoides* Tausch. (Салина и др., 1997), блоки повтора локализируются в субтеломерных районах хромосом данного вида. Отдельные сайты Spelt1 встречаются у некоторых образцов тетра- и гексаплоидных пшениц, в частности *T. timopheevii*, и могут служить маркерами этих хромосом (Salina et al., 2006). Флуоресцентную *in situ* гибридизацию проводили в соответствии с методикой (Salina et al., 2006) с незначительными модификациями. Работы выполняли в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (г. Новосибирск).

В дополнение к цитогенетическому анализу был выполнен молекулярно-генетический анализ. Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу J. Plaschke с коллегами (1995). В анализ были взяты микросателлитные маркеры: *Xgwm312* (Röder et al., 1998), наиболее близко расположенный к гену устойчивости *LrTt1* на длинном плече хромосомы 2A (Leonova et al., 2004); маркеры длинного плеча хромосомы 2D *Xgwm4480* (<http://www.graingenes.org>) и *Xksm73* (Yu et al., 2004). Проце-

дуру полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли согласно протоколам авторов. Продукты амплификации разделяли в двухпроцентном агарозном геле.

Третий этап – оценка показателей продуктивности зерна, физических и хлебопекарных свойств теста и хлеба у сортов-реципиентов С68, Добрыня, сорта-стандарта Фаворит и *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624. Исследования проводили в 2017–2022 гг.

Гидротермический коэффициент (ГТК) за период вегетации мягкой пшеницы в 2017 г. составил 1.0 (удовлетворительно увлажненные условия), в 2018 и в 2019 гг. – 0.6 (очень засушливые условия), в 2020 г. – 0.8 (засушливые условия), в 2021 г. – 0.9 (засушливые условия) и в 2022 г. – 0.8 (засушливые условия). Основными отличиями погодных условий 2018, 2019 и 2021 гг. были высокие температуры в период цветения (выше средней многолетней на 5.0, 4.2 и 8.0 °С соответственно) при пониженном количестве осадков (ниже среднего многолетнего на 13–15 мм), что резко снизило продуктивность зерна. Самым увлажненным при умеренной температуре был вегетационный сезон 2017 г., но в 2020 г., как и в 2017 г., в период цветения температура воздуха была ниже средне-многолетней, а именно, на 0.7 и 1.0 °С, при этом количество осадков на 23 и 48 мм выше в 2017 и 2020 гг. соответственно, что повысило урожайность зерна. Отличием погодных условий 2022 г. была повышенная температура воздуха в период цветения на 1.0 °С при пониженном количестве осадков на 12 мм, но в следующую декаду (начало июля) отмечалось повышение осадков на 16 мм при пониженной температуре на 1.0 °С, что в целом позволило нивелировать вредный эффект.

Экспериментальный материал рендомизированно высевали в 7 м<sup>2</sup> делянки в 3-кратной повторности. Норма высева – 400 зерен на 1 м<sup>2</sup>. Качество муки и хлеба оценивали по содержанию сырой клейковины, крепость которой определялась на приборе ИДК-3, а также по показателям альвеографа Шопена с выпечкой опытных образцов хлебцев. Содержание белка в зерне урожая 2020–2022 гг. определяли на анализаторе зерна Infratec TM 1241. Полученные данные по *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624 и сортам-реципиентам С68, Добрыня и сорту-стандарту Фаворит подвергли однофакторному дисперсионному анализу со множественными сравнениями по Дункану с использованием пакета селекционно-генетических программ Agros-2.10 (Мартьянов и др., 2000).

## Результаты

### Фитопатологический анализ устойчивости к возбудителю листовой ржавчины

В условиях сильного инфекционного фона в вегетационный период 2017 г. и средней эпифитотии в 2022 г. линия Л624 проявила устойчивый тип реакции (R) (пораженность 0 %, тип реакции – IT = 0;), в то время как сорта-реципиенты: С68 – восприимчивость к патогену (S, IT = 3+ в 2017 г. и S, IT = 3 в 2022 г.) (пораженность 20–40 %) и Добрыня – восприимчивость к патогену (S, IT = 3 в 2017 г. и RS, IT = 0;/3 в 2022 г.). Сходные результаты получены при искусственной инокуляции линий в фазе проростков в тепличных условиях (табл. 1).

Таким образом, фитопатологический анализ устойчивости к возбудителю листовой ржавчины *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624 в полевых и лабораторных условиях показал ее высокий уровень по сравнению с родительскими сортами-реципиентами и видом-донором. Необходимо уточнить, что искусственное заражение сортов и Л624 проводили трижды в течение 2018–2020 гг. саратовскими популяциями патогена с добавлением патотипа *pp19*, собранного с инфицированного сорта Добрыня. Все три оценки (за 2018, 2019 и 2020 гг.) имели одинаковые результаты по типу реакции по всем исследуемым сортам и Л624. Высокая эффективность устойчивости к *P. triticina* Л624 на стадии как проростков (фаза трех листьев), так и взрослых растений (фаза молочной спелости) указывает на ювенильный характер резистентности.

### Цитогенетическая оценка

#### *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624

В целом по результатам цитогенетического анализа линия Л624 является цитологически стабильной и характеризуется стандартным для гексаплоидной пшеницы числом хромосом – 42. Хромосомные замещения и транслокации с участием хромосом G генома *T. timopheevii* не обнаружены. Результаты FISH с зондами pSc119.2 и pAs1 на метафазных хромосомах линии Л624 представлены на рис. 1.

Гибридизация с зондами pSc119.2 и pAs1 не выявила изменений в хромосомах геномов В и D линии Л624, кроме хромосомы 2D. У хромосомы 2D отсутствует сигнал pAs1 на конце длинного плеча (Schneider et al., 2003) (см. рис. 1), что может указывать на транслокацию неустановленно-

**Таблица 1.** Устойчивость линии Л624, родительских сортов и сорта-стандарта к *P. triticina* в поле (естественные эпифитотии) и теплице (искусственное заражение)

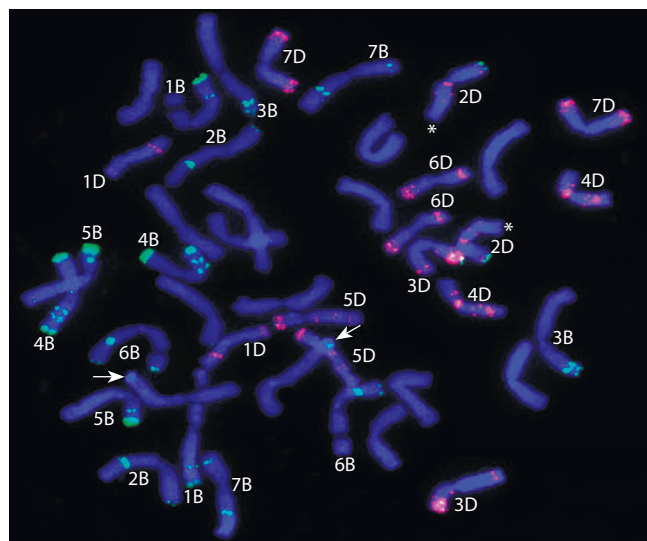
Сорт, линия	Гены <i>Lr</i>	Тип реакции (IT, балл) и степень устойчивости		
		2017 г.	2022 г.	2018–2020 гг.
		Поле, стадия молочной спелости		Теплица, стадия трех листьев
Саратовская 68	10	3+, 40S	3, 20S	3
Добрыня	19	3, 15S	0;/3, RS*	3
Л624	?	0, R	0, R	0;
Фаворит	6Ag <sup>i</sup>	0;, R	0;, R	0;
<i>T. timopheevii</i>	?	0;, R	0;, R	0;

\* Данный тип реакции и степень устойчивости вызваны низким присутствием в популяции *P. triticina* патотипа *pp19*.

го происхождения. Проведенный молекулярно-генетический анализ показал, что при использовании микросателлитных маркеров хромосомы 2DL (*Xgprw4480*, *Xksum73*) (рис. 2, б) фрагменты амплификации линии Л624 соответствуют по длине фрагментам контрольных образцов пшеницы. Таким образом, можно заключить, что обнаруженная транслокация от *T. timopheevii* в длинном плече хромосомы 2D не затрагивает район локализации маркеров *Xgprw4480* и *Xksum73*, т. е. является субтеломерной.

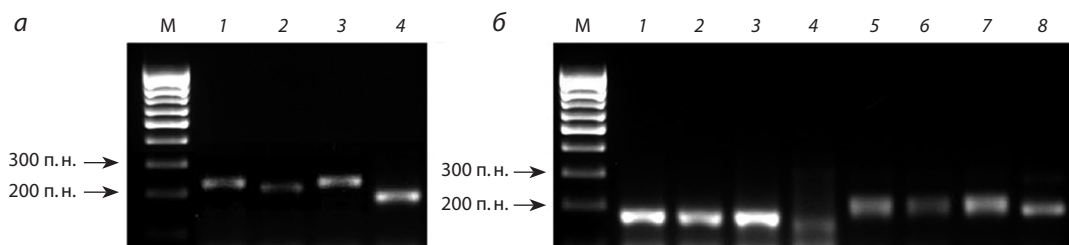
У одной из хромосом генома А на конце длинного плеча выявлен слабый сигнал рSc119.2 (см. рис. 1, рис. 3, а). Гибридизация одновременно с двумя зондами, рSc119.2 и Spelt1 (см. рис. 3), показала, что эта хромосома несет также блок повтора Spelt1 на конце длинного плеча (см. рис. 3, б). Поскольку ранее подобная локализация этих проб была найдена на хромосомах 2A<sup>t</sup> у отдельных образцов *T. araraticum* Jakubz. [син. *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. subsp. *armeniacum* (Jakubz.) van Slageren)] (Salina et al., 2006), можно было предположить наличие у линии Л624 целой хромосомы 2A<sup>t</sup> *T. timopheevii* или транслокации в длинном плече хромосомы 2A (Т2AS.2AL-2A<sup>t</sup>L).

Однако молекулярно-генетический анализ с использованием маркера *Xgwm312* (см. рис. 2, а) выявил, что фрагмент амплификации у линии Л624 отличается по длине



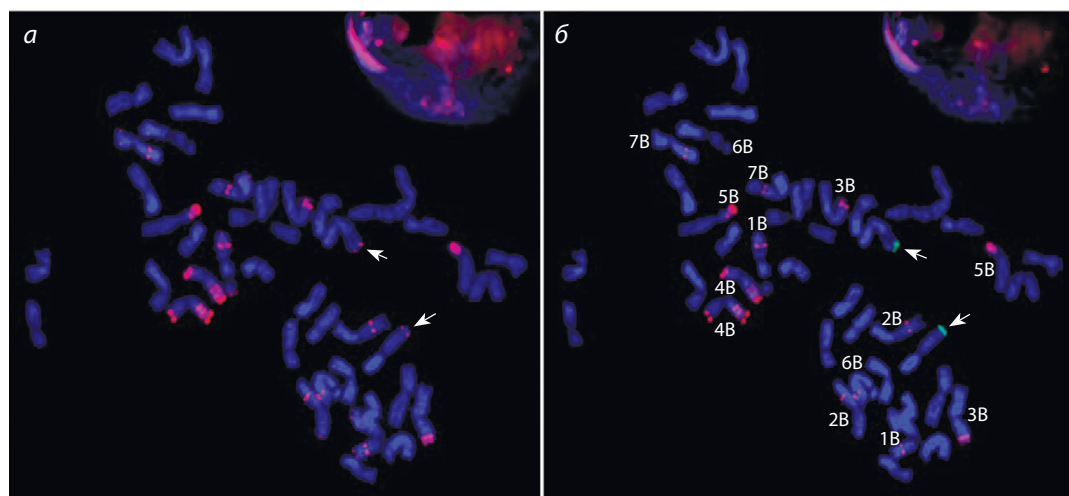
**Рис. 1.** Флуоресцентная *in situ* гибридизация на метафазных хромосомах линии яровой мягкой пшеницы Л624 = Саратовская 68/*T. timopheevii* \*4//Добрыня с зондами рSc119.2 (зеленый сигнал) и рAs1 (красный сигнал).

Стрелками указаны сайты гибридизации с зондом рSc119.2 на длинных плечах одной из хромосом генома А. Звездочками обозначены длинные плечи хромосом 2D.



**Рис. 2.** Электрофореграмма результатов ПЦР-амплификации микросателлитных маркеров с ДНК линии Л624 и родительских форм.

а – *Xgwm312*; б – *Xgprw4480* (1–4), *Xksum73* (5–8): 1, 5 – *T. aestivum* (сорт Саратовская 68), 2, 6 – *T. aestivum* (сорт Добрыня), 3, 7 – линия Л624, 4, 8 – *T. timopheevii*. М – маркер длины фрагментов.



**Рис. 3.** Флуоресцентная *in situ* гибридизация на метафазных хромосомах линии яровой мягкой пшеницы Л624 = Саратовская 68/*T. timopheevii* \*4//Добрыня с зондами рSc119.2 (красный сигнал) и Spelt1 (зеленый сигнал).

На одной и той же метафазной пластинке (а) отмечена локализация только зонда рSc119.2, стрелками указаны сигналы рSc119.2 на длинных плечах, предположительно, хромосом 2A; (б) стрелками показаны сигналы Spelt1 на 2AL.

**Таблица 2.** Показатели продуктивности зерна у *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624

Сорт, линия	Всходы– колошение, сут., среднее за 2018–2022 гг.	Урожайность зерна, кг/га						Масса 1000 зерен, г за 2018–2022 гг.	Белок, % за 2020–2022 гг.
		2018 г.	2019 г.	2020 г.	2021 г.	2022 г.	Среднее		
С68	42.0	1427	668	3485	797	2699	1815	31.12	16.2
Добрыня	41.6	852	670	2805	651	2829	1561	30.32	17.1
Л624	44.2	1095	590	2873	759	2797	1623	27.96	16.9
Фаворит (St)	43.8	861	602	2631	519	2401	1403	28.48	16.2
НСР <sub>05</sub>	1.3	188	NS	240	193	343	240	2.05	0.5

от фрагмента *T. timopheevii* и соответствует фрагменту одного из родительских сортов пшеницы (Саратовская 68). Это свидетельствует об отсутствии хромосомного замещения 2A<sup>1</sup>(2A) у линии Л624 и указывает на терминальную транслокацию в длинном плече хромосомы 2A (T2AS.2AL-2A<sup>1</sup>L), не затрагивающую район локализации маркера *Xgwm312*. Кроме того, есть основание предполагать неидентичность гена(ов) *Lr* в линии Л624 гену *LrTt1*, близко расположенному к микросателлитному маркеру *Xgwm312*.

#### Пребридинговые исследования

##### *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624

Результаты изучения продуктивности зерна у *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624, устойчивой к возбудителю листовой ржавчины, продемонстрировали, что в среднем за период с 2018 по 2022 г. нет значимых различий по урожайности у линии по сравнению с сортами-реципиентами Саратовская 68 и Добрыня, а также с сортом-стандартом Фаворит, что ожидаемо, так как показатели по продуктивности в 2020 и 2022 гг. в три-пять раз превышают урожайность 2019 и 2021 гг. (табл. 2).

Тем не менее анализ продуктивности зерна по годам выявил, что из пяти лет изучения два года (2018 и 2020) урожайность зерна была значимо ниже, чем у сорта-реципиента Саратовская 68, и три года (2019, 2021 и 2022) – на одном уровне. По сравнению с сортом Добрыня продуктивность зерна у Л624 четыре года (2019–2022) была на одном уровне и превзошла сорт-реципиент Добрыня в 2018 г. По сравнению с сортом-стандартом Фаворит урожайность зерна *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624 превысила Фаворит – четыре года (2018, 2020–2022) и только в 2019 г. была одного уровня (см. табл. 2).

Как упоминалось выше, вегетационные сезоны 2018, 2019 и 2021 гг. характеризовались острой засухой, а сезон 2020 г. выделялся избытком влаги и умеренной температурой воздуха от всходов до начала цветения, а затем до полного созревания отмечалась засуха с высокими температурами. В то же время сезон 2022 г. отличался противоположным распределением осадков, т. е. от всходов до начала цветения – недостаток влаги, и во время налива зерна (июль) – избыток влаги. Однако весь период 2018–2022 гг. относится в разной степени к засушливым условиям. Таким образом, есть основания констатировать высокую засухоустойчивость Л624 и нейтральное влия-

ние в этой линии интрогрессивного материала от *T. timopheevii* на важный селекционный признак – засухоустойчивость.

В среднем за 2018–2022 гг. анализ массы 1000 зерен как одного из важных элементов продуктивности зерна выявил значимое понижение у линии Л624 (27.96 г) по сравнению с сортами Саратовская 68 (31.12 г) и Добрыня (30.32 г), но незначимое снижение по сравнению с сортом-стандартом Фаворит (28.48 г) (см. табл. 2).

По показателю «период всходы–колошение» за вегетационные сезоны 2018–2022 гг. у Л624, по сравнению с сортами-реципиентами, наблюдались значимые различия, а именно: 44.2 против 42.0 сут у С68 и 41.6 сут у Добрыни, НСР<sub>05</sub> = 1.3 сут. При этом значимых различий с сортом-стандартом Фаворит (43.8 сут) не было.

По высоте растений Л624 не отличалась как от сортов С68 и Добрыня, так и от сорта Фаворит. Однако по устойчивости к полеганию различия были между Л624 (4.24 балла) и сортом Добрыня (4.60 балла), но линия не отличалась от сорта С68 (4.22 балла) и сорта-стандарта Фаворит (4.26 балла), НСР<sub>05</sub> = 0.15.

Изучение влияния хромосом или транслокаций от родственных видов на качество конечной продукции, муки и хлеба у интрогрессивных линий мягкой пшеницы – важный этап оценки их селекционной ценности. В целом по ряду исследований *T. aestivum*/*T. timopheevii* линий (Тимонова и др., 2012), а также линий, полученных на сорте яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 с использованием синтетика д-ра Савова (A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>GGDD), выявлено положительное или нейтральное влияние генного материала *T. timopheevii* на показатели муки и хлеба (Лайкова и др., 2007; Laikova et al., 2013).

По оценке содержания белка в зерне за 2020–2022 гг. *T. aestivum*/*T. timopheevii* линия Л624 значимо превысила сорта С68 и Фаворит (16.9 против 16.2 % у сортов), но была на одном уровне с сортом Добрыня (17.1 %) (см. табл. 2). По параметрам клейковины – содержанию и крепости клейковины – по показателям прибора ИДК-3 получены следующие результаты: линия Л624 значимо уступила по содержанию клейковины сортам-реципиентам С68 и Добрыня, а именно: 38.7 и 39.7 % против 36.4 % у Л624, при НСР<sub>05</sub> = 2.0. При этом линия была на одном уровне с сортом-стандартом Фаворит (37.2 %). По крепости клейковины Л624 значимо превзошла как сорта-реципиенты, так и сорт-стандарт Фаворит, а именно:

**Таблица 3.** Показатели качества муки и хлеба у *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624 в 2018–2022 гг.

Сорт, линия	Альвеограф*			Хлеб**		
	P, мм	P/L	W, ед. а.	V, см <sup>3</sup>	Пористость, балл	Цвет мякиша
Саратовская 68	88.8	1.75	195	761	4.50	Белый
Добрыня	84.4	1.68	204	814	4.88	Желтый
Л624	84.7	1.51	203	799	4.85	Белый
Фаворит	69.1	1.20	170	780	4.75	Кремовый
НСР <sub>05</sub>	8.0	0.3	25	30	0.26	

\* Показатели альвеографа: P – упругость теста; P/L – отношение упругости теста к растяжимости; W – сила муки.

\*\* Показатели оценки хлеба: V – объем хлеба, пористость.

78.1 ед. п. у линии Л624 против 85.8 (С68), 83.5 (Добрыня) и 91.3 ед. п. (Фаворит), НСР<sub>05</sub> = 4.0.

При изучении показателей альвеографа (табл. 3) было выявлено, что линия Л624 по упругости теста, отношению упругости теста к растяжимости и силе муки незначимо отличалась от сортов-реципиентов. Однако по всем вышеуказанным показателям отмечено существенное повышение у *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии Л624 по сравнению с сортом-стандартом Фаворит. По пористости мякиша и объему хлеба Л624 была одного уровня с сортами Добрыня и Фаворит, но значимо превысила сорт С68. Наблюдались различия в цвете мякиша хлеба. Так, у С68 и Л624 мякиш белый, у Фаворита – кремовый и у Добрыни – желтый, что связано с присутствием 7DS-7DL-7Ae#1L транслокации, которая несет гены повышенного содержания каротиноидов (Prins et al., 1996) (см. табл. 3).

## Обсуждение

Как уже отмечалось выше, вид *T. timopheevii* привлекает селекционеров высоким иммунитетом к комплексу грибных заболеваний. Получен набор *T. aestivum*/*T. timopheevii* линий с генами устойчивости к различным заболеваниям: к возбудителю листовой ржавчины – *Lr18*, *Lr50*, *LrTt1*, *LrTt2*, *LrSelG12*; к возбудителю стеблевой ржавчины (*P. graminis* Pers.) – *Sr36*, *Sr37*, *Sr40*; к возбудителю мучнистой росы (*Blumeria graminis* DC.) – *Pm6*, *Pm27* (Adonina et al., 2021). Резистентные к патогенам *T. aestivum*/*T. timopheevii* линии в основном несут интрогрессивный материал от хромосом 6G, 2G, 5G, кроме того, от хромосом 1A<sup>t</sup>, 2A<sup>t</sup>, 3A<sup>t</sup>, 5A<sup>t</sup>, 7A<sup>t</sup>, 3G, 4G, 7G (Badaeva et al., 2010).

В наших исследованиях интрогрессии от *T. timopheevii* затронули хромосому 2A (транслокация T2AS.2AL-2A<sup>t</sup>L), и у хромосомы 2D отсутствует сигнал rAs1 на конце длинного плеча, что может указывать на транслокацию неустановленного происхождения. Ранее в длинном плече хромосомы 2A (транслокация 2AS-2A<sup>t</sup>S.2A<sup>t</sup>L-2AL) линии 842 = Saratovskaya 29 \*2/*T. timopheevii* spp. *viticulosum* между маркерами *Xgwm817* и *Xgwm312* был картирован ген *LrTt1* (Leonova et al., 2004, 2011; Леонова и др., 2008). Установлено, что этот ген наследуется рецессивно моногенным образом (Leonova et al., 2004). У Л624 ген устойчивости к листовой ржавчине (по данным расщепления в семьях F<sub>2</sub> Саратовская 68/*T. timopheevii* \*4//Добрыня) также наследуется рецессивно моногенным образом (Сибикеев, неопубл. данные).

Однако в наших исследованиях с помощью ПЦР-анализа с ДНК-маркером гена *LrTt1* (*Xgwm312*) установлена его неидентичность гену(ам) *Lr* у линии Л624. Кроме того, *LrTt1* эффективен к европейской популяции *P. triticina* в стадии проростков, но обладает лишь сдерживающим эффектом (тип реакции IT = 3) на стадии взрослых растений к западносибирской популяции патогена (Leonova et al., 2004; Тимонова и др., 2012). К тому же транслокация с *LrTt1* не сцеплена с устойчивостью к возбудителю стеблевой ржавчины в Западной Сибири, степень поражения 80 % (Тимонова и др., 2012).

Интрогрессии от *T. timopheevii* в Л624 защищали от саратовской популяции *P. triticina* как на стадии проростков (фаза три листа), так и в полевых условиях в стадии взрослых растений (фаза молочной спелости), тип инфекции IT = 0;. Линия Л624 поражалась возбудителем стеблевой ржавчины в стадии проростков при искусственном заражении как саратовской, так и омской популяцией, IT = 3.

При попытке идентификации у Л624 генов устойчивости к *P. graminis* (гены *Sr*: *Sr2*, 22, 24, 25, 26, 31, 32, 35, 36, 38, 39, 57) с помощью ДНК-маркеров не было выявлено ни одного из указанных генов (Баранова, неопубл. данные). В то же время ранее в наших исследованиях была показана эффективность Л624 (в этих исследованиях Л624 обозначена порядковым номером 49) в стадии проростков против саратовской, краснодарской, дагестанской и челябинской популяций *P. triticina*, собранных в 2018 г., а также к тест-клонам патогена с вирулентностью к генам устойчивости к возбудителю листовой ржавчины – *Lr9*, *Lr19*, *Lr26*, тип реакции Л624 на патоген был IT = 0.

Кроме того, использование ДНК-маркеров к генам *Lr1*, 3, 9, 10, 19, 20, 21, 22a, 24, 25, 28, 29, 34, 35, 37, 39 = 41, 47, 50, 53, 66, 6Agi позволило идентифицировать у Л624 гены *Lr10* и *Lr28*. Ген *Lr19* от сорта Добрыня не выявили. Обнаружение маркера SCS421 для гена *Lr28* указывает на наличие у образца генетического материала *T. timopheevii* (*LrTtim*), так как этот маркер не строго специфичен для определения гена *Lr28*, переданного от *Ae. speltoides*, и присутствует также у образцов *T. timopheevii* (Gulyaeva et al., 2014). Среди генов *Lr* от *T. timopheevii* ген *Lr18* относится к группе неэффективных в условиях Поволжья и имеет отличный тип реакции на патоген (IT = 3) от IT = 0 у Л624.

Тип реакции линии с *Lr50* (второй ген *Lr* от *T. timopheevii*) при инокуляции саратовской популяцией возбу-

теля листовой ржавчины варьировал от 0–1 до 2+ баллов и отличался от такового у линии Л624. Маркер *Xgwm382* гена *Lr50* указывал на отсутствие *Lr50* у этой линии (Гульгяева и др., 2020). Таким образом, есть основания предполагать, что у Л624 в транслокации T2AS.2AL-2A<sup>1</sup>L присутствует ген устойчивости к возбудителю листовой ржавчины, отличный от *Lr18*, *Lr50* и, возможно, не аллельный гену *LrTt1*.

При анализе влияния интрогрессивного материала с генами устойчивости к патогенам от *T. timopheevii* на агрономически важные показатели необходимо отметить его разнонаправленное действие (Леонова, 2018). Однако данных о конкретном влиянии интрогрессий с участием 2A<sup>1</sup> хромосомы на показатели продуктивности крайне мало.

Известно об изучении *T. aestivum*/T. *timopheevii* линий 5352-104 и 5360-191/5, полученных путем трех возвратных скрещиваний гибридных родительских линий 744 и 832 (*T. aestivum*–*T. timopheevii*, 2n = 42) с сортом Саратовская 29 и последующего самоопыления (Тимонова и др., 2012). Линия 5352-104 содержит интрогрессивные фрагменты хромосом 1A<sup>1</sup> и 2A<sup>1</sup>, а линия 5360-191/5 – 2A<sup>1</sup> и 5GL. По высоте растений эти линии не отличались от сорта Саратовская 29 (С29), а по длине колоса линия 5352-104 превосходила сорт С29. По числу колосков в колосе не обнаружено отличий от С29, но по числу и массе зерен с колоса показатели у линии были выше, чем у сорта-реципиента. По массе зерна с растения и массе 1000 зерен линия 5352-104 не отличалась от С29.

Линия Л 5360-191/5 как возможный носитель генов *LrTt1*(2A<sup>1</sup>) и *LrTt2* (5GL) не отличалась от сорта-реципиента С29 по всем параметрам продуктивности колоса, а также массе зерна с растения и массе 1000 зерен и высоте растений (Тимонова и др., 2012).

В наших исследованиях интрогрессии в Л624 затронули хромосомы 2A и 2D, что привело к высокоэффективной устойчивости к листовой ржавчине. Из пяти лет изучения Л624 два года (2018 и 2020) урожайность зерна была значимо ниже, чем у сорта-реципиента Саратовская 68, и три года (2019, 2021 и 2022) – на одном уровне. По сравнению с сортом Добрыня продуктивность зерна у Л624 четыре года (2019–2022) была на одном уровне и превосходила сорт-реципиент Добрыня в 2018 г. По сравнению с сортом-стандартом Фаворит урожайность зерна *T. aestivum*/T. *timopheevii* линии Л624 превосходила Фаворит – четыре года (2018, 2020–2022) и только в 2019 г. была одного уровня. В целом можно предполагать, что Л624 не понижает продуктивность зерна. Однако по массе 1000 зерен Л624 уступила обоим реципиентам и была одного уровня с сортом-стандартом Фаворит. По влиянию на этот признак Л624 отличается от линий Л5352-104 и 5360-191/5.

К сожалению, работы других исследователей по изучению влияния интрогрессий с участием хромосомы 2A<sup>1</sup> от *T. timopheevii* на показатели качества муки и хлеба нам не известны. Можно констатировать, что интрогрессии на хромосомах 2A и 2D у Л624 повысили содержание белка в зерне по сравнению с сортом-реципиентом С68 и стандартом Фаворит, но эти показатели остались на одном уровне с сортом Добрыня. По показателям муки и хлеба Л624 не уступила сортам-реципиентам, более того,

по объему и пористости хлеба превосходила сорт С68. В то же время она превосходила сорт-стандарт Фаворит по всем параметрам альвеографа: упругости теста, отношению упругости теста к растяжимости и силе муки. Таким образом, интрогрессии в хромосомах 2A и 2D у Л624 не ухудшают хлебопекарные свойства. Однако следует отметить уменьшение количества клейковины по сравнению с сортами-реципиентами. Например, интрогрессии от *T. timopheevii* в сорте Памяти Майстренко – 2В(2G), 6В(6G) и 1D(1D<sup>1</sup>) – повышали содержание белка и клейковины, а также показатели силы муки и объема хлеба (Laikova et al., 2013).

У Л624 = Саратовская 68/T. *timopheevii* \*4//Добрыня, несмотря на четыре беккросса на сорт Добрыня, содержащего транслокацию 7DS-7DL-7Ae#1L от *Ag. elongatum* с генами *Lr19*/*Sr25*, сцепленными с желтым цветом муки, эта транслокация была потеряна. Как следствие, у Л624 – белый цвет муки и хлеба. Отсутствие транслокации 7DS-7DL-7Ae#1L у Л624 было подтверждено с помощью ДНК-маркера на *Lr19*/*Sr25*-SCS265 (Гульгяева и др., 2020). Возможная причина этого факта – то, что при создании Л624 проводили постоянный отбор устойчивых растений на фоне инфицирования популяцией *P. triticina* с высоким присутствием патотипа *pp19*, вирулентного к *Lr19*.

## Заключение

По всему изучаемому комплексу хозяйственно ценных признаков *T. aestivum*/T. *timopheevii* линия Л624 является перспективной по сравнению как с сортами-реципиентами, так и с сортом-стандартом Фаворит. Линия Л624 не снижала урожайность зерна в течение пяти лет изучения, что, по всей видимости, связано с достаточно высоким уровнем засухоустойчивости. Ген устойчивости к возбудителю листовой ржавчины у Л624 высокоэффективен как в проростковой фазе, так и у взрослых растений. Для дальнейшего использования линии Л624 в селекционных программах требуется проведение дополнительных исследований по комбинированию устойчивости к *P. triticina* с генами устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины, что стало необходимым для зоны Нижнего Поволжья.

## Список литературы / References

- Баранова О.А., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Созина И.Д. Потеря эффективности генов устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr25* и *Sr6Ag1* на территории Нижнего Поволжья. *Вестн. защиты растений*. 2021;104(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994.
- [Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Sozina I.D. Loss of effectiveness of stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr6Ag1* in the Lower Volga region. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2021;104(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994. (in Russian)]
- Гульгяева Е.И., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Шайдаюк Е.Л. Расширение генетического разнообразия сортов яровой мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине (*P. triticina* Eriks.) в Нижнем Поволжье. *С.-х. биология*. 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus.
- [Gulyaeva E.I., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Shaydayuk E.L. Enlargement of genetic diversity of spring bread wheat resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Erics.) in Lower Volga region. *Selskokozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus. (in Russian)]

- Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Е.Ф., Удачин Р.А., Якубцинер М.М. Культурная флора СССР. Т. 1. Пшеница. Л., 1979.  
[Dorofeev V.F., Filatenko A.A., Migushova E.F., Udachin R.A., Yakubtsiner M.M. Cultural Flora of the USSR. Vol. 1. Wheat. Leningrad, 1979. (in Russian)]
- Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. *Вестн. с.-х. науки*. 1984;10:58-66.  
[Zhirov E.G., Ternovskaya T.K. Genome engineering in wheat. *Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Sciences*. 1984;10:58-66. (in Russian)]
- Козловская В.Ф., Григорьева Л.П., Шатилова Н.В. Использование межвидовой гибридизации для создания новых источников устойчивости пшеницы к стеблевой ржавчине. *С.-х. биология*. 1990;1:65-71.  
[Kozlovskaya V.F., Grigoryeva L.P., Shatilova N.V. Using interspecific hybridization for the development of new sources for stem rust resistance of wheat. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1990;1:65-71. (in Russian)]
- Лайкова Л.И., Арбузова В.С., Ефремова Т.Т., Попова О.М., Ермакова М.Ф. Оценка продуктивности и качества зерна у иммунных линий мягкой пшеницы Саратовская 29. *С.-х. биология*. 2007;42(5):75-85.  
[Laikova L.I., Arbuzova V.S., Efremova T.T., Popova O.M., Ermakova M.F. Estimation productivity and quality of the grain in immune introgressive lines of soft wheat of Saratovskaya 29 variety. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2007;42(5):75-85. (in Russian)]
- Леонова И.Н. Влияние чужеродного генетического материала на проявление хозяйственно важных признаков мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367.  
[Leonova I.N. Influence of alien genetic material on the manifestation of agronomically important traits of common wheat (*T. aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367. (in Russian)]
- Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н.П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующих устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине. *Генетика*. 2008;44:1652-1659.  
[Leonova I.N., Kalinina N.P., Budashkina E.B., Röder M.S. Genetic analysis and localization of loci controlling leaf rust resistance of *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* introgression lines. *Russ. J. Genet.* 2008;44(12):1431-1437. DOI 10.1134/S1022795408120077.]
- Мартынов С.П., Мусин Н.Н., Кулагина Т.В. Пакет программ статистического биометрико-генетического анализа "Agros" версия 2.10. Российская академия сельскохозяйственных наук. Отдел статистического анализа, 2000.  
[Martynov S.P., Musin N.N., Kulagina T.V. The Agros software package for statistical biometric and genetic analysis, version 2.10. Russian Academy of Agricultural Sciences. Department of Statistical Analysis, 2000. (in Russian)]
- Салина Е.А., Песцова Е.Г., Вершинин А.В. «Spelt1» – новое семейство тандемных повторов злаков. *Генетика*. 1997;33(4):437-442.  
[Salina E.A., Pestsova E.G., Vershinin A.V. "Spelt1" a novel family of tandemly repeated DNA in cereals. *Russ. J. Genet.* 1997;33(4):352-357.]
- Сибикеев С.Н., Конькова Э.А., Салмова М.Ф. Характеристика вирулентности бурой ржавчины мягкой пшеницы в условиях Саратовской области. *Аграр. науч. журнал*. 2020;9:40-44. DOI 10.28983/asj.y2020i9pp40-44.  
[Sibikeev S.N., Konkova E.A., Salmova M.F. Characteristic of the bread wheat leaf rust pathogen virulence in the Saratov region conditions. *Agrarnyy Nautchnyy Zhurnal = Agrarian Scientific Journal*. 2020;9:40-44. DOI 10.28983/asj.y2020i9pp40-44. (in Russian)]
- Скурыгина Н.А. Высокоэффективные гены устойчивости к популяции бурой ржавчины и мучнистой росы у линий мягкой пшеницы, производных *T. timopheevii* Zhuk., и их идентификация. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1984;85:5-13.  
[Skurygina N.A. Highly effective genes for resistance to the population of leaf rust and powdery mildew in bread wheat lines derived from *T. timopheevii* Zhuk., and their identification. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1984;85:5-13. (in Russian)]
- Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):142-159.  
[Timonova E.M., Leonova I.N., Belan I.A., Rosseeva L.P., Salina E.A. Effect of certain chromosome regions of *Triticum timopheevii* on the formation on pest resistance and quantitative traits in common wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):142-159. (in Russian)]
- Adonina I.G., Timonova E.M., Salina E.A. Introgressive hybridization of common wheat: results and prospects. *Russ. J. Genet.* 2021;57(4):390-407. DOI 10.1134/S1022795421030029.
- Allard R.W., Shands R.G. Inheritance of resistance to stem rust and powdery mildew in cytologically stable spring wheats derived from *Triticum timopheevii*. *Phytopathology*. 1954;44:266-274.
- Badaeva E.D., Budashkina E.B., Bilinskaya E.N., Pukhalskiy V.A. Intergenic chromosome substitutions in wheat interspecific hybrids and their use in the development of a genetic nomenclature of *Triticum timopheevii* chromosomes. *Russ. J. Genet.* 2010;46(7):769-785. DOI 10.1134/S102279541007001X.
- Badaeva E.D., Ruban A.S., Aliyeva-Schnorr L., Muncio C., Hesse S., Houben A. *In situ* hybridization to plant chromosomes. In: Liehr T. (Ed.). Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). Berlin; Heidelberg, Germany: Springer, 2017;477-494. DOI 10.1007/978-3-662-52959-1\_49.
- Bedbrook R.J., Jones J., O'Dell M., Thompson R.J., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*. 1980;19(2):545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2.
- Brown-Guedira G.L., Singh S., Fritz A.K. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum*. *Phytopathology*. 2003;93(7):784-789. DOI 10.1094/PHYTO.2003.93.7.784.
- Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 2001;36(1-2):61-65. DOI 10.1556/aphyt.36.2001.1-2.8.
- Gulyaeva E.I., Orina A.S., Gannibal P.B., Mitrofanova O.P., Odintsova I.G., Laikova L.I. The effectiveness of molecular markers for the identification of *Lr28*, *Lr35* and *Lr47* genes in common wheat. *Russ. J. Genet.* 2014;50(2):131-139. DOI 10.7868/S0016675814020064.
- Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Gannibal P.B. Leaf rust resistance genes in wheat cultivars registered in Russia and their influence on adaptation processes in pathogen populations. *Agriculture*. 2021;11(4):319. DOI 10.3390/agriculture11040319.
- Jiang J., Gill B.S. Different species-specific chromosome translocation in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support dipyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Res.* 1994;2(1):59-64. DOI 10.1007/BF01539455.
- Jørgensen J.H., Jensen C.J. Genes for resistance to wheat powdery mildew in derivatives of *Triticum timopheevii* and *T. carthlicum*. *Euphytica*. 1972;21:121-128. DOI 10.1007/BF00040557.
- Laikova L.I., Belan I.A., Badaeva E.D., Rosseeva L.P., Shepelev S.S., Shumny V.K., Pershina L.A. Development and study of spring bread wheat variety Pamyati Maystrenko with introgression of genetic material from syntetic hexaploid *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegi-*

- lops tauschii* Coss. *Russ. J. Genet.* 2013;49(1):89-97. DOI 10.1134/S1022795413010067.
- Leonova I.N., Borner A., Budashkina E.B., Kalinina N.P., Unger O., Roder M.S., Salina E.A. Identification of microsatellite markers for a leaf rust resistance gene introgressed into common wheat from *Triticum timopheevii*. *Plant Breed.* 2004;123(1):93-95. DOI 10.1046/j.0179-9541.2003.00906.x.
- Leonova I.N., Laikova L.I., Popova O.M., Unger O., Borner A., Roder M.S. Detection of quantitative trait loci for leaf rust resistance in wheat – *T. timopheevii*/T. *tauschii* introgression lines. *Euphytica.* 2007;155:79-87. DOI 10.1007/s10681-006-9303-4.
- Leonova I.N., Budashkina E.B., Flath K., Weidner A., Börner A., Röder M.S. Microsatellite mapping of a leaf rust resistance gene transferred to common wheat from *Triticum timopheevii*. *Cereal Res. Commun.* 2010;38(2):212-220. DOI 10.1556/CRC.38.2010.2.7.
- Leonova I.N., Budashkina E.B., Kalinina N.P., Röder M.S., Börner A., Salina E.A. *Triticum aestivum*–*Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2011;47:S49-S55.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology.* 1926;16: 89-120.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts. An Atlas of Resistance Genes. Springer Dordrecht, 1995.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium; 8-13 September 2013; Yokohama, Japan. Springer Open, 2013. <https://host170.sedici.unlp.edu.ar/server/api/core/bitstreams/bc9e00ea-92ac-4d4a-8df7-a9f51111a8e0/content>.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2018 Supplement. *Annu. Wheat Newsl.* 2018;64:73-93.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2022 Supplement. *Annu. Wheat Newsl.* 2022;68:68-82.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 1948;26(5):496-500. DOI 10.1139/cjr48c-033.
- 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.
- Prins R., Marais G.F., Janse B.J.H., Pretorius Z.A., Marais A.S. A physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation. *Genome.* 1996;39(5):1013-1019. DOI 10.1139/g96-126.
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a *D*-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Report.* 1986;4: 104-109. DOI 10.1007/BF02732107.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saaru E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1992.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998; 149(4):2007-2023. DOI 10.1093/genetics/149.4.2007.
- Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Scherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Y., Zoshchuk S.A., Leitch A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome.* 2006;49(8):1023-1035. DOI 10.1139/g06-050.
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed.* 2003;122(5):396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x.
- Sibikeev S.N., Krupnov V.A., Voronina S.A., Elesin V.A. First report of leaf rust pathotypes virulent to highly effective *Lr*-genes transferred from *Agropyron* species to bread wheat. *Plant Breed.* 1996;115(4): 276-278. DOI 10.1111/j.1439-0523.1996.tb00917.x.
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Gulyaeva E.I., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Ag<sup>1</sup> and 6Ag<sup>2</sup> chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat–wheatgrass substitutions. *Russ. J. Genet.* 2017;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115.
- Singh A.K., Sharma J.B., Vinod, Singh P.K., Singh A., Mallick N. Genetics and mapping of a new leaf rust resistance gene in *Triticum aestivum* L. × *Triticum timopheevii* Zhuk. derivative ‘Selection G12’. *J. Genet.* 2017;96:291-297. DOI 10.1007/s12041-017-0760-4.
- Tomar S.M.S., Joshi B.C., Kochumadhavan M., Shrivastava K.D. Transfer of leaf rust resistance into bred wheat from *Triticum timopheevii* Zhuk. *Current Sci.* 1988;57(1):17-19.
- Yu J.-K., Dake T.M., Singh S., Benschel D., Li W., Gill B., Sorrells M.E. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome.* 2004;47(5):805-818. DOI 10.1139/G04-057.

#### ORCID ID

S.N. Sibikeev [orcid.org/0000-0001-8324-9765](https://orcid.org/0000-0001-8324-9765)  
I.G. Adonina [orcid.org/0000-0002-8460-6119](https://orcid.org/0000-0002-8460-6119)  
A.E. Druzhin [orcid.org/0000-0002-3968-2470](https://orcid.org/0000-0002-3968-2470)  
O.A. Baranova [orcid.org/0000-0001-9439-2102](https://orcid.org/0000-0001-9439-2102)

**Благодарности.** Цитогенетический анализ выполнен при поддержке проекта Министерства науки и высшего образования FWNR-2022-0017.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.03.2023. После доработки 02.05.2023. Принята к публикации 12.05.2023.



## *In vivo* MRS study of long-term effects of traumatic intracranial injection of a culture medium in mice

O.B. Shevelev<sup>1, 2</sup>✉, O.P. Cherkasova<sup>3, 4</sup>, I.A. Razumov<sup>1, 5</sup>, E.L. Zavjalov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
<sup>2</sup> Institute "International Tomographic Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
<sup>3</sup> Institute of Laser Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
<sup>4</sup> Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia  
<sup>5</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia  
✉ shevelev.oleg.nsk@gmail.com

**Abstract.** Orthotopic transplantation of glioblastoma cells in the brain of laboratory mice is a common animal model for studying brain tumors. It was shown that <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy (MRS) enables monitoring of the tumor's occurrence and its development during therapy based on the ratio of several metabolites. However, in studying new approaches to the therapy of glioblastoma in the model of orthotopic xenotransplantation of glioma cells into the brain of mice, it is necessary to understand which metabolites are produced by a growing tumor and which are the result of tumor cells injection along the modeling of the pathology. Currently, there are no data on the dynamic metabolic processes in the brain that occur after the introduction of glioblastoma cells into the brain of mice. In addition, there is a lack of data on the delayed effects of invasive brain damage. Therefore, this study investigates the long-term dynamics of the neurometabolic profile, assessed using <sup>1</sup>H MRS, after intracranial injection of a culture medium used in orthotopic modeling of glioma in mice. Levels of N-acetylaspartate, N-acetylaspartylglutamic acid, myoinositol, taurine, glutathione, the sum of glycerophosphocholine and phosphocholine, glutamic acid (Glu), glutamine (Gln), and gamma aminobutyric acid (GABA) indicate patterns of neurometabolites in the early stage after intracranial injection similar to brain trauma ones. Most of the metabolites, with the exception of Gln, Glu and GABA, returned to their original values on day 28 after injection. A progressive increase in the Glu/Gln and Glu/GABA ratio up to 28 days after surgery potentially indicates an impaired turnover of these metabolites or increased neurotransmission. Thus, the data indicate that the recovery processes are largely completed on day 28 after the traumatic event in the brain tissue, leaving open the question of the neurotransmitter system impairment. Consequently, when using animal models of human glioma, researchers should clearly distinguish between which changes in neurometabolites are a response to the injection of cancer cells into the brain, and which processes may indicate the early development of a brain tumor. It is important to keep this in mind when modeling human glioblastoma in mice and monitoring new treatments. In addition, these results may be important in the development of approaches for non-invasive diagnostics of traumatic brain injury as well as recovery and rehabilitation processes of patients after certain brain surgeries.

**Key words:** magnetic resonance spectroscopy; animal model of human glioma; neurometabolites; traumatic brain injury.

**For citation:** Shevelev O.B., Cherkasova O.P., Razumov I.A., Zavjalov E.L. *In vivo* MRS study of long-term effects of traumatic intracranial injection of a culture medium in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):633-640. DOI 10.18699/VJGB-23-74

## Прижизненное МРС исследование долгосрочных последствий травматической внутричерепной инъекции культуральной среды у мышей

О.Б. Шевелев<sup>1, 2</sup>✉, О.П. Черкасова<sup>3, 4</sup>, И.А. Разумов<sup>1, 5</sup>, Е.Л. Завьялов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
<sup>2</sup> Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
<sup>3</sup> Институт лазерной физики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
<sup>4</sup> Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия  
<sup>5</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия  
✉ shevelev.oleg.nsk@gmail.com

**Аннотация.** Ортопическая ксенотрансплантация клеток глиобластомы в головной мозг лабораторных мышей – распространенная животная модель для изучения опухолей головного мозга. Показано, что <sup>1</sup>H магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) позволяет отслеживать возникновение опухоли и ее развитие в процессе терапии по соотношению нескольких метаболитов. Однако при изучении новых подходов в терапии глиобластомы на модели ортопической ксенотрансплантации клеток глиомы в головной мозг мышей необходимо понимать, какие изменения уровней метаболитов являются следствием роста опухоли, а какие – результатом инъекции опухоли-

вых клеток в головной мозг в процессе моделирования патологии. В настоящее время отсутствуют данные о динамике метаболических процессов в головном мозге, возникающих после введения клеток глиобластомы в мозг мышей. Мало также данных об отсроченных последствиях инвазивного повреждения головного мозга. Поэтому в нашей работе исследуется долговременная динамика нейрометаболического профиля, оцененного с применением  $^1\text{H}$  МРС, после внутрочерепной инъекции культуральной среды, используемой при ортотопическом моделировании глиомы у мышей. Уровни N-ацетиласпартата, N-ацетиласпартилглутаминовой кислоты, мио-инозитола, таурина, глутатиона, суммы глицерофосфохолина и фосфохолина, глутаминовой кислоты (Glu), глутамин (Gln) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) указывают на паттерны нейрометаболитов на ранней стадии после внутрочерепной инъекции, схожие с таковыми при травме головного мозга. Большинство метаболитов, за исключением Glu, Glu и ГАМК, возвращались к исходным значениям на 28-й день после инъекции. Прогрессирующее увеличение соотношения Glu/Gln и Glu/GABA до 28 дней после операции потенциально указывает на нарушение обмена этих метаболитов или усиление нейротрансмиссии. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что восстановительные процессы в основном завершаются на 28-й день после травматического события в ткани головного мозга, оставляя открытым вопрос о нарушении нейромедиаторной системы. Соответственно, при использовании животных моделей глиомы человека исследователи должны четко различать, какие изменения нейрометаболитов являются реакцией на саму инъекцию раковых клеток в головной мозг, а какие процессы могут свидетельствовать о раннем развитии опухоли головного мозга. Это важно иметь в виду при моделировании глиобластомы человека у мышей и мониторинге новых методов лечения. Кроме того, полученные данные могут быть важны при разработке подходов к неинвазивной диагностике черепно-мозговой травмы, а также при мониторинге процессов восстановления и реабилитации пациентов после некоторых операций на головном мозге.

Ключевые слова: магнитно-резонансная спектроскопия; животная модель глиобластомы человека; нейрометаболиты; черепно-мозговая травма.

## Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive tumor of the central nervous system (Goodenberger, Jenkins, 2012). Even in the case of aggressive therapy of the brain glioma, such as surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy, many types of gliomas almost always have a pessimistic prognosis for the patients' survival (Tykocki et al., 2018; Ostrom et al., 2019). Despite the efforts of scientists and clinicians to increase the life expectancy of GBM patients, survivors do not easily exceed the 15th month (3–5) and the 5-year survival rate is as low as 5.8 % (Ostrom et al., 2018, 2019; Tan et al., 2020).

Xenograft mice models are widely used for modeling GBM and testing developmental therapeutics (Haddad et al., 2021). Orthotopic transplantation of glioblastoma cells in the brain of laboratory mice is a common animal model for studying brain tumors (Zavjalov et al., 2016; Miyai et al., 2017; Haddad et al., 2021). This model is characterized by rapid glioma growth following injection of tumor cells into the subcortical structures of the brain, resulting in destruction of blood vessels and neurons, compression of individual brain structures, impairment of cognitive function and deep irreversible lesions (Hall et al., 2005; Maas et al., 2008). Currently, the most accessible way to detect and visualize glioma is magnetic resonance imaging (MRI), which is widely used in the clinic. The main advantage of MRI is its non-invasiveness with the ability to image unlabeled cells, while optical methods require stable expression of fluorophore-labeled protein in tumor cells, which can lead to a change in the behavior of tumor cells (Dass, Choong, 2007). Finally, MRI is a reliable and sufficiently accurate method that can be used to repeatedly study the dynamic processes for the same organism.

To visualize tumors, reliable MRI contrast agents are used, which, however, do not always allow a correct diagnosis. Up to 45 % of abnormalities in a patient's brain detectable with MRI require biopsy and subsequent histological studies. There is another significant drawback of this approach for intracerebral tumors. Contrast does not always lead to an increase in the

MRI signal, and although this happens quite rarely – about 4 % of gliomas, the life of the patient is on the line in every such case (Barker et al., 1997; Ginsberg et al., 1998; Sugahara et al., 1998; Castillo et al., 2001; Nelson, Cha, 2003; Atkinson et al., 2008; Stockhammer et al., 2008).

Recently, *in vivo* studies of the functional state of the brain are increasing due to attempts to assess the metabolic profile using  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy – MRS (Ratai, Gilberto González, 2016). It was shown that MRS enables monitoring of the tumor's occurrence and its development during therapy based on the ratio of several metabolites (Hishii et al., 2019; Tiwari et al., 2020). However, at study of new approaches in the therapy of glioblastoma in the model of orthotopic xenotransplantation of glioma cells into the brain of mice, it is necessary to understand which metabolites are produced by a growing tumor and which are the result of tumor cells injection along the modeling of the pathology. Currently, there are no data on the dynamic metabolic processes in the brain that occur after the introduction of glioblastoma cells into the brain of mice. Furthermore, there is a lack of data on the delayed effects of invasive brain damage (Singh et al., 2016; Li Y. et al., 2021). These studies require multiple animal MRI sessions under anesthesia, and so this study investigates the long-term dynamics of the neurometabolic profile by  $^1\text{H}$  MRS repeated sessions after intracranial injection of a culture medium used at orthotopic modeling of glioma in mice.

## Materials and methods

The study was carried out in the Center for Collective Use “SPF-vivarium” of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (RFMEFI62119X0023). This study was approved by the Inter-Institutional Commission on Biological Ethics at the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Permission #78, April 16, 2021). Ten SPF male SCID mice aged 6–7 weeks were used. Their health status was investigated in accordance with the recommendations of the Federation of European Laboratory

Animal Science Associations (FELASA working group..., 2014). The animals were kept in single-sex family groups of 2–5 mice in individually ventilated cages using the Optimice system (Animal Care Systems, Centennial, CO, USA). The mice were maintained under controlled conditions: temperature, 22–26 °C; relative humidity, 30–50 %; and 12/12 light/dark periods with dawn at 02:00. Standart V1534-300 ssniff® diet (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and reverse osmosis water enriched with minerals were provided to the animals *ad libitum*.

Before the operation, the animal was placed in a chamber with an air flow of 300–350 ml/min and an isoflurane concentration of 1.5 % (Baxter International Inc., Deerfield, IL, USA). After 3–5 min, the animal was transferred to a heated operating table with a surface temperature of 37 °C and placed under an anesthetic mask with 1.5 % isoflurane. The culture medium (DMEM/F-12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) used for orthotopic glioma modeling was introduced into the subcortical structures of the brain through a hole in the cranium (Zavjalov et al., 2016). A 3–4 mm skin incision was made on the animal's head in the caudal-cranial direction in the region of the bregma, and 5 µl of medium was injected through the hole in the skull. Intravital MRS was performed on the anesthetized animals before surgery and on days 7, 14, 21 and 28 after the injection.

**Magnetic resonance imaging and MRS protocols.** Neurometabolite analyses were performed on a horizontal tomograph with a magnetic field strength of 11.7 Tesla (Biospec 117/16; Bruker, Billerica, MA, USA). Five minutes prior to the analysis, animals were immobilized with gas anesthesia (Isofluran, Baxter International Inc.) using an anesthesia machine (The Univenter 400 Anaesthesia Unit; Univenter Ltd., Zejtun, Malta). The body temperature of the animals was maintained using a water circuit in a tomographic bed-table with a surface temperature of 30 °C. A pneumatic breathing sensor (SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA) was placed under the lower torso, which made it possible to control the depth of anesthesia.

All proton spectra of the mouse brain were obtained using a <sup>1</sup>H volumetric radiofrequency coil (T11440V3). Correct positioning of spectroscopic voxels (2.5 × 2.5 × 2.5 mm<sup>3</sup>) was performed using the RARE method (rapid acquisition with relaxation enhancement), with the parameters of the pulse sequence set at TE = 11 ms and TR = 2.5 s. T2-weighted high-resolution mouse brain images (slice thickness, 0.5 mm; field of view, 2.0 × 2.0 cm; and matrix size, 256 × 256 points) were obtained. The voxel location is shown in Fig. 1, a. All proton spectra were obtained using spatially localized single-voxel spectroscopy using the STEAM method (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) with pulse sequence parameters of TE = 3 ms, TR = 5 s, and the number of accumulations = 180. Before each spectroscopic measurement, the uniformity of the magnetic field was adjusted within the selected voxel using the FastMap technique (Gruetter, 1993). The water signal in the spectra was suppressed using a variable power pulse and an optimized relaxation sequence delay (VAPOR) (Tkac et al., 1999).

**MRS processing.** The LCModel software package was used to process the experimental <sup>1</sup>H MRS spectra and determine the number of individual metabolites (Provencher, 2001).

This software package has a high degree of automation with minimal user intervention, which minimizes biased input data, thus allowing data exchange, acceptance, and reliable comparison with values obtained using different equipment or under different conditions. Metabolites with Cramer-Rao lower bounds, which represent the estimates of the percentage standard deviation of the fit for each metabolite, < 20 % were considered reliable and are presented in this study. MRS processing is described in more detail in (Singh et al., 2016). According to the manual for the LCModel, the following levels were estimated: the sum of N-acetylaspartate and N-acetyl-aspartylglutamic acid (tNAA), myoinositol (mIno), taurine (Tau), glutathione (GSH), the sum of glycerophosphocholine and phosphocholine (tCho), glutamic acid (Glu), glutamine (Gln), gamma aminobutyric acid (GABA) as a relation to the sum of creatine and creatine phosphate (tCr). Moreover, the ratios of neurotransmitters and their precursors Glu/GABA and Glu/Gln were estimated (see Fig. 1).

**Statistical analysis.** We used Student's *t*-test for dependent samples to process the results. The values of the studied parameters are presented as means ± standard error of the mean.

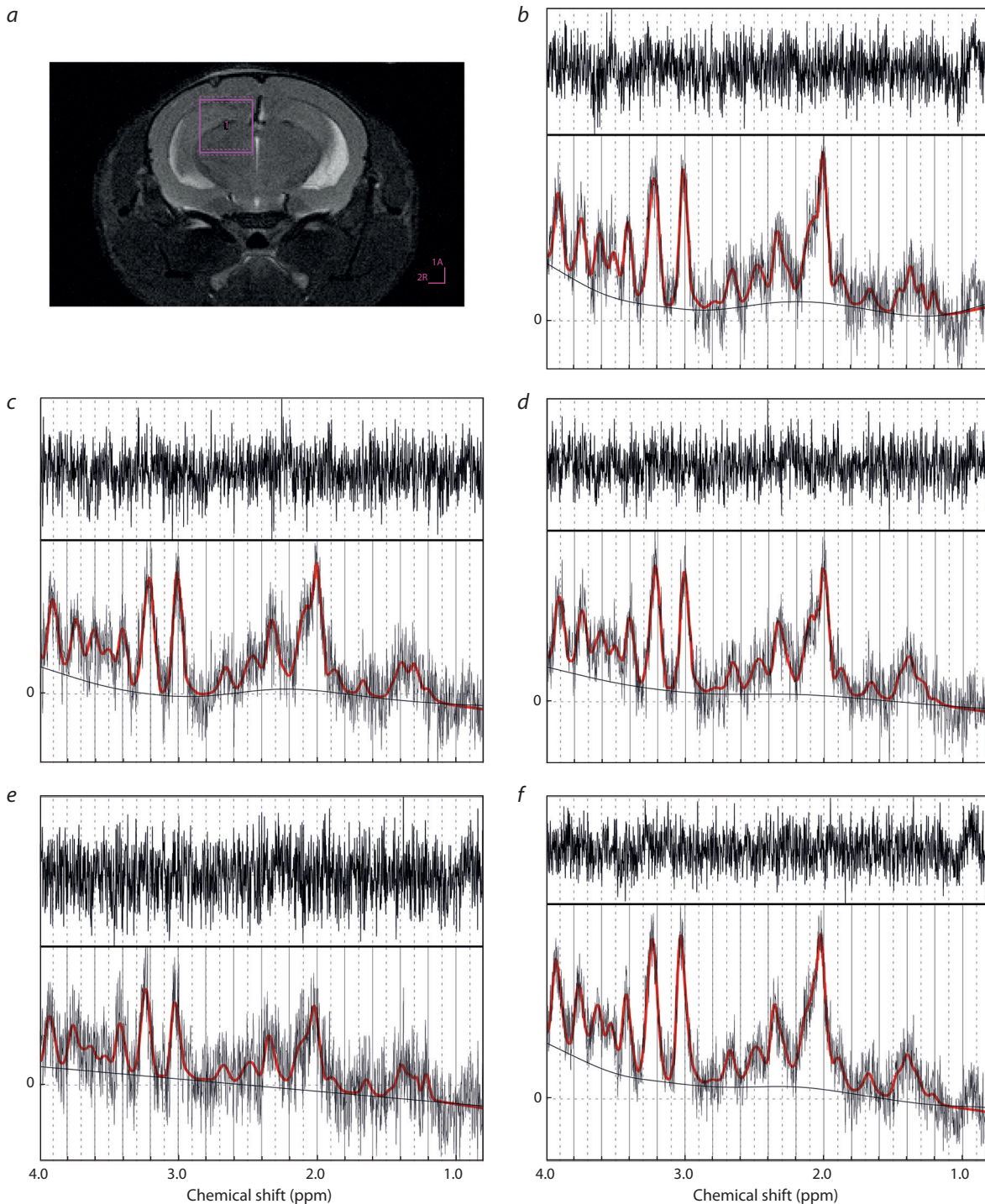
## Results

In studies using *in vivo* MRS, data are presented both as concentrations or relative units of individual metabolites, and as the ratio of individual metabolites to tCr, using it as an internal control. Since in our work the level of tCr in animals did not differ from the base level at all the studied time points ( $p > 0.19$ ), it would be appropriate in the future to present the data as the ratio of individual metabolites to tCr.

Evaluation of indicators of brain cell viability, including tNAA/tCr (indicator of neuronal viability), mIno/tCr (indicator of glial cell viability), tCho/tCr (integrity of cell membranes), Tau/tCr (osmolyte, neuromodulator, and trophic factor) and GSH/tCr (antioxidant) showed that all of the metabolites returned to their initial levels on day 28 after injection ( $p > 0.12$ ), except mIno (Fig. 2).

The levels of metabolites reflected the viability and integrity of cells decreased in the first week of the study and then recovered two weeks after the injection significantly for tNAA/tCr ( $p = 0.0152$ ) and slightly for tCho/tCr ( $p = 0.062$ ) whereas the mIno/tCr level was significantly lower than the original on the 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day after injection ( $p = 0.0059$  and  $p = 0.0484$ , respectively). A different picture was observed for Tau/tCr and GSH/tCr, which reflect the energy processes that take place in cells (see Fig. 2). It was found that the relative values of these metabolites increased significantly for Tau/tCr and slightly for GSH/tCr with maximum at 14 days after administration:  $p = 0.001$  and  $p = 0.054$ , respectively. The levels of Tau/tCr and GSH/tCr returned to the original values 28 days after the injection (see Fig. 2).

The analysis of the relative level of metabolites performing the functions of neurotransmitters (Glu/tCr, Gln/tCr and GABA/tCr) also showed the dynamic processes in brain tissue after injection (Fig. 3). The Gln/tCr level progressively decreased from 7 to 28 days after the injection and was significantly lower than the original level on the 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day after the surgery ( $p = 0.028$  and  $p = 0.026$ , respectively). The GABA/tCr level had the same dynamic profile, but on the 7<sup>th</sup> day, there was a dip before minimal values ( $p = 0.015$ ) with

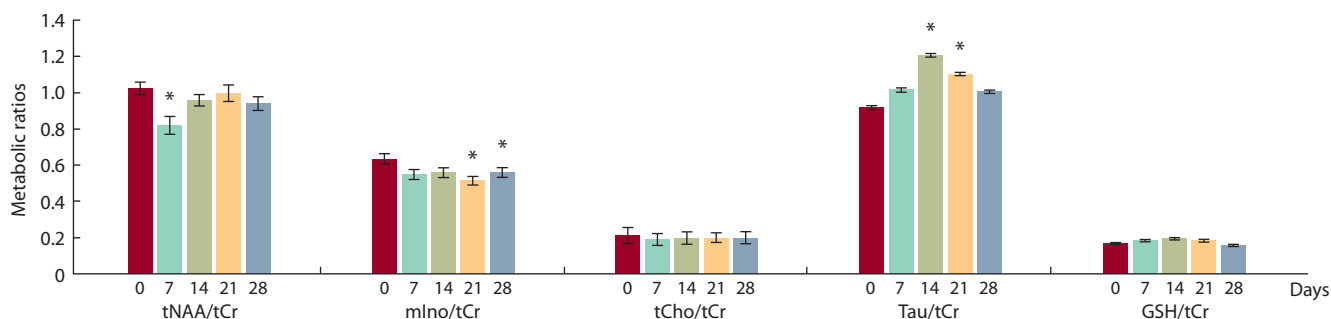


**Fig. 1.** Voxel location (a), characteristic spectra and FIDs (LCModel) before (b) and 7 (c), 14 (d), 21 (e) or 28 (f) days after injection.

a following recovery and the next extinction on the 28<sup>th</sup> day ( $p = 0.034$ ). On the contrary, Glu/tCr increased, but only on 14 days after injection, maintaining high values up to 28 days ( $p = 0.017$ ,  $p = 0.019$  and  $p = 0.045$ , respectively).

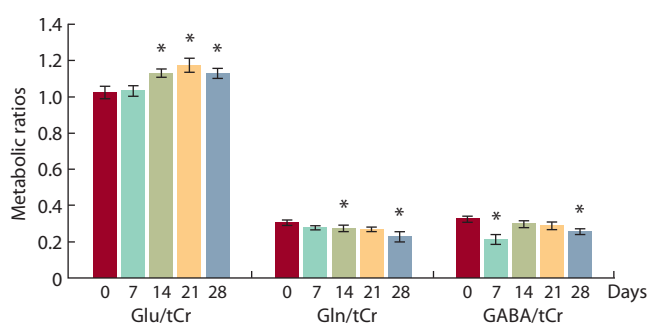
A particularly interesting results were found at analyzing the Glu/GABA and Glu/Gln ratios that reflect the effectiveness of neurotransmitters metabolism, because both the GABA and Gln have converted from Glu (Fig. 4). It was found that on the 7<sup>th</sup> day after the injection of the culture medium, the

Glu/GABA ratio significantly increased indicating a shift in the balance of neurotransmitters towards excitatory. These differences had disappeared by the 14<sup>th</sup> day post-injection, but with some progressive growth to 28<sup>th</sup> day. These differences were significant only for 21 and 28 days ( $p = 0.024$  and  $p = 0.002$ , respectively). Contrarily, the Glu/Gln ratio steadily increased during the experiment before a significant difference appeared on 14, 21 and 28 days after injection ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.027$  and  $p = 0.015$ , respectively).

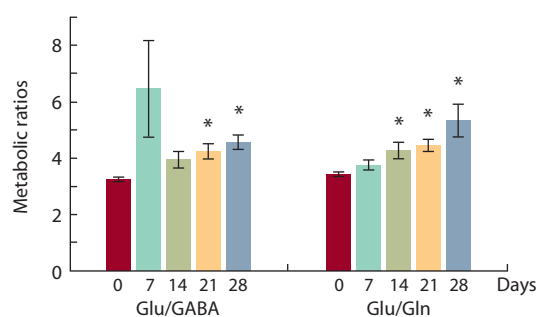


**Fig. 2.** Dynamics of the relative levels of 5 metabolites (tNAA/tCr, mIno/tCr, Tau/tCr, GSH/tCr, tCho/tCr) with levels before (0 days) and 7, 14, 21, and 28 days after the intracranial injection.

Here and in Fig. 3 and 4: \* Significant difference from 0 days ( $p < 0.05$ ; Student's  $t$ -test for dependent samples).



**Fig. 3.** Dynamics of the relative levels of neurotransmitters (Glu/tCr, Gln/tCr and GABA/tCr) before (0 days) and 7, 14, 21, 28 days after the intracranial injection.



**Fig. 4.** The Glu/GABA and Glu/Gln ratios before (0 days) and 7, 14, 21, 28 days after the intracranial injection.

## Discussion

The change in the tNAA/tCr ratio serves as an indicator of the dynamics of neuronal integrity and is an important biomarker of brain injury (Moffett et al., 2007). tNAA is involved in important processes such as lipid and myelin synthesis (Van Horn et al., 2017). In our study, the decrease in the tNAA level on day seven after surgery may indicate both potential neuronal loss and diffuse axonal injury characteristic of the early stages of brain trauma (Moffett et al., 2007), and its eventual recovery may indicate the stabilization process and the restoration of neurons and their viability.

Another metabolite, mIno, is an osmolyte found mainly in astrocytes and glial cells of the microglia. Increased mIno levels are observed during both the subacute and chronic stages after experimental brain trauma, as well as after moderate or severe head trauma in humans (Brooks et al., 2001; Ashwal et al., 2004; Kierans et al., 2014). These changes are associated with reactive astrogliosis and microgliosis, accompanied by increased glial content and proliferation in response to brain injury (Ashwal et al., 2004), accelerated myelin breakdown, or hypertensive stress (Fisher et al., 2002). However, we found that mIno did not increase but rather decreased during the 28 days of the experiment, reaching the minimum values on day 21. Based on the data obtained, it can be assumed that the destruction of the integrity of the brain tissue caused by the needle injection of the culture medium did not lead to the changes in glial cell function.

tCho, including choline compounds such as acetylcholine, phosphatidylcholine, and phosphocholine, is considered to

be a product of nerve myelin disintegration and measures the membrane turnover (Xu et al., 2011; Li J. et al., 2017). In a study on rats (Lescot et al., 2010), two days after brain damage, a slight increase in the tCho level was detected, followed by recovery to the control value by seven days. In our study, we found a slight decrease in the tCho level seven days after the surgery, followed by its recovery to the baseline level, which is consistent with the behavior of the NAA level and may reflect the violation of membrane integrity and myelin degradation processes in the first week after surgery.

Another important indicator of brain cell activity is the balance of Tau levels. Tau is an endogenous amino acid synthesized in large quantities by neurons and astrocytes in the central nervous system. Tau acts as an osmolyte, neuromodulator, trophic factor, stabilizer of membrane integrity, and regulator of intracellular calcium homeostasis (Niu et al., 2018; Gupte et al., 2019). The significant increase in Tau at the injection region at 14 and 21 days post-injection, with the subsequent decrease at 28 days, may act as an adaptive brain tissue response to reduce the negative effects of the brain damage.

In response to the brain injury, markers of oxidative stress are produced in the brain, while levels of antioxidant defense enzymes (including GSH) are reduced (Rodríguez-Rodríguez et al., 2014). The addition of Tau to the culture medium in a neuron model with trauma led to an increase in GSH levels and, accordingly, a decrease in the effect of oxidative stress and in the levels of pro-inflammatory cytokines (Niu et al., 2018). In our study, it is likely that the increased Tau levels

slowed the decline in GSH levels in the first three weeks after injection. The increase in the Tau level in the injection area led to a slight growth of the level of GSH in 14 days. Then there was a subsequent decrease in Tau levels by 21 and 28 days after the injection, ultimately accompanied by the reduction of GSH levels, which may indicate a completion of the traumatic process in 28 days after the traumatic event.

The Glu level in brain trauma models decreases starting from the first hours after trauma and remains at a low level up to two weeks post-exposure (Xu et al., 2011). This decrease may be due to an increased release of Glu into the synaptic cleft in response to brain injury, its capture by astrocytes, and its subsequent accelerated conversion to Gln, as evidenced by an increase in Gln (Guerriero et al., 2015; Van Horn et al., 2017). This is confirmed by the analysis of the Glu/Gln ratio. Changes in the Glu/Gln ratio may indicate neuronal death or glial cell abnormalities. In our study, the Glu/Gln ratio was the only indicator the change in which in the injected area intensified over time. There are two potential reasons for this. First, it may indicate a disturbance in the conversion of Glu to Gln in astrocytes, caused both by the transport of Glu into the astrocyte and its conversion to Gln under the action of glutamine synthetase. Second, the change in the Glu/Gln ratio may have been caused by hyperactivity of the reverse conversion of Gln to Glu in neurons, likely due to glutaminase hyperactivation (Guerriero et al., 2015; Van Horn et al., 2017). Regardless, both of these processes indicate a breakdown of the Gln to Glu conversion system specific to brain trauma processes.

Analysis of the GABA level showed a two-wave decline: on 7 and 28 days. These results generally agree with those in the literature, where it was shown that in the acute phase of brain trauma, the GABA level decreases from the first day after injury (Harris et al., 2012). We attribute this decrease to the reduced conversion of Glu to GABA. The same effect can be caused by the accelerated uptake and conversion of GABA to Gln by oligodendrocytes (Van Horn et al., 2017). Additionally, the Glu/GABA ratio reflects the balance of excitatory and inhibitory neurotransmitters and its displacement may indicate the development of post-traumatic pathology, for example, to epileptogenesis (Cantu et al., 2015).

In a study on rats with mild traumatic brain injury caused by the blast, it was shown that the NAA level did not change, changes were observed only for mIno, Glu, and Tau, and only the Tau level was restored to the initial values after seven days, while the other metabolites showed an increase (Li Y. et al., 2021). In our study, metabolites characterizing the viability of neurons returned to their original level on day 28. However, the levels of mIno, as an indicator of the glial cells state, and the levels of neurotransmitters and their predictor (Glu, GABA and Gln) did not return to their initial values within 28 days, which may indicate some incomplete processes of tissue repair (Rodríguez-Rodríguez et al., 2014; Guerriero et al., 2015). All this results in longitudinal changes to the functional state of the brain cells obtained during the modeling surgery procedure of glioma.

Many studies have aimed to determine methods of early diagnosis of brain tumor diseases, including the use of *in vivo* <sup>1</sup>H MRS (Porcari et al., 2016; Hyare et al., 2017). It is known that during the development of glioblastoma, especially at

its later stages, the amount of NAA is significantly reduced. Also, at the early stages of tumor development, the level of mIno increases significantly, decreasing towards the later stage (Bulik et al., 2013). At the same time, our data show that the process of cell xenotransplantation itself leads to a decrease in NAA on the 7<sup>th</sup> day after the surgery and a decrease in the level of mIno on the 21<sup>st</sup> day. Besides, glioma cells that secrete Glu lead to an increase in extracellular Glu. Although Gln concentrations in the contralateral brain tissue in patients with glioblastoma were significantly elevated compared with the levels found in normal brain (Chaumeil et al., 2015). In our study, we found an elevated level of Glu and an increased level of Gln.

The data obtained on the dynamics of the level of neurotransmitters in the brain during the simulation of the xenotransplantation process, on the one hand, can be the result of surgical intervention, as well as the result of multiple MRS procedures using anesthesia. At the same time, there is evidence of minimal effects of isoflurane anesthesia on the metabolomic profile in animals (Menshanov, Akulov, 2015; Söbbeler et al., 2018).

Taking together, when using animal models of human glioma, researchers should clearly distinguish between the changes in neurometabolites that are a response to brain injury caused by the injection of cancer cells into the brain, and the processes that may indicate the early development of a brain tumor. Therefore, this is important for understanding how the level of metabolites changes during the process of tumor development.

## Conclusion

For modeling orthotopic xenotransplantation of glioma cells into the brain of mice, it is necessary to understand which metabolites are produced by a growing tumor and which are the result of surgery invasion of the tumor cells injection. The dynamic of nine neurometabolites in the mouse brain after needle injection with *in vivo* <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy was studied. On the 28<sup>th</sup> day after injection, only metabolic levels of cells reflecting neurons' viability in the area of the injection were restored. However, the levels of neurotransmitters and their predictor (Glu, GABA and Gln) did not return to their initial values within 28 days. So, the recovery processes are largely completed on the 28<sup>th</sup> day after the traumatic event in the brain tissue, leaving open the question of the neurotransmitter system impairment. It is important to keep in mind when modeling human glioblastoma in mice and monitoring new treatments. In addition, these results may be important at the development of approaches for non-invasive diagnostics of traumatic brain injury as well as recovery and rehabilitation processes of patients after certain brain surgeries.

## References

- Ashwal S., Holshouser B., Tong K., Serna T., Osterdock R., Gross M., Kido D. Proton spectroscopy detected myoinositol in children with traumatic brain injury. *Pediatr. Res.* 2004;56(4):630-638. DOI 10.1203/01.PDR.0000139928.60530.7D.
- Atkinson M., Juhasz C., Shah J., Guo X., Kupsky W., Fuerst D., Johnson R., Watson C. Paradoxical imaging findings in cerebral gliomas. *J. Neurol. Sci.* 2008;269(1-2):180-183. DOI 10.1016/j.jns.2007.12.029.

- Barker F.G. 2nd, Chang S.M., Huhn S.L., Davis R.L., Gutin P.H., McDermott M.W., Wilson C.B., Prados M.D. Age and the risk of anaplasia in magnetic resonance-nonenhancing supratentorial cerebral tumors. *Cancer*. 1997;80(5):936-941.
- Brooks W.M., Friedman S., Gasparovic C. Magnetic resonance spectroscopy in traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 2001; 16(2):149-164. DOI 10.1097/00001199-200104000-00005.
- Bulik M., Jancalек R., Vanicek J., Skoch A., Mechl M. Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2013;115(2):146-153. DOI 10.1016/j.clineuro.2012.11.002.
- Cantu D., Walker K., Andresen L., Taylor-Weiner A., Hampton D., Tesco G., Dulla C.G. Traumatic brain injury increases cortical glutamate network activity by compromising GABAergic control. *Cereb. Cortex.* 2015;25(8):2306-2320. DOI 10.1093/cercor/bhu041.
- Castillo M., Smith J.K., Kwock L., Wilber K. Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas. *Am. J. Neuroradiol.* 2001;22(1):60-64.
- Chaumeil M.M., Lupo J.M., Ronen S.M. Magnetic resonance (MR) metabolic imaging in glioma. *Brain Pathol.* 2015;25(6):769-780. DOI 10.1111/bpa.12310.
- Dass C.R., Choong P.F. GFP expression alters osteosarcoma cell biology. *DNA Cell Biol.* 2007;26(8):599-601. DOI 10.1089/dna.2006.053.
- FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits; Mähler Convenor M., Berard M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke B., Pritchett-Corning K., Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2014;48(3):178-192. DOI 10.1177/0023677213516312.
- Fisher S.K., Novak J.E., Agranoff B.W. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.* 2002;82(4):736-754. DOI 10.1046/j.1471-4159.2002.01041.x.
- Ginsberg L.E., Fuller G.N., Hashmi M., Leeds N.E., Schomer D.F. The significance of lack of MR contrast enhancement of supratentorial brain tumors in adults: histopathological evaluation of a series. *Surg. Neurol.* 1998;49(4):436-440. DOI 10.1016/s0090-3019(97)00360-1.
- Goodenberger M.L., Jenkins R.B. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012;205(12):613-621. DOI 10.1016/j.cancergen.2012.10.009.
- Gruetter R. Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first-and second-order shim coils. *Magn. Reson. Med.* 1993;29(6):804-811. DOI 10.1002/mrm.1910290613.
- Guerrero R.M., Giza C.C., Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2015;15(5):27. DOI 10.1007/s11910-015-0545-1.
- Gupte R., Christian S., Keselman P., Habiger J., Brooks W.M., Harris J.L. Evaluation of taurine neuroprotection in aged rats with traumatic brain injury. *Brain Imaging Behav.* 2019;13(2):461-471. DOI 10.1007/s11682-018-9865-5.
- Haddad A.F., Young J.S., Amara D., Berger M.S., Raleigh D.R., Aghi M.K., Butowski N.A. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neurooncol. Adv.* 2021; 3(1):vdab100. DOI 10.1093/oaajnl/vdab100.
- Hall E.D., Sullivan P.G., Gibson T.R., Pavel K.M., Thompson B.M., Scheff S.W. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: More than a focal brain injury. *J. Neurotrauma.* 2005;22(2):252-265. DOI 10.1089/neu.2005.22.252.
- Harris J.L., Yeh H.W., Choi I.Y., Lee P., Berman N.E., Swerdlow R.H., Craciunas S.C., Brooks W.M. Altered neurochemical profile after traumatic brain injury: <sup>1</sup>H-MRS biomarkers of pathological mechanisms. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32(12):2122-2134. DOI 10.1038/jcbfm.2012.114.
- Hishii M., Matsumoto T., Arai H. Diagnosis and treatment of early-stage glioblastoma. *Asian J. Neurosurg.* 2019;14(2):589-592. DOI 10.4103/ajns.AJNS\_18\_19.
- Hyare H., Thust S., Rees J. Advanced MRI techniques in the monitoring of treatment of gliomas. *Curr. Treat. Options Neurol.* 2017; 19(3):11. DOI 10.1007/s11940-017-0445-6.
- Kierans A.S., Kirov I.I., Gonen O., Haemer G., Nisenbaum E., Babb J.S., Grossman R.I., Lui Y.W. Myoinositol and glutamate complex neuro-metabolite abnormality after mild traumatic brain injury. *Neurology.* 2014;82(6):521-528. DOI 10.1212/WNL.000000000000105.
- Lescot T., Fulla-Oller L., Po C., Chen X.R., Puybasset L., Gillet B., Plotkine M., Meric P., Marchand-Leroux C. Temporal and regional changes after focal traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2010; 27(1):85-94. DOI 10.1089/neu.2009.0982.
- Li J., Zhao C., Rao J.S., Yang F.X., Wang Z.J., Lei J.F., Yang Z.Y., Li X.G. Structural and metabolic changes in the traumatically injured rat brain: high-resolution *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Neuroradiology.* 2017;59(12):1203-1212. DOI 10.1007/s00234-017-1915-y.
- Li Y., Liu K., Li C., Guo Y., Fang J., Tong H., Tang Y., Zhang J., Sun J., Jiao F., Zhang Q., Jin R., Xiong K., Chen X. 18F-FDG PET combined with MR spectroscopy elucidates the progressive metabolic cerebral alterations after blast-induced mild traumatic brain injury in rats. *Front. Neurosci.* 2021;15:593723. DOI 10.3389/fnins.2021.593723.
- Maas A.I., Stocchetti N., Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008;7(8):728-741. DOI 10.1016/S1474-4422(08)70164-9.
- Menshanov P.N., Akulov A.E. The neurochemical profile of the hippocampus in isoflurane-treated and unanesthetized rat pups. *Interdiscip. Toxicol.* 2015;8(3):113-117. DOI 10.1515/intox-2015-0017.
- Miyai M., Tomita H., Soeda A., Yano H., Iwama T., Hara A. Current trends in mouse models of glioblastoma. *J. Neurooncol.* 2017; 135(3):423-432. DOI 10.1007/s11060-017-2626-2.
- Moffett J.R., Ross B., Arun P., Madhavarao C.N., Namboodiri A.M. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 2007;81(2):89-131. DOI 10.1016/j.pneurobio.2006.12.003.
- Nelson S.J., Cha S. Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer J.* 2003; 9(2):134-145. DOI 10.1097/00130404-200303000-00009.
- Niu X., Zheng S., Liu H., Li S. Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury. *Mol. Med. Rep.* 2018;18(5):4516-4522. DOI 10.3892/mmr.2018.9465.
- Ostrom Q.T., Cote D.J., Ascha M., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States from 2000 to 2014. *JAMA Oncol.* 2018;4(9):1254-1262. DOI 10.1001/jamaoncol.2018.1789.
- Ostrom Q.T., Cioffi G., Gittleman H., Patil N., Waite K., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl. 5):v1-v100. DOI 10.1093/neuonc/noz150.
- Porcari P., Hegi M.E., Lei H., Hamou M.F., Vassallo I., Capuani S., Gruetter R., Mlynarik V. Early detection of human glioma sphere xenografts in mouse brain using diffusion MRI at 14.1 T. *NMR Biomed.* 2016;29(11):1577-1589. DOI 10.1002/nbm.3610.
- Provencher S.W. Automatic quantitation of localized *in vivo* <sup>1</sup>H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* 2001;14(4):260-264. DOI 10.1002/nbm.698.
- Ratai E.M., Gilberto González R. Clinical magnetic resonance spectroscopy of the central nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* 2016; 135:93-116. DOI 10.1016/B978-0-444-53485-9.00005-2.
- Rodríguez-Rodríguez A., Egea-Guerrero J.J., Murillo-Cabezas F., Carrillo-Vico A. Oxidative stress in traumatic brain injury. *Curr. Med. Chem.* 2014;21(10):1201-1211. DOI 10.2174/0929867321666131217153310.
- Singh K., Trivedi R., Haridas S., Manda K., Khushu S. Study of neurometabolic and behavioral alterations in rodent model of mild traumatic brain injury: a pilot study. *NMR Biomed.* 2016;29(12):1748-1758. DOI 10.1002/nbm.3627.

- Söbbeler F.J., Carrera I., Pasloske K., Ranasinghe M.G., Kircher P., Kästner S.B.R. Effects of isoflurane, sevoflurane, propofol and alfaxalone on brain metabolism in dogs assessed by proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  MRS). *BMC Vet. Res.* 2018;14(1):69. DOI 10.1186/s12917-018-1396-1.
- Stockhammer F., Plotkin M., Amthauer H., van Landeghem F.K., Woiciechowsky C. Correlation of F-18-fluoro-ethyl-tyrosin uptake with vascular and cell density in non-contrastenhancing gliomas. *J. Neurooncol.* 2008;88(2):205-210. DOI 10.1007/s11060-008-9551-3.
- Sugahara T., Korogi Y., Kochi M., Ikushima I., Hirai T., Okuda T., Shigematsu Y., Liang L., Ge Y., Ushio Y., Takahashi M. Correlation of MR imaging-determined cerebral blood volume maps with histologic and angiographic determination of vascularity of gliomas. *AJR Am. J. Roentgenol.* 1998;171(6):1479-1486. DOI 10.2214/ajr.171.6.9843274.
- Tan A.C., Ashley D.M., Lopez G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J. Clin.* 2020;70(4):299-312. DOI 10.3322/caac.21613.
- Tiwari V., Mashimo T., An Z., Vemireddy V., Piccirillo S., Askari P., Hulsey K.M., Zhang S., de Graaf R.A., Patel T.R., Pan E., Mickey B.E., Maher E.A., Bachoo R.M., Choi C. In vivo MRS measurement of 2-hydroxyglutarate in patient-derived IDH-mutant xenograft mouse models versus glioma patients. *Magn. Reson. Med.* 2020;84(3):1152-1160. DOI 10.1002/mrm.28183.
- Tkac I., Starcuk Z., Choi I.-Y., Gruetter R. In vivo  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn. Reson. Med.* 1999;41(4):649-656. DOI 10.1002/(sici)1522-2594(199904)41:4<649::aid-mrm2>3.0.co;2-g.
- Tykocki T., Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *J. Clin. Neurosci.* 2018;54:7-13. DOI 10.1016/j.jocn.2018.05.002.
- Van Horn J.D., Bhattarai A., Irimia A. Multimodal imaging of neuro-metabolic pathology due to traumatic brain injury. *Trends Neurosci.* 2017;40(1):39-59. DOI 10.1016/j.tins.2016.10.007.
- Xu S., Zhuo J., Racz J., Shi D., Roys S., Fiskum G., Gullapalli R. Early microstructural and metabolic changes following controlled cortical impact injury in rat: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *J. Neurotrauma.* 2011;28(10):2091-2102. DOI 10.1089/neu.2010.1739.
- Zavjalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. In vivo MRI visualization of U87 glioblastoma development dynamics in the model of orthotopic xenotransplantation to the scid mouse. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(4):448-453. DOI 10.1134/S2079059716040225.

#### ORCID ID

O.B. Shevelev [orcid.org/0000-0003-3200-958X](https://orcid.org/0000-0003-3200-958X)  
O.P. Cherkasova [orcid.org/0000-0002-8035-2422](https://orcid.org/0000-0002-8035-2422)  
I.A. Razumov [orcid.org/0000-0002-6756-1457](https://orcid.org/0000-0002-6756-1457)  
E.L. Zavjalov [orcid.org/0000-0002-9412-3874](https://orcid.org/0000-0002-9412-3874)

**Acknowledgements.** The study was carried out with the support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant 19–52–55004 using the equipment of the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (RFMEFI62119X0023).

**Author contributions.** Investigation, O.S., I.R. and E.Z.; data analysis, O.S. and E.Z.; writing – original draft preparation, O.S.; writing – review and editing, E.Z.; project administration, E.Z., O.C.; funding acquisition, O.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Institutional review board statement.** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Inter-Institutional Commission on Biological Ethics at the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Permission #78, April 16, 2021).

**Data availability statement.** The data generated and/or analyzed during this research are presented in this published article. All raw data (MR spectra and MR images) are available from the corresponding author on reasonable request.

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

Received May 16, 2022. Revised February 21, 2023. Accepted June 1, 2023.



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Хромосомы певчих птиц, ограниченные зародышевой линией

П.М. Бородин

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

**Аннотация.** Хромосомы, ограниченные зародышевой линией (germline-restricted chromosomes – GRC), присутствуют в геномах герминативных клеток и запрограммированно элиминируются из соматических клеток в ходе развития. Они крайне редко возникают в ходе эволюции. Еще реже они становятся необходимыми элементами геномов герминативных клеток крупных таксонов. Такая хромосома, ограниченная зародышевой линией, была обнаружена у всех исследованных представителей подотряда воробьинообразных певчих птиц. Ни у одного из представителей других отрядов птиц GRC не выявлено. Это свидетельствует о том, что GRC возникла у общего предка воробьинообразных певчих птиц. У всех представителей этого подотряда GRC присутствует, как правило, в двух копиях в герминативных клетках самок и в одной копии у самцов и отсутствует в соматических клетках. У самок GRC синаптируют и рекомбинируют в профазе мейоза. У самцов они почти всегда элиминируются из сперматоцитов. Таким образом, GRC наследуется почти исключительно по материнской линии. Хромосомы, ограниченные зародышевой линией, – необходимый элемент генома герминативных клеток певчих птиц. На сегодняшний день исследованы геномы GRC четырех видов. Некоторые гены GRC активно экспрессируются в гонадах самок и самок, контролируют развитие герминативных клеток, синтез белков, вовлеченных в организацию мейотических хромосом. GRC разных видов различаются по размерам и генетическому составу. Геном GRC каждого вида птиц состоит из амплифицированных перестроенных копий генов основного генома данного вида. Уровень гомологии между GRC разных видов довольно низок. Это указывает на высокую скорость эволюции генетического состава хромосомы. Значительный вклад в ускорение эволюции GRC вносят передача этой хромосомы по материнской линии и подавление рекомбинации в ней. Можно считать, что быстрая согласованная эволюция генов GRC и генов основного набора воробьинообразных певчих птиц играет важную роль в видообразовании и адаптивной радиации представителей этого самого богатого видами и разнообразного подотряда птиц. Ключевые слова: хромосомы, ограниченные зародышевой линией; эволюция генома птиц; запрограммированная элиминация ДНК.

**Для цитирования:** 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

## Germline-restricted chromosomes of the songbirds

P.M. Borodin

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

**Abstract.** Germline-restricted chromosomes (GRCs) are present in the genomes of germline cells and absent from somatic cells. A GRC is found in all species of the songbirds (Passeri) and in none of the other bird orders studied to date. This indicates that GRC originated in the common ancestor of the songbirds. The germline-restricted chromosome is permanently absent from somatic cells of the songbird, while female germline cells usually contain two copies of GRC and male ones have one copy. In females, GRCs undergo synapsis and restricted recombination in their terminal regions during meiotic prophase. In males, it is almost always eliminated from spermatocytes. Thus, GRC is inherited almost exclusively through the maternal lineage. The germline-restricted chromosome is a necessary genomic element in the germline cells of songbirds. To date, the GRC genetic composition has been studied in four species only. Some GRC genes are actively expressed in female and male gonads, controlling the development of germline cells and synthesis of the proteins involved in the organization of meiotic chromosomes. Songbird species vary in GRC size and genetic composition. The GRC of each bird species consists of amplified and modified copies of genes from the basic genome of that species. The level of homology between GRCs of different species is relatively low, indicating a high rate of genetic evolution of this chromosome. Transmission through the maternal lineage and suppression of the recombination contribute significantly to the accelerated evolution of GRCs. One may suggest that the rapid coordinated evolution between the GRC genes and the genes of the basic genome in the songbirds might be responsible for the explosive speciation and adaptive radiation of this most species-rich and diverse infraorder of birds.

Key words: germline-restricted chromosomes; avian genome evolution; programmed DNA elimination.

**For citation:** Borodin P.M. Germline-restricted chromosomes of the songbirds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):641-650. DOI 10.18699/VJGB-23-75

## Запрограммированная элиминация ДНК

В конце XIX в. А. Вейсман предположил, что существует фундаментальное различие между соматическими клетками и герминативными клетками зародышевой линии, т. е. теми, которые дифференцируются в половые клетки – гаметы. (Weissman, 1890, 1893). Согласно теории А. Вейсмана, только герминативные клетки обладают полным набором наследственного материала (зародышевой плазмы), а необратимая дифференциация и специализация соматических клеток происходит за счет их неравного деления, при котором зародышевая плазма фрагментируется и разные дочерние соматические клетки получают разные ее фрагменты.

Первая часть гипотезы А. Вейсмана легла в основу современной эволюционной биологии, генетики и биологии развития. Вторая часть была существенно изменена. Неравное деление соматических клеток в ходе раннего развития абсолютного большинства современных многоклеточных организмов приводит не к фрагментации генома (зародышевой плазмы – в терминах Вейсмана), а к неравномерному распределению его производных – белков и РНК – между дочерними клетками, что в свою очередь приводит к последовательной дифференциации их генной активности и в конечном счете к их специализации (Dröschner, 2014).

Соматические клетки некоторых таксонов многоклеточных проходят, по крайней мере, часть пути дифференциации почти по Вейсману, теряя в процессе специализации часть своего генома. Этот феномен раньше назывался «диминуция хроматина». Сейчас превалирует термин «запрограммированная элиминация ДНК» (Wang, Davis, 2014). Первый пример диминуции хроматина был обнаружен Т. Бовери у нематоды *Ascaris megalocephala* (Boveri, 1887). Т. Бовери показал, что на ранних стадиях эмбрионального развития этой нематоды ядра некоторых клеток последовательно утрачивают часть хромосомного материала. Он установил, что этот процесс является частью программы нормального развития, необходим для формирования определенных тканей и органов червя (Maderspacher, 2008).

Запрограммированная элиминация ДНК наблюдается в разных таксонах многоклеточных и играет ключевую роль в регулировании экспрессии генов и поддержании геномной стабильности. Современные исследования этого процесса сосредоточены на понимании молекулярных механизмов, которые его контролируют. Идентифицированы различные молекулярные пути, участвующие в селективном удалении ДНК во время диминуции хроматина (Wang, Davis, 2014; Smith, 2018; Smith et al., 2021; Dedukh, Krasikova, 2022). В ходе этих исследований стало ясно, что элиминируются именно те районы генома, гомологи которых у других многоклеточных подвергаются сайленсингу, – онкогены и другие гены раннего развития (Wang et al., 2012; Streit et al., 2016; Smith, 2018; Smith et al., 2018).

Таким образом, мы можем рассматривать запрограммированную элиминацию ДНК как радикальный способ сайленсинга для разрешения проблемы антагонистической плейотропии между ранними и поздними генетическими программами. По-видимому, этот механизм регуляции развития за счет запрограммированной элиминации ДНК

возникал неоднократно в эволюции и оказывался эволюционным тупиком. На это указывает его спорадическое распределение по филогенетическому древу многоклеточных животных (Smith et al., 2021).

## Хромосомы на элиминацию

В большинстве исследованных случаев элиминации из соматических клеток подвергаются не целые хромосомы, а их фрагменты. Случаи элиминации целых хромосом встречаются реже (Dedukh, Krasikova, 2022). У нескольких видов млекопитающих и беспозвоночных разных таксонов удаление хромосом используется в качестве механизма определения пола и/или компенсации дозы генов гетерогаметной половой хромосомы (Watson et al., 1998; Wang, Davis, 2014; Smith et al., 2021).

Конфликт между геномами хозяев и их геномными паразитами иногда приводит к появлению дополнительных (т. е. жизненно не необходимых) хромосом. Их называют В-хромосомами, в отличие от А-хромосом основного набора. Они варьируют по размеру, морфологии и генетическому содержанию между видами, между особями внутри вида и между отдельными клетками животного (Houben et al., 2014; Camacho, 2022). Ряд исследователей отмечают тенденцию к накоплению В-хромосом в герминативных клетках и утрате их в соматических клетках (Camacho et al., 2000; Camacho, 2022).

В-хромосомы могут присутствовать не во всех, а только в части популяций определенного вида. Для видов с В-хромосомами также характерно спорадическое распределение по филогенетическим деревьям отдельных таксонов (D'Ambrosio et al., 2017). Так, например, из 1130 видов млекопитающих, представленных в «Атласе хромосом млекопитающих» (Graphodatsky et al., 2020), только 16 видов из 11 довольно богатых видами родов содержат В-хромосомы. Из этого следует, что В-хромосомы – это типичные геномные паразиты, которые время от времени возникают в отдельных видах, иногда одерживают пирровы победы и распространяются в популяциях, но в конечном счете либо полностью элиминируются из геномов этих видов, либо вымирают вместе с хозяевами (Camacho et al., 2000; Houben et al., 2014; Houben, 2017; Camacho, 2022; Chen et al., 2022).

В единичных случаях, однако, таким паразитическим хромосомам удается добиться эволюционного успеха, став незаменимой частью генома герминативных клеток у всех или большинства видов крупного таксона. Такие хромосомы, ограниченные зародышевой линией (GRC – germline-restricted chromosomes), были обнаружены у почти всех исследованных видов из трех семейств двукрылых насекомых: грибных комариков (Sciaridae), галловых комариков (Cecidomyiidae) и комаров-звонцов (Chironomidae) (Hodson, Ross, 2021) и у всех исследованных видов воробьинообразных (Passeriformes) – самого богатого видами отряда птиц (Torgasheva et al., 2019; Borodin et al., 2022).

Современным знаниям о GRC двукрылых был посвящен подробный обзор (Hodson, Ross, 2021). Обзор работ по GRC воробьинообразных был недавно опубликован группой авторов, в которую входили почти все европейские исследователи этой хромосомы, включая и автора

настоящей статьи (Borodin et al., 2022). Он был подготовлен для специального выпуска журнала “Chromosome Research”, посвященного менделеевскому наследованию и мейотическому драйву (Hanlon, Larracuente, 2022). Поэтому в нем особое внимание было уделено гипотезам о механизмах передачи GRC в зародышевой линии и элиминации этой хромосомы из соматических тканей. Еще один обзор, в котором GRC анализируется в контексте геномного конфликта между соматическими и герминативными клетками, появился онлайн в сентябре 2023 г. (Vontzou et al., 2023).

В настоящей работе будут рассмотрены проблемы, связанные со структурой, функцией и эволюцией этой загадочной хромосомы.

### Открытие GRC у птиц

GRC воробьинообразных птиц была впервые обнаружена аргентинскими цитогенетиками М.И. Пигоцци и А. Солари у зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*) (Pigozzi, Solari, 1998). Они наткнулись на нее совершенно случайно в ходе сравнительного изучения синапсиса и рекомбинации половых хромосом в мейозе самок птиц. В длинном ряду видов птиц, изученных этими исследователями (Solari, Moses, 1973; Rahn, Solari, 1986; Solari, 1992; Solari, Pigozzi, 1993; Pigozzi, Solari, 1997), зебровая амадина была первым представителем отряда воробьинообразных. В ее мейотических клетках они увидели нечто, чего не видели ни у кого из представителей ранее исследованных видов.

Герминативные клетки самок и самцов этого вида содержали дополнительную хромосому, которой не было в клетках костного мозга и остальных соматических клетках. Эта дополнительная хромосома была крупнее всех остальных хромосом. Она была эухроматической в герминативных клетках самок и гетерохроматической в сперматоцитах самцов (Pigozzi, Solari, 1998). При этом в герминативных клетках у самок она почти всегда была в двух копиях, а у самцов – всегда в одной (Pigozzi, Solari, 2005).

Еще одной неожиданной особенностью этой хромосомы было то, что у самцов она отсутствовала не только в соматических клетках, но и в сперматозоидах. В пахитене, диплотене и метафазе I мейоза GRC выявлялась на периферии хромосомных пластинок. В метафазе II мужского мейоза она отсутствовала. При этом рядом с некоторыми сперматоцитами наблюдали округлое плотное DAPI-позитивное тело. С помощью электронной микроскопии было показано, что эти округлые тела были окружены двойной мембраной. М.И. Пигоцци с коллегами предположили, что эти микроядра содержат GRC, элиминированную после первого мейотического деления (Pigozzi, Solari, 1998, 2005; Itoh et al., 2009; Goday, Pigozzi, 2010; Schoenmakers et al., 2010).

Позднее А.А. Торгашева с коллегами подтвердили это предположение в прямом эксперименте. Они провели микродиссекцию этих микроядер, приготовили из них ДНК-пробы и гибридизовали эти пробы на препаратах пахитенных сперматоцитов и ооцитов. Во всех случаях сильный специфичный гибридизационный сигнал наблюдался на GRC (Torgasheva et al., 2019). Поскольку GRC удалялась из сперматоцитов и, следовательно, отсутствовала в сперматозоидах, М.И. Пигоцци с коллегами предположили, что

она должна наследоваться исключительно по материнской линии (Pigozzi, Solari, 2005; Itoh et al., 2009).

М.И. Пигоцци и А. Солари сначала классифицировали GRC амадины как В-хромосому. Однако они отметили ее уникальные особенности. В-хромосомы обычно изменчивы по числу в соматических клетках и имеют тенденцию накапливаться в герминативных клетках. Хромосома, ограниченная зародышевой линией, зебровой амадины отсутствовала в соматических клетках и всегда присутствовала в каждой герминативной клетке. С самого начала исследования GRC стало ясно, что эта хромосома не факультативный, а облигатный элемент генома герминативных клеток, абсолютно необходимый для гаметогенеза (Pigozzi, Solari, 1998).

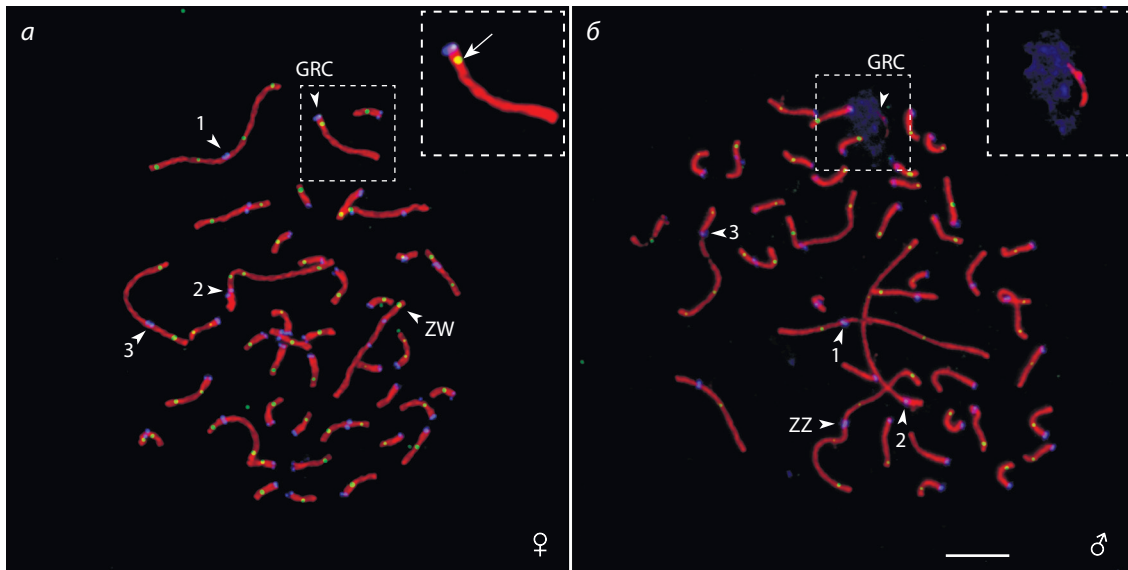
### GRC на филогенетическом древе птиц

Около двух десятилетий после открытия GRC у зебровой амадины эту хромосому рассматривали как интересный генетический курьез, единственный случай обнаружения В-хромосомы у птиц. Открытие в герминативных клетках родственного вида, японской амадины (*Lonchura striata domestica*), дополнительной хромосомы, сходной по морфологии и особенностям поведения в мейозе с GRC зебровой амадины (del Priore, Pigozzi, 2014), не изменило этого отношения. Ситуация резко поменялась в 2018–2019 гг., когда три независимые группы исследователей с разрывом в несколько месяцев опубликовали данные, свидетельствующие о том, что GRC может присутствовать в зародышевой линии многих видов птиц (Biederman et al., 2018; Kinsella et al., 2019; Torgasheva et al., 2019).

Прямые свидетельства древнего происхождения и широкого распространения GRC среди певчих птиц были получены в работе А.А. Торгашевой с коллегами (2019). Авторы провели цитогенетический скрининг 15 видов певчих птиц и 8 видов птиц за пределами этого подотряда. Они использовали иммунолокализацию SYCP3, основного белка синаптонемного комплекса – осевого скелета хромосом, на стадии профазы мейоза, центромерных белков и белка мисматч-репарации MLH1, маркирующего сайты гомологичной рекомбинации (рис. 1).

А.А. Торгашева с коллегами (Torgasheva et al., 2019) показали, что GRC присутствует во всех пахитенных клетках всех исследованных особей всех исследованных видов певчих птиц, включая грача (*Corvus frugilegus*), представителя инфраотряда Corvida, сестринского к инфраотряду Passerida, включающему все остальные семейства певчих птиц (рис. 2). Размер GRC варьирует в широких пределах. У одних видов GRC относится к классу макрохромосом, 1–3-го размерного ранга, у других – к микрохромосомам. Филогенетической кластеризации по этому признаку не наблюдается. Близкие виды могут сильно различаться по размерам GRC (см. рис. 2). При этом GRC весьма консервативна в отношении морфологии. Почти у всех исследованных видов это акроцентрическая хромосома. Исключением составляет мухоловка-пеструшка, GRC которой оказалась метацентрической (Torgasheva et al., 2019; Malinovskaya et al., 2022).

Хромосома, ограниченная зародышевой линией, не обнаружена ни у одного из видов птиц за пределами отряда воробьинообразных, включая волнистого попу-



**Рис. 1.** Герминативные клетки большой синицы на стадии пахитены после иммуноокрашивания антителами к SYCP3 (красный цвет), центромерным белкам (синий) и MLH1 (зеленый).

*a* – ооцит, содержащий бивалент GRC; *б* – сперматоцит с унивалантом GRC. Масштаб 5 мкм.

Наконечники стрелок указывают на центромеры GRC трех самых больших макробивалентов и гетероморфного бивалента ZW с невыровненными центромерами. Стрелка указывает на сигнал MLH1 в перичентромерном районе бивалента GRC. Масштаб 5 мкм. Фотографии из статьи (Torgasheva et al., 2019), опубликованной в журнале "Proceedings of National Academy of Sciences USA" по лицензии CC-BY-SA 4.0 (модифицировано).

гайчика (*Melospittacus undulates*), представителя отряда попугаеобразных (Psittaciformes), сестринского к отряду воробьинообразных (Torgasheva et al., 2019). Затем этот список был расширен и на момент написания этого обзора включал 27 видов певчих птиц с GRC и 9 видов птиц без GRC за пределами этого подотряда (см. рис. 2) (Borodin et al., 2022).

На основании цитогенетического скрининга А.А. Торгашева с коллегами (Torgasheva et al., 2019) заключили, что GRC, по-видимому, присутствует в геномах герминативных клеток всех певчих птиц и отсутствует у всех остальных птиц, и предположили, что она возникла у общего предка подотряда певчих воробьинообразных птиц (Passeri), включающего около 5000 видов. Герминативные клетки представителей подотряда кричащих воробьинообразных (Tyranni), состоящего из примерно 1200 видов, и подотряда Acanthisitti, в который входят два вида новозеландских крапивников, до сих пор не проанализированы. Поэтому мы пока не знаем, есть ли у них хромосома, ограниченная зародышевой линией. Если она есть, значит, GRC возникла гораздо раньше, у общего предка всех воробьинообразных птиц.

Независимые свидетельства эволюционной древности GRC были получены на основе сравнительного анализа результатов секвенирования клеток семенников и соматических тканей зебровой амадины (Kinsella et al., 2019) и «вычитательного» анализа их транскриптомов (Biederman et al., 2018). Выявлено более 100 генов, специфичных для GRC (гаметоцитов) и имеющих паралогов (соматоцитов) на по меньшей мере 19 различных А-хромосомах.

Результаты филогенетического анализа позволили подразделить GRC-специфичные гены на пять эволюционных

страт по степени их дивергенции с соматическими паралогами (Kinsella et al., 2019).

Степень дивергенции между гаметологами самой молодой страты 5 и их соматологами сопоставима с уровнем дивергенции этих соматологов между подвидами зебровой амадины. Гаметотологи страты 4 возникли в ходе дивергенции зебровой амадины от острохвостой амадины (*Poephila acuticauda*) и кольчатого астрильда (*Stizoptera bichenovii*). К страте 3 относятся гаметологи, возникшие у общего предка видов семейства астрильдовых (Estrildidae), к страте 2 – предка инфраотряда Passerida. Самая древняя страта 1 возникла у общего предка подотряда певчих птиц.

Таким образом, и цитологические, и молекулярно-генетические данные однозначно указывают на монофилетическое происхождение хромосомы, ограниченной зародышевой линией.

### Генетический состав GRC

Что же содержится в GRC, что позволило этой хромосоме стать облигатным элементом генома герминативных клеток всех певчих птиц? На момент написания этой статьи опубликованы результаты геномного анализа GRC всего четырех видов певчих птиц: зебровой амадины (Kinsella et al., 2019), двух видов соловьев, западного (*Luscinia megarhynchos*) и восточного (*L. luscinia*) (Schlebusch et al., 2023), и обыкновенной лазоревки *Cyanistes caeruleus* (Mueller et al., 2023).

Наиболее детально исследованная GRC зебровой амадины содержит ряд генов, важных для развития репродуктивной системы. Против ожидания, мобильных элементов и сателлитной ДНК в GRC не больше, а меньше, чем в А-хромосомах (Kinsella et al., 2019; Torgasheva et al.,



**Рис. 2.** Филогенетическое древо видов птиц, для которых исследованы пахитенные кариотипы.

Черные круги указывают на виды с макро-GRC, белые – на виды с микро-GRC, отсутствие кругов означает отсутствие хромосомы, ограниченной зародышевой линией. Источник данных: \* Torgasheva et al. (2019); # Malinovskaya et al. (2022); ^ Sotelo-Muñoz et al. (2022); & Poignet et al. (2021). Схема – из статьи (Borodin et al., 2022), опубликованной в журнале "Chromosome Research", по лицензии CC-BY-SA 4.0 (модифицировано).

2019). Результаты транскриптомного анализа показали, что по меньшей мере шесть GRC-специфичных генов транскрибируются в семенниках и 32 гена – в яичниках. С помощью масс-спектрометрического анализа была подтверждена трансляция мРНК некоторых из этих генов в гонадах у обоих полов. В наборе GRC-специфичных генов наиболее представлены категории генов, относящихся к формированию гонад у самок и связанных с размножением. Ортологи многих GRC-специфичных генов зебровой амадины преимущественно экспрессируются в гонадах обоих полов у курицы (Kinsella et al., 2019). В макро-GRC зебровой амадины и микро-GRC синицы-

лазоревки обнаружен функциональный паралог транскрипционного фактора *BMP15*, который играет важную роль в созревании фолликулов в яичниках птиц и других позвоночных. В GRC лазоревки и двух видов соловьев (но не у зебровой амадины!) выявлены гены, контролирующие формирование синаптомемного комплекса – структуры, необходимой для синапсиса и рекомбинации хромосом в мейозе (Mueller et al., 2023).

Показано, что на некоторые из гаметологов, в том числе и на самые древние из них (*biccl1* и *trim71*), действует очищающий отбор. Продукты их ортологов необходимы для дифференцировки эмбриональных клеток млеко-

питающих (Uhlén et al., 2015). Ген *bicc1* кодирует РНК-связывающий белок, модулирующий трансляцию белка во время эмбрионального развития. Продукт гена *trim71* связывается с микроРНК и поддерживает рост и пролиферацию эмбриональных стволовых клеток. Он также участвует в контроле клеточного цикла. Обнаружены следы недавнего движущего отбора на ген *puf60*, который кодирует белок, регулирующий множество ядерных процессов, включая сплайсинг пре-мРНК и транскрипцию (Kinsella et al., 2019). Это однозначно указывает на функциональную значимость, по крайней мере, некоторых гаметологов. При этом отдельные гены GRC синицы-лазоревки и многие гены обоих видов соловьев подверглись псевдогенизации и, по-видимому, утратили функциональное значение (Mueller et al., 2023; Schlebusch et al., 2023).

Интересно, что копирование генов соматического генома в GRC не привело к утрате их «оригиналов». Более того, на синице-лазоревке обнаружена положительная корреляция в числе копий между гаметологами и их соматологами ( $r = 0.35$ ,  $P = 0.001$ ) (Mueller et al., 2023).

Таким образом, GRC всех четырех исследованных видов содержит копии генов А-хромосом, многие из которых вовлечены в контроль развития и функционирования герминативных клеток.

### Половой диморфизм по числу GRC в герминативных клетках и особенностям ее поведения в профазе мейоза

Во всех пахитенных клетках самцов (за редкими исключениями, о которых сказано ниже) обнаруживается как минимум одна GRC, которая выглядит как унивалент: извитой, иногда фрагментированный одиночный осевой элемент синаптономемного комплекса, окруженный облаком хроматина, который интенсивно метится антицентромерными антителами. Этот унивалент не вступает в синапсис и рекомбинацию ни сам с собой, ни с А-хромосомами. У всех исследованных видов во всех пахитенных клетках самок (за редкими исключениями) обнаруживаются две GRC, которые ведут себя как обычные А-хромосомы. Они синаптируют друг с другом по всей длине, образуя биваленты, и рекомбинируют. Единственное, чем биваленты GRC отличаются от бивалентов А-хромосом, – распределение точек рекомбинации. Их меньше, чем на А-хромосомах сходного размера, и они сильнее смещены к концам бивалентов GRC (Pigozzi, Solari, 1998, 2005; Torgasheva et al., 2019, 2021; Malinovskaya et al., 2020).

С расширением спектра видов, увеличением числа исследованных особей и применением молекулярных проб стали выявляться исключения. У пяти самок (одна зебровая амадина и четыре ласточки-береговушки) из 50 исследованных представителей семи видов все изученные пахитенные клетки содержали одну GRC (Borodin et al., 2022). Кроме того, четыре самки большой синицы из семи исследованных были мозаиками по числу хромосом, ограниченных зародышевой линией. В небольшом количестве их клеток (от 2 до 26 %) наблюдалась одна GRC, во всех остальных – две (Torgasheva et al., 2021).

Среди 76 самцов 26 исследованных видов до сих пор не обнаружено особей, у которых во всех герминативных

клетках было бы больше одной хромосомы, ограниченной зародышевой линией. Но у девяти из них (семи бледных береговушек, одной большой синицы, одной мухоловки-пеструшки и одной восточной черноголовой мунии) был выявлен мозаицизм по числу GRC (Borodin et al., 2022). Некоторые герминативные клетки самцов-мозаиков содержали две или даже три GRC (Malinovskaya et al., 2020). Восточная черноголовая муния была мозаиком не только по числу, но и по размеру хромосом, ограниченных зародышевой линией. Некоторые ее клетки содержали одну макро- и одну микро-GRC (Sotelo-Muñoz et al., 2022).

Было предложено несколько гипотез, направленных на объяснение полового диморфизма, полиморфизма и мозаицизма по числу GRC (Borodin et al., 2022). Эти гипотезы можно разделить на две группы. Гипотезы первой группы исходят из предположения о том, что женский мейоз протекает нормально и все ооциты содержат одну GRC, а вторая GRC возникает у самок за счет нерасхождения хроматид в ходе митотических делений примордиальных половых клеток. Гипотезы второй группы предполагают, что обе GRC в первом делении женского мейоза или обе хроматиды одиночной GRC во втором делении не расходятся и преимущественно направляются в ооцит. В результате большинство зигот содержат две копии GRC, как и ооциты перед вступлением в мейоз. У самцов одна из копий, предположительно, элиминируется в ходе митотических делений примордиальных половых клеток.

На мой взгляд, все предложенные на сегодняшний день гипотезы содержат ряд непроверенных и непроверяемых предположений, и ни одна из них не объясняет всего круга явлений, связанных с передачей хромосомы, ограниченной зародышевой линией. Решение этой проблемы может быть получено на основе анализа сегрегации уникальных полиморфных маркеров, локализованных на GRC.

Половой диморфизм в мейотическом поведении GRC сохраняется и в тех герминативных клетках, которые содержат нетипичное для данного пола число хромосом, ограниченных зародышевой линией. Униваленты у самок не были окружены облаком хроматина, меченного антителами против центромер. Два осевых элемента GRC в клетках самцов если и синаптировали друг с другом, то почти всегда не полностью, и крайне редко рекомбинировали (Malinovskaya et al., 2020). Среди тысяч проанализированных сперматоцитов I у самцов 26 видов птиц не найдено цитологических признаков рекомбинации GRC ни внутри себя, ни с А-хромосомами (Torgasheva et al., 2019, 2021; Malinovskaya et al., 2020, 2022; Poignet et al., 2021; Sotelo-Muñoz et al., 2022). Однако даже в случае наличия такой рекомбинации в мужском мейозе она не должна играть роли в эволюции генетического состава GRC в силу невысокой частоты ее передачи через самцов (Pei et al., 2022).

Практически исключительная передача GRC по материнской линии и тот факт, что рекомбинация во всех районах GRC, кроме терминальных, почти полностью заперта, свидетельствуют о том, что с появлением у певчих птиц GRC у них возник новый элемент генома, подверженный действию храповика Мёллера, вдобавок к достаточно богатой генами хромосоме W и геному митохондрий. Для нерекombинирующих элементов генома характерен

исключительно высокий темп фиксации точковых и структурных мутаций (Gabriel et al., 1993). Можно полагать, – потому, что GRC должна эволюционировать с высокой скоростью и ускорять эволюцию всего подотряда певчих птиц.

### Эволюция GRC

Скорость эволюции GRC можно оценить по уровню дивергенции генетического состава GRC между разными видами птиц. С использованием реципрокной флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) была получена грубая оценка степени гомологии между GRC нескольких видов птиц. Она оказалась удивительно низкой, что указывает на быструю эволюцию генетического состава GRC (Torgasheva et al., 2019). Для определения масштабов и деталей этого процесса необходим геномный анализ GRC разных видов.

Первые результаты такого анализа подтверждают предположение об исключительно высокой скорости эволюции хромосомы, ограниченной зародышевой линией. На это указывает значительная ее дивергенция у западного (*L. megarhynchos*) и обыкновенного (*L. luscinia*) соловьев, которых разделяет всего 1.8 млн лет независимой эволюции. У первого вида обнаружено 585 гаметологов, у второго – 406. Из них всего 25 были общими для GRC соловьев и зебровой амадины и 192 – общими для обоих видов соловьев. То есть всего одна треть генома GRC двух близких видов соловьев была унаследована от общего предка. Так, например, почти половину GRC обыкновенного соловья составляет большой, хотя и фрагментированный, сегмент, гомологичный неразрывному сегменту А-хромосомы 2. У западного соловья этот генетический материал выявить не удалось (Schlebusch et al., 2023).

Блочное копирование сегментов А-генома в GRC и последующее диспергирование этих сегментов в составе GRC обнаружены у всех видов, исследованных достаточно детально. Так, с использованием FISH с пробами ДНК GRC было показано, что большую часть GRC зебровой амадины занимают диспергированные последовательности, гомологичные сегменту из короткого плеча хромосомы 3 (Itoh et al., 2009; Torgasheva et al., 2019). Фрагмент длинного плеча этой же хромосомы и одна из микрохромосом оказались гомологичными последовательностям GRC чижа. Хромосома, ограниченная зародышевой линией, ласточки-береговушки содержит материал из длинного плеча хромосомы 4 и хромосомы W, проба GRC синицы гибридизовалась с одной из микрохромосом (Torgasheva et al., 2019).

Механизмы копирования и диспергирования фрагментов А-геномов в GRC остаются неизвестными. Рекомбинация между GRC и А-геномами вряд ли возможна. Ни в одной из работ, посвященных анализу синапсиса и рекомбинации хромосом у самок четырех видов певчих птиц, не обнаружено ни эктопических контактов между GRC и А-хромосомами, которые могли бы привести к рекомбинации и/или конверсии, ни образования шпилек осевых элементов синаптонемного комплекса самой GRC, которые могли бы привести к делециям, дупликациям и диспергированию последовательностей в составе GRC (Torgasheva et al., 2019, 2021; Malinovskaya et al., 2020).

Поразительный размах межвидовой изменчивости по размеру и гетерогенности по генетическому составу GRC свидетельствует о беспрецедентной эволюционной текучести этой удивительной хромосомы. Мало того, что гаметологи постоянно накапливают точковые замены, постепенно дивергируя от своих соматологов и от гаметологов других видов. Разные гаметологи разных видов постоянно возникают в составе GRC за счет копирования из разных районов разных А-хромосом. Одни гаметологи амплифицируются в GRC, увеличивая ее размер, в то время как делетирование других (или тех же?) гаметологов влечет за собой ее уменьшение. Эти процессы роста и сокращения GRC затрагивают ее разные районы у разных видов, усиливая дивергенцию их хромосом, ограниченных зародышевой линией.

### Гипотезы о происхождении GRC и ее роли в эволюции певчих птиц

Данные о распространении GRC среди птиц (Torgasheva et al., 2019) и результаты анализа времени дивергенции между гаметологами и соматологами зебровой амадины (Biederman et al., 2018; Kinsella et al., 2019) однозначно указывают на ее монофилетическое происхождение.

А.А. Торгашева с коллегами предположили, что первая GRC могла возникнуть в геноме предков певчих птиц за счет трисомии по одной из микрохромосом (Torgasheva et al., 2019). Древность GRC певчих птиц и чрезвычайная эволюционная текучесть ее генетического состава практически не оставляют надежд на то, что нам удастся найти паралоги А-хромосомы, которая стала последним общим предком GRC всех певчих птиц.

Как показывает анализ В-хромосом разных видов, их основой могут служить не целые А-хромосомы, а их фрагменты, которые содержат центромеру и возникают в ходе хромосомных перестроек в зародышевой линии (Camacho et al., 2000; Rubtsov, Borisov, 2018; Poignet et al., 2021). Межхромосомные перестройки фиксируются в эволюции птиц гораздо реже, чем в других таксонах позвоночных. Диплоидное число  $2n$  абсолютного большинства видов птиц варьирует в очень узких пределах,  $80 \pm 2$ , а большинство хромосом современных птиц синтенно хромосомам рептилий (Warren et al., 2010; Griffin, Burt, 2014; Damas et al., 2018). При этом внутривидовые перестройки, в частности инверсии, играют значительную роль в эволюции кариотипов птиц, в ряде случаев выступая как один из механизмов видообразования (Hooper, Price, 2017; Bravo et al., 2021). Побочным эффектом гетерозиготности по инверсиям часто бывает образование фрагментов хромосом, содержащих функциональные центромеры. Один из таких фрагментов мог стать родоначальником GRC певчих птиц.

Можно думать, что прото-GRC стала хромосомой, ограниченной герминативными клетками, на самых ранних этапах своей эволюции. Для многих В-хромосом характерен генотаксис – их накопление в генеративной ткани и нехватка в соматических клетках (Camacho, 2022). Эволюционный смысл этого явления очевиден: ослабление давления естественного отбора по генам, локализованным в этих хромосомах, но механизмы его остаются неизвестными.

А.А. Торгашева с коллегами предположили, что прото-GRC уже содержала несколько копий соматических генов, контролирующих развитие и функционирование репродуктивных органов (Torgasheva et al., 2019). Поэтому она могла бы стать полезной из-за обеспечения более высокой дозы данных генов. Это соображение кажется обоснованным, учитывая крайнюю экономность птичьего генома (Griffin, Burt, 2014). Более вероятно, однако, что в момент своего возникновения GRC была типичной В-хромосомой – эффективным паразитом, который обеспечивал свою передачу, не оглядываясь на интересы хозяина. Полезные гены, скорее всего, были скопированы в GRC на более поздних стадиях эволюции. Те немногие варианты В-хромосом, которые надолго закрепляются в геномах хозяев и достаточно широко распространяются в популяциях, постепенно «доместицируются», приобретая свойства, полезные для хозяев (Johnson Pokorná, Reifová, 2021).

Вопрос в том, что это за свойства. По аналогии с другими примерами запрограммированной элиминации ДНК, которые мы обсуждали выше, можно предположить, что GRC может содержать уникальные или амплифицированные гены раннего развития, проявляющие антагонистическую плейотропию. Такие гены могут быть необходимы для раннего развития, однако их экспрессия на более поздних этапах жизни может оказаться опасной. В таком случае GRC можно рассматривать как аналог «загрузочного диска» программы развития. В пользу этой гипотезы свидетельствует обнаружение эволюционно древних гаметологов *bicc1*, *trim71* и *puf60*, продукты которых могут играть важную роль в дифференцировке эмбриональных клеток и контроле клеточного цикла (Kinsella et al., 2019).

Еще один класс генов, создание добавочных копий которых в составе GRC могло быть эволюционно полезным, – это гены, вовлеченные в контроль развития и пролиферации герминативных клеток (например, *prdm1* и *BMP15* у зебровой амадины и синицы-лазоревки), в регуляцию синапсиса и рекомбинации хромосом (*SIX6OS1*, *SYCE2*, *SYCP1*, *TEX12*, *RNF212B* у синицы-лазоревки и соловьев) (Mueller et al., 2023).

Высказано предположение, что GRC может участвовать в определении пола и быть основой новой системы (где  $GRC/0 = X0$  – самцы,  $GRC/GRC = X/X$  – самки), уже возникшей или возникающей поверх типичной для всех птиц системы ZZ-ZW (Stöck et al., 2021). Для обоснования этого привлекают половой диморфизм по числу GRC, который мы обсуждали выше. Это предположение кажется весьма сомнительным. Факты показывают, что среди самок обнаруживаются вполне нормально развитые особи с одной GRC, а отдельные самцы имеют две GRC в довольно высокой доле своих герминативных клеток.

Подавление рекомбинации GRC наряду с массивным трафиком между А-геномом и GRC должно вести к очень быстрому возникновению несовместимости между геномами родственных видов. По аналогии с моделью Добжанского–Мёллера (Orr, Turelli, 2001), можно предположить, что внутри каждого вида возникающие варианты GRC проверяются на совместимость с А-геномом, с которым гомология и так достаточно велика за счет постоянного трафика.

Механизмы массивного трафика генов из А-генома в GRC остаются неизвестными. Кроме того, неизвестно, насколько односторонен этот трафик и нет ли обратного движения – из GRC в А-геномы. Если трафик идет в обоих направлениях, то GRC может служить генератором и инкубатором новых А-генов. Если трафик идет только в одном направлении, то виды птиц должны быстро распадаться на матрилинии по составу хромосом, ограниченных зародышевой линией. Это может вести к несовместимости не только с представителями географически изолированных популяций, но и внутри популяций, открывая широкие возможности аллопатрического и симпатрического видообразования.

Воробьинообразные – самый богатый видами подотряд птиц. Он включает 6500 из 10500 известных видов птиц. Все воробьинообразные, и только они, имеют хромосомы, ограниченные зародышевой линией. Не потому ли они так многочисленны и разнообразны?

## Список литературы / References

- 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. *Chromosom. Res.* 2022;30(2-3):255-272. DOI 10.1007/s10577-022-09688-3.
- Boveri T. Ueber Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Anat. Anz.* 1887;2: 688-693.
- Bravo G.A., Schmitt C.J., Edwards S.V. What have we learned from the first 500 avian genomes? *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2021;52: 611-639. DOI 10.1146/annurev-ecolsys-012121-085928.
- Camacho J.P.M. Non-Mendelian segregation and transmission drive of B chromosomes. *Chromosom. Res.* 2022;30(2-3):217-228. DOI 10.1007/s10577-022-09692-7.
- Camacho J.P., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2000;355(1394):163-178. DOI 10.1098/rstb.2000.0556.
- Chen J., Birchler J.A., Houben A. The non-Mendelian behavior of plant B chromosomes. *Chromosome Res.* 2022;30(2):229-239. DOI 10.1007/s10577-022-09687-4.
- D'Ambrosio U., Alonso-Lifante M.P., Barros K., Kovařík A., Mas de Xaxars G., Garcia S. B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytol.* 2017;216(3):635-642. DOI 10.1111/nph.14723.
- Damas J., Kim J., Farré M., Griffin D.K., Larkin D.M. Reconstruction of avian ancestral karyotypes reveals differences in the evolutionary history of macro- and microchromosomes. *Genome Biol.* 2018; 19(1):155. DOI 10.1186/s13059-018-1544-8.
- Dedukh D., Krasikova A. Delete and survive: strategies of programmed genetic material elimination in eukaryotes. *Biol. Rev.* 2022;97(1): 195-216. DOI 10.1111/brv.12796.
- del Priore L., Pigozzi M.I. Histone modifications related to chromosome silencing and elimination during male meiosis in Bengalese finch. *Chromosoma.* 2014;123(3):293-302. DOI 10.1007/s00412-014-0451-3.
- Dröschner A. Images of cell trees, cell lines, and cell fates: the legacy of Ernst Haeckel and August Weismann in stem cell research. *Hist. Philos. Life Sci.* 2014;36(2):157-186. DOI 10.1007/s40656-014-0028-8.



- Gabriel W., Lynch M., Burger R. Muller's ratchet and mutational meltdowns. *Evolution (N. Y.)*. 1993;47(6):1744-1757. DOI 10.2307/2410218.
- Goday C., Pigozzi M.I. Heterochromatin and histone modifications in the germline-restricted chromosome of the zebra finch undergoing elimination during spermatogenesis. *Chromosoma*. 2010;119(3):325-336. DOI 10.1007/s00412-010-0260-2.
- Graphodatsky A.S., Perelman P.L., O'Brien S.J. (Eds.) Atlas of Mammalian Chromosomes. John Wiley & Sons, Inc., 2020. DOI 10.1002/9781119418061.
- Griffin D., Burt D.W. All chromosomes great and small: 10 years on. *Chromosome Res.* 2014;22(1):1-6. DOI 10.1007/s10577-014-9413-0.
- Hanlon S.L., Larracuente A.M. When it comes to genetics, cheaters do prosper. *Chromosome Res.* 2022;30(2):137-139. DOI 10.1007/s10577-022-09705-5.
- Hodson C.N., Ross L. Evolutionary perspectives on germline-restricted chromosomes in flies (Diptera). *Genome Biol. Evol.* 2021;13(6):1-19. DOI 10.1093/gbe/evab072.
- 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.
- Houben A. B chromosomes – a matter of chromosome drive. *Front. Plant Sci.* 2017;8:210. DOI 10.3389/fpls.2017.00210.
- Houben A., Banaei-Moghaddam A.M., Klemme S., Timmis J.N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71(3):467-478. DOI 10.1007/s00018-013-1437-7.
- Itoh Y., Kampf K., Pigozzi M.I., Arnold A.P. Molecular cloning and characterization of the germline-restricted chromosome sequence in the zebra finch. *Chromosoma*. 2009;118(4):527-536. DOI 10.1007/s00412-009-0216-6.
- Johnson Pokorná M., Reifová R. Evolution of B chromosomes: from dispensable parasitic chromosomes to essential genomic players. *Front. Genet.* 2021;12:1-11. DOI 10.3389/fgene.2021.727570.
- 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.
- Maderspacher F. Theodor Boveri and the natural experiment. *Curr. Biol.* 2008;18(7):R279-R286. DOI 10.1016/j.cub.2008.02.061.
- Malinovskaya L.P., Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Akberdina E.A., Kizilova E.A., Romanenko M.V., Shnaider E.P., Scherbakova M.M., Korobitsyn I.G., Rubtsov N.B., Borodin P.M., Torgasheva A.A. Germline-restricted chromosome (GRC) in the sand martin and the pale martin (Hirundinidae, Aves): synopsis, recombination and copy number variation. *Sci. Rep.* 2020;10(1):1058. DOI 10.1038/s41598-020-58032-4.
- Malinovskaya L.P., Slobodchikova A.Y., Grishko E.O., Pristyazhnyuk 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.
- Mueller J.C., Schlebusch S.A., Pei Y., Poignet M., Vontzou N., Ruiz-Ruano F.J., Albrecht T., Reifová R., Forstmeier W., Suh A., Kempenaers B. Micro germline-restricted chromosome in blue tits: Evidence for meiotic functions. *Mol. Biol. Evol.* 2023;40(5):msad096. DOI 10.1093/molbev/msad096.
- Orr H.A., Turelli M. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky–Muller incompatibilities. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 2001;55:1085-1094. DOI 10.1111/j.0014-3820.2001.tb00628.x.
- Pei Y., Forstmeier W., Ruiz-Ruano F.J., Mueller J.C., Cabrero J., Camacho J.P.M., Alché J.D., Franke A., Hoepfner M., Börno S., Gesara I., Hertel M., Teltcher K., Knief U., Suh A., Kempenaers 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.
- Pigozzi M.I., Solari A.J. Extreme axial equalization and wide distribution of recombination nodules in the primitive ZW pair of *Rhea americana* (Aves, Ratitae). *Chromosome Res.* 1997;5(6):421-428. DOI 10.1023/a:1018404610973.
- Pigozzi M.I., Solari A.J. Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Chromosome Res.* 1998;6(2):105-113. DOI 10.1023/A:1009234912307.
- 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.
- Poignet M., Johnson Pokorná M., Altmanová M., Majtánová Z., Dedukh D., Albrecht T., Reif J., Osiejuk T.S., Reifová R. Comparison of karyotypes in two hybridizing passerine species: conserved chromosomal structure but divergence in centromeric repeats. *Front. Genet.* 2021;12:76898. DOI 10.3389/fgene.2021.768987.
- Rahn M.I., Solari A.J. Recombination nodules in the oocytes of the chicken, *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Genome Res.* 1986;43(3-4):187-193. DOI 10.1159/000132319.
- Rubtsov N., Borisov Y. Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes. *Genes (Basel)*. 2018;9(10):490. DOI 10.3390/genes9100490.
- Schlebusch S.A., Rídl 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.
- Schoenmakers S., Wassenaar E., Laven J.S.E., Grootegoed J.A., Baarends W.M. Meiotic silencing and fragmentation of the male germline restricted chromosome in zebra finch. *Chromosoma*. 2010;119(3):311-324. DOI 10.1007/s00412-010-0258-9.
- Smith J.J. Programmed DNA elimination: Keeping germline genes in their place. *Curr. Biol.* 2018;28(10):R601-R603. DOI 10.1016/j.cub.2018.03.057.
- Smith J.J., Timoshevskaya N., Ye C., Holt C., Keinath M.C., Parker H.J., Cook M.E., Hess J.E., Narum S.R., Lamanna F., Kaessmann H., Timoshevskiy V.A., Waterbury C.K.M., Saraceno C., Wiedemann L.M., Robb S.M.C., Baker C., Eichler E.E., Hockman D., Sauka-Spengler T., Yandell M., Krumlauf R., Elgar G., Amemiya C.T. The sea lamprey germline genome provides insights into programmed genome rearrangement and vertebrate evolution. *Nat. Genet.* 2018;50(2):270-277. DOI 10.1038/s41588-017-0036-1.
- Smith J.J., Timoshevskiy V.A., Saraceno C. Programmed DNA elimination in vertebrates. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2021;9(1):173-201. DOI 10.1146/annurev-animal-061220-023220.
- Solari A.J. Equalization of Z and W axes in chicken and quail oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* 1992;59(1):52-56.
- Solari A.J., Moses M.J. The structure of the central region in the synaptonemal complexes of hamster and cricket spermatocytes. *J. Cell Biol.* 1973;56(1):145-152.
- Solari A.J., Pigozzi M.I. Recombination nodules and axial equalization in the ZW pairs of the Peking duck and the guinea fowl. *Cytogenet. Cell Genet.* 1993;64(3-4):268-272.
- Sotelo-Muñoz M., Poignet M., Albrecht T., Kautz O., Dedukh D., Schlebusch S.A., Janko K., Reifová R. Germline-restricted chromosome shows remarkable variation in size among closely related passerine species. *Chromosoma*. 2022;131(1-2):77-86. DOI 10.1007/s00412-022-00771-6.
- Stöck M., Kratochvíl L., Kuhl H., Rovatsos M., Evans B.J., Suh A., Valenzuela N., Veyrunes F., Zhou Q., Gamble T., Capel B., Schartl M., Guiguen Y. A brief review of vertebrate sex evolution with a pledge for integrative research: towards “sexomics”. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2021;376(1832):20200426. DOI 10.1098/rstb.2020.0426.
- Streit A., Wang J., Kang Y., Davis R.E. Gene silencing and sex determination by programmed DNA elimination in parasitic nematodes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016;32:120-127. DOI 10.1016/j.mib.2016.05.012.
- Torgasheva A.A., Malinovskaya L.P., Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Kizilova E.A., Akberdina E.A., Pristyazhnyuk I.E., Shnai-

- der 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;12:2008. DOI 10.3389/fgene.2021.768056.
- Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., ... Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. DOI 10.1126/science.1260419.
- Vontzou N., Pei Y., Mueller J., Reifová R, Ruiz-Ruano F. Schlebusch S., 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.
- Wang J., Davis R.E. Programmed DNA elimination in multicellular organisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2014;27(1):26-34. DOI 10.1016/j.gde.2014.03.012.
- Wang J., Mitreva M., Berriman M., Thorne A., Magrini V., Koutsovoulos G., Kumar S., Blaxter M.L., Davis R.E. Silencing of germline-expressed genes by DNA elimination in somatic cells. *Dev. Cell*. 2012;23(5):1072-1080. DOI 10.1016/j.devcel.2012.09.020.
- Warren W.C., Clayton D.F., Ellegren H., Arnold A.P., Hillier L.W., Kunstner A., Searle S., ... Graves T., Fulton L., Nelson J., Chinwalla A., Hou S., Mardis E.R., Wilson R.K. The genome of a songbird. *Nature*. 2010;464(7289):757-762. DOI 10.1038/nature08819.
- Watson C.M., Margan S.H., Johnston P.G. Sex-chromosome elimination in the bandicoot *Isodon macrourus* using Y-linked markers. *Cytogenet. Genome Res.* 1998;81(1):54-59. DOI 10.1159/000015008.
- Weissman A. Prof. Weismann's theory of heredity. *Nature*. 1890; 41(1058):317-323. DOI 10.1038/041317g0.
- Weissman A. The Germ-Plasm: A Theory of Heredity. New York: Charles Scribner's Sons, 1893.

---

**ORCID ID**

P.M. Borodin orcid.org/0000-0002-6717-844X

**Благодарности.** Работа поддержана грантом Российского научного фонда 23-14-00182. Автор выражает искреннюю признательность А.А. Торгашевой и Л.П. Малиновской за помощь в подготовке статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.05.2023. После доработки 30.06.2023. Принята к публикации 30.06.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Профиль экспрессии генов, связанных с регуляцией стресса, поведения и нейрогенеза, вдоль дорзовентральной оси в гиппокампе у взрослых ручных и агрессивных лисиц

Ю.В. Александрович<sup>1</sup>, Е.В. Антонов<sup>1,2</sup>, С.Г. Шихевич<sup>1</sup>, А.В. Харламова<sup>1</sup>, Л.В. Мейстер<sup>1</sup>, Ю.В. Маковка<sup>1</sup>, Д.В. Шепелева<sup>1</sup>, Р.Г. Гулевич<sup>1</sup>✉, Ю.Э. Гербек<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр трансляционной медицины, Сочи, Россия

<sup>3</sup> Школа ветеринарной медицины им. И. Корета, Факультет сельского хозяйства, продовольственных ресурсов и окружающей среды им. Р.Г. Смита, Еврейский университет в Иерусалиме, Реховот, Израиль

✉ gulevich@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Гиппокамп является ключевой структурой в регуляции стресс-ответа, который, по-видимому, снижен у домашних животных по сравнению с их дикими сородичами. Известно, что гиппокамп функционально неоднороден вдоль дорзовентральной оси, и в регуляции стресса в большей мере участвует вентральная часть. В серии экспериментов на уникальной селекционной модели одомашнивания животных – серебристо-черной лисице (*Vulpes vulpes*), включающей ручных, агрессивных и неселекционированных животных, ранее было показано снижение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы во многих звеньях. Кроме того, что уровень нейрогенеза в гиппокампе повышен у взрослых ручных лисиц, что может быть взаимосвязано со снижением уровня стресса. Тем не менее молекулярно-генетические механизмы снижения стресс-ответа у domesticiрованных животных по-прежнему не ясны. В настоящей работе выполнено сравнение мРНК 13 генов в дорзальном и вентральном гиппокампе и проведен анализ кортизола в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц. Установлено, что на данном этапе domesticiкации стресс-индуцированный уровень кортизола у ручных, агрессивных и неселекционированных животных достоверно отличается друг от друга, причем у ручных животных он самый низкий, а у агрессивных – самый высокий. Выявлены достоверные различия в экспрессии 12 генов между дорзальной и вентральной частями гиппокампа, что в большинстве случаев соответствует аналогичным различиям, найденным у грызунов и человека. У ручных лисиц обнаружен достоверно повышенный уровень в дорзальном гиппокампе мРНК генов цитохрома P450 26B1 (*CYP26B1*) и адренергического рецептора  $\alpha_{1A}$  (*ADRA1A*), а в вентральном гиппокампе – мРНК гена минералокортикоидного рецептора (*NR3C2*). Эти гены могут быть важной частью механизма снижения стресса по отношению к человеку и взаимосвязи регуляции стресса и нейрогенеза у взрослых ручных лисиц в частности и domesticiрованных животных вообще.

Ключевые слова: ручное поведение; агрессия; domesticiкация; серебристо-черные лисицы; кортизол.

**Для цитирования:** Александрович Ю.В., Антонов Е.В., Шихевич С.Г., Харламова А.В., Мейстер Л.В., Маковка Ю.В., Шепелева Д.В., Гулевич Р.Г., Гербек Ю.Э. Профиль экспрессии генов, связанных с регуляцией стресса, поведения и нейрогенеза, вдоль дорзовентральной оси в гиппокампе у взрослых ручных и агрессивных лисиц. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):651-661. DOI 10.18699/VJGB-23-76

## The expression profile of genes associated with behavior, stress, and adult neurogenesis along the hippocampal dorsoventral axis in tame and aggressive foxes

Yu.V. Alexandrovich<sup>1</sup>, E.V. Antonov<sup>1,2</sup>, S.G. Shikhevich<sup>1</sup>, A.V. Kharlamova<sup>1</sup>, L.V. Meister<sup>1</sup>, Y.V. Makovka<sup>1</sup>, D.V. Shepeleva<sup>1</sup>, R.G. Gulevich<sup>1</sup>✉, Yu.E. Herbeck<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Translational Medicine, Sochi, Russia

<sup>3</sup> Koret School of Veterinary Medicine, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

✉ gulevich@bionet.nsc.ru

**Abstract.** The hippocampus plays the key role in stress response regulation, and stress response appears to be weakened in domesticated animals compared to their wild relatives. The hippocampus is functionally heterogeneous along its dorsoventral axis, with its ventral compartment being more closely involved in stress regulation. An earlier series of experiments was conducted with a unique breeding model of animal domestication, the farm silver fox (*Vulpes vulpes*), which included tame, aggressive, and unselected animals. A decrease in many indices of the hypothalamic–pituitary–adrenal activity was observed in tame animals. Also, adult hippocampal neurogenesis was more intense in tame foxes, and this fact may relate

to reduced stress levels in this experimental population of foxes. Nevertheless, the molecular mechanisms responsible for the reduced stress response in tame animals remain obscure. In this study, serum cortisol levels and the mRNA levels of 13 genes in the dorsal and ventral hippocampus have been measured and compared in tame, aggressive, and unselected foxes. At the current stage of domestication, stress-induced cortisol levels in tame, aggressive, and unselected animals differ significantly from each other: tame foxes show the lowest levels, and aggressive ones, the highest. Twelve genes tested demonstrate significant gene expression differences between the dorsal and ventral hippocampi. These differences are mainly consistent with those found in rodents and humans. In tame foxes, significantly elevated mRNA levels were recorded for several genes: *CYP26B1* for cytochrome P450 26B1 and *ADRA1A* for  $\alpha_{1A}$  adrenergic receptor in the dorsal hippocampus, whereas the level of *NR3C2* mRNA for mineralocorticoid receptor was higher in the ventral. It is presumed that these genes constitute an important part of the mechanism reducing stress induced by contacts with humans and contribute to linking stress regulation with adult neurogenesis in tame foxes and domesticated animals in general.

Key words: tame behavior; aggression; domestication; silver fox; cortisol.

**For citation:** Alexandrovich Yu.V., Antonov E.V., Shikhevich S.G., Kharlamova A.V., Meister L.V., Makovka Y.V., Shepeleva D.V., Gulevich R.G., Herbeck Yu.E. The expression profile of genes associated with behavior, stress, and adult neurogenesis along the hippocampal dorsoventral axis in tame and aggressive foxes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):651-661. DOI 10.18699/VJGB-23-76

## Введение

Гиппокамп – важная структура мозга, которая участвует в регуляции таких процессов, как стресс-ответ, обучение, пространственная и память социального распознавания и консолидация памяти. Объем гиппокампа у млекопитающих и птиц и уровень нейрогенеза у взрослых млекопитающих, вероятно, связан со способностью к пространственной ориентации и памяти, и, возможно, изменение морфологии гиппокампа вызвано адаптивной эволюцией (Jacobs et al., 1990; Jacobs, Spencer, 1994; Rehkämper et al., 2008; Croston et al., 2015; Sonnenberg et al., 2019). Однако некоторые исследователи считают, что хотя уровень нейрогенеза и объем гиппокампа адаптивны, они не связаны с памятью или пространственной ориентацией (Lipp, 2017). Так, 15-кратный уровень нейрогенеза в гиппокампе у взрослых рыжих лисиц по сравнению с собакой (Amrein, Slomianka, 2010) может быть связан с пространственным запоминанием, характерным для лисиц при запасании пищи (Sklepkovych, Montecchi, 1996). Кроме того, известно, что поле CA2 участвует в формировании социальной памяти и в процессах распознавания (Tzakis, Holahan, 2019). Объем же CA1 и CA3 у приматов, по-видимому, ассоциирован с социальными и экологическими сигналами, такими как размер группы и домашнего ареала (Todorov et al., 2019).

Гиппокамп является одним из ключевых звеньев центральной регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС). Известно, что он функционально и структурно неоднороден вдоль дорзовентральной оси. Считается, что с регуляцией активности ГГНС, стрессорным и эмоциональным ответом связана преимущественно вентральная часть гиппокампа, а с когнитивными функциями – дорзальная (O’Leary, Cryan, 2014; Gulyaeva, 2019), что, вероятно, обусловлено расположением этих частей гиппокампа и, соответственно, большим количеством проекций у дорзального гиппокампа в кору, а у вентрального – в структуры, относящиеся к лимбической системе (O’Leary, Cryan, 2014).

В гиппокампе, наряду с субэпендимальной зоной боковых желудочков, постоянно происходит нейрогенез – даже во взрослом возрасте (Ming, Song, 2011). При этом уровень нейрогенеза в большинстве случаев снижается при воздействии стресса, и наоборот, высокий уровень

нейрогенеза уменьшает эффект стресса на гиппокамп (Levone et al., 2015). Таким образом, существуют взаимные влияния стресса на функциональный ответ гиппокампа, и наоборот. По-видимому, эффект стресса в разной степени действует на нейрогенез вдоль дорзовентральной оси (O’Leary, Cryan, 2014). Возможно, поэтому у ручных лисиц, стресс-реактивность которых существенно ниже, уровень нейрогенеза в гиппокампе выше, чем у неселекционированных, причем самые заметные различия обнаружены в вентральной и средней частях (Huang et al., 2015). В то же время важно отметить, что в исследованиях, проведенных на собаках, различия между дорзальным и вентральным гиппокампом сохранялись на одном уровне, несмотря на существенные различия в общем уровне нейрогенеза между особями (Lowe et al., 2015).

В экспериментах с образцами гиппокампа крыс, мышей и человека обнаружены различия между дорзальным и вентральным гиппокампом также на уровне экспрессии генов, что, вероятно, отражает как функциональные, так и структурные различия вдоль его оси (Cembrowski et al., 2016; Lee et al., 2017; Floriou-Servou et al., 2018; Vogel et al., 2020). Однако у других таксонов, несмотря на функциональные и структурные особенности, паттерн экспрессии этих генов в гиппокампе вдоль дорзовентральной оси не изучался.

Поэтому в данной работе для исследования изменений экспрессии генов вдоль дорзовентральной оси и поиска молекулярно-генетических механизмов взаимодействия нейрогенеза и стресса было оценено количество мРНК 13 генов в дорзальном и вентральном отделах гиппокампа у серебристо-черных лисиц – модели доместикации животных, созданной многолетним отбором на эмоционально-положительное («ручные») или на агрессивное поведение по отношению к человеку, контролем к которым служили лисицы, не подвергнутые сознательному отбору по поведению.

Известно, что они существенно различаются по глюкокортикоидному стресс-ответу и активности ГГНС во многих звеньях, что, по-видимому, является общей особенностью домашних животных (Belyaev, 1979; Price, 2000; Трут и др., 2004; Trut et al., 2009), и уровню нейрогенеза в гиппокампе во взрослом состоянии (Huang et al., 2015). Полногеномный анализ доместизируемых лисиц выявил

гены из системы ретиноевой кислоты, связанной с активацией нейрогенеза, которые локализованы в регионах, предположительно подвергнутых отбору (Kukekova et al., 2018; Трут и др., 2021). Кроме того, обнаружено, что количество мРНК одного из этих генов, *CYP26B1*, в дорзальном гиппокампе ручных лисиц отличается от такового у агрессивных (неопубликованные данные). Вероятно, это один из механизмов изменения взрослого нейрогенеза у лисиц, что может тоже влиять на уровень стресса, обучение и память, а также социальное поведение. Однако ничего не известно об изменении этого гена в вентральной части гиппокампа лисиц различного поведения, хотя у мыши, крысы и человека его повышенная экспрессия считается маркером дорзального гиппокампа.

Помимо гена *CYP26B1*, в данной работе было исследовано количество мРНК в дорзальном и вентральном гиппокампе других генов, экспрессия которых у мыши, крысы или человека существенно изменялась вдоль дорзовентральной оси (Vogel et al., 2020) (см. табл. 1), с одной стороны, и которые были связаны с нейрогенезом, стрессом или поведением, с другой. Гены *NR3C1*, *NR3C2* и *HSD11B1* участвуют в регуляции ГГНС – глюкокортикоидных рецепторов первого и второго типа, и 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы первого типа (de Kloet et al., 2016). *NR2F2* является одним из наиболее четких маркеров положения вдоль дорзовентральной оси гиппокампа и в то же время, по-видимому, играет роль медиатора в транскрипционной активности, индуцированной рецепторами глюкокортикоидов и ретиноевой кислоты, что, вероятно, связано со взаимодействием стресса и нейрогенеза (de Martino et al., 2004; Vogel et al., 2020). Ген *ADRA1A* адренергического рецептора  $\alpha_{1A}$  известен возможной ролью в регуляции поведения и нейрогенеза (Doze et al., 2011; Vogel et al., 2020). *KCND2*, *KCND3*, *CADM2*, *CPNE2* – гены, связанные с  $K^{+}$ - и  $Ca^{2+}$ -зависимой синаптической передачей и глутаматной трансмиссией (Corradini et al., 2014; Truvé et al., 2020; Haddjeri-Hopkins et al., 2021; Xiao et al., 2021), которая, по-видимому, является важнейшей в доместикационных изменениях поведения (O'Rourke, Voescx, 2020; Трут и др., 2021). Экспрессия же генов *TRHR*, *LCT* и *NTS* использовалась в предыдущих работах в качестве маркеров вентрального и дорзального гиппокампов соответственно (Cembrowski et al., 2016; Lee et al., 2017).

Полученные ранее данные о глюкокортикоидном стресс-ответе у лисиц требуют дополнительных исследований на современном этапе отбора по следующим причинам. Параллельная экспериментальная модель доместикации на серых крысах, селекционированная по критериям, близким к лисицам, после более чем 60 поколений отбора дикой родительской популяции потеряла различия в глюкокортикоидном стресс-ответе между ручными и агрессивными животными. Скорее всего, это произошло вследствие адаптации агрессивных крыс к человеку и условиям неволи (Прасолова и др., 2014). В предыдущих исследованиях использовали несоциальный рестрикционный стресс (Трут и др., 2004; Трут et al., 2009). Эта методика менее корректная, чем использование социального стресса при изучении контактов животных между собой и с человеком. Так, показано, что у крыс,

селекционированных на высокий уровень тревожно-подобного поведения, рестрикционный стресс вызывает больший кортикостероновый стресс-ответ, чем у крыс, селекционированных на низкий уровень, а при социальном стрессе в тесте резидент-интродер – наоборот (Veemeta, Neumann, 2007). Поэтому в нашей работе исследован стресс-ответ на комбинированное воздействие – удержание лисицы социальным объектом (человеком). Удержание на руках в течение 15 мин является стрессором для всех трех популяций лисиц, так как при отборе лисиц никогда не брали на руки и они имели возможность избежать контакта с человеком.

## Материалы и методы

**Экспериментальные животные.** Исследование проводили на трех группах серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*): доместизируемые, агрессивные и неселекционированные животные. Селекция ведется более 60 лет на эмоционально-положительную (у доместизируемых) или на агрессивно-оборонительную (у агрессивных) реакции по отношению к человеку (Belyaev, 1979; Трут и др., 2004; Трут et al., 2009) в ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН, Новосибирск.

Образцы крови взяты из *v. safena* у 6–7-месячных самцов перед стрессом (удержанием на руках человека в течение 15 мин) и сразу после этого воздействия. Интактных, без предварительного воздействия стресса, 7–8-месячных самцов умерщвляли путем введения 5 % раствора тиопентала натрия. Были взяты фрагменты дорзальной и вентральной частей гиппокампа. Все образцы хранились при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами работы с лабораторными хищными млекопитающими» (ГОСТ 33217-2014) и международными европейскими биоэтическими стандартами (директива 2010/63/EU).

**Хроматографический анализ.** Содержание кортизола в сыворотке крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф Agilent 1200 Series LC) с использованием диоднолучного детектора, как в предыдущих исследованиях (Овчинников и др., 2018). Для концентрирования образцов применяли жидкостную экстракцию дихлорэтаном. Элюирование проводили в изократическом режиме: 30 % ацетонитрила в воде со скоростью подачи элюента 1 мл/мин. Для количественного анализа была выбрана длина волны 246 нм. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке ZORBAX C18 2 $\times$ 150 мм, 5 мкм. Концентрации вычисляли по внутреннему стандарту (дексаметазон).

**Выделение суммарной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени.** РНК выделяли с помощью TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.) согласно инструкциям производителя, как описано в (Овчинников и др., 2018). Концентрацию РНК, а также отношение поглощения на длинах волн (нм) A260/A280 и A260/A230 для определения чистоты выделения РНК измеряли на приборе NanoPhotometer N50 (Implen, Германия). Далее удаляли геномную ДНК из препаратов РНК, используя набор DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Литва). кДНК синтезировали в объеме 20 мкл с использованием 0.2 мкг РНК, свободной

от ДНК, с помощью набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Литва).

Последовательности праймеров к исследуемым генам были подобраны в интернет-ресурсе Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Последовательности для каждого праймера приведены в табл. 1.

ПЦР в реальном времени проводили на приборе Roche LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Швейцария). Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 4 мкл кДНК (разведенных в 20 раз), 0.3 мкл праймеров (10 пкмоль/мкл), 7.4 мкл воды MQ и 8 мкл концентрата «2.5× реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I», кат. № M-427 («Синтол», Россия). Каждую реакцию выполняли в двух технических повторах.

Результаты обрабатывали модифицированным методом  $\Delta\Delta C_t$  (Livak, Schmittgen, 2001), позволяющим учитывать эффективность реакции, в программе GenEx ver.6 (Multi-D, Швеция). В качестве референсного гена использовали *CANX* (Calnexin) ввиду высокого уровня и стабильности экспрессии как между отдельными лисицами, так и между дорзальным и вентральным гиппокампом, подтвержденной с помощью программы NormFinder (Andersen et al., 2004). За единицу относительной экспрессии (калибратор) принимали среднюю экспрессию каждого гена. Кроме того, для корректного сравнения результатов нескольких планшетов использовали дополнительный внешний образец, который присутствовал на всех планшетах.

**Статистическая обработка.** Статистическую значимость результатов концентрации гормонов в экспериментальных группах оценивали с помощью факторного дисперсионного анализа с повторяющимися измерениями, с последующим *post-hoc* анализом Фишера (Fisher LSD), прирост уровня кортизола оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Для сравнения результатов ОТ-ПЦР применяли тест Краскела–Уоллеса. Парные сравнения проводили, используя тест Манна–Уитни. Непараметрические критерии были применены, так как выборки не соответствовали нормальному распределению согласно критерию Колмогорова–Смирнова.

Для анализа использовали программные пакеты Statistics ver.10, StatSoft (США) и GenEx ver.6 (Multi-D, Швеция). Во всех случаях величина  $p < 0.05$  считалась статистически значимой. Результаты на графиках представлены в виде значений среднего  $\pm$  ошибка среднего.

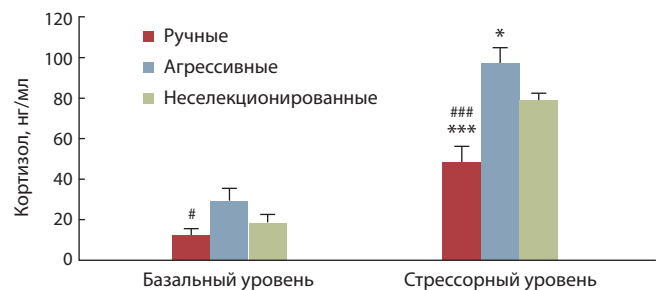
## Результаты

### Анализ количества кортизола в сыворотке крови в ответ на стресс

Факторный дисперсионный анализ с повторяющимися измерениями выявил эффект генотипа ( $F_{2,28} = 9.62, p < 0.001$ ) и эффект стресса на уровень кортизола ( $F_{2,28} = 179.72, p < 0.001$ ). Взаимодействие фактора генотипа и фактора стресса также достоверно ( $F_{2,28} = 9.36, p < 0.01$ ). Базальный уровень кортизола в сыворотке крови у одомашниваемых лисиц был ниже, чем у агрессивных (рис. 1,  $p < 0.05$ ), и не отличался статистически от неселекционированных.

**Таблица 1.** Праймеры, использованные в ПЦР в реальном времени

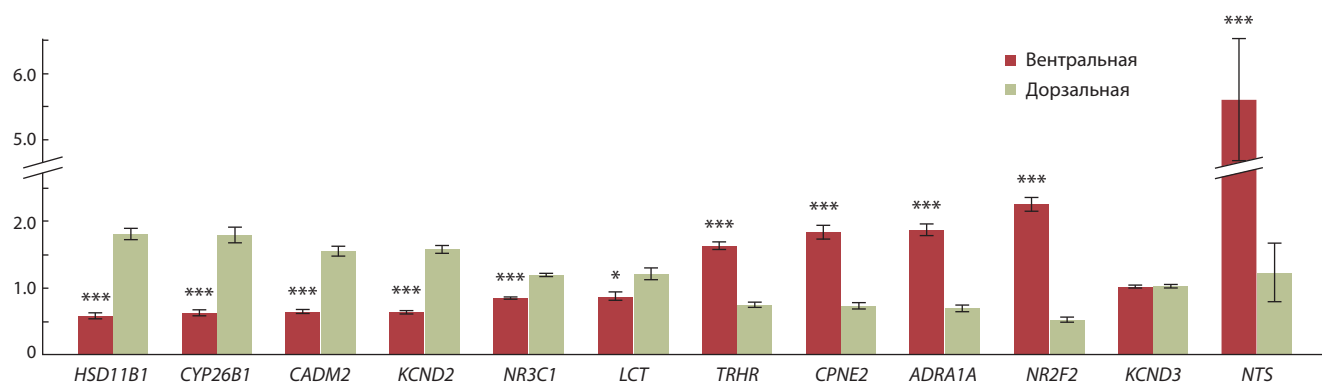
Ген	Последовательности праймеров
<i>NTS</i>	fNTS-F1: 5'-TGGTGTGCATGATACTTCTGG-3' fNTS-R1: 5'-ACACTTGCCTTGTGTATCTTTG-3'
<i>NR2F2</i>	fNR2F2-F3: 5'-AGCCAAGGAATGTGTCCAAG-3' fNR2F2-R3: 5'-CAATTCAGGAACCTAAGCGGGA-3'
<i>ADRA1A</i>	fADRA1A-F: 5'-CGTGCTCCAGTCAAGAGTTT-3' fADRA1A-R: 5'-AAGGTATAGCCCAGGGTGTG-3'
<i>CPNE2</i>	fCPNE2-F6: 5'-CCAGGTCATGTGTACGACT-3' fCPNE2-R6: 5'-CCTTTGCTTCTTGGGGTTGA-3'
<i>CYP26B1</i>	fCYP26B1-F1: 5'-TTCTTTGGCCTGGACTCGAA-3' fCYP26B1-R1: 5'-GGCTAGGCGCAGTTAGAC-3'
<i>CADM2</i>	fCADM2-F3: 5'-GTAGCCATAACAACCCAGCCC-3' fCADM2-R3: 5'-AGAACACAGCGTGACAAATACA-3'
<i>KCND2</i>	fKCND2-F1: 5'-GAAACCTTCCGCATCCAAA-3' fKCND2-R1: 5'-ACATTCTTCCATCTTGGCGTT-3'
<i>KCND3</i>	fKCND3-F6: 5'-CAGAGACCGATAAACGCAG-3' fKCND3-R6: 5'-GTGCAGATAGGCATTGGAGC-3'
<i>TRHR</i>	fTRHR-F1: 5'-GACTCAACCCATCAGAACAAGA-3' fTRHR-R1: 5'-GGGCATCCATAAAAGGGCAA-3
<i>LCT</i>	fLCT-F1: 5'-AAGAACGGCGATTACAACGA-3' fLCT-R1: 5'-TGCCATTGATCCTCTCTTCT-3'
<i>HSD11B1</i>	fHSD11B1-F2: 5'-GCAAGGGGATTGGAGAACAG-3' fHSD11B1-R2: 5'-GGTGCCAGGAATGTAGTGTG-3'
<i>NR3C1</i>	fNR3C1-F6: 5'-CAAGCTGGGATGAACCTTGA-3' fNR3C1-R6: 5'-AGTTTCTTGTGACGCTCTCG-3'
<i>NR3C2</i>	fNR3C2-F7: 5'-AAAGGCTACCACAGTCTCCC-3' fNR3C2-R7: 5'-TCATCGGTCCTCTCTGTAGG-3'
<i>CANX</i>	CANX-F1: 5'-GATGCCCTTGCTAAGATTCC-3' CANX-R1: 5'-CTTCATCCCAATCCTCTGGC-3'



**Рис. 1.** Базальный и индуцированный стрессом уровень кортизола в сыворотке крови ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц ( $n = 11$  в каждой группе).

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с неселекционированными лисицами. #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  по сравнению с агрессивными лисицами.

Прирост уровня кортизола в крови был статистически значимым независимо от генотипа. Однако у одомашниваемых лисиц он менее выражен, чем у агрессивных и неселекционированных. Поэтому стрессорный уровень кортизола у агрессивных и неселекционированных превы-



**Рис. 2.** Различия в относительном количестве мРНК генов между дорзальной и вентральной частями гиппокампа ( $n = 18$  в каждой группе).

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с дорзальной частью гиппокампа.

**Таблица 2.** Различия в экспрессии генов между дорзальным и вентральным гиппокампом у разных видов животных

Животное	HSD11B1	CYP26B1	CADM2	KCND2	NR3C1	LCT	NR3C2	TRHR	CPNE2	ADRA1A	NR2F2	KCND3	NTS	Литературный источник
Мышь	в (DG) д (CA1)	д (CA3)	д (DG, CA3, CA1)	д (DG, CA3, CA1)	–	д (DG, CA3)	д (DG, CA1)	–	в (CA3, CA1)	в (CA1)	в (CA3, CA1)	в (CA3, CA1)	–	Cembrowski et al., 2016
	д	д	д	д	–	д	д	в	в	в	в	в	в	Floriou-Servou et al., 2018
Крыса	–	д	д	д <sup>а</sup>	д <sup>с</sup>	–	д <sup>б</sup>	в	в	–	в	–	д	Lee et al., 2017
Человек	в	д	д	–	–	в	–	в	в	в	в	–	д	Vogel et al., 2020
Лисица	д	д	д	д	д	д	д	в	в	в	в	–	в	Наши данные
$p$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.018	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05	<0.001	

Примечание. CA1, CA3, DG (зубчатая извилина) – поля гиппокампа. «д» – для генов с большим количеством мРНК в дорзальной области, «в» – для генов с большим количеством мРНК в вентральной области; «–» – не установлено;  $p$  в соответствии с критерием Манна–Уитни.

<sup>а</sup> 28 и 45 дней (развивающиеся животные); <sup>б</sup> 28 дней; <sup>с</sup> мРНК *Nr3c1* крыс из (Квичанский и др., 2017).

пает его значение у ручных лисиц ( $p < 0.001$ , см. рис. 1), в то же время у агрессивных этот показатель выше, чем у неселекционированных ( $p < 0.05$ , см. рис. 1).

#### Анализ количества мРНК генов

##### в дорзальном и вентральном гиппокампе лисиц

С помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени обнаружено достоверно большее количество мРНК в дорзальном гиппокампе генов *HSD11B1*, *CYP26B1*, *CADM2*, *KCND2*, *NR3C1*, *LCT*, *NR3C2* и в вентральном у *TRHR*, *CPNE2*, *ADRA1A*, *NR2F2*, и не обнаружено в случае *KCND3* (рис. 2, табл. 2). У *NTS* имеет место большой разброс в количестве мРНК в гиппокампе разных лисиц, но экспрессия во всех случаях выше в вентральной части (см. рис. 2, табл. 2), точно так же, как уровень нейрогенеза в исследованиях на собаках (Lowe et al., 2015).

##### Анализ количества мРНК генов в гиппокампе

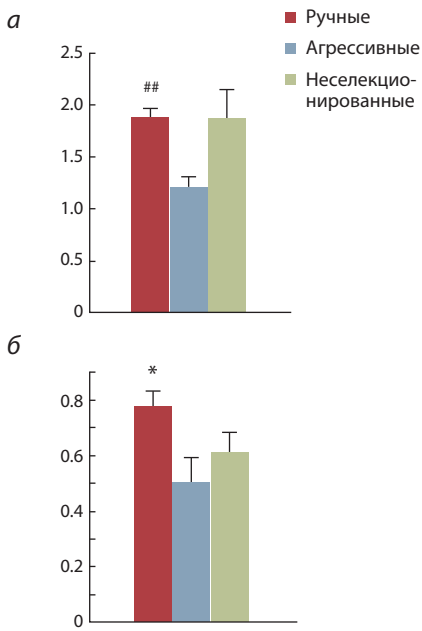
##### ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц

Сравнение мРНК генов, указанных в табл. 2, у различных групп лисиц (ручных, агрессивных и неселекционированных) критерием Краскела–Уоллеса выявило влияние гено-

типа на количество мРНК генов *CYP26B1* ( $H(2, n = 19) = 8.89$ ;  $p = 0.02$ ) и *ADRA1A* ( $H(2, n = 19) = 7.81$ ;  $p = 0.02$ ) в дорзальном гиппокампе, а также гена минералокортикоидного рецептора *NR3C2* ( $H(2, n = 19) = 7.07$ ;  $p = 0.03$ ) в вентральном гиппокампе. Достоверное превышение мРНК у ручных лисиц показано: для гена *CYP26B1* – по сравнению с агрессивными ( $p = 0.003$ ) (рис. 3, а), а для гена *ADRA1A* – по сравнению как с агрессивными ( $p = 0.027$ ), так и с неселекционированными ( $p = 0.038$ ) (см. рис. 3, б). В вентральном гиппокампе обнаружено достоверное превышение количества мРНК гена минералокортикоидного рецептора *NR3C2* у ручных лисиц по сравнению с неселекционированными ( $p = 0.011$ ) (рис. 4).

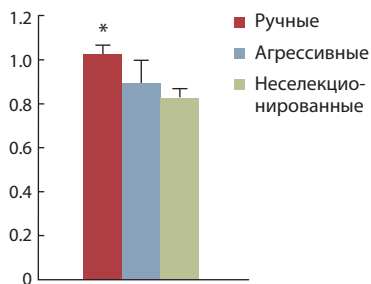
#### Обсуждение

Наши результаты показали, что в гиппокампе лисиц, как и у других видов (крыса, мышь и человек) (Cembrowski et al., 2016; Lee et al., 2017; Floriou-Servou et al., 2018; Vogel et al., 2020), прослеживаются значительные различия в количестве мРНК некоторых генов между дорзальным и вентральным участками. В целом эти различия согласуются с данными литературы по крысам и мышам (см. табл. 2).



**Рис. 3.** Относительное количество мРНК генов *CYP26B1* (а) и *ADRA1A* (б) в дорзальной части гиппокампа у ручных ( $n = 7$ ), агрессивных ( $n = 6$ ) и неселекционированных ( $n = 6$ ) лисиц.

##  $p < 0.01$  по сравнению с агрессивными лисицами; \*  $p < 0.05$  по сравнению с агрессивными и неселекционированными лисицами.



**Рис. 4.** Относительное количество мРНК *NR3C2* в вентральной части гиппокампа у ручных ( $n = 7$ ), агрессивных ( $n = 6$ ) и неселекционированных ( $n = 6$ ) лисиц.

\*  $p < 0.05$  по сравнению с неселекционированными лисицами.

Согласно недавним исследованиям с использованием данных экспрессии генов человека из Allen Brain Atlas, около 5 тысяч генов изменяют свою экспрессию вдоль дорзовентральной оси гиппокампа (Vogel et al., 2020). Среди них некоторые гены имеют линейное или приближенное к линейному изменение экспрессии и могут рассматриваться как маркеры положения вдоль оси, другие имеют нелинейные паттерны экспрессии.

Одним из маркеров, наиболее строго предсказывающих место на оси, является *NR2F2*, кодирующий фактор транскрипции COUP-TFII. У этого гена выявлено большее количество мРНК в вентральном гиппокампе по сравнению с дорзальным во всех проведенных исследованиях на крысах, мышах, человеке и в настоящем исследовании на лисицах. Его экспрессия во взрослом гиппокампе ограничена в основном ГАМК- и глутаматергическими нейронами (Jinno, Kosaka, 2010). Количество ГАМКергических нейронов повышается вдоль дорзовентральной оси (Jinno, Kosaka, 2010), так же как и экспрессия *NR2F2*. Однако, несмотря на это, экспрессия *NR2F2* в дорзальном гиппокампе преимущественно ограничена ГАМКергическими нейронами, что указывает на их высокую плотность и в дорзальной области (Fuentealba et al., 2010). Различная функция отделов гиппокампа может быть связана с распределением нейронов вдоль дорзовентральной оси. Известно, что экспрессия никотинового ацетилхолинового рецептора  $\alpha_7$  (*CHRNA7*) в гиппокампе, тоже ограниченная ГАМКергическими нейронами, участвует в регуляции агрессии (Lewis et al., 2018). Тем не менее различий в экспрессии *NR2F2* между поведенческими группами лисиц не обнаружено, что говорит о регуляции агрессии другими механизмами.

У некоторых генов в разных работах и у разных видов обнаружены противоположные отношения количества мРНК в дорзальном и вентральном гиппокампе или отсутствие различий у одних видов и наличие – у других (см. табл. 2). Например, в данном исследовании к таким генам относятся *KCND3* и *NTS*. Эти различия могут объясняться нелинейным паттерном экспрессии вдоль дорзовентральной оси, а значит, возможным влиянием взятия образцов из неравнозначных частей гиппокампа в разных экспериментах. В других случаях видоспецифичность экспрессии некоторых генов может быть связана с морфофункциональной видоспецифичностью самого гиппокампа. Например, гиппокампальный нейрогенез у лисиц значительно превышает нейрогенез ряда млекопитающих (Amrein, Slomianka, 2010). Причиной морфофизиологической видоспецифичности также могут быть экологические особенности видов, в частности с пространственным поведением при создании запасов пищи (Jacobs et al., 1990; Jacobs, Spencer, 1994; Rehkämper et al., 2008; Amrein, 2015; Croston et al., 2015; Lipp, 2017; Sonnenberg et al., 2019). Можно предположить, что и 15-кратный уровень гиппокампального нейрогенеза у рыжих лисиц по сравнению с собакой (Amrein, Slomianka, 2010) связан с пространственным поведением при создании запасов пищи, которое характерно для них, согласно (Sklepkovych, Montevecchi, 1996).

Поскольку гиппокамп, и особенно его вентральная часть, является ключевой структурой в регуляции стресс-ответа, было проведено исследование глюкокортикоидного ответа ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц современного этапа селекции. Важность изучения стресс-ответа на разных этапах селекции по поведению была показана на параллельной модели – ручных и агрессивных серых крысах, которые на данном этапе селекции не проявляют достоверных различий в глюкокортикоидном стресс-ответе (Прасолова и др., 2014). Обнаруженные достоверные различия между ручными, агрессивными и неселекционированными животными схожи с ранее полученными данными (Trut et al., 2009). Таким образом, можно видеть, что у экспериментальных лисиц рестрикционный и комбинированный рестрикционный и эмоциональный стресс приводят к одинаковым различиям в кортизолном стресс-ответе у поведенческих групп животных, которые сохраняются на данном этапе селекции. Однако неселекционированные животные имели промежуточный уровень глюкокортикоидного стресс-ответа по сравнению с ручными и агрессивными лисицами, тогда как в исследованиях прошлых лет уровень стресс-ответа агрессивных лисиц не отличался от неселекционированных. Эти расхождения могут быть связаны как с усилением стресс-ответа вследствие отбора на агрессивность, так и с процессом естественного отбора неселекционированных лисиц в сторону адаптации к сосуществованию с человеком. Кроме того, эти различия могут быть обусловлены разным дизайном эксперимента (рестрикционный стресс с ограничением передвижения в клетке против удержания на руках) и методикой измерения (радиоиммунный метод против ВЭЖХ).



Вероятно, пониженный ответ на стресс разного типа у ручных лисиц может быть основной причиной повышенного уровня нейрогенеза в гиппокампе взрослых лисиц, как показано в работах на других животных (Levone et al., 2015). Поэтому при поиске молекулярно-генетических механизмов изменений нейрогенеза мы в первую очередь обратили внимание на количество мРНК генов глюкокортикоидного (*NR3C1*, ГР) и минералокортикоидного (*NR3C2*, МР) рецепторов в гиппокампе. Однако различий в количестве мРНК *NR3C1* ни в дорзальной, ни в вентральной части гиппокампа между животными разного поведения не обнаружено, хотя разные группы исследователей рассматривали эти рецепторы как важные гены-кандидаты, связанные с домашикацией (Оськина и др., 2008; Pörtl, Jung, 2017). Известно, что клетки-предшественники нейронов в субвентрикулярной зоне экспрессируют *NR3C1*, но не *NR3C2* (García et al., 2004). По-видимому, активация *NR3C1* в этих клетках – механизм прямого влияния глюкокортикоидов на нейрогенез (Saaltink, Vreugdenhil, 2014). Возможно, в этой субпопуляции клеток гиппокампа существуют различия в экспрессии *NR3C1* у лисиц различного поведения.

В то же время количество мРНК гена *NR3C2* в вентральном гиппокампе оказалось больше у ручных лисиц, чем у агрессивных. Вероятно, у неселекционированных лисиц оно находится между ручными и агрессивными, однако это различие уже выходит за пределы определения методом количественной ПЦР. Однако, если исследовать отдельно сплайс-варианты, которых у грызунов известно три –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , то различие между группами в экспрессии какого-то из сплайс-вариантов будет выше. Известно, что их экспрессия при клеточном стрессе может меняться неравномерно в первичной культуре клеток коры (Kang et al., 2009). В нашем исследовании был проанализирован только общий пул мРНК *NR3C2* из-за недостаточного аннотирования генома лисицы. Кроме того, количество рецептора *NR3C2* не одинаково в разных типах клеток гиппокампа (Le Menuet, Lombès, 2014). Важно отметить, что различия обнаружены именно в вентральном гиппокампе, который, по-видимому, в большей степени отвечает за регуляцию стресс-ответа и эмоций, чем дорзальный (Gulyaeva, 2019).

В ряде экспериментальных работ на грызунах было показано, что повышенное количество МР связано с пониженной тревожностью, активной стратегией преодоления стресса, а у самок – с ослаблением стресс-ответа (Lai et al., 2007; Rozeboom et al., 2007; Kanatsou et al., 2015; de Kloet et al., 2016). В *post mortem* исследованиях человека выявлено, что депрессия вызывает снижение МР в переднем (соответствует вентральному у грызунов), но не в заднем (дорзальному) гиппокампе, при этом ГР изменен не был (Medina et al., 2013). У крыс также обнаружено, что изменение экспрессии МР под действием стресса изменяет синаптическую пластичность в вентральном (но не дорзальном) гиппокампе (Maggio, Segal, 2009; O'Leary, Cryan, 2014). Повышение экспрессии *NR3C2* в нейроглии, вероятно, может повышать нейрогенез при остром стрессе в вентральном гиппокампе (Le Menuet, Lombès, 2014; O'Leary, Cryan, 2014). Известно также, что у нокаутных

*NR3C2* мышей пролиферация клеток-предшественников снижалась (Gass et al., 2000), а повышенная экспрессия *NR3C2* в переднем мозге приводила к повышенной пролиферации клеток-предшественников и увеличению количества молодых нейронов в зубчатой извилине гиппокампа (Kanatsou et al., 2017). С другой стороны, показано, что МР сигнализация в гиппокампе участвует в регуляции начала и величины стрессорной реакции (Ratka et al., 1989; Harris et al., 2013; de Kloet et al., 2016), а инициация стресса ведет к повышению количества МР в гиппокампе (Veenema et al., 2003; de Kloet et al., 2016). Противоположные эффекты МР, а также их агонистов и антагонистов могут быть связаны с разным количеством МР у животных в начале эксперимента (de Kloet et al., 2016). Вероятно, обнаруженное нами большее количество мРНК МР (но не ГР) в вентральном гиппокампе ручных лисиц является одним из механизмов снижения стресса и тревожности при экспериментальной домашикации, а возможно, опосредованно повышенным нейрогенезом в этой части гиппокампа. Однако дальнейшие исследования позволят получить данные об экспрессии сплайс-вариантов МР и распределении белка в гиппокампе.

У лисиц разного поведения были обнаружены различия в количестве мРНК генов *CYP26B1* (в дорзальном) и *ADRA1A* (в вентральном), которые, как упоминалось выше, различаются также вдоль дорзовентральной оси гиппокампа. На необходимость подробного изучения экспрессии *CYP26B1* в трех популяциях и в разных отделах гиппокампа указали различия в количестве мРНК, выявленные при анализе ограниченного количества образцов дорзального гиппокампа ручных и агрессивных лисиц методом RNAseq (неопубликованные данные). Ген *CYP26B1* кодирует фермент из суперсемейства цитохромов P450. Этот фермент катализирует деградацию политранскриптовой (птРК) кислоты, производной витамина А. Можно предположить, что изменение экспрессии гена *CYP26B1* ассоциировано с различной концентрацией птРК в гиппокампе ручных и агрессивных лисиц.

Известно, что птРК моделирует нейрогенез. Однако ее эффект проявляется в виде перевернутой U-образной кривой. Дефицит птРК приводит к снижению дифференциации нейронов, повышение концентрации – к усилению нейрогенеза как пролиферации, так и дифференциации нейральных стволовых клеток, а высокая концентрация птРК ингибирует пролиферацию клеток, при этом изменяются когнитивные функции и поведение (Kane et al., 2010; Hu et al., 2016, 2020; Stoney, McCaffery, 2016; Stoney et al., 2016; Mishra et al., 2018). Повышенная экспрессия гена *CYP26B1*, возможно, снижающая концентрацию птРК, ассоциирована с повышенным нейрогенезом в гиппокампе взрослых ручных лисиц, который был ранее показан (Huang et al., 2015). Полученные нами результаты, вероятно, сравнимы с негативным влиянием птРК на нейрогенез в исследованиях (Hu et al., 2016, 2020; Stoney et al., 2016). Ингибирование *CYP26B1* приводило к снижению пролиферации клеток в субгранулярной зоне гиппокампа у мышей (Stoney et al., 2016). Можно предположить, что у ручных лисиц количество птРК в гиппокампе находится на уровне, близком к максимуму, повышающему нейро-

генез. У агрессивных животных более низкая экспрессия гена *CYP26B1* связана с еще большим количеством птРК и, вероятно, снижением нейрогенеза. Неселекционированные лисицы со сниженным по сравнению с ручными нейрогенезом, по-видимому, находятся посередине между ручными и агрессивными. Следует отметить, что полногеномное сравнение деревенских собак с волками и человека с шимпанзе также выявило различия в системе птРК (Theofanopoulou et al., 2017; Pendleton et al., 2018).

В литературе описаны сложные и противоречивые эффекты витамина А и птРК на ГГНС. Показано, что дексаметазон повышает экспрессию гена *Aldh1a1* – фермента синтеза птРК (Gil-Ibáñez et al., 2014). Хроническое воздействие птРК и других форм РК приводит к повышению активности ГГНС и депрессии (Bremner, McCaffery, 2008; Cai et al., 2015). В частности, птРК вызывает гиперэкспрессию генов *Crf*, *Crf1* и *Aup* в гипоталамусе (Cai et al., 2015). Возможно, ослабление активности ГГНС у ручных лисиц частично связано с ослаблением системы птРК. Однако следует отметить, что РК может, напротив, снижать уровень глюкокортикоидов, которые, в свою очередь, могут иметь различные эффекты на ткани-мишени (Bonhomme et al., 2014; Hélène et al., 2016).

Интересным представляется обнаруженное повышенное количество мРНК *ADRA1A* в дорзальном гиппокампе ручных лисиц. Это изменение может отражать также сниженную тревожность и повышенный взрослый гиппокампальный нейрогенез вследствие ослабления активности ГГНС при отборе по поведению. Хотя дорзальный гиппокамп, по-видимому, в меньшей степени участвует в регуляции стресс-активности и тревожности, известное его влияние на эти процессы (Weaver et al., 2004; Gulyaeva, 2019). *ADRA1A* выступает в качестве гена-кандидата при синдроме дефицита внимания (Elia et al., 2009). Механизмы участия *ADRA1A* в регуляции поведения до конца не ясны, но известно, что долговременная стимуляция *ADRA1A* снижает депрессивно-подобное поведение и тревожность, а трициклические антидепрессанты повышают плотность рецептора *ADRA1A* в переднем мозге у грызунов (Deupree et al., 2007; Doze et al., 2009, 2011). Также в исследованиях второй, наряду с субгранулярной зоной гиппокампа, зоны взрослого нейрогенеза – субэпендима боковых желудочков на трансгенных мышах – была показана ассоциация повышенной экспрессии *ADRA1A* с повышенным уровнем нейрогенеза (Gupta et al., 2009). Возможно, *ADRA1A* связан также с нейрогенезом в гиппокампе (Doze et al., 2011).

## Заключение

Благодаря анализу отдельно дорзальной и вентральной частей гиппокампа лисиц, селекционируемых на различное поведение, мы обнаружили дифференциальную экспрессию генов *NR3C2*, *CYP26B1* и *ADRA1A*, связанных как с нейрогенезом в гиппокампе, так и с регуляцией ГГНС. Дальнейшее исследование экспрессии функциональных групп этих генов, вероятно, прольет свет на неизвестные ранее молекулярно-генетические механизмы одомашивания, в частности на снижение стресс-ответа, повышение нейрогенеза и изменение поведения по отношению к человеку у одомашиваемых животных.

## Список литературы / References

- Квичанский А.А., Волобуева М.Н., Манолова А.О., Большаков А.П., Гуляева Н.В. Неонатальный провоспалительный стресс изменяет экспрессию генов кортикостероидных рецепторов в гиппокампе крыс: септо-темпоральные различия. *Нейрохимия*. 2017;34(3):257-260. DOI 10.7868/S1027813317030050. [Kvichansky A.A., Volobueva M.N., Manolova A.O., Bolshakov A.P., Gulyaeva N.V. Neonatal proinflammatory stress alters the expression of genes of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: septo-temporal differences. *Neurochem. J.* 2017;11(3):255-258. DOI 10.1134/S1819712417030059.]
- Овчинников В.Ю., Антонов Е.В., Васильев Г.В., Шихевич С.Г., Шепелева Д.В., Гербек Ю.Э. Исследование экспрессии генов рецептора глюкокортикоидов и микроРНК в гиппокампе и концентрации кортизола в крови у лисиц, селекционируемых по реакции на человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(2):230-234. DOI 10.18699/VJ18.352. [Ovchinnikov V.Yu., Antonov E.V., Vasilyev G.V., Shihevich S.G., Shepeleva D.V., Herbeck Yu.E. Hippocampal glucocorticoid receptor and microRNA gene expression and serum cortisol concentration in foxes selected for behavior toward humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(2):230-234. DOI 10.18699/VJ18.352. (in Russian)]
- Оськина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г., Плюснина И.З., Гулевич Р.Г. Изменения в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе при отборе животных на одомашивание. *Информ. вестн. ВОГУС*. 2008;12(1/2):39-49. [Oskina I.N., Herbeck Yu.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G. Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2008;12(1/2):39-49. (in Russian)]
- Прасолова Л.А., Гербек Ю.Э., Гулевич Р.Г., Шихевич С.Г., Коношенко М.Ю., Кожемякина Р.В., Оськина И.Н., Плюснина И.З. Эффекты длительного отбора по поведению на стресс-ответ и активность половой системы самцов серых крыс (*Rattus norvegicus*). *Генетика*. 2014;50(8):959-966. DOI 10.7868/S0016675814080037. [Prasolova L.A., Gerbek Yu.E., Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Oskina I.N., Plyusnina I.Z. The effects of prolonged selection for behavior on the stress response and activity of the reproductive system of male grey rats (*Rattus norvegicus*). *Russ. J. Genet.* 2014;50(8):846-852. DOI 10.1134/S1022795414080031.]
- Трут Л.Н., Плюснина И.З., Оськина И.Н. Эксперимент по одомашиванию лисиц и дискуссионные вопросы эволюции собак. *Генетика*. 2004;40(6):794-807. DOI 10.31857/S0016675821070146. [Trut L.N., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. An experiment on fox domestication and debatable issues of evolution of the dog. *Russ. J. Genet.* 2004;40(6):644-655. DOI 10.1023/B:RUGE.0000033312.92773.c1.]
- Трут Л.Н., Харламова А.В., Пилипенко А.С., Гербек Ю.Э. Эксперимент по одомашиванию лисиц и эволюция собак с позиции современных молекулярно-генетических и археологических данных. *Генетика*. 2021;57(7):767-785. DOI 10.31857/S0016675821070146. [Trut L.N., Kharlamova A.V., Pilipenko A.S., Herbeck Yu.E. The fox domestication experiment and dog evolution: a view based on modern molecular, genetic, and archaeological data. *Russ. J. Genet.* 2021;57(7):778-794. DOI 10.1134/S1022795421070140.]
- Amrein I. Adult hippocampal neurogenesis in natural populations of mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(5):a021295. DOI 10.1101/cshperspect.a021295.
- Amrein I., Slomianka L. A morphologically distinct granule cell type in the dentate gyrus of the red fox correlates with adult hippocampal neurogenesis. *Brain Res.* 2010;1328:12-24. DOI 10.1016/j.brainres.2010.02.075.

- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245-5250. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J. Hered.* 1979;70(5):301-308. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a109263.
- Bonhomme D., Minni A.M., Alfos S., Roux P., Richard E., Higuieret P., Moisan M.P., Pallet V., Touyarot K. Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:20. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00020.
- Bremner J.D., McCaffery P. The neurobiology of retinoic acid in affective disorders. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008;32(2):315-331. DOI 10.1016/j.pnpbp.2007.07.001.
- Cai L., Li R., Zhou J.N. Chronic all-trans retinoic acid administration induces CRF over-expression accompanied by AVP up-regulation and multiple CRF-controlling receptors disturbance in the hypothalamus of rats. *Brain Res.* 2015;1601:1-7. DOI 10.1016/j.brainres.2014.12.054.
- Cembrowski M.S., Wang L., Sugino K., Shields B.C., Spruston N. HippoSeq: a comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons. *eLife.* 2016;5:e14997. DOI 10.7554/eLife.14997.001.
- Corradini B.R., Iamashita P., Tampellini E., Farfel J.M., Grinberg L.T., Moreira-Filho C.A. Complex network-driven view of genomic mechanisms underlying Parkinson's disease: analyses in dorsal motor vagal nucleus, locus coeruleus, and substantia nigra. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:543673. DOI 10.1155/2014/543673.
- Croston R., Branch C.L., Kozlovsky D.Y., Roth T.C., LaDage L.D., Freas C.A., Pravosudov V.V. Potential mechanisms driving population variation in spatial memory and the hippocampus in food-caching chickadees. *Integr. Comp. Biol.* 2015;55(3):354-371. DOI 10.1093/icb/icc029.
- de Kloet E.R., Otte C., Kumsta R., Kok L., Hillegers M.H.J., Hasselmann H., Kliegel D., Joëls M. Stress and depression: a crucial role of the mineralocorticoid receptor. *J. Neuroendocrinol.* 2016;28(8). DOI 10.1111/jne.12379.
- de Martino M.U., Alesci S., Chrousos G.P., Kino T. Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocorticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1024:72-85. DOI 10.1196/annals.1321.006.
- Deupree J.D., Reed A.L., Bylund D.B. Differential effects of the tricyclic antidepressant desipramine on the density of adrenergic receptors in juvenile and adult rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;321(2):770-776. DOI 10.1124/jpet.106.118935.
- Doze V.A., Handel E.M., Jensen K.A., Darsie B., Luger E.J., Haselton J.R., Talbot J.N., Rorabaugh B.R.  $\alpha$ 1A- and  $\alpha$ 1B-adrenergic receptors differentially modulate antidepressant-like behavior in the mouse. *Brain Res.* 2009;1285:148-157. DOI 10.1016/j.brainres.2009.06.035.
- Doze V.A., Papay R.S., Goldenstein B.L., Gupta M.K., Collette K.M., Nelson B.W., Lyons M.J., Davis B.A., Luger E.J., Wood S.G., Haselton J.R., Simpson P.C., Perez D.M. Long-term  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor stimulation improves synaptic plasticity, cognitive function, mood, and longevity. *Mol. Pharmacol.* 2011;80(4):747-758. DOI 10.1124/mol.111.073734.
- Elia J., Capasso M., Zaheer Z., Lantieri F., Ambrosini P., Berrettini W., Devoto M., Hakonarson H. Candidate gene analysis in an on-going genome-wide association study of attention-deficit hyperactivity disorder: suggestive association signals in ADRA1A. *Psychiatr. Genet.* 2009;19(3):134-141. DOI 10.1097/YPG.0b013e32832a5043.
- Floriou-Servou A., von Ziegler L., Stalder L., Sturman O., Privitera M., Rassi A., Cremonesi A., Thöny B., Bohacek J. Distinct proteomic, transcriptomic, and epigenetic stress responses in dorsal and ventral hippocampus. *Biol. Psychiatry.* 2018;84(7):531-541. DOI 10.1016/j.biopsych.2018.02.003.
- Fuentealba P., Klausberger T., Karayannis T., Suen W.Y., Huck J., Tomioka R., Rockland K., Capogna M., Studer M., Morales M., Somogyi P. Expression of COUP-TFII nuclear receptor in restricted GABAergic neuronal populations in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2010;30(5):1595-1609. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4199-09.2010.
- Garcia A., Steiner B., Kronenberg G., Bick-Sander A., Kempermann G. Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell.* 2004;3(4):363-371. DOI 10.1111/j.1474-9728.2004.00130.x.
- Gass P., Kretz O., Wolfer D.P., Berger S., Tronche F., Reichardt H.M., Kellendonk C., Lipp H.P., Schmid W., Schütz G. Genetic disruption of mineralocorticoid receptor leads to impaired neurogenesis and granule cell degeneration in the hippocampus of adult mice. *EMBO Rep.* 2000;1(5):447-451. DOI 10.1093/embo-reports/kvd088.
- Gil-Ibáñez P., Bernal J., Morte B. Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells: role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic acid and glucocorticoids. *PLoS One.* 2014;9(3):e91692. DOI 10.1371/journal.pone.0091692.
- Gulyaeva N.V. Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage. *Neurochem. Res.* 2019;44:1306-1322. DOI 10.1007/s11064-018-2662-0.
- Gupta M.K., Papay R.S., Jurgens C.W.D., Gaivin R.J., Shi T., Doze V.A., Perez D.M.  $\alpha$ 1-Adrenergic receptors regulate neurogenesis and gliogenesis. *Mol. Pharmacol.* 2009;76(2):314-326. DOI 10.1124/mol.109.057307.
- Haddjeri-Hopkins A., Tapia M., Ramirez-Franco J., Tell F., Marqueze-Pouey B., Amalric M., Goillard J.M. Refining the identity and role of Kv4 channels in mouse substantia nigra dopaminergic neurons. *eNeuro.* 2021;8(4):ENEURO.0207-21.2021. DOI 10.1523/ENEURO.0207-21.2021.
- Harris A.P., Holmes M.C., De Kloet E.R., Chapman K.E., Seckl J.R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinol.* 2013;38(5):648-658. DOI 10.1016/j.psyneuen.2012.08.007.
- Hélène R., Julie B., Aloïs L., Marie-Pierre M., Véronique P., Anabelle R., Jean-Benoît C. Retinoids and glucocorticoids have opposite effects on actin cytoskeleton rearrangement in hippocampal HT22 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016;71:102-110. DOI 10.1016/j.biocel.2015.12.014.
- Hu P., Wang Y., Liu J., Meng F.T., Qi X.R., Chen L., van Dam A.M., Joëls M., Lucassen P.J., Zhou J.N. Chronic retinoic acid treatment suppresses adult hippocampal neurogenesis, in close correlation with depressive-like behavior. *Hippocampus.* 2016;26(7):911-923. DOI 10.1002/hipo.22574.
- Hu P., van Dam A.M., Wang Y., Lucassen P.J., Zhou J.N. Retinoic acid and depressive disorders: evidence and possible neurobiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020;112:376-391. DOI 10.1016/j.neubiorev.2020.02.013.
- Huang S., Slomianka L., Farmer A.J., Kharlamova A.V., Gulevich R.G., Herbeck Yu.E., Trut L.N., Wolfer D.P., Amrein I. Selection for tameness, a key behavioral trait of domestication, increases adult hippocampal neurogenesis in foxes. *Hippocampus.* 2015;25(8):963-975. DOI 10.1002/hipo.22420.
- Jacobs L.F., Spencer W.D. Natural space-use patterns and hippocampal size in kangaroo rats. *Brain Behav. Evol.* 1994;44(3):125-132. DOI 10.1159/000113584.
- Jacobs L.F., Gaulin S.J., Sherry D.F., Hoffman G.E. Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87(16):6349-6352. DOI 10.1073/pnas.87.16.6349.

- Jinno S., Kosaka T. Stereological estimation of numerical densities of glutamatergic principal neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus*. 2010;20(7):829-840. DOI 10.1002/hipo.20685.
- Kanatsou S., Fearey B.C., Kuil L.E., Lucassen P.J., Harris A.P., Seckl J.R., Krugers H., Joels M. Overexpression of mineralocorticoid receptors partially prevents chronic stress-induced reductions in hippocampal memory and structural plasticity. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142012. DOI 10.1371/journal.pone.0142012.
- Kanatsou S., Karst H., Kortessidou D., van den Akker R.A., den Blaauwen J., Harris A.P., Seckl J.R., Krugers H.J., Joels M. Overexpression of mineralocorticoid receptors in the mouse forebrain partly alleviates the effects of chronic early life stress on spatial memory, neurogenesis and synaptic function in the dentate gyrus. *Front. Cell. Neurosci*. 2017;11:132. DOI 10.3389/fncel.2017.00132.
- Kane M.A., Foliás A.E., Wang C., Napoli J.L. Ethanol elevates physiological *all-trans*-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in multiple loci: a potential mechanism of ethanol toxicity. *FASEB J*. 2010;24(3):823-832. DOI 10.1096/fj.09-141572.
- Kang P., Rogalska J., Walker C.A., Burke M., Seckl J.R., Macleod M.R., Lai M. Injury-induced mineralocorticoid receptor expression involves differential promoter usage: a novel role for the rat MR $\beta$  variant. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2009;305(1-2):56-62. DOI 10.1016/j.mce.2009.02.008.
- Kukekova A.V., Johnson J.L., Xiang X., Feng S., Liu S., Rando H.M., Kharlamova A.V., Herbeck Yu., Serdyukova N.A., Xiong Z., Beklemisheva V., Koepfli K.-P., Gulevich R.G., Vladimirova A.V., Hekman J.P., Perelman P.L., Graphodatsky A.S., O'Brien S.J., Wang X., Clark A.G., Acland G.A., Trut L.N., Zhang G. Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nat. Ecol. Evol*. 2018;2(9):1479-1491. DOI 10.1038/s41559-018-0611-6.
- Lai M., Horsburgh K., Bae S.E., Carter R.N., Stenvers D.J., Fowler J.H., Yau J.L., Gomez-Sanchez C.E., Holmes M.C., Kenyon C.J., Seckl J.R., Macleod M.R. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci*. 2007;25(6): 1832-1842. DOI 10.1111/j.1460-9568.2007.05427.x.
- Le Menuet D., Lombès M. The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. *Steroids*. 2014;91:11-19. DOI 10.1016/j.steroids.2014.05.018.
- Lee A.-R., Kim J.-H., Cho E., Kim M., Park M. Dorsal and ventral hippocampus differentiate in functional pathways and differentially associate with neurological disease-related genes during postnatal development. *Front. Mol. Neurosci*. 2017;10:331. DOI 10.3389/fnmol.2017.00331.
- Levone B.R., Cryan J.F., O'Leary O.F. Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiol. Stress*. 2015;1:147-155. DOI 10.1016/j.ynstr.2014.11.003.
- Lewis A.S., Pittenger S.T., Mineur Y.S., Stout D., Smith P.H., Picciotto M.R. Bidirectional regulation of aggression in mice by hippocampal alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(6):1267-1275. DOI 10.1038/npp.2017.276.
- Lipp H.P. Evolutionary shaping of adult hippocampal neurogenesis in mammals-cognitive gain or developmental priming of personality traits? *Front. Neurosci*. 2017;11:420. DOI 10.3389/fnins.2017.00420.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
- Lowe A., Dalton M., Sidhu K., Sachdev P., Reynolds B., Valenzuela M. Neurogenesis and precursor cell differences in the dorsal and ventral adult canine hippocampus. *Neurosci. Lett*. 2015;593:107-113. DOI 10.1016/j.neulet.2015.03.017.
- Maggio N., Segal M. Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. *J. Neurosci*. 2009;29(27):8633-8638. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1901-09.2009.
- Medina A., Seasholtz A.F., Sharma V., Burke S., Bunney W., Jr., Myers R.M., Schatzberg A., Akil H., Watson S.J. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in the human hippocampus in major depressive disorder. *J. Psychiatr. Research*. 2013;47(3): 307-314. DOI 10.1016/j.jpsychires.2012.11.002.
- Ming G., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011;70(4):687-702. DOI 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- Mishra S., Kelly K.K., Rumian N.L., Siegenthaler J.A. Retinoic acid is required for neural stem and progenitor cell proliferation in the adult hippocampus. *Stem Cell Rep*. 2018;10(6):1705-1720. DOI 10.1016/j.stemcr.2018.04.024.
- O'Leary O.F., Cryan J.F. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. *Trends Pharmacol. Sci*. 2014;35(12):675-687. DOI 10.1016/j.tips.2014.09.011.
- O'Rourke T., Boeckx C. Glutamate receptors in domestication and modern human evolution. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2020;108:341-357. DOI 10.1016/j.neubiorev.2019.10.004.
- Pendleton A.L., Shen F., Taravella A.M., Emery S., Veeramah K.R., Boyko A.R., Kidd J.M. Comparison of village dog and wolf genomes highlights the role of the neural crest in dog domestication. *BMC Biol*. 2018;16(1):e64. DOI 10.1186/s12915-018-0535-2.
- Pörtl D., Jung C. Is dog domestication due to epigenetic modulation in brain? *Dog Behav*. 2017;3(2):21-32. DOI 10.4454/db.v3i2.55.
- Price E.O. *Animal Domestication and Behavior*. Oxford; New York: Oxford Univ. Press, 2002.
- Ratka A., Sutanto W., Bloemers M., de Kloet E.R. On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*. 1989;50(2):117-123. DOI 10.1159/000125210.
- Rehkämper G., Frahm H.D., Cnotka J. Mosaic evolution and adaptive brain component alteration under domestication seen on the background of evolutionary theory. *Brain Behav. Evol*. 2008;71(2):115-126. DOI 10.1159/000111458.
- Rozeboom A.M., Akil H., Seasholtz A.F. Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(11):4688-4693. DOI 10.1073/pnas.0606067104.
- Saaltink D.J., Vreugdenhil E. Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition? *Cell. Mol. Life Sci*. 2014;71:2499-2515. DOI 10.1007/s00018-014-1568-5.
- Sklepkovych B.O., Montevecchi W.A. Food availability and food hoarding behaviour by red and arctic foxes. *Arctic*. 1996;49(3): 228-234. DOI 10.14430/arctic1199.
- Sonnenberg B.R., Branch C.L., Pitera A.M., Bridge E., Pravosudov V.V. Natural selection and spatial cognition in wild food-caching mountain chickadees. *Curr. Biol*. 2019;29(4):670-676. DOI 10.1016/j.cub.2019.01.006.
- Stoney P.N., McCaffery P. A vitamin on the mind: new discoveries on control of the brain by vitamin A. *World Rev. Nutr. Diet*. 2016;115: 98-108. DOI 10.1159/000442076.
- Stoney P.N., Fragoso Y.D., Saeed R.B., Ashton A., Goodman T., Simons C., Gomaa M.S., Sementilli A., Sementilli L., Ross A.W., Morgan P.J., McCaffery P.J. Expression of the retinoic acid catabolic enzyme CYP26B1 in the human brain to maintain signaling homeostasis. *Brain Struct. Funct*. 2016;221:3315-3326. DOI 10.1007/s00429-015-1102-z.
- Theofanopoulou C., Gastaldon S., O'Rourke T., Samuels B.D., Messner A., Martins P.T., Delogu F., Alamri S., Boeckx C. Self-domestication in *Homo sapiens*: insights from comparative genomics. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185306. DOI 10.1371/journal.pone.0185306.
- Todorov O.S., Weisbecker V., Gilissen E., Zilles K., De Sousa A.A. Primate hippocampus size and organization are predicted by sociality but not diet. *Proc. Royal Soc. B*. 2019;286(1914):20191712. DOI 10.1098/rspb.2019.1712.

- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *BioEssays*. 2009;31(3):349-360. DOI 10.1002/bies.200800070.
- Truvé K., Parris T.Z., Vizlin-Hodzic D., Salmela S., Berger E., Ågren H., Funa K. Identification of candidate genetic variants and altered protein expression in neural stem and mature neural cells support altered microtubule function to be an essential component in bipolar disorder. *Transl. Psychiatry*. 2020;10(1):e390. DOI 10.1038/s41398-020-01056-1.
- Tzakis N., Holahan M.R. Social memory and the role of the hippocampal CA2 region. *Front. Behav. Neurosci*. 2019;13:233. DOI 10.3389/fnbeh.2019.00233.
- Veenema A.H., Neumann I.D. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain Behav. Evol.* 2007;70(4):274-285. DOI 10.1159/000105491.
- Veenema A.H., Meijer O.C., de Kloet E.R., Koolhaas J.M. Genetic selection for coping style predicts stressor susceptibility. *J. Neuroendocrinol.* 2003;15:256-267. DOI 10.1046/j.1365-2826.2003.00986.x.
- Vogel J.W., La Joie R., Grothe M.J., Diaz-Papkovich A., Doyle A., Vachon-Presseau E., Lepage C., Vos de Wael R., Thomas R.A., Iturria-Medina Y., Bernhardt B., Rabinovici G.D., Evans A.C. A molecular gradient along the longitudinal axis of the human hippocampus informs large-scale behavioral systems. *Nat. Commun.* 2020;11(1):960. DOI 10.1038/s41467-020-14518-3.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004;7:847-854. DOI 10.1038/nn1276.
- Xiao F., Zhang X., Ni P., Yu H., Gao Q., Li M., Huo P., Wei Z., Wang S., Zhang Y., Zhao R., Li A., Li Z., Li Yu., Cheng H., Du L., Ren S., Yu Q., Liu Ya., Zhao Yu. Voltage-dependent potassium channel Kv4.2 alleviates the ischemic stroke impairments through activating neurogenesis. *Neurochem. Int.* 2021;50:e105155. DOI 10.1016/j.neuint.2021.105155.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* 2012;13:134. DOI 10.1186/1471-2105-13-134.

---

**Благодарности.** Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 21-44-04405). Содержание и разведение экспериментальных животных в ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН поддерживалось бюджетным проектом № FWNR-2022-0019. Авторы выражают благодарность начальнику ЦКП В.В. Ивайкину, вед. инженеру А.В. Владимировой, ст. лаборанту И.В. Пивоваровой, ст. лаборанту Т.И. Семёновой, бригадирам звероводов В.И. Владимировой и Т.В. Коноваловой и всему персоналу ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН за помощь в исследовании, сохранении и разведении уникальной популяции экспериментальных лисиц, а также рецензентам, внесшим существенный вклад в улучшение статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.12.2022. После доработки 18.06.2023. Принята к публикации 30.06.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Однонуклеотидные замены в геноме человека, влияющие на связывание факторов транскрипции, и их роль в развитии патологий

Е.В. Антонцева , А.О. Дегтярева, Е.Е. Корболина, И.С. Дамаров, Т.И. Меркулова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
 [antontseva@bionet.nsc.ru](mailto:antontseva@bionet.nsc.ru)


**Аннотация.** Однонуклеотидные замены, также называемые однонуклеотидными полиморфизмами (single nucleotide polymorphism, SNP), – это наиболее распространенный тип вариаций генома человека. Подавляющая часть выявленных в геноме человека SNP не оказывает какого-либо воздействия на молекулярный фенотип, однако некоторые способны приводить к изменению функции гена или уровня его экспрессии. В то же время большинство SNP, ассоциированных с некими признаками или патологиями, картируются в регуляторных областях генома, изменяют потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов и, соответственно, могут влиять на экспрессию генов. В последние десятилетия значительные усилия были направлены на поиск таких регуляторных SNP (rSNP), а также на понимание механизмов, посредством которых они приводят к фенотипическим различиям, в первую очередь к разной предрасположенности к заболеваниям и индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам. Развитие технологии NGS (next generation sequencing) способствовало не только выявлению огромного количества SNP и поиску их ассоциации (genome wide association studies, GWAS) с некими заболеваниями или фенотипическими проявлениями, но и развитию более производительных подходов для их функциональной аннотации. Стоит отметить, что наличие ассоциации не позволяет выделить функциональный, действительно связанный с болезнью вариант последовательности ДНК из множества маркерных, которые выявляются за счет неравновесия по сцеплению. Более того, установление ассоциаций генетических вариантов с заболеванием не дает сведений о функциональности этих вариантов, что необходимо для выяснения молекулярных механизмов развития патологии и разработки эффективных методов ее лечения и профилактики. В связи с этим функциональный анализ SNP, аннотированных в GWAS каталоге, как на полногеномном уровне, так и на уровне отдельных SNP в последние годы стал особенно актуальным. В настоящее время активно развивается полногеномный поиск потенциально регуляторных SNP без каких-либо предварительных знаний об их ассоциации с признаком. Так, картирование локусов количественных признаков экспрессии (eQTL, expression quantitative trait loci) позволяет выявить SNP, для которого в транскриптомах гомозигот по разным его аллелям, а также гетерозигот наблюдаются различия в уровне экспрессии неких генов, причем как близко расположенных, так и на значительном удалении. Для предсказания регуляторных SNP используют также подходы, основанные на поиске аллель-специфических событий в данных RNA-seq, ChIP-seq, DNase-seq, ATAC-seq, MPRA и т.д. Однако для более полной характеристики таких rSNP необходимо устанавливать их ассоциацию с признаком, в частности с предрасположенностью к некой патологии или с чувствительностью к лекарственным препаратам. Таким образом, именно комплексное использование двух основанных на противоположных принципах подходов к поиску значимых для развития признака (патологии) SNP: с одной стороны, исходящего из данных по ассоциации SNP с неким признаком, а с другой стороны, идущего от определения аллель-специфических изменений на молекулярном уровне (в транскриптоме или регуломе) – существенно обогащает картину наших знаний о роли генетических детерминант в молекулярных механизмах формирования признаков, включая предрасположенность к многофакторным заболеваниям.

Ключевые слова: регуляторный однонуклеотидный полиморфизм; сайты связывания транскрипционных факторов; экспрессия генов; полногеномные исследования.

**Для цитирования:** Антонцева Е.В., Дегтярева А.О., Корболина Е.Е., Дамаров И.С., Меркулова Т.И. Однонуклеотидные замены в геноме человека, влияющие на связывание факторов транскрипции, и их роль в развитии патологий. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):662-675. DOI 10.18699/VJGB-23-77

## Human-genome single nucleotide polymorphisms affecting transcription factor binding and their role in pathogenesis

E.V. Antontseva , A.O. Degtyareva, E.E. Korbolina, I.S. Damarov, T.I. Merkulova

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
 [antontseva@bionet.nsc.ru](mailto:antontseva@bionet.nsc.ru)

**Abstract.** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common type of variation in the human genome. The vast majority of SNPs identified in the human genome do not have any effect on the phenotype; however, some can lead to changes in the function of a gene or the level of its expression. Most SNPs associated with certain traits or pathologies are

mapped to regulatory regions of the genome and affect gene expression by changing transcription factor binding sites. In recent decades, substantial effort has been invested in searching for such regulatory SNPs (rSNPs) and understanding the mechanisms by which they lead to phenotypic differences, primarily to individual differences in susceptibility to diseases and in sensitivity to drugs. The development of the NGS (next-generation sequencing) technology has contributed not only to the identification of a huge number of SNPs and to the search for their association (genome-wide association studies, GWAS) with certain diseases or phenotypic manifestations, but also to the development of more productive approaches to their functional annotation. It should be noted that the presence of an association does not allow one to identify a functional, truly disease-associated DNA sequence variant among multiple marker SNPs that are detected due to linkage disequilibrium. Moreover, determination of associations of genetic variants with a disease does not provide information about the functionality of these variants, which is necessary to elucidate the molecular mechanisms of the development of pathology and to design effective methods for its treatment and prevention. In this regard, the functional analysis of SNPs annotated in the GWAS catalog, both at the genome-wide level and at the level of individual SNPs, became especially relevant in recent years. A genome-wide search for potential rSNPs is possible without any prior knowledge of their association with a trait. Thus, mapping expression quantitative trait loci (eQTLs) makes it possible to identify an SNP for which – among transcriptomes of homozygotes and heterozygotes for its various alleles – there are differences in the expression level of certain genes, which can be located at various distances from the SNP. To predict rSNPs, approaches based on searches for allele-specific events in RNA-seq, ChIP-seq, DNase-seq, ATAC-seq, MPRA, and other data are also used. Nonetheless, for a more complete functional annotation of such rSNPs, it is necessary to establish their association with a trait, in particular, with a predisposition to a certain pathology or sensitivity to drugs. Thus, approaches to finding SNPs important for the development of a trait can be categorized into two groups: (1) starting from data on an association of SNPs with a certain trait, (2) starting from the determination of allele-specific changes at the molecular level (in a transcriptome or regulome). Only comprehensive use of strategically different approaches can considerably enrich our knowledge about the role of genetic determinants in the molecular mechanisms of trait formation, including predisposition to multifactorial diseases. Key words: regulatory single-nucleotide polymorphism; transcription factor-binding sites; gene expression; genome-wide studies.

**For citation:** Antontseva E.V., Degtyareva A.O., Korbolina E.E., Damarov I.S., Merkulova T.I. Human-genome single nucleotide polymorphisms affecting transcription factor binding and their role in pathogenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):662-675. DOI 10.18699/VJGB-23-77

## Введение

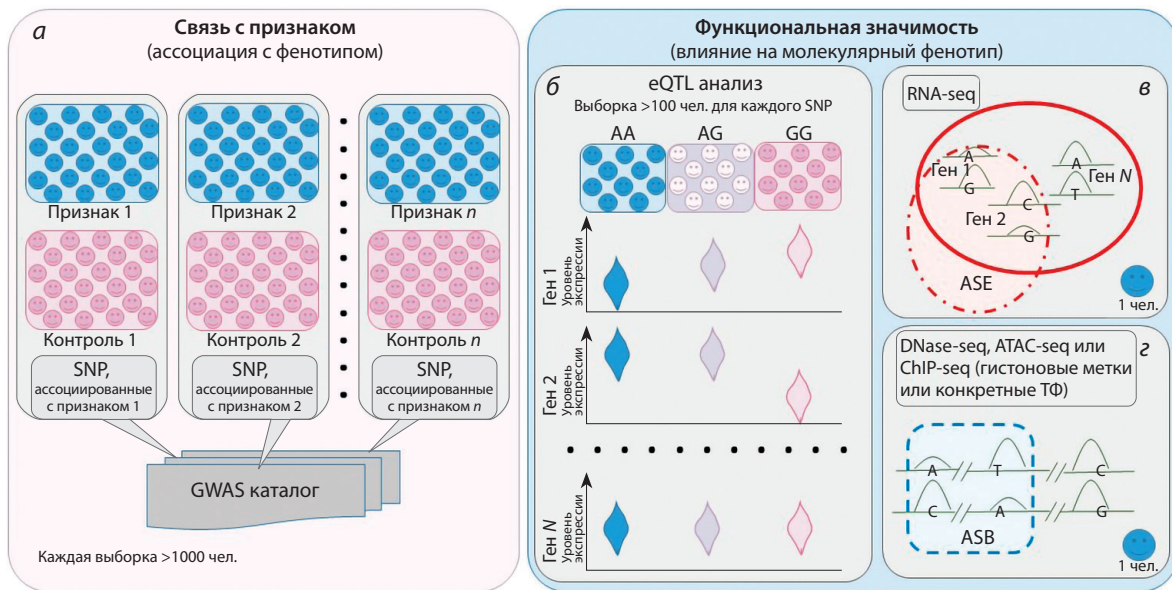
Одной из основных задач генетики человека является выяснение механизмов, посредством которых вариации генома приводят к фенотипическим различиям, в первую очередь к разной предрасположенности к заболеваниям и индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам. Однонуклеотидные замены (SNP) – наиболее распространенный тип вариаций генома (Chanock, 2001). В настоящее время благодаря развитию технологий NGS (next generation sequencing) в базе dbSNP ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_summary.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi)) (Sherry et al., 2001) зарегистрировано свыше 950 млн SNP в геноме человека, причем более 90 % от общего числа приходится на долю редких, с частотой встречаемости менее 1 %. Представляется маловероятным, что вся масса обнаруженных вариаций может иметь значение для фенотипа, но какая-то их часть, безусловно, является генетической основой фенотипических проявлений, включая предрасположенность к различным заболеваниям. В последние десятилетия на поиск таких SNP были направлены значительные усилия.

Доминирующим подходом к идентификации связанных с признаком однонуклеотидных замен, стартовавшим еще в 1980-х гг., было определение ассоциации с заболеваниями для SNP, обнаруженных в генах-кандидатах (Lander, Schork, 1994; Ring, Kroetz, 2002). Как правило, исследовались лишь SNP, затрагивающие белок-кодирующую часть гена (Cooper, 1998). Несколько позже возник интерес к выяснению функциональности вариантов, расположенных в некодирующих районах генов, т. е. к определению влияния таких вариантов на некий молекулярный фенотип. В частности, было показано, что такие SNP затрагивают сайты связывания транскрипционных факторов (ССТФ), что приводит к изменению экспрессии

соответствующих генов (Ludlow et al., 1996; Piedrafita et al., 1996; Knight et al., 1999; Vasiliev et al., 1999). Однако эти малочисленные функциональные исследования оставались почти незаметными на фоне огромного вала работ по выявлению ассоциаций.

Масштабы обнаружения связанных с заболеваниями SNP резко возросли с внедрением в середине 2000-х гг. технологии GWAS (genome wide association study) (рис. 1, а), которая основана на непредвзятом, не исходящем из каких-либо представлений о формировании признака принципе выявления ассоциированных с ним SNP в масштабе генома (Visscher et al., 2012; Tam et al., 2019). К настоящему времени с помощью GWAS найдено уже более 72 тыс. ассоциаций генетических вариантов с признаками (GWAS Catalog, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>), что позволило выявить много новых генов и генных систем, связанных с предрасположенностью к различным болезням (Buniello et al., 2019; Tam et al., 2019; Claussnitzer et al., 2020).

Однако технология GWAS не дает никакой информации о функциональности обнаруженных вариантов, что сильно затрудняет выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе развития патологии, и, как следствие, разработку эффективных методов ее лечения и профилактики. Помимо того, по результатам GWAS почти невозможно отличить действительно связанный с болезнью вариант от множества маркерных, которые выявляются за счет неравновесия по сцеплению (Lappalainen, 2015; Tam et al., 2019; Zhao et al., 2020). Известно также, что большинство обнаруженных с помощью GWAS SNP располагается в некодирующей части генома и, как правило, в его регуляторных районах (промоторах, энхансерах и т. д.) (Hindorff et al., 2009; Maurano et al., 2012; Bryzgalov



**Рис. 1.** Полногеномные подходы для анализа SNP.

а – принцип GWAS исследований; б – схема eQTL анализа для каждого SNP; в, з – поиск аллель-специфичных событий: в – экспрессии (ASE), з – связывания (ASB).

et al., 2013; Farh et al., 2015), что предполагает их влияние на связывание транскрипционных факторов (ТФ) и экспрессию генов. Таким образом, стала очевидной необходимость проведения исследований, посвященных функциональной интерпретации данных GWAS как на уровне отдельных потенциально регуляторных SNP (rSNP), так и на массовом уровне. Кроме того, поскольку технология GWAS сильно занижает число выявленных ассоциаций по сравнению с реально существующими в силу необходимости применения жестких порогов при статистической обработке (Tam et al., 2019), возникло осознание необходимости разработки независимых от GWAS масштабных функциональных подходов к поиску rSNP (Westra, Franke, 2014; Maurano et al., 2015; Cavalli et al., 2016b; Korbolina et al., 2018).

Из полногеномных функциональных подходов первым стал (почти одновременно с началом применения технологии GWAS) eQTL анализ (см. рис. 1, б), который, опираясь на данные транскриптомов (ранее использовались данные микрочипового анализа, затем данные РНК-секвенирования, RNA-seq), определяет для каждого SNP разницу в уровне экспрессии отдельных генов у гомозигот по разным аллелям этого SNP, а также его гетерозигот (Westra, Franke, 2014; GTEx Consortium, 2020). Несколько позднее были разработаны методы поиска аллель-специфичных событий как в данных RNA-seq (аллель-специфичные события экспрессии, ASE) (см. рис. 1, в) (Castel et al., 2020; Fan et al., 2020), так и в данных ChIP-seq, DNase-seq и ATAC-seq (аллель-специфичные события связывания, ASB) (см. рис. 1, з) (Maurano et al., 2015; Cavalli et al., 2016a, b; Xu et al., 2020; Korbolina et al., 2021). К числу массовых функциональных подходов относятся также MPRA (massively parallel reporter assay), SNP-seq, and SNP-SELEX (Zhang et al., 2018; Lu et al., 2021; Yan et al., 2021).

В начале настоящего обзора на примерах современных работ рассмотрены rSNP, связанные с развитием патологий по данным GWAS и подробно охарактеризованные как влияющие на взаимодействие с ТФ и экспрессию близлежащих или удаленных генов. Затем описано применение подходов функциональной геномики для интерпретации данных GWAS, а также для независимого от GWAS поиска новых регуляторных вариантов. По ходу изложения показаны сильные и слабые стороны этих подходов и важность комплексного применения GWAS и методов функциональной геномики для выяснения роли SNP в молекулярных нарушениях, лежащих в основе развития патологии.

### Функциональная интерпретация данных GWAS на уровне отдельных rSNP

Для функционального изучения отдельных потенциальных rSNP используется широкий спектр экспериментальных методов. На первых этапах обычно применяют классические: метод задержки ДНК-пробы в геле белками ядерного экстракта (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) и репортерный анализ (анализ экспрессии репортерного гена под контролем аллельных вариантов района расположения SNP), которые позволяют зарегистрировать факт влияния SNP на связывание некоего ТФ или на экспрессию репортерного гена соответственно (Antontseva et al., 2015; Fang et al., 2017). С целью идентификации ТФ, сайты связывания которых затрагивает замена нуклеотида, проводится EMSA с использованием соответствующих антител или очищенных ТФ (Piedrafitra et al., 1996; Knight et al., 1999; Vasiliev et al., 1999; Jiang et al., 2020), иммунопреципитация хроматина с детекцией аллель-асимметрии в продукте ПЦР (ChIP-AS-qPCR) (Gao et al., 2018; Choi et al., 2020; Thynn et al., 2020; Protze et al., 2022) и масс-спектрометрический анализ белков, вы-



деленных из комплексов с олигонуклеотидами, содержащими альтернативные аллели (Fang et al., 2017; Liu D. et al., 2018; Choi et al., 2020).

Влияние нуклеотидной замены в идентифицированных ССТФ на их потенциальные гены-мишени подтверждают в экспериментах с подавлением или искусственным усилением экспрессии генов соответствующих ТФ или же путем изучения эффекта точковых мутаций, внесенных в ССТФ с помощью технологии CRISPR/Cas9 (Prestel et al., 2019; Gutierrez-Arcelus et al., 2020; Pan et al., 2020; Thynn et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Wang X. et al., 2021). В последнее время все более популярным подходом в этом направлении исследований SNP становится также определение аллельного дисбаланса экспрессии для SNP, попадающих в транскрибируемые области генов. Однако стоит отметить, что такой SNP может быть как непосредственно регуляторным (Syddall et al., 2013; Klein et al., 2019), так и маркерным, находящимся в группе сцепления с rSNP, расположенным в нетранскрибируемом районе (Fang et al., 2017; Li X.-X. et al., 2019; Peng et al., 2020).

В современных исследованиях используются различные сочетания перечисленных методов, что хорошо иллюстрируют приведенные ниже примеры.

#### rs36115365

Хрестоматийным примером хорошо изученного rSNP является rs36115365 (G/C), расположенный в локусе, связанном, по данным GWAS, с различными типами рака (chr5p15.33 – район 2). Корреляционный анализ выявил в этом локусе девять SNP ( $r^2 > 0.60$ , 1000G EUR population), ассоциированных с развитием рака поджелудочной железы, герминогенной опухоли яичка, рака легких и меланомой. Для скрининга всех девяти SNP на регуляторную активность применялись EMSA и репортерный анализ, которые проводились на восьми клеточных линиях человека (Fang et al., 2017). Использование нескольких клеточных линий – обычная практика подобных исследований (Bryzgalov et al., 2013; Boldes et al., 2020), направленная на максимально возможный охват событий взаимодействия ТФ с их сайтами связывания, что обусловлено существенными различиями в наборах экспрессирующихся ТФ в разных типах клеток (Tobias et al., 2021). Скрининговые исследования идентифицировали в качестве потенциально регуляторного только rs36115365, аллель С которого демонстрировал как гораздо лучшее связывание с неким белком в EMSA, так и большую активацию экспрессии репортерного гена по сравнению с аллелем G (Fang et al., 2017).

rs36115365 расположен на расстоянии ~18 т. п. н. выше начала гена *TERT*, кодирующего обратную транскриптазу теломеразного комплекса, и на расстоянии ~5 т. п. н. ниже конца гена *CLPTMIL*. Согласно данным ChIP-seq (иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием ДНК из преципитатов) из проекта ENCODE (Moore et al., 2020), участок его локализации перекрывается со множеством сайтов связывания ТФ и обогащен гистоновыми метками активного хроматина, что характерно для энхансерных районов. Инактивация этого района с помощью siRNA-опосредованного сайленсинга транскрипции (Malecová, Morris, 2010) привела к снижению

экспрессии только гена *TERT*. Для идентификации ТФ, сайт связывания которого изменяется в результате замены G на C, была проведена инкубация белков экстрактов ядер с олигонуклеотидами, содержащими альтернативные аллели, с последующим масс-спектрометрическим анализом связавшихся белков. По результатам анализа полученных пептидов детектировались четыре ТФ-кандидата, предпочитающих аллель С: ZNF148, VEZF1/ZNF161, ZNF281 и ZNF740. С помощью EMSA и специфических антител к этим ТФ подтвердился только ZNF148, что впоследствии было верифицировано в эксперименте по связыванию с очищенным белком ZNF148. Точку поставил siRNA-опосредованный нокдаун по ZNF148, который привел к снижению экспрессии *TERT* и активности теломеразы, а также к уменьшению длины теломер. Таким образом, аллель С исправляет сайт связывания ZNF148, усиливает экспрессию *TERT* и, как следствие, увеличивает риск канцерогенеза (Fang et al., 2017).

#### rs174575

Согласно данным GWAS, rs174575 (C/G) связан с повышенным риском развития колоректального рака (Tian et al., 2020). Этот SNP расположен в первом интроне гена дельта-6-десатуразы (*FADS2*) на расстоянии +41.5 т. п. н. от его старта транскрипции (transcription start-site, TSS) и на расстоянии –178.8 т. п. н. от TSS гена длинной некодирующей РНК AP002754.2. Участок локализации rs174575 в хроматине обогащен модификациями гистонов, характерными для активных регуляторных районов (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac), и, по данным DNase-seq (определение участков гиперчувствительности к DNase I), а также ATAC-seq (участков, доступных для транскриптазы, Assay for Transposase-Accessible Chromatin), соответствует открытому хроматину (ENCODE). Предположение о регуляторной роли rs174575 подтверждается данными eQTL анализа, показавшими связь аллеля G с повышенным уровнем экспрессии *FADS2* и AP002754.2.

Компьютерное исследование ДНК-мотивов с использованием ресурсов Cistrome (Zheng et al., 2019) и JASPAR (Fornes et al., 2020) обнаружило, что в случае rs174575 замена G на C приводит к повреждению сайта связывания ТФ E2F1, а данные ChIP-seq из ENCODE, полученные на клетках колоректального рака LoVo, показали, что E2F1 картируется в области локализации данного SNP. Кросс-конкурентный EMSA подтвердил лучшее связывание некоего белка ядерного экстракта с G аллелем, а то, что этот белок – E2F1, показал ChIP-qPCR с соответствующими антителами. Так, в клеточных линиях с различными генотипами: HCT116 (CG), SNU-C1 (CG) и HT115 (CC), наблюдалось более сильное связывание E2F1 в клетках, несущих аллель G. Исследование с использованием репортерных конструкций тоже подтвердило более высокую энхансерную активность фрагмента, содержащего аллель G (Tian et al., 2020).

Непосредственный контакт между областью, содержащей rs174575, и промоторами *FADS2* и AP002754.2 был установлен с помощью метода захвата конформации хромосомы (3C). При этом взаимодействие было гораздо более выраженным в клеточных линиях, содержащих аллель G. Дальнейшие эксперименты показали, что сверх-

экспрессия AP002754.2 резко увеличивает уровень экспрессии *FADS2* в клетках HCT116 и LoVo, а нокадаун AP002754.2 с помощью микроРНК приводит к снижению уровня экспрессии этого гена, что указывает на стимулирующую роль AP002754.2 в регуляции гена *FADS2*. Показано, что сверхэкспрессия *FADS2* и AP002754.2 существенно увеличивает скорость пролиферации клеток HCT116 и LoVo, а нокадаун *FADS2* или AP002754.2 ускоряет рост опухоли в экспериментах *in vivo* на мышах. Известно, что продукт гена *FADS2* – ключевой фермент в биосинтезе полиненасыщенных жирных кислот, включая арахидоновую кислоту, которая, в свою очередь, является предшественником простагландина E2 (PGE2), способствующего росту опухоли и метастазированию. Таким образом, rs174575 действует как аллель-специфический энхансер, стимулирующий транскрипцию *FADS2* и AP002754.2, что приводит к повышенному риску развития колоректального рака в случае аллеля G (Tian et al., 2020).

#### rs4903064

Согласно данным GWAS, rs4903064 (T/C) связан с почечно-клеточным раком (ПКР), наиболее частым видом рака почки (Scelo et al., 2017). Он расположен в третьем интроне гена *DPF3*, который кодирует белок подсемейства BAF комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF. Показано преобладание аллеля С rs4903064 в образцах опухолевых тканей пациентов с диагнозом «светлоклеточный ПКР» по сравнению с нормальными тканями почки, а также с опухолевой тканью лиц с папиллярным ПКР и хромофобным ПКР. При этом измерение соотношения аллелей в пре-мРНК *DPF3* пациентов со светлоклеточным ПКР, гетерозиготных по rs4903064, подтвердило дисбаланс в сторону аллеля С (Protze et al., 2022).

По данным ATAC-seq, полученным на первичных клетках рака почки, rs4903064 находится в области открытого хроматина, в предполагаемом энхансере. Поскольку замена Т на С (rs4903064) создает потенциальный сайт связывания ТФ HIF, был проведен репортерный анализ на клеточных линиях HeLa и MCF-7. Усиление экспрессии репортерного гена наблюдалось только в случае аллеля С и только при обработке клеток специфическим стабилизатором HIF – диметилноксалилглицином (DMOG). Нокаут по различным изоформам HIF показал, что увеличение репортерной активности при стимуляции DMOG зависит от HIF-1 $\alpha$ . С помощью ChIP-qPCR в первичных клетках почечных канальцев с разными генотипами rs4903064 (ТТ, СТ, СС) подтверждено повышенное связывание HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  с рисковым аллелем С. Для выяснения роли повышенной экспрессии *DPF3* в развитии светлоклеточного ПКР с помощью технологии CRISPR/Cas9 был проведен нокаут *DPF3* в клетках проксимальных почечных канальцев. Продемонстрировано, что клетки с дефектной экспрессией *DPF3* росли медленнее, чем контрольные клоны соответствующих клеток. Это позволяет предположить, что усиление экспрессии *DPF3* в клетках проксимальных канальцев стимулирует пролиферацию (Protze et al., 2022).

#### rs17114036

rs17114036 (T/C), связанный с ишемической болезнью сердца и ишемическим инсультом, согласно данным GWAS (Dichgans et al., 2014), локализован в пятом интроне гена *PLPP*, кодирующем фосфатазу фосфолипидов 3, которая ингибирует воспаление эндотелия и способствует целостности его монослоя (Panchatcharam et al., 2014; Wu et al., 2015). Эксперименты ATAC-seq и ChIP-seq (H3K27ac, H3K4me2), проведенные на эндотелиальных клетках аорты человека HАЕС, идентифицировали область, содержащую rs17114036, как потенциальный энхансер. Энхансерная активность данной области была подтверждена с помощью репортерного анализа, при этом протективный аллель С значительно сильнее увеличивал активность люциферазы при трансфекции векторных конструкций в клетки HАЕС по сравнению с аллелем Т. Делеция участка длиной 66 п. н., содержащего rs17114036, с помощью CRISPR/Cas9 значительно снижала экспрессию *PLPP3* по сравнению с неотредактированным геномом и повышала проницаемость монослоя отредактированных HАЕС. В результате моделирования процессов гемодинамики было обнаружено увеличение активности исследуемого энхансера, содержащего аллель С, в HАЕС при 18-часовом «атерозащитном» потоке по сравнению с «атерогенным» потоком, тогда как никакого эффекта аллеля Т не выявлено. Как выяснилось, замена нуклеотида Т на С приводит к образованию сайта связывания (CAAC) для фактора KLF2, что подтверждено данными ChIP-AS-qPCR анализа в клетках HАЕС, гетерозиготных по rs17114036. Эксперименты по котрансфекции с плазмидой, обеспечивающей сверхэкспрессию KLF2, также показали более высокую активность люциферазы в случае тестируемого энхансера, несущего аллель С (Krause et al., 2018).

#### rs4407214

rs4407214 (T/G) ассоциирован с негативным по эстрогеновому рецептору раком молочной железы. Анализ данных ChIP-seq из проекта ENCODE по расположению меток активного хроматина (H3K4m1, H3K4m2, H3K4m3, H3K9ac, H3K27ac, H3K36m3, H3K79m2, H4K20m1, EZH2 и H2AZ) в клеточной линии HMEC позволил выявить в области rs4407214 регуляторный район, попадающий в интрон 1 гена *WDR43* (белок-кодирующий ген, связанный с процессингом рРНК и рибосомальным биогенезом). С помощью EMSA было показано аллель-специфическое связывание ядерных белков из клеточных линий MCF10A и CAL-51 с ДНК-зондами, воспроизводящими район локализации SNP в геноме. Экспрессия репортерного гена под контролем выявленного регуляторного района на этих же клеточных линиях тоже имела аллель-зависимый характер (Couch et al., 2016; Fachal et al., 2020).

Для идентификации ТФ, сайты связывания которых изменяются из-за замены G на Т (rs4407214), был проведен биоинформатический анализ с использованием базы JASPAR и доступных данных ChIP-seq для этого района из проекта ENCODE. В результате в качестве такого ТФ был идентифицирован USF1. Конкурентный анализ EMSA с ядерными белками, выделенными из клеточных линий CAL-51 и MCF10A, подтвердил аллель-специфи-

ческое связывание USF1 в случае аллеля G. Также было показано, что CRISPR/Cas9 опосредованное удаление предполагаемой регуляторной области, содержащей rs4407214, приводило к снижению уровня экспрессии *PLB1* (фосфолипазы B1), находящегося на расстоянии около 400 т. п. н. от *WDR43*.

### Массовая интерпретация данных GWAS с помощью методов функциональной геномики

По результатам GWAS, с признаком (заболеванием), как правило, связано множество локусов (Goldstein, 2009; Boyle et al., 2017), большинство из которых, в свою очередь, содержит множество часто совместно наследуемых SNP (Tak, Farnham, 2015; Schaid et al., 2018), поэтому выбор среди них потенциальных rSNP, вовлеченных в механизм развития патологии, весьма затруднен. К настоящему времени разработан ряд эффективных экспериментальных подходов к решению этой задачи. Прежде всего, это масштабированные варианты подходов, используемых для исследования отдельных rSNP: массовое параллельное исследование репортерных конструкций (massively parallel reporter assay, MPRA), Reel-seq, SNP-seq и SNP-SELEX (Zhao et al., 2020; Lu et al., 2021; Yan et al., 2021).

В частности, MPRA был успешно применен для поиска rSNP, играющих ключевую роль в генетической предрасположенности к красной волчанке (Lu et al., 2021). По данным GWAS, с этим заболеванием ассоциировано 3073 SNP в 91 локусе. Авторы сконструировали баркодированную библиотеку, содержащую 12396 олигонуклеотидов длиной 170 п. н., содержащих в центре все известные варианты для этих 3073 SNP, которые были встроены перед минимальным промотором, присоединенным к гену *eGFP*. На клеточной линии GM12878 было показано влияние альтернативного аллеля на энхансерную активность вставок для 51 SNP из 27 локусов. Небольшое количество выявленных rSNP, вероятнее всего, связано с трансфекцией только одной линии клеток; при использовании нескольких клеточных линий их число стало бы существенно больше из-за увеличения набора вовлеченных в исследование ТФ. Подобным образом с помощью MPRA было определено, что 30 из 832 SNP, связанных, по данным GWAS, с риском развития меланомы, обнаруживают существенную разницу во влиянии альтернативных аллелей на экспрессию репортерного гена в клеточной линии меланомы UACC903 (Choi et al., 2020). Для одного из этих 30 SNP (rs398206), расположенного в интроне 1 гена *MX2*, разница была максимальной. Установлено, что рискованный аллель А rs398206 существенно усиливает связывание ТФ YY1 в условиях *in vitro* (EMSA) и *in vivo* (ChIP-AS-qPCR), что приводит к увеличению уровня экспрессии *MX2*, способствующему развитию меланомы (Choi et al., 2020). Другие примеры можно найти в работах (Ulirsch et al., 2016; Liu S. et al., 2017; Kalita et al., 2018; Klein et al., 2019).

С помощью методически мало различающихся Reel-seq и SNP-seq, основанных на сравнительном изучении связывания ТФ с олигонуклеотидами, содержащими альтернативные аллели, был отобран 521 потенциальный rSNP из 4316 связанных с развитием рака молочной железы по данным GWAS (Zhao et al., 2020) и 403 из 903 ассо-

циированных с раком простаты соответственно (Zhang et al., 2018). Наиболее масштабное исследование с использованием подхода из данной группы опубликовано в 2021 г. (Yan et al., 2021). Подход был назван SNP-SELEX. Для его реализации авторы использовали библиотеку из 383544 олигонуклеотидов длиной 40 п. н., содержащих в центральной части все возможные аллели 95886 SNP. SNP были выбраны по принципу их ассоциации с помощью GWAS с диабетом второго типа или по принципу локализации в окне размером 500 т. п. н., которое содержало бы связанный с этой патологией вариант. Используя 270 рекомбинатных ТФ, авторы провели мультиплексный анализ их связывания с олигонуклеотидами и выявили 11079 SNP, демонстрирующих существенное влияние аллеля на связывание хотя бы с одним ТФ.

Для массовой интерпретации результатов GWAS широко используются также данные функциональной геномики из доступных баз, такие как данные о полногеномных профилях (ChIP-seq) связывания ТФ (Li S. et al., 2020) и гистоновых модификаций (Jones et al., 2020), полногеномных профилях открытого хроматина (ATAC-seq) (Corces et al., 2020), трехмерных хроматиновых контактах (Corces et al., 2020) и расположении энхансерных и суперэнхансерных районов (Gong et al., 2018; Sun W. et al., 2018; Nasser et al., 2021), данные eQTL анализа (Gamazon et al., 2018; Zheng et al., 2019; Barbeira et al., 2021).

Так, например, 8005 SNP, либо непосредственно связанных, по данным GWAS, с большим депрессивным расстройством, либо находящихся в той же группе сцепления, были картированы в пиках ChIP-seq, полученных на тканях мозга или в клетках нейронального происхождения с использованием антител к 34 различным ТФ (Li S. et al., 2020). Затем был произведен поиск сайтов связывания соответствующих ТФ в местах локализации SNP с использованием базы данных, содержащей 7699 весовых матриц (PWM) (Whittington et al., 2016), и обнаружено, что 34 SNP разрушают сайты связывания 15 ТФ. Репортерный анализ подтвердил влияние аллеля на экспрессию для 29 SNP. Один из них, rs3101339, попадал в потенциальный сайт связывания ТФ REST в промоторном районе гена *NEGR1*, а замена А на С существенно повреждала структуру данного сайта, что отражалось в снижении уровня экспрессии репортерного гена под контролем вставки, несущей аллель С. Влияние rs3101339 на экспрессию гена *NEGR1* в условиях *in vivo* было подтверждено путем элиминации соответствующего фрагмента с помощью CRISPR-Cas9 геномного редактирования. Поскольку продукт гена *NEGR1* играет важную роль в поддержании необходимой плотности дендритных шипиков, снижение его экспрессии при замене А на С может вносить существенный вклад в развитие депрессивного состояния (Li S. et al., 2020).

Данные о полногеномных профилях гистоновых меток активного хроматина тоже оказываются весьма информативными для функциональной интерпретации результатов GWAS. Например, для анализа множества SNP, связанных с развитием эпителиального рака яичников, было проведено их картирование в области ChIP-seq пиков для H3K27Ac, полученных авторами при исследовании 26 образцов этого типа рака (Jones et al., 2020). Затем с

помощью инструмента motifbreakR (Coetzee et al., 2015) среди картированных SNP были выбраны 469, в которых нуклеотидная замена существенно меняла сайт связывания какого-либо ТФ. Наиболее частым было изменение последовательности сайта связывания ТФ REST, для которого отмечены как онкосупрессорная, так и онкогенная функции (Jones et al., 2020). Использование массивов ChIP-seq данных о различных гистоновых модификациях из соответствующих баз в сочетании с данными и инструментами ресурса потенциальных регуляторных вариантов (rVarBase) (Guo et al., 2016) позволило также обнаружить 286 и 366 локализованных в суперэнхансерах потенциальных rSNP, связанных с диабетом второго типа (Sun W. et al., 2018) и ишемической болезнью сердца (Gong et al., 2018) соответственно, которые меняли предсказанные ССТФ.

### Независимые от GWAS функциональные подходы к выявлению потенциальных rSNP

Современные массовые функциональные подходы для поиска потенциальных rSNP в основном опираются на регистрацию влияния нуклеотидной замены на некий молекулярный фенотип. Это может быть определение в транскриптомах разницы в уровне экспрессии отдельных генов у гомозигот по разным аллелям, а также гетерозигот для каждого SNP (eQTL анализ); идентификация SNP, проявляющих асимметрию представленности в транскриптомных (RNA-seq) – аллель-асимметричные события экспрессии (ASE), или в эпигеномных данных (DNase-seq, ChIP-seq, ATAC-seq) – аллель-асимметричные события связывания (ASB), а также определение эффекта аллеля на экспрессию репортерного гена с помощью массового параллельного репортерного исследования (MPRA).

### eQTL анализ

Термин eQTL либо означает факт наличия связи между вариантом (eVariant) и уровнем экспрессии некоего гена/генов (eGene/eGenes) (GTEx Consortium, 2017, 2020), либо относится непосредственно к SNP, аллели которого демонстрируют такую связь, и в этом смысле употребляется гораздо чаще (Fairfax et al., 2014; Fan et al., 2020; Jiang et al., 2020; Werling et al., 2020). Для поиска eQTL пригодны транскриптомные данные, полученные как с использованием микрочипов (Fairfax et al., 2014; Westra, Franke, 2014), так и с помощью РНК-секвенирования (RNA-seq) (GTEx Consortium, 2020). Их вполне достаточно для детекции eQTL, расположенных в транскрибируемых районах (Göring et al., 2007). Для выявления же всего их множества требуются также данные по секвенированию генома (GTEx Consortium, 2020; Werling et al., 2020). В отличие от GWAS, для проведения которых необходимы биологические образцы от многих тысяч индивидуумов (Tam et al., 2019), для eQTL анализа достаточно нескольких сотен участников (Westra et al., 2013; Fairfax et al., 2014; GTEx Consortium, 2020). Однако так же, как и в случае GWAS, для eQTL анализа остается актуальной проблема выделения действительно имеющего отношение к формированию признака SNP от детектируемых за счет неравновесия по сцеплению маркерных вариантов (Zou et al., 2019; Umans et al., 2021).

Наиболее масштабным проектом по получению транскриптомных данных и анализу eQTL является международный консорциум GTEx, в рамках которого получены данные RNA-seq для 15201 образца из 49 тканей, взятых постмортально у 838 доноров, что позволило идентифицировать 4278636 eQTL, связанных с изменением экспрессии 18262 и 5006 генов, кодирующих белки и lincRNA соответственно (GTEx Consortium, 2020).

Существуют и другие массивы eQTL, в том числе полученные не на постмортальном, а на биопсийном материале (Fairfax et al., 2014; Stolze et al., 2020). Например, в работе (Stolze et al., 2020) при анализе транскриптомов (RNA-seq) эндотелия аорты 157 доноров были установлены тысячи eQTL, не зарегистрированных в базе консорциума GTEx. В.Р. Fairfax с коллегами использовали CD14<sup>+</sup> моноциты, полученные от здоровых индивидуумов, которые в условиях *in vitro* обрабатывали либо интерфероном гамма (в течение 24 ч, 367 индивидуумов), либо липополисахаридом (LPS) бактериальной стенки (2 и 24 ч, 261 и 322 индивидуума соответственно). В качестве контроля использовали CD14<sup>+</sup> моноциты 414 человек. С помощью микрочипового РНК-профилирования и генотипирования было исследовано 609704 SNP (minor allele frequency, MAF > 0.04) и обнаружена 21516 eQTL, 24.6 % из которых проявляли себя в контрольных клетках, 21.6 % – после двухчасовой обработки LPS, а 25.4 и 28.3 % – после 24-часовой обработки LPS и IFN- $\gamma$  соответственно. Результаты этой работы демонстрируют важную роль вариаций генома в характере транскриптомного ответа на препарат (Fairfax et al., 2014). В заключение надо отметить, что для поиска eQTL может быть взят любой массив транскриптомных данных, полученных для сотни и более индивидуумов, как, например, было сделано нами (Korbolina et al., 2021) с использованием данных RNA-seq для постмортальных образцов мозга 96 человек (Ramaker et al., 2017).

В настоящее время eQTL анализ преимущественно применяется для идентификации групп генов, вовлеченных в формирование признака (Hormozdiari et al., 2016; Morrow et al., 2018; Gamazon et al., 2019; Ratnapriya et al., 2019; Jaffe et al., 2020). Также его результаты часто используют для приоритизации обнаруженных с помощью GWAS однонуклеотидных замен с целью их последующего тщательного экспериментального изучения. В качестве примера можно привести rs13239597, расположенный в промоторе гена *TNPO3* и, согласно GWAS, ассоциированный с красной волчанкой и рассеянным склерозом. eQTL анализ транскриптомов лимфобластоидных клеточных линий, полученных от 373 индивидуумов, не выявил никакого влияния rs13239597 на экспрессию гена *TNPO3*, зато обнаружил достоверную связь аллеля А этого SNP с увеличенной экспрессией гена *IRF5*, расположенного на расстоянии 118 т. п. н. (Thynn et al., 2020), что совпадало с данными консорциума GTEx (GTEx Consortium, 2017). Анализ доступных результатов Hi-C позволил установить, что *IRF5* является одним из 12 генов, непосредственно контактирующих с участком локализации rs13239597. Компьютерное исследование мотивов, потенциально меняющих сродство к ТФ в результате нуклеотидной замены (Coetzee et al., 2015), выявило четыре таких ТФ: EVI1,

ERF, GATA1 и TAL1. С помощью ChIP-AS-qPCR было показано, что EVI1 гораздо лучше связывается с районом rs13239597 в случае А аллеля по сравнению с аллелем С (Thynn et al., 2020). Подобные примеры можно найти также в статьях (Roca-Ayats et al., 2019; Jiang et al., 2020; Tian et al., 2020).

### Широкомасштабный поиск аллель-специфичных событий экспрессии (ASE) и связывания (ASB)

Развитие основанных на NGS методов транскриптомного (RNA-seq) и эпигеномного анализа (ChIP-seq, DNase-seq, ATAC-seq) открыло уникальную возможность количественного определения разницы в представленности двух аллелей (дисбаланс аллелей) каждого гетерозиготного полиморфного сайта диплоидного организма в соответствующих данных (Maurano et al., 2015; Cavalli et al., 2016a, b; Castel et al., 2020; Fan et al., 2020; Xu et al., 2020; Korbolina et al., 2021). Важная особенность этих подходов к выявлению потенциальных rSNP в сравнении с eQTL анализом и тем более с GWAS, в которых проводятся исследования SNP множества индивидуумов на фоне различного геномного контекста и условий жизни, состоит в том, что аллель-асимметричные события регистрируются для каждого индивидуума и фон для них один и тот же. Это позволяет получать достоверные данные при исследовании очень малого числа индивидуумов, вплоть до одного (Harvey et al., 2015). Увеличение выборок требуется лишь для вовлечения в анализ большего числа SNP, находящихся в гетерозиготном состоянии. Так, проведенные расчеты показывают, что использование данных, полученных для 20 индивидуумов, теоретически позволяет определить ASE или ASB события для 65–70 % SNP, имеющих частоту встречаемости в популяции  $\geq 5$  % (Cavalli et al., 2016a).

Благодаря этому обстоятельству существенно расширяются возможности проведения фармакогенетических и фармакогеномных исследований. Самым ярким примером такого исследования является одновременное изучение аллель-специфичных эффектов 50 различных веществ (стероидных и пептидных гормонов, нутриентов, широко применяемых лекарств и ряда загрязнителей окружающей среды) с использованием первичных культур пяти типов клеток (LCL, PBMC, HUVEC, SMC и меланоцитов), каждый из которых был представлен образцами от трех индивидуумов (Moyerbrailean et al., 2016). Анализ полученных транскриптомных данных позволил обнаружить более 300 SNP, дисбаланс в представленности аллелей которых в транскриптомах возникал или существенно возрастал в ответ на обработку тем или иным препаратом. С помощью такого же подхода были выявлены зависимые от индуктора (LPS бактериальной стенки) ASE в 19 генах иммунного ответа при анализе транскриптомов мононуклеарных клеток крови восьми индивидуумов (Edsgård et al., 2016), а также 561 ASE, реагирующих на обработку CD4<sup>+</sup> Т клеток (от 24 генотипированных человек) иммунизованными антителами к CD3/CD28 (Gutierrez-Arcelus et al., 2020). Получение таких результатов открывает новый, не связанный с какой-либо первоначальной гипотезой путь к выяснению механизмов индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам.

Самый крупный к настоящему времени ресурс ASE, содержащий 431 миллион таких событий, получен на основе данных RNA-seq и полногеномного секвенирования (WGS) консорциума GTEx (GTEx Consortium, 2020) и опубликован в статье (Castel et al., 2020). Этот ресурс может служить источником для массового выявления rSNP, например, при сопоставлении с данными GWAS или eQTL. Важно отметить, что в случае отсутствия WGS соответствующая информация может быть получена с помощью более сложных методов биоинформатического поиска аллель-специфичных событий непосредственно в данных RNA-seq (Harvey et al., 2015; Moyerbrailean et al., 2016; Fan et al., 2020; Korbolina et al., 2021).

ChIP-seq эксперименты с использованием антител к различным ТФ позволяют напрямую регистрировать события аллель-асимметричного взаимодействия этих белков со своими сайтами в случае гетерозиготного состояния SNP в этих сайтах. В пионерной работе, выполненной в лаборатории Клауса Ваделиуса, были проанализированы все доступные на тот момент профили связывания ТФ из проекта ENCODE в линиях клеток GM12878 (В клетки), H1-hESC, K562 и SK-N-SH, что позволило обнаружить 9962 SNP, демонстрирующих аллельный дисбаланс в связывании ТФ (ASB) (Cavalli et al., 2016b). С помощью того же подхода было найдено 3713 SNP с аллельным дисбалансом в связывании ТФ в линиях клеток HepG2 и HeLa-S3. Тестирование 39 из них в репортерной системе люциферазы подтвердило влияние аллеля на экспрессию репортерного гена для 27 SNP (Cavalli et al., 2016a). Детальный анализ одного из них, rs953413, показал, что аллель А разрушает сайт связывания ТФ FOXA, в результате чего снижается связывание не только этого ТФ, но и кооперативно взаимодействующего с ним ТФ HNF4α, что в итоге приводит к снижению экспрессии гена *ELOVL2* и может быть одним из факторов патогенеза неалкогольной жировой болезни печени (Pan et al., 2020).

Поскольку аллель-асимметричные изменения в профилях гистоновых модификаций и открытого хроматина могут являться отражением вызванных SNP изменений в связывании ТФ (Kar et al., 2014; Hatayama, Aruga, 2018; Huang et al., 2018; Yi et al., 2020), эти данные тоже широко применяются для поиска ASB. Так, в работе (Maurano et al., 2015) было проанализировано 493 профиля открытого хроматина (DNase-seq), полученного на различных линиях клеток, в которых обнаружено 64 599 SNP с ASB. Биоинформатический анализ с использованием весовых матриц для 2203 мотивов ССТФ из разных источников показал, что большинство выявленных SNP может влиять на связывание ТФ и, как следствие, на доступность соответствующих районов к DNase I (Maurano et al., 2015). Более новый метод обнаружения открытого хроматина ATAC-seq, основанный на способности гиперактивной мутантной формы транспозазы Tn5 опознавать открытые участки ДНК в составе хроматина (Marinov, Shipony, 2021), также используется для поиска ASB событий. В частности, с его помощью выявлено 53 rSNP в клеточной линии рака молочной железы MCF-7 и 125 rSNP в линии мезенхимальных стволовых клеток MSC человека. Тридцать процентов rSNP, найденных в MCF-7, и 43 % найденных в MSC идентифицируются как eQTL в данных

консорциума GTEx, что указывает на их влияние на экспрессию генов (Xu et al., 2020). Примеры использования данных ChIP-seq с антителами к гистоновым меткам для регистрации событий ASB можно найти в статьях (Sun J. et al., 2016; D'Oliveira Albanus et al., 2021; Li M. et al., 2021).

В качестве наиболее продуктивного подхода к поиску rSNP можно рассматривать сочетание поиска событий ASE и ASB. К примеру, в нашей работе (Korbolina et al., 2018) вначале были идентифицированы события ASB в данных ChIP-seq из проекта ENCODE для гистоновых модификаций H3K27ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 и H3K27me3, а также для 456 ТФ и связанных с ними белков в линиях клеток человека K562, MCF-7 и HCT-116. Затем с использованием данных RNA-seq, полученных на тех же линиях, были выделены SNP (rSNP), связанные с изменением уровня экспрессии генов. По данным GWAS, из 1633 найденных таким образом rSNP 27 имеют связь с онкологическими заболеваниями (Korbolina et al., 2018), а 14 – с когнитивными расстройствами (Bryzgalov et al., 2018). Еще 30 rSNP удалось связать с колоректальным раком (КРР), используя данные ICGC (International Cancer Genome Consortium) (Seshagiri et al., 2012). Генотипирование больных КРР и здоровых индивидуумов по шести из них показало связь rs590352, rs4796672 и rs2072580 с данным заболеванием (Leberfarb et al., 2020). Для rs2072580 была также найдена связь с раком молочной железы (Degtyareva et al., 2020). Позднее применение этого подхода позволило выявить 14266 rSNP при обработке полученных в работе (Reyes-Palomares et al., 2020) данных профилирования гистоновой метки H3K4me3 (ChIP-seq) и RNA-seq для образцов эпителия легочной артерии 19 индивидуумов (Korbolina et al., 2021).

### Массовое параллельное изучение репортерных конструкций (MPRA)

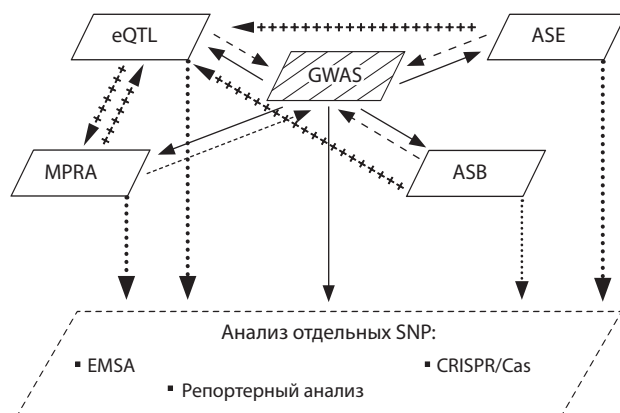
Анализ влияния аллелей полиморфных сайтов на экспрессию репортерного гена при одновременной трансфекции сотен и тысяч баркодированных плазмидных конструкций в эукариотические клетки с последующим секвенированием транскриптомов также является информативным подходом для поиска rSNP (Vockley et al., 2015; Tewhey et al., 2016; Movva et al., 2019). Наиболее масштабное исследование с помощью этого подхода было проведено в лаборатории Баса Ван Стинсела (van Arensbergen et al., 2019). С использованием беспромоторной плазмиды и фрагментированных геномов (длина фрагмента 150–500 п. н.) четырех индивидуумов, принадлежащих разным этническим группам, для каждого индивидуума были сконструированы две баркодированные библиотеки, где вставки должны были играть роль промотора. При этом авторы, основываясь на данных об инициации транскрипции в энхансерных районах (Natoli, Andrau, 2012; van Arensbergen et al., 2017), рассчитывали регистрировать не только промоторы, но и энхансеры. Использование ДНК людей генетически далеких этносов позволяло надеяться на охват максимального числа полиморфных сайтов, находящихся в гомозиготе по разным аллелям хотя бы у двух из них.

После трансфекции полученными библиотеками K562 и HepG2 клеток было найдено 19 и 14 тысяч потенциаль-

ных rSNP соответственно, большая часть из которых не перекрывалась, что еще раз свидетельствует о тканеспецифичности надгеномной (белковой) регуляторной машины. Выявленные SNP демонстрировали существенное обогащение в регуляторных районах генома. При этом обогащение было втрое выше в промоторных районах (приблизительно в 15 раз), чем в энхансерных (приблизительно в 5 раз), что, очевидно, объясняется дизайном репортерных конструкций. Для ряда rSNP с помощью масс-спектрометрического анализа белков, взаимодействующих с олигонуклеотидами, содержащими альтернативные аллели, авторам удалось идентифицировать ТФ, сайты связывания которых меняет нуклеотидная замена. В частности, показано, что аллель А rs623853 нарушает связывание ТФ семейства ELF, а аллель С rs554591 снижает связывание ZNF787, одновременно повышая связывание KLF и SP (van Arensbergen et al., 2019).

### Заключение

Программы координированного включения, выключения и изменения уровня экспрессии различных генов, лежащие в основе онтогенетических событий, существования множества типов дифференцированных клеток и способности клеток реагировать на различные факторы внешней и внутренней среды, обеспечиваются регуляторной частью генома многоклеточных организмов. Информация, закодированная в регуляторных районах, транслируется в необходимый паттерн генной экспрессии прежде всего за счет связывания ТФ со специфическими последовательностями в регуляторных районах (промоторами, энхансерами, сайленсерами и т. д.) (Lan et al., 2012; Меркулова и др., 2013; Dubois-Chevalier et al., 2018; Chen, Pugh, 2021; Tobias et al., 2021). По современным представлениям, SNP в регуляторных районах генов, затрагивающие сайты связывания ТФ и изменяющие уровень генной экспрессии, играют центральную роль в вариабельности фенотипических проявлений, включая предрасположенность/устойчивость к многофакторным заболеваниям (Maurano et al., 2015; Deplancke et al., 2016; Carrasco Pro et al., 2020). С этим связан огромный интерес как к функциональной интерпретации SNP, демонстрирующих ассоциацию с различными заболеваниями (в первую очередь по данным GWAS), так и к разработке массовых функциональных подходов к поиску rSNP. Интерпретация данных GWAS проводится либо на уровне отдельных SNP, либо на массовом уровне с использованием разнообразных методов функциональной геномики (рис. 2). Параллельно те же методы функциональной геномики применяются для самостоятельного поиска rSNP, но при этом возникает необходимость решения обратной задачи – установления связи найденных rSNP с признаком (заболеванием). Самым популярным способом решения этой задачи является сопоставление полученных результатов с имеющимися данными GWAS (см. рис. 2). Однако таким образом обычно удается связать с различными признаками лишь 1.5–3 % найденных rSNP (Cavalli et al., 2016b, 2019; Korbolina et al., 2021). В этой связи весьма перспективным представляется eQTL анализ, в результате которого можно установить влияние многих конкретных rSNP на экспрессию довольно больших групп генов, последующий



**Рис. 2.** Схема комплексного подхода для поиска функционально значимых для развития признака (патологии) SNP, основанного на использовании двух противоположных принципов: от связи с признаком к его функции (сплошные стрелки) и, наоборот, от функции к признаку (штриховые стрелки). Стрелки из крестиков показывают пути усиления доказательной базы функциональной значимости массивов SNP, а пунктирные – пути детального изучения отдельных SNP.

анализ которых с помощью современных инструментов функциональной аннотации (GO, Kegg и др.) позволяет «выходить» на признак (Korboлина et al., 2021).

Подводя итоги, следует заключить, что комплексное использование двух основанных на противоположных принципах подходов к поиску значимых для развития признака (патологии) SNP – с одной стороны, исходящего из данных по ассоциации SNP с неким признаком, а с другой стороны, идущего от определения аллель-специфических изменений на молекулярном уровне (в транскриптом или регуломе) – существенно обогащает картину наших знаний о роли генетических детерминант в молекулярных механизмах формирования признаков, включая предрасположенность к многофакторным заболеваниям.

## Список литературы / References

Меркулова Т.И., Ананько Е.А., Игнатъева Е.В., Колчанов Н.А. Регуляторные коды транскрипции геномов эукариот. *Генетика*. 2013;49(1):37-54. DOI 10.7868/S0016675813010074.  
[Merkulova T.I., Ananko E.A., Ignatieva E.V., Kolchanov N.A. Transcription regulatory codes of eukaryotic genomes. *Russ. J. Genet.* 2013;49(1):29-45. DOI 10.1134/S1022795413010079.]  
Antonseva E.V., Matveeva M.Y., Bondar N.P., Kashina E.V., Leberfarb E.Y., Bryzgalov L.O., Gervas P.A., Ponomareva A.A., Cherdynseva N.V., Orlov Y.L., Merkulova T.I. Regulatory single nucleotide polymorphisms at the beginning of intron 2 of the human *KRAS* gene. *J. Biosci.* 2015;40(5):873-883. DOI 10.1007/s12038-015-9567-8.  
Barbeira A.N., Bonazzola R., Gamazon E.R., Liang Y., Park Y., Kim-Hellmuth S., Wang G., Jiang Z., Zhou D., Hormozdiari F., Liu B., Rao A., Hamel A.R., Pividori M.D., Aguet F., Bastarache L., Jordan D.M., Verbanck M., Do R., Stephens M., Ardlie K., McCarthy M., Montgomery S.B., Segrè A.V., Brown C.D., Lappalainen T., Wen X., Im H.K. Exploiting the GTEx resources to decipher the mechanisms at GWAS loci. *Genome Biol.* 2021;22(1):49. DOI 10.1186/s13059-020-02252-4.  
Boldes T., Merenbakh-Lamin K., Journo S., Shachar E., Lipson D., Yeheskel A., Pasmanik-Chor M., Rubinek T., Wolf I. R269C variant of *ESR1*: high prevalence and differential function in a subset of pancreatic cancers. *BMC Cancer*. 2020;20(1):531. DOI 10.1186/s12885-020-07005-x.

Boyle E.A., Li Y.I., Pritchard J.K. An expanded view of complex traits: from polygenic to omnigenic. *Cell*. 2017;169(7):1177-1186. DOI 10.1016/j.cell.2017.05.038.  
Bryzgalov L.O., Antonseva 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.  
Bryzgalov L.O., Korboлина E.E., Brusentsov I.I., Leberfarb E.Y., Bondar N.P., Merkulova T.I. Novel functional variants at the GWAS-implicated loci might confer risk to major depressive disorder, bipolar affective disorder and schizophrenia. *BMC Neurosci.* 2018; 19(S1):22. DOI 10.1186/s12868-018-0414-3.  
Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M., Harris L.W., Hayhurst J., Malangone C., McMahon A., Morales J., Mountjoy E., Solliis E., Suveges D., Vrousou O., Whetzel P.L., Amode R., Guillen J.A., Riat H.S., Trevanion S.J., Hall P., Junkins H., Flicek P., Burdett T., Hindorf L.A., Cunningham F., Parkinson H. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1):D1005-D1012. DOI 10.1093/nar/gky1120.  
Carrasco Pro S., Bulekova K., Gregor B., Labadorf A., Fuxman Bass J.I. Prediction of genome-wide effects of single nucleotide variants on transcription factor binding. *Sci. Rep.* 2020;10(1):17632. DOI 10.1038/s41598-020-74793-4.  
Castel S.E., Aguet F., Mohammadi P., Aguet F., Anand S., Ardlie K.G., Gabriel S., Getz G.A., Graubert A., Hadley K., ... Moore H.M., Nierras C.R., Rao A.K., Vaught J.B., Volpi S., Ardlie K.G., Lappalainen T. A vast resource of allelic expression data spanning human tissues. *Genome Biol.* 2020;21(1):234. DOI 10.1186/s13059-020-02122-z.  
Cavalli M., Pan G., Nord H., Wallén Arzt E., Wallerman O., Wadelius C. Allele-specific transcription factor binding in liver and cervix cells unveils many likely drivers of GWAS signals. *Genomics*. 2016a;107(6):248-254. DOI 10.1016/j.ygeno.2016.04.006.  
Cavalli M., Pan G., Nord H., Wallerman O., Wallén Arzt E., Berggren O., Elvers I., Eloranta M.-L., Rönnblom L., Lindblad Toh K., Wadelius C. Allele-specific transcription factor binding to common and rare variants associated with disease and gene expression. *Hum. Genet.* 2016b;135(5):485-497. DOI 10.1007/s00439-016-1654-x.  
Cavalli M., Baltzer N., Umer H.M., Grau J., Lemnian I., Pan G., Wallerman O., Spalinskas R., Sahlén P., Grosse I., Komorowski J., Wadelius C. Allele specific chromatin signals, 3D interactions, and motif predictions for immune and B cell related diseases. *Sci. Rep.* 2019;9(1):2695. DOI 10.1038/s41598-019-39633-0.  
Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis. Markers*. 2001;17(2): 89-98. DOI 10.1155/2001/858760.  
Chen H., Pugh B.F. What do transcription factors interact with? *J. Mol. Biol.* 2021;433(14):166883. DOI 10.1016/j.jmb.2021.166883.  
Choi J., Zhang T., Vu A., Ablain J., Makowski M.M., Colli L.M., Xu M., Hennessey R.C., Yin J., Rothschild H., Gräwe C., Kovacs M.A., Funderburk K.M., Brossard M., Taylor J., Pasaniuc B., Chari R., Chanock S.J., Hoggart C.J., Demenais F., Barrett J.H., Law M.H., Iles M.M., Yu K., Vermeulen M., Zon L.I., Brown K.M. Massively parallel reporter assays of melanoma risk variants identify *MX2* as a gene promoting melanoma. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2718. DOI 10.1038/s41467-020-16590-1.  
Claussnitzer M., Cho J.H., Collins R., Cox N.J., Dermitzakis E.T., Hurles M.E., Kathiresan S., Kenny E.E., Lindgren C.M., MacArthur D.G., North K.N., Plon S.E., Rehm H.L., Risch N., Rotimi C.N., Shendure J., Soranzo N., McCarthy M.I. A brief history of human disease genetics. *Nature*. 2020;577(7789):179-189. DOI 10.1038/s41586-019-1879-7.  
Coetzee S.G., Coetzee G.A., Hazelett D.J. motifbreakR: an R/Bioconductor package for predicting variant effects at transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2015;31(23):3847-3849. DOI 10.1093/bioinformatics/btv470.  
Cooper D. The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(1):285-287. DOI 10.1093/nar/26.1.285.

- Corces M.R., Shcherbina A., Kundu S., Gloude-mans M.J., Frésard L., Granja J.M., Louie B.H., Eulalio T., Shams S., Bagdatli S.T., Mumbach M.R., Liu B., Montine K.S., Greenleaf W.J., Kundaje A., Montgomery S.B., Chang H.Y., Montine T.J. Single-cell epigenomic analyses implicate candidate causal variants at inherited risk loci for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Genet.* 2020;52(11):1158-1168. DOI 10.1038/s41588-020-00721-x.
- Couch F.J., Kuchenbaecker K.B., Michailidou K., Mendoza-Fandino G.A., Nord S., Lilyquist J., Olswold C., Hallberg E., Agata S., Ahsan H., ... Slager S., Chenevix-Trench G., Pharoah P.D.P., Monteiro A.A.N., Garcia-Closas M., Easton D.F., Antoniou A.C. Identification of four novel susceptibility loci for oestrogen receptor negative breast cancer. *Nat. Commun.* 2016;7(1):11375. DOI 10.1038/ncomms11375.
- Degtyareva A.O., Leberfarb E.Y., Efimova E.G., Brusentsov I.I., Usova A.V., Lushnikova E.L., Merkulova T.I. *rs2072580T>A* polymorphism in the overlapping promoter regions of the *SART3* and *ISCU* genes associated with the risk of breast cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020;169(1):81-84. DOI 10.1007/s10517-020-04829-2.
- Deplancke B., Alpern D., Gardeux V. The genetics of transcription factor DNA binding variation. *Cell.* 2016;166(3):538-554. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.012.
- Dichgans M., Malik R., König I.R., Rosand J., Clarke R., Gretarsdottir S., Thorleifsson G., Mitchell B.D., Assimes T.L., Levi C., ... Willenborg C., Laaksonen R., Voight B.F., Stewart A.F.R., Rader D.J., Hall A.S., Kooner J.S. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke.* 2014;45(1):24-36. DOI 10.1161/STROKEAHA.113.002707.
- D'Oliveira Albanus R., Kyono Y., Hensley J., Varshney A., Orchard P., Kitzman J.O., Parker S.C.J. Chromatin information content landscapes inform transcription factor and DNA interactions. *Nat. Commun.* 2021;12(1):1307. DOI 10.1038/s41467-021-21534-4.
- Dubois-Chevalier J., Mazrooei P., Lupien M., Staels B., Lefebvre P., Eeckhoutte J. Organizing combinatorial transcription factor recruitment at cis-regulatory modules. *Transcription.* 2018;9(4):233-239. DOI 10.1080/21541264.2017.1394424.
- Edsgård D., Iglesias M.J., Reilly S.-J., Hamsten A., Tornvall P., Odeberg J., Emanuelsson O. GeneiASE: detection of condition-dependent and static allele-specific expression from RNA-seq data without haplotype information. *Sci. Rep.* 2016;6(1):21134. DOI 10.1038/srep21134.
- Fachal L., Aschard H., Beesley J., Barnes D.R., Allen J., Kar S., Pooley K.A., Dennis J., Michailidou K., Turman C., ... Edwards S.L., Antoniou A.C., Chenevix-Trench G., Simard J., Easton D.F., Kraft P., Dunning A.M. Fine-mapping of 150 breast cancer risk regions identifies 191 likely target genes. *Nat. Genet.* 2020;52(1):56-73. DOI 10.1038/s41588-019-0537-1.
- Fairfax B.P., Humburg P., Makino S., Naranbhai V., Wong D., Lau E., Jostins L., Plant K., Andrews R., McGee C., Knight J.C. Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science.* 2014;343(6175):1246949. DOI 10.1126/science.1246949.
- Fan J., Hu J., Xue C., Zhang H., Susztak K., Reilly M.P., Xiao R., Li M. ASEP: gene-based detection of allele-specific expression across individuals in a population by RNA sequencing. *PLoS Genet.* 2020;16(5):e1008786. DOI 10.1371/journal.pgen.1008786.
- Fang J., Jia J., Makowski M., Xu M., Wang Z., Zhang T., Hoskins J.W., Choi J., Han Y., Zhang M., ... Amos C.I., Iles M.M., Nathanson K.L., Landi M.T., Vermeulen M., Brown K.M., Amundadottir L.T. Functional characterization of a multi-cancer risk locus on chr5p15.33 reveals regulation of *TERT* by ZNF148. *Nat. Commun.* 2017;8(1):15034. DOI 10.1038/ncomms15034.
- Farh K.K.-H., Marson A., Zhu J., Kleinewietfeld M., Housley W.J., Beik S., Shores N., Whitton H., Ryan R.J.H., Shishkin A.A., Hatan M., Carrasco-Alfonso M.J., Mayer D., Luckey C.J., Patsopoulos N.A., De Jager P.L., Kuchroo V.K., Epstein C.B., Daly M.J., Hafler D.A., Bernstein B.E. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature.* 2015;518(7539):337-343. DOI 10.1038/nature13835.
- Fornes O., Castro-Mondragon J.A., Khan A., van der Lee R., Zhang X., Richmond P.A., Modi B.P., Correard S., Gheorghe M., Baranašić D., Santana-Garcia W., Tan G., Chèneby J., Ballester B., Parcy F., Sandelin A., Lenhard B., Wasserman W.W., Mathelier A. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D87-D92. DOI 10.1093/nar/gkz1001.
- Gamazon E.R., Segre A.V., van de Bunt M., Wen X., Xi H.S., Hormozdiari F., Ongen H., Konkashbaev A., Derks E.M., Aguet F., Quan J., Nicolae D.L., Eskin E., Kellis M., Getz G., McCarthy M.I., Dermizakis E.T., Cox N.J., Ardlie K.G. Using an atlas of gene regulation across 44 human tissues to inform complex disease- and trait-associated variation. *Nat. Genet.* 2018;50(7):956-967. DOI 10.1038/s41588-018-0154-4.
- Gamazon E.R., Zwinderman A.H., Cox N.J., Denys D., Derks E.M. Multi-tissue transcriptome analyses identify genetic mechanisms underlying neuropsychiatric traits. *Nat. Genet.* 2019;51(6):933-940. DOI 10.1038/s41588-019-0409-8.
- Gao P., Xia J.-H., Sipeky C., Dong X.-M., Zhang Q., Yang Y., Zhang P., Cruz S.P., Zhang K., Zhu J., Lee H.-M., Suleman S., Giannareas N., Liu S., Tammela T.L.J., Auvinen A., Wang X., Huang Q., Wang Liguang, Manninen A., Vaarala M.H., Wang Liang, Schleutker J., Wei G.-H. Biology and clinical implications of the 19q13 aggressive prostate cancer susceptibility locus. *Cell.* 2018;174(3):576-589.e18. DOI 10.1016/j.cell.2018.06.003.
- Goldstein D.B. Common genetic variation and human traits. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(17):1696-1698. DOI 10.1056/NEJMp0806284.
- Gong J., Qiu C., Huang D., Zhang Y., Yu S., Zeng C. Integrative functional analysis of super enhancer SNPs for coronary artery disease. *J. Hum. Genet.* 2018;63(5):627-638. DOI 10.1038/s10038-018-0422-2.
- Göring H.H.H., Curran J.E., Johnson M.P., Dyer T.D., Charlesworth J., Cole S.A., Jowett J.B.M., Abraham L.J., Rainwater D.L., Comuzie A.G., Mahaney M.C., Almasy L., MacCluer J.W., Kissebah A.H., Collier G.R., Moses E.K., Blangero J. Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat. Genet.* 2007;39(10):1208-1216. DOI 10.1038/ng2119.
- GTEX Consortium. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature.* 2017;550(7675):204-213. DOI 10.1038/nature24277.
- GTEX Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science.* 2020;369(6509):1318-1330. DOI 10.1126/science.aaz1776.
- Guo L., Du Y., Qu S., Wang J. rVarBase: an updated database for regulatory features of human variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D888-D893. DOI 10.1093/nar/gkv1107.
- Gutierrez-Arcelus M., Baglaenko Y., Arora J., Hannes S., Luo Y., Amariuta T., Teslovich N., Rao D.A., Ermann J., Jonsson A.H., Navarrete C., Rich S.S., Taylor K.D., Rotter J.I., Gregersen P.K., Esko T., Brenner M.B., Raychaudhuri S. Allele-specific expression changes dynamically during T cell activation in HLA and other autoimmune loci. *Nat. Genet.* 2020;52(3):247-253. DOI 10.1038/s41588-020-0579-4.
- Harvey C.T., Moyerbrailean G.A., Davis G.O., Wen X., Luca F., Pique-Regi R. QuASAR: quantitative allele-specific analysis of reads. *Bioinformatics.* 2015;31(8):1235-1242. DOI 10.1093/bioinformatics/btu802.
- Hatayama M., Aruga J. Role of Zic family proteins in transcriptional regulation and chromatin remodeling. In: Aruga J. (Ed.) Zic Family. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1046. Singapore: Springer, 2018;353-380. DOI 10.1007/978-981-10-7311-3\_18.
- Hindorf L.A., Sethupathy P., Junkins H.A., Ramos E.M., Mehta J.P., Collins F.S., Manolio T.A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(23):9362-9367. DOI 10.1073/pnas.0903103106.



- Hormozdiari F., van de Bunt M., Segrè A.V., Li X., Joo J.W.J., Bilow M., Sul J.H., Sankararaman S., Pasaniuc B., Eskin E. Colocalization of GWAS and eQTL signals detects target genes. *Am. J. Hum. Genet.* 2016;99(6):1245-1260. DOI 10.1016/j.ajhg.2016.10.003.
- Huang Q., Ma C., Chen L., Luo D., Chen R., Liang F. Mechanistic insights into the interaction between transcription factors and epigenetic modifications and the contribution to the development of obesity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2018;9:370. DOI 10.3389/fendo.2018.00370.
- Jaffe A.E., Hoepfner D.J., Saito T., Blanpain L., Ukaigwe J., Burke E.E., Collado-Torres L., Tao R., Tajinda K., Maynard K.R., Tran M.N., Martinowich K., Deep-Soboslay A., Shin J.H., Kleinman J.E., Weinberger D.R., Matsumoto M., Hyde T.M. Profiling gene expression in the human dentate gyrus granule cell layer reveals insights into schizophrenia and its genetic risk. *Nat. Neurosci.* 2020;23(4):510-519. DOI 10.1038/s41593-020-0604-z.
- Jiang Z., Huang Y., Zhang P., Han C., Lu Y., Mo Z., Zhang Z., Li X., Zhao S., Cai F., Huang L., Chen C., Shi Z., Zhang Y., Ling F. Characterization of a pathogenic variant in GBA for Parkinson's disease with mild cognitive impairment patients. *Mol. Brain.* 2020;13(1):102. DOI 10.1186/s13041-020-00637-x.
- Jones M.R., Peng P.-C., Coetzee S.G., Tyrer J., Reyes A.L.P., Corona R.I., Davis B., Chen S., Dezem F., Seo J.-H., Kar S., Dareng E., Berman B.P., Freedman M.L., Plummer J.T., Lawrenson K., Pharoah P., Hazelett D.J., Gayther S.A. Ovarian cancer risk variants are enriched in histotype-specific enhancers and disrupt transcription factor binding sites. *Am. J. Hum. Genet.* 2020;107(4):622-635. DOI 10.1016/j.ajhg.2020.08.021.
- Kalita C.A., Brown C.D., Freiman A., Isherwood J., Wen X., Pique-Regi R., Luca F. High-throughput characterization of genetic effects on DNA-protein binding and gene transcription. *Genome Res.* 2018;28(11):1701-1708. DOI 10.1101/gr.237354.118.
- Kar S., Parbin S., Deb M., Shilpi A., Sengupta D., Rath S.K., Rakshit M., Patra A., Patra S.K. Epigenetic choreography of stem cells: the DNA demethylation episode of development. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71(6):1017-1032. DOI 10.1007/s00018-013-1482-2.
- Klein J.C., Keith A., Rice S.J., Shepherd C., Agarwal V., Loughlin J., Shendure J. Functional testing of thousands of osteoarthritis-associated variants for regulatory activity. *Nat. Commun.* 2019;10(1):2434. DOI 10.1038/s41467-019-10439-y.
- Knight J.C., Udalova I., Hill A.V.S., Greenwood B.M., Peshu N., Marsh K., Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the *TNF* promoter region is associated with severe malaria. *Nat. Genet.* 1999;22(2):145-150. DOI 10.1038/9649.
- Korboлина E.E., Brusentsov I.I., Bryzgalov L.O., Leberfarb E.Y., Degtyareva A.O., Merkulova T.I. Novel approach to functional SNPs discovery from genome-wide data reveals promising variants for colon cancer risk. *Hum. Mutat.* 2018;39(6):851-859. DOI 10.1002/humu.23425.
- Korboлина E.E., Bryzgalov L.O., Ustrokhanova D.Z., Postovalov S.N., Poverin D.V., Damarov I.S., Merkulova T.I. A panel of rSNPs demonstrating allelic asymmetry in both ChIP-seq and RNA-seq data and the search for their phenotypic outcomes through analysis of DEGs. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(14):7240. DOI 10.3390/ijms22147240.
- Krause M.D., Huang R.-T., Wu D., Shentu T.-P., Harrison D.L., Whalen M.B., Stolze L.K., Di Rienzo A., Moskowitz I.P., Civelek M., Romanoski C.E., Fang Y. Genetic variant at coronary artery disease and ischemic stroke locus 1p32.2 regulates endothelial responses to hemodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(48):E11349-E11358. DOI 10.1073/pnas.1810568115.
- Lan X., Farnham P.J., Jin V.X. Uncovering transcription factor modules using one- and three-dimensional analyses. *J. Biol. Chem.* 2012;287(37):30914-30921. DOI 10.1074/jbc.R111.309229.
- Lander E.S., Schork N.J. Genetic dissection of complex traits. *Science.* 1994;265(5181):2037-2048. DOI 10.1126/science.8091226.
- Lappalainen T. Functional genomics bridges the gap between quantitative genetics and molecular biology. *Genome Res.* 2015;25(10):1427-1431. DOI 10.1101/gr.190983.115.
- Leberfarb E.Y., Degtyareva A.O., Brusentsov I.I., Maximov V.N., Voevodova M.I., Autenshlus A.I., Morozov D.V., Sokolov A.V., Merkulova T.I. Potential regulatory SNPs in the *ATXN7L3B* and *KRT15* genes are associated with gender-specific colorectal cancer risk. *Per. Med.* 2020;17(1):43-54. DOI 10.2217/pme-2019-0059.
- Li M., Huang H., Li L., He C., Zhu L., Guo H., Wang L., Liu Jiafeng, Wu S., Liu Jingxin, Xu T., Mao Z., Cao N., Zhang K., Lan F., Ding J., Yuan J., Liu Y., Ouyang H. Core transcription regulatory circuitry orchestrates corneal epithelial homeostasis. *Nat. Commun.* 2021;12(1):420. DOI 10.1038/s41467-020-20713-z.
- Li S., Li Y., Li X., Liu J., Huo Y., Wang J., Liu Z., Li M., Luo X.-J. Regulatory mechanisms of major depressive disorder risk variants. *Mol. Psychiatry.* 2020;25(9):1926-1945. DOI 10.1038/s41380-020-0715-7.
- Li X.-X., Peng T., Gao J., Feng J.-G., Wu D.-D., Yang T., Zhong L., Fu W.-P., Sun C. Allele-specific expression identified rs2509956 as a novel long-distance cis-regulatory SNP for *SCGB1A1*, an important gene for multiple pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2019;317(4):L456-L463. DOI 10.1152/ajplung.00275.2018.
- Liu D., Qin S., Ray B., Kalari K.R., Wang L., Weinsilboum R.M. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) distant from xenobiotic response elements can modulate Aryl hydrocarbon receptor function: SNP-dependent CYP1A1 induction. *Drug Metab. Dispos.* 2018;46(9):1372-1381. DOI 10.1124/dmd.118.082164.
- Liu S., Liu Y., Zhang Q., Wu J., Liang J., Yu S., Wei G.-H., White K.P., Wang X. Systematic identification of regulatory variants associated with cancer risk. *Genome Biol.* 2017;18(1):194. DOI 10.1186/s13059-017-1322-z.
- Lu X., Chen X., Forney C., Donmez O., Miller D., Parameswaran S., Hong T., Huang Y., Pujato M., Cazares T., Miraldi E.R., Ray J.P., de Boer C.G., Harley J.B., Weirauch M.T., Kottyan L.C. Global discovery of lupus genetic risk variant allelic enhancer activity. *Nat. Commun.* 2021;12(1):1611. DOI 10.1038/s41467-021-21854-5.
- Ludlow L.B., Schick B.P., Budarf M.L., Driscoll D.A., Zackai E.H., Cohen A., Konkle B.A. Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibb promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J. Biol. Chem.* 1996;271(36):22076-22080. DOI 10.1074/jbc.271.36.22076.
- Malecová B., Morris K.V. Transcriptional gene silencing through epigenetic changes mediated by non-coding RNAs. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010;12(2):214-222.
- Marinov G.K., Shipony Z. Interrogating the accessible chromatin landscape of eukaryote genomes using ATAC-seq. In: Shomron N. (Ed.) *Deep Sequencing Data Analysis. Methods in Molecular Biology.* Vol. 2243. New York: Humana, 2021;183-226. DOI 10.1007/978-1-0716-1103-6\_10.
- Maurano M.T., Humbert R., Rynes E., Thurman R.E., Haugen E., Wang H., Reynolds A.P., Sandstrom R., Qu H., Brody J., Shafer A., Neri F., Lee K., Kutayavin T., Stehling-Sun S., Johnson A.K., Canfield T.K., Giste E., Diegel M., Bates D., Hansen R.S., Neph S., Sabo P.J., Heimfeld S., Raubitschek A., Ziegler S., Cotsapas C., Sotoodehnia N., Glass I., Sunyaev S.R., Kaul R., Stamatoypoulos J.A. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science.* 2012;337(6099):1190-1195. DOI 10.1126/science.1222794.
- Maurano M.T., Haugen E., Sandstrom R., Vierstra J., Shafer A., Kaul R., Stamatoypoulos J.A. Large-scale identification of sequence variants influencing human transcription factor occupancy *in vivo*. *Nat. Genet.* 2015;47(12):1393-1401. DOI 10.1038/ng.3432.
- Moore J.E., Purcaro M.J., Pratt H.E., Epstein C.B., Shores N., Adrian J., Kawli T., Davis C.A., Dobin A., Kaul R., ... Snyder M.P., Bernstein B.E., Wold B., Hardison R.C., Gingeras T.R., Stamatoypoulos J.A., Weng Z. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature.* 2020;583(7818):699-710. DOI 10.1038/s41586-020-2493-4.
- Morrow J.D., Cho M.H., Platig J., Zhou X., DeMeo D.L., Qiu W., Celli B., Marchetti N., Criner G.J., Bueno R., Washko G.R., Glass K., Quackenbush J., Silverman E.K., Hersh C.P. Ensemble genomic

- analysis in human lung tissue identifies novel genes for chronic obstructive pulmonary disease. *Hum. Genomics*. 2018;12(1):1. DOI 10.1186/s40246-018-0132-z.
- Movva R., Greenside P., Marinov G.K., Nair S., Shrikumar A., Kundaje A. Deciphering regulatory DNA sequences and noncoding genetic variants using neural network models of massively parallel reporter assays. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218073. DOI 10.1371/journal.pone.0218073.
- Moyerbrailean G.A., Richards A.L., Kurtz D., Kalita C.A., Davis G.O., Harvey C.T., Alazizi A., Watzka D., Sorokin Y., Hauff N., Zhou X., Wen X., Pique-Regi R., Luca F. High-throughput allele-specific expression across 250 environmental conditions. *Genome Res*. 2016;26(12):1627-1638. DOI 10.1101/gr.209759.116.
- Nasser J., Bergman D.T., Fulco C.P., Guckelberger P., Doughty B.R., Patwardhan T.A., Jones T.R., Nguyen T.H., Ulirsch J.C., Lekschas F., Muallim K., Natri H.M., Weeks E.M., Munson G., Kane M., Kang H.Y., Cui A., Ray J.P., Eisenhaure T.M., Collins R.L., Dey K., Pfister H., Price A.L., Epstein C.B., Kundaje A., Xavier R.J., Daly M.J., Huang H., Finucane H.K., Hacohen N., Lander E.S., Engreitz J.M. Genome-wide enhancer maps link risk variants to disease genes. *Nature*. 2021;593(7858):238-243. DOI 10.1038/s41586-021-03446-x.
- Natoli G., Andrau J.-C. Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annu. Rev. Genet.* 2012;46(1):1-19. DOI 10.1146/annurev-genet-110711-155459.
- Pan G., Cavalli M., Carlsson B., Skrtic S., Kumar C., Wadelius C. rs953413 regulates polyunsaturated fatty acid metabolism by modulating *ELOVL2* expression. *iScience*. 2020;23(2):100808. DOI 10.1016/j.isci.2019.100808.
- Panchatcharam M., Salous A.K., Brandon J., Miriyala S., Wheeler J., Patil P., Sunkara M., Morris A.J., Escalante-Alcalde D., Smyth S.S. Mice with targeted inactivation of *Ppap2b* in endothelial and hematopoietic cells display enhanced vascular inflammation and permeability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014;34(4):837-845. DOI 10.1161/ATVBAHA.113.302335.
- Peng T., Zhong L., Gao J., Wan Z., Fu W.-P., Sun C. Identification of rs11615992 as a novel regulatory SNP for human *P2RX7* by allele-specific expression. *Mol. Genet. Genomics*. 2020;295(1):23-30. DOI 10.1007/s00438-019-01598-0.
- Piedrafitra F.J., Molander R.B., Vansant G., Orlova E.A., Pfahl M., Reynolds W.F. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J. Biol. Chem.* 1996;271(24):14412-14420. DOI 10.1074/jbc.271.24.14412.
- Prestel M., Prell-Schicker C., Webb T., Malik R., Lindner B., Ziesch N., Rex-Haffner M., Röh S., Vitorawong T., Lehm M., Mokry M., den Ruijter H., Haitjema S., Asare Y., Söllner F., Najafabadi M.G., Aherrahrou R., Civelek M., Samani N.J., Mann M., Haffner C., Dichgans M. The atherosclerosis risk variant rs2107595 mediates allele-specific transcriptional regulation of *HDAC9* via E2F3 and Rb1. *Stroke*. 2019;50(10):2651-2660. DOI 10.1161/STROKEAHA.119.026112.
- Protze J., Naas S., Krüger R., Stöhr C., Kraus A., Grampp S., Wiesener M., Schiffer M., Hartmann A., Wullich B., Schödel J. The renal cancer risk allele at 14q24.2 activates a novel hypoxia-inducible transcription factor-binding enhancer of *DPF3* expression. *J. Biol. Chem.* 2022;298(3):101699. DOI 10.1016/j.jbc.2022.101699.
- Ramaker R.C., Bowling K.M., Lasseigne B.N., Hagenauer M.H., Hardigan A.A., Davis N.S., Gertz J., Cartagena P.M., Walsh D.M., Vawter M.P., Jones E.G., Schatzberg A.F., Barchas J.D., Watson S.J., Bunney B.G., Akil H., Bunney W.E., Li J.Z., Cooper S.J., Myers R.M. Post-mortem molecular profiling of three psychiatric disorders. *Genome Med.* 2017;9(1):72. DOI 10.1186/s13073-017-0458-5.
- Ratnapriya R., Sosina O.A., Starostik M.R., Kwicklis M., Kaphahn R.J., Fritsche L.G., Walton A., Arvanitis M., Gieser L., Pietraszkiewicz A., Montezuma S.R., Chew E.Y., Battle A., Abecasis G.R., Ferrington D.A., Chatterjee N., Swaroop A. Retinal transcriptome and eQTL analyses identify genes associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 2019;51(4):606-610. DOI 10.1038/s41588-019-0351-9.
- Reyes-Palomares A., Gu M., Grubert F., Berest I., Sa S., Kasowski M., Arnold C., Shuai M., Srivas R., Miao S., Li D., Snyder M.P., Rabonovitch M., Zaugg J.B. Remodeling of active endothelial enhancers is associated with aberrant gene-regulatory networks in pulmonary arterial hypertension. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1673. DOI 10.1038/s41467-020-15463-x.
- Ring H.Z., Kroetz D.L. Candidate gene approach for pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics*. 2002;3(1):47-56. DOI 10.1517/14622416.3.1.47.
- Roca-Ayats N., Martínez-Gil N., Cozar M., Gerousi M., Garcia-Giralt N., Ovejero D., Mellibovsky L., Nogués X., Díez-Pérez A., Grinberg D., Balcells S. Functional characterization of the *C7ORF76* genomic region, a prominent GWAS signal for osteoporosis in 7q21.3. *Bone*. 2019;123:39-47. DOI 10.1016/j.bone.2019.03.014.
- Scelo G., Purdie M.P., Brown K.M., Johansson M., Wang Z., Eckel-Passow J.E., Ye Y., Hofmann J.N., Choi J., Foll M., ... Deleuze J.-F., McKay J.D., Parker A.S., Wu X., Houlston R.S., Brennan P., Chanoock S.J. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for renal cell carcinoma. *Nat. Commun.* 2017;8(1):15724. DOI 10.1038/ncomms15724.
- Schaid D.J., Chen W., Larson N.B. From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat. Rev. Genet.* 2018;19(8):491-504. DOI 10.1038/s41576-018-0016-z.
- Seshagiri S., Stawiski E.W., Durinck S., Modrusan Z., Storm E.E., Conboy C.B., Chaudhuri S., Guan Y., Janakiraman V., Jaiswal B.S., Guillory J., Ha C., Dijkgraaf G.J.P., Stinson J., Gnad F., Huntley M.A., Degenhardt J.D., Haverty P.M., Bourgon R., Wang W., Koepfen H., Gentleman R., Starr T.K., Zhang Z., Largaespada D.A., Wu T.D., de Sauvage F.J. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature*. 2012;488(7413):660-664. DOI 10.1038/nature11282.
- Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-311. DOI 10.1093/nar/29.1.308.
- Stolze L.K., Conklin A.C., Whalen M.B., López Rodríguez M., Öunap K., Selvarajan I., Toropainen A., Örd T., Li J., Eshghi A., Solomon A.E., Fang Y., Kaikkonen M.U., Romanoski C.E. Systems genetics in human endothelial cells identifies non-coding variants modifying enhancers, expression, and complex disease traits. *Am. J. Hum. Genet.* 2020;106(6):748-763. DOI 10.1016/j.ajhg.2020.04.008.
- Sun J., Zhao Y., McGreal R., Cohen-Tayar Y., Rockowitz S., Wilczek C., Ashery-Padan R., Shechter D., Zheng D., Cvekl A. Pax6 associates with H3K4-specific histone methyltransferases Mll1, Mll2, and Set1a and regulates H3K4 methylation at promoters and enhancers. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9(1):37. DOI 10.1186/s13072-016-0087-z.
- Sun W., Yao S., Tang J., Liu S., Chen J., Deng D., Zeng C. Integrative analysis of super enhancer SNPs for type 2 diabetes. *PLoS One*. 2018;13(1):e0192105. DOI 10.1371/journal.pone.0192105.
- Syddall C.M., Reynard L.N., Young D.A., Loughlin J. The identification of *trans*-acting factors that regulate the expression of *GDF5* via the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *PLoS Genet.* 2013;9(6):e1003557. DOI 10.1371/journal.pgen.1003557.
- Tak Y.G., Farnham P.J. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:57. DOI 10.1186/s13072-015-0050-4.
- Tam V., Patel N., Turcotte M., Bossé Y., Paré G., Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 2019;20(8):467-484. DOI 10.1038/s41576-019-0127-1.
- Tewhey R., Kotliar D., Park D.S., Liu B., Winnicki S., Reilly S.K., Andersen K.G., Mikkelsen T.S., Lander E.S., Schaffner S.F., Sabeti P.C. Direct identification of hundreds of expression-modulating variants using a multiplexed reporter assay. *Cell*. 2016;165(6):1519-1529. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.027.
- Thynn H.N., Chen X.-F., Hu W.-X., Duan Y.-Y., Zhu D.-L., Chen H., Wang N.-N., Chen H.-H., Rong Y., Lu B.-J., Yang M., Jiang F.,

- Dong S.-S., Guo Y., Yang T.-L. An allele-specific functional SNP associated with two systemic autoimmune diseases modulates *IRF5* expression by long-range chromatin loop formation. *J. Invest. Dermatol.* 2020;140(2):348-360.e11. DOI 10.1016/j.jid.2019.06.147.
- Tian J., Lou J., Cai Y., Rao M., Lu Z., Zhu Y., Zou D., Peng X., Wang H., Zhang M., Niu S., Li Y., Zhong R., Chang J., Miao X. Risk SNP-mediated enhancer-promoter interaction drives colorectal cancer through both *FADS2* and *AP002754.2*. *Cancer Res.* 2020; 80(9):1804-1818. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-19-2389.
- Tobias I.C., Abatti L.E., Moorthy S.D., Mullany S., Taylor T., Khader N., Filice M.A., Mitchell J.A. Transcriptional enhancers: from prediction to functional assessment on a genome-wide scale. *Genome.* 2021;64(4):426-448. DOI 10.1139/gen-2020-0104.
- Ulirsch J.C., Nandakumar S.K., Wang L., Giani F.C., Zhang X., Rogov P., Melnikov A., McDonel P., Do R., Mikkelsen T.S., Sankaran V.G. Systematic functional dissection of common genetic variation affecting red blood cell traits. *Cell.* 2016;165(6):1530-1545. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.048.
- Umans B.D., Battle A., Gilad Y. Where are the disease-associated eQTLs? *Trends Genet.* 2021;37(2):109-124. DOI 10.1016/j.tig.2020.08.009.
- van Arensbergen J., FitzPatrick V.D., de Haas M., Pagie L., Sluimer J., Bussemaker H.J., van Steensel B. Genome-wide mapping of autonomous promoter activity in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(2):145-153. DOI 10.1038/nbt.3754.
- van Arensbergen J., Pagie L., FitzPatrick V.D., de Haas M., Baltissen M.P., Comoglio F., van der Weide R.H., Teunissen H., Vösa U., Franke L., de Wit E., Vermeulen M., Bussemaker H.J., van Steensel B. High-throughput identification of human SNPs affecting regulatory element activity. *Nat. Genet.* 2019;51(7):1160-1169. DOI 10.1038/s41588-019-0455-2.
- Vasiliev G.V., Merkulov V.M., Kobzev V.F., Merkulova T.I., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A. Point mutations within 663–666 bp of intron 6 of the human *TD02* gene, associated with a number of psychiatric disorders, damage the YY-1 transcription factor binding site. *FEBS Lett.* 1999;462(1-2):85-88. DOI 10.1016/S0014-5793(99)01513-6.
- Visscher P.M., Brown M.A., McCarthy M.I., Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(1):7-24. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.11.029.
- Vockley C.M., Guo C., Majoros W.H., Nodzenski M., Scholtens D.M., Hayes M.G., Lowe W.L., Reddy T.E. Massively parallel quantification of the regulatory effects of noncoding genetic variation in a human cohort. *Genome Res.* 2015;25(8):1206-1214. DOI 10.1101/gr.190090.115.
- Wang X., Hayes J.E., Xu X., Gao X., Mehta D., Lilja H.G., Klein R.J. Validation of prostate cancer risk variants rs10993994 and rs7098889 by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Gene.* 2021; 768:145265. DOI 10.1016/j.gene.2020.145265.
- Wang Y., Ma R., Liu B., Kong J., Lin H., Yu X., Wang R., Li L., Gao M., Zhou B., Mohan M., Yu H., Hou Z., Shen H., Qian B. SNP rs17079281 decreases lung cancer risk through creating an YY1-binding site to suppress *DCBLD1* expression. *Oncogene.* 2020; 39(20):4092-4102. DOI 10.1038/s41388-020-1278-4.
- Werling D.M., Pochareddy S., Choi J., An J.-Y., Sheppard B., Peng M., Li Z., Dastmalchi C., Santpere G., Sousa A.M.M., Tebbenkamp A.T.N., Kaur N., Gulden F.O., Breen M.S., Liang L., Gilson M.C., Zhao X., Dong S., Klei L., Cicek A.E., Buxbaum J.D., Adle-Biassette H., Thomas J.-L., Aldinger K.A., O'Day D.R., Glass I.A., Zaitlen N.A., Talkowski M.E., Roeder K., State M.W., Devlin B., Sanders S.J., Sestan N. Whole-genome and RNA sequencing reveal variation and transcriptomic coordination in the developing human prefrontal cortex. *Cell Rep.* 2020;31(1):107489. DOI 10.1016/j.celrep.2020.03.053.
- Westra H.-J., Franke L. From genome to function by studying eQTLs. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1842(10):1896-1902. DOI 10.1016/j.bbadis.2014.04.024.
- Westra H.-J., Peters M.J., Esko T., Yaghootkar H., Schurmann C., Kettunen J., Christiansen M.W., Fairfax B.P., Schramm K., Powell J.E., ... Psaty B.M., Ripatti S., Teumer A., Frayling T.M., Metspalu A., van Meurs J.B.J., Franke L. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat. Genet.* 2013;45(10):1238-1243. DOI 10.1038/ng.2756.
- Whittington T., Gao P., Song W., Ross-Adams H., Lamb A.D., Yang Y., Svezia I., Klevebring D., Mills I.G., Karlsson R., Halim S., Dunning M.J., Egevad L., Warren A.Y., Neal D.E., Grönberg H., Lindberg J., Wei G.-H., Wiklund F. Gene regulatory mechanisms underpinning prostate cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 2016;48(4): 387-397. DOI 10.1038/ng.3523.
- Wu C., Huang R.-T., Kuo C.-H., Kumar S., Kim C.W., Lin Y.-C., Chen Y.-J., Birukova A., Birukov K.G., Dulin N.O., Civelek M., Lusic A.J., Loyer X., Tedgui A., Dai G., Jo H., Fang Y. Mechano-sensitive PPAP2B regulates endothelial responses to atherorelevant hemodynamic forces. *Circ. Res.* 2015;117(4):e41-e53. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.117.306457.
- Xu S., Feng W., Lu Z., Yu C.Y., Shao W., Nakshatri H., Reiter J.L., Gao H., Chu X., Wang Y., Liu Y. regSNPs-ASB: a computational framework for identifying allele-specific transcription factor binding from ATAC-seq data. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:886. DOI 10.3389/fbioe.2020.00886.
- Yan J., Qiu Y., Ribeiro dos Santos A.M., Yin Y., Li Y.E., Vinckier N., Nariai N., Benaglio P., Raman A., Li X., Fan S., Chiou J., Chen F., Frazer K.A., Gaulton K.J., Sander M., Taipale J., Ren B. Systematic analysis of binding of transcription factors to noncoding variants. *Nature.* 2021;591(7848):147-151. DOI 10.1038/s41586-021-03211-0.
- Yi M., Tan Y., Wang L., Cai J., Li Xiaoling, Zeng Z., Xiong W., Li G., Li Xiayu, Tan P., Xiang B. TP63 links chromatin remodeling and enhancer reprogramming to epidermal differentiation and squamous cell carcinoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020;77(21):4325-4346. DOI 10.1007/s00018-020-03539-2.
- Zhang P., Xia J.-H., Zhu J., Gao P., Tian Y.-J., Du M., Guo Y.-C., Suleman S., Zhang Q., Kohli M., Tillmans L.S., Thibodeau S.N., French A.J., Cerhan J.R., Wang L.-D., Wei G.-H., Wang L. High-throughput screening of prostate cancer risk loci by single nucleotide polymorphisms sequencing. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2022. DOI 10.1038/s41467-018-04451-x.
- Zhao Y., Wu D., Jiang D., Zhang X., Wu T., Cui J., Qian M., Zhao J., Oesterreich S., Sun W., Finkel T., Li G. A sequential methodology for the rapid identification and characterization of breast cancer-associated functional SNPs. *Nat. Commun.* 2020;11(1):3340. DOI 10.1038/s41467-020-17159-8.
- Zheng R., Wan C., Mei S., Qin Q., Wu Q., Sun H., Chen C.-H., Brown M., Zhang X., Meyer C.A., Liu X.S. Cistrome Data Browser: expanded datasets and new tools for gene regulatory analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D729-D735. DOI 10.1093/nar/gky1094.
- Zou J., Hormozdiari F., Jew B., Castel S.E., Lappalainen T., Ernst J., Sul J.H., Eskin E. Leveraging allelic imbalance to refine fine-mapping for eQTL studies. *PLoS Genet.* 2019;15(12):e1008481. DOI 10.1371/journal.pgen.1008481.

**ORCID ID**

E.V. Antontseva orcid.org/0000-0002-4214-7153  
A.O. Degtyareva orcid.org/0000-0001-8586-2256

E.E. Korbolina orcid.org/0000-0002-7460-5892  
I.S. Damarov orcid.org/0000-0002-3883-3054  
T.I. Merkulova orcid.org/0000-0002-2707-0127

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-15-00113.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 17.01.2023. После доработки 24.03.2023. Принята к публикации 30.03.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Молекулярно-генетическая характеристика гипогидротических эктодермальных дисплазий

В.А. Ковальская , Т.Б. Череватова, А.В. Поляков, О.П. Рыжкова

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

 kovalskaya@med-gen.ru

**Аннотация.** Эктодермальные дисплазии – гетерогенная группа наследственных заболеваний кожи и ее придатков, которые характеризуются нарушением развития и/или гомеостаза двух и более производных эктодермы, включая: волосы, зубы, ногти, потовые железы и их модификации (например, молочные железы). Общая распространенность эктодермальных дисплазий остается точно неизвестной не только в России, но и в мире, так же как и вклад отдельных генов в ее структуру. Это затрудняет ДНК-диагностику данного заболевания ввиду отсутствия строгого алгоритма диагностики и универсального, экономически выгодного метода анализа. На сегодняшний день наиболее изученными генами, вовлеченными в развитие ангидротической или гипогидротической форм эктодермальной дисплазии являются *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* и *WNT10A*. Ген эктодисплазина А (*EDA*) служит причиной самой частой X-сцепленной формы эктодермальной дисплазии, ген из семейства Wnt (*WNT10A*) отвечает за аутосомно-рецессивную форму заболевания, а два других гена (*EDAR* и *EDARADD*) могут быть причиной как аутосомно-рецессивных, так и аутосомно-доминантных форм. В настоящем литературном обзоре приведены характеристика генов, вовлеченных в эктодермальную дисплазию, спектры их мутаций, уровень их экспрессии в тканях человека, а также взаимосвязь вышеупомянутых генов друг с другом. Обсуждается также доменная структура соответствующих белков, рассмотрены молекулярно-генетические пути, в которые они преимущественно вовлечены, и описаны животные модели для изучения данной патологии. Ввиду межвидовой консервативности упомянутых генов, мутации в них вызывают нарушения развития производных эктодермы не только у человека, но и у мышей, коров, собак и даже рыб, что может быть использовано для лучшего понимания этиопатогенеза эктодермальных дисплазий. Более того, в статье поднимаются вопросы о возможных частых мутациях в генах *EDA* и *WNT10A*. Приведены также данные касательно разрабатываемых перспективных подходов к внутриутробному лечению эктодермальной дисплазии.


Ключевые слова: эктодермальная дисплазия; *EDA*; агенезия зубов; семейство Wnt.

**Для цитирования:** Ковальская В.А., Череватова Т.Б., Поляков А.В., Рыжкова О.П. Молекулярно-генетическая характеристика гипогидротических эктодермальных дисплазий. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):676-683. DOI 10.18699/VJGB-23-78

## Molecular basis and genetics of hypohidrotic ectodermal dysplasias

V.A. Kovalskaia , T.B. Cherevatova, A.V. Polyakov, O.P. Ryzhkova

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

 kovalskaya@med-gen.ru

**Abstract.** Ectodermal dysplasia (ED) is a heterogeneous group of hereditary diseases of the skin and its appendages, which are characterized by impaired development and/or homeostasis of two or more ectoderm derivatives, including: hair, teeth, nails, sweat glands and their modifications (mammary glands, for instance). The overall prevalence of ectodermal dysplasia remains precisely unknown not only in Russia, but also in the world, nor is known the contribution of individual genes to its structure. This complicates the DNA diagnosis establishment of this disease due to the lack of an accurate diagnostic algorithm and a universal cost-effective method of analysis. To date, the most highly-researched genes involved in the development of anhydrous or hypohidrotic forms of ED are *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* and *WNT10A*. The ectodysplasin A (*EDA*) gene is the cause of the most common X-linked form of ED, a gene from the Wnt family (*WNT10A*) is responsible for the autosomal recessive form of the disease, and two other genes (*EDAR* and *EDARADD*) can cause both autosomal recessive and autosomal dominant forms. This review provides the characteristics of the genes involved in ED, their mutation spectra, the level of their expression in human tissues, as well as the interrelation of the aforementioned genes. The domain structures of the corresponding proteins are considered, as well as the molecular genetic pathways in which they are involved. Animal models for studying this disorder are also taken into consideration. Due to the cross-species genes conservation, their mutations cause the disruption of the development of ectoderm derivatives not only in humans, but also in mice, cows, dogs, and even fish. It can be exploited for a better understanding of the etiopathogenesis of ectodermal

dysplasias. Moreover, this article brings up the possibility of recurrent mutations in the *EDA* and *WNT10A* genes. The review also presents data on promising approaches for intrauterine ED treatment.

Key words: ectodermal dysplasia; *EDA*; tooth agenesis; Wnt family.

**For citation:** Kovalskaia V.A., Cherevatova T.B., Polyakov A.V., Ryzhkova O.P. Molecular basis and genetics of hypohidrotic ectodermal dysplasias. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023; 27(6):676-683. DOI 10.18699/VJGB-23-78

## Введение

Эктодермальная дисплазия (ЭД) – собирательное название гетерогенной группы молекулярно-генетических патологий, характеризующихся аномалиями развития и/или гомеостазом двух и более эктодермальных структур (Wright et al., 2019). Несмотря на то что эктодерма определяет развитие многих органов и тканей, таких как центральная и периферическая нервная система, гипофиз, обонятельный нейроэпителий, меланоциты, зубная эмаль, эпидермис, включая потовые железы, волосы, ногти, при эктодермальных дисплазиях поражаются лишь последние из производных эктодермы.

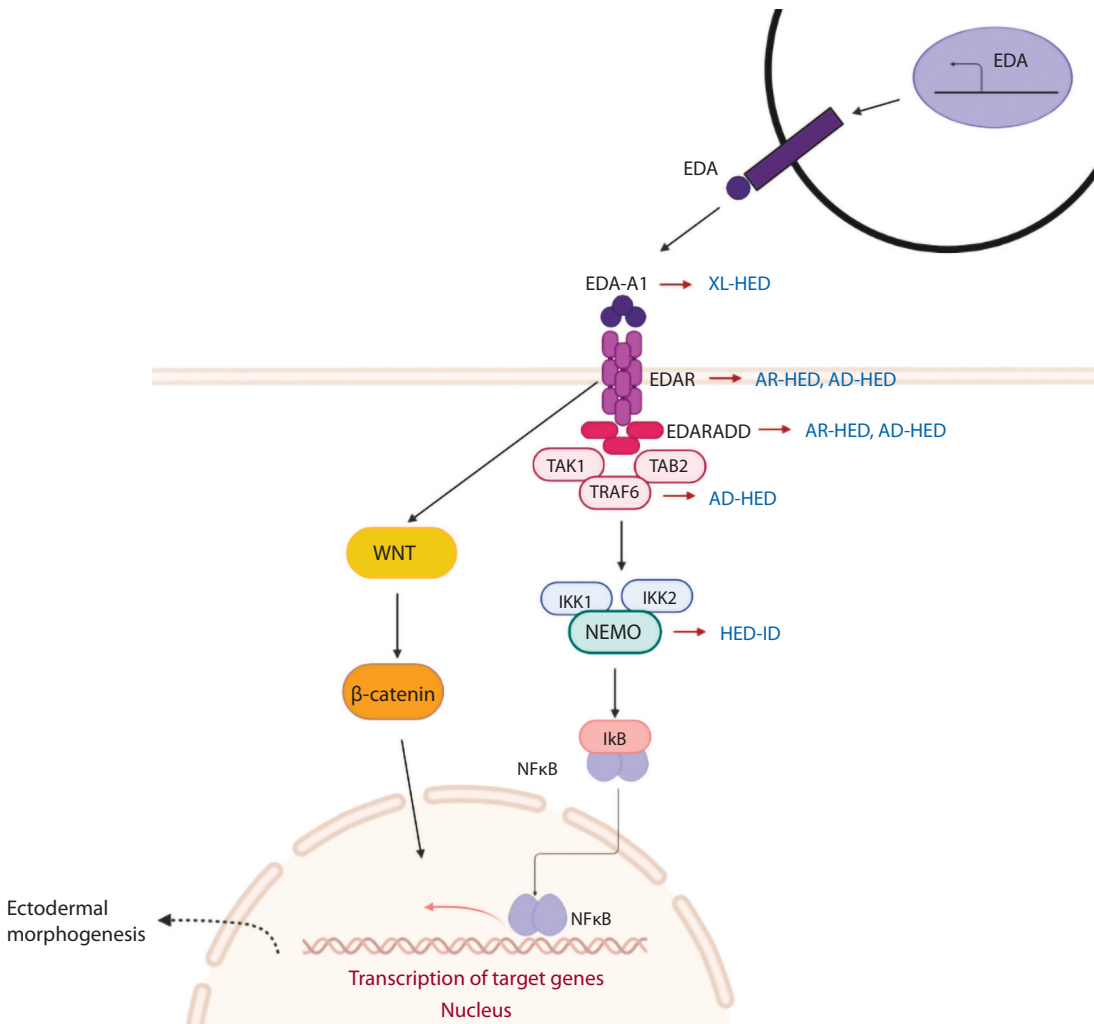
Общая распространенность всех ЭД точно не известна ввиду ограниченного числа подобного рода исследований и отсутствия однозначной классификации в разных странах, однако, по некоторым оценкам, может достигать 70 случаев на 100 000 новорожденных (Itin, Fistarol, 2004). Отчетные же данные по датской популяции, собранные с 1995 по 2010 г., свидетельствуют о том, что на 100 000 человек приходится 21.9 случая эктодермальных дисплазий, а молекулярно-подтвержденной X-сцепленной эктодермальной дисплазии – 1.6 (Nguyen-Nielsen et al., 2013). Таким образом, хотя эктодермальные дисплазии и не относятся к наиболее частым наследственным заболеваниям, они встречаются повсеместно и вносят значимый вклад в структуру стоматологической, дерматологической и генетической патологии.

Данная группа патологических состояний могла быть известна еще с конца XVIII века, тем не менее первый задокументированный случай эктодермальной дисплазии датирован 1838 г., когда Wedderburn в письме к Charles Darwin описал 10 мужчин из индийской семьи, страдающих от частичного отсутствия зубов, облысения и чрезмерной сухости кожных покровов (Felsner, 1944). В 1848 г. Thurman зафиксировал два подобных случая, а в 1883 г. Guilford задокументировал еще один. Но только в 1929 г. исследователем по имени A. Weech было введено понятие «наследственная эктодермальная дисплазия», а также предложен термин «ангидротическая», позднее измененный на «гипогидротическая», описывающий индивидуумов с эктодермальной дисплазией со сниженной способностью к потоотделению (Weech, 1929). В 1937 г. H.W. Siemens, проанализировав 19 пораженных семей, сделал вывод, что генетическая природа эктодермальной дисплазии не может быть объяснена одним геном и одним типом наследования. К тому моменту уже сложилось понимание, что существуют как доминантные и рецессивные, так и сцепленные с полом формы заболевания, перекрывающиеся по фенотипу, но не полностью дублирующие его (Siemens, 1937). Спустя два года H. Clouston заметил, что несмотря на сходные клинические данные, пациенты с проявлениями эктодермальной дисплазии

могут принципиально отличаться друг от друга по степени развития потовых желез. Он выделил две большие группы: гипогидротическую, обнаружив всего четыре случая, и гидротическую эктодермальную дисплазию, описав более 50 пациентов (Clouston, 1939).

Дальнейшее изучение данной нозологической единицы породило первую клиническую классификацию N. Freire-Maia и M. Pinheiro (Freire-Maia, 1971; Freire-Maia, Pinheiro, 1988), долгие годы использовавшуюся в повседневной практике. Эта классификация базировалась на принципе вовлечения в патологический процесс тех или иных эктодермальных структур. К группе «А» исследователи отнесли все состояния, в которых наблюдалось поражение не менее двух классических производных эктодермы, таких как: волосы, зубы, ногти и потовые железы. Заболевания, отнесенные к группе «В», включали нарушения только в одной из четырех вышеупомянутых структур и один дополнительный эктодермальный дефект, например аномалии ушей, губ или ладонный и подошвенный гиперкератоз. Состояние, которое характеризовалось наличием только эктодермальных признаков, они назвали подлинной эктодермальной дисплазией (pure ectodermal dysplasia), а сочетание эктодермальных признаков с другими аномалиями – синдромом эктодермальной дисплазии. Помимо этого, все классические структуры эктодермы получили нумерацию (где 1 – волосы, 2 – зубы, 3 – ногти, 4 – потовые железы) с целью дальнейшего выделения основных групп ЭД: ЭД1 – триходисплазия, ЭД2 – дентальная дисплазия, ЭД3 – ониходисплазия, ЭД4 – дисгидроз (Deshmukh, Prashanth, 2012). Следует отметить, что классификация N. Freire-Maia и M. Pinheiro не учитывала молекулярно-генетическую составляющую эктодермальных дисплазий и потребовала пересмотра с появлением технологий массового параллельного секвенирования и развитием геномной медицины.

В конце 2019 г. в *American Journal of Medical Genetics* международной экспертной группой из NFED (National Foundation for Ectodermal Dysplasias) была опубликована новая классификация, основанная на молекулярных путях, вовлеченных в процесс развития ЭД. Более того, был уточнен список патологий, достигающий 102 синдромов, попадающих под определение «эктодермальная дисплазия» (Wright et al., 2019). В него, помимо несиндромальных эктодермальных дисплазий, вошли такие разнородные синдромы, как Коффина–Сириса, Дубовица, Халлермана–Штрайфа, Горлина–Гольца, Йохансона–Близзарда и другие, что не отвечает критериям, заданным отечественной терминологией. В Российской Федерации под термином «эктодермальная дисплазия» принято рассматривать только ее несиндромальные (изолированные) формы: ангидротическую (гипогидротическую) и гидротическую (Козлова, Демикова, 2007), которые, тем не менее,



**Рис. 1.** Основные белки, вовлеченные в развитие эктодермальных структур.

EDA экспрессируется на поверхности клеток, однако его внеклеточный домен может быть протеолитически расщеплен с образованием растворимой сигнальной молекулы, которая связывается с рецептором эктодисплазина (EDAR). EDAR взаимодействует с белком EDARADD, и дальнейшая передача сигналов в нисходящем направлении через активацию NFκB-пути приводит к экспрессии генов, специфичных для эпидермиса, волос, зубов и ногтей. XL-HED – X-сцепленная гипогидротическая эктодермальная дисплазия, AD-HED – аутосомно-доминантная гипогидротическая эктодермальная дисплазия, AR-HED – аутосомно-рецессивная гипогидротическая эктодермальная дисплазия, HED-ID – гипогидротическая эктодермальная дисплазия с иммунодефицитом.

полностью укладываются в молекулярную этиологию, предложенную специалистами NFED.

На сегодняшний день описано четыре основных сигнальных пути ЭД: EDA-опосредованный путь, WNT-путь, NF-κB-путь и TR63-опосредованный путь, но только первые три (рис. 1) вовлечены в развитие ангидротических эктодермальных дисплазий (Mikkola, 2009; Sadier et al., 2015; Wright et al., 2019).

### Основные гены, вовлеченные в развитие эктодермальных дисплазий

Ген *EDA* человека (также известный как *ED1*, *HED*, *EDA1*, *EDA2*, *HED1*, *ODT1*, *XHED*, *ECTD1*) является белок-кодирующим геном, ответственным за синтез эктодисплазина А – трансмембранного белка второго типа, принадлежащего к семейству факторов некроза опухоли (TNF), который участвует в передаче эпителиально-

мезенхимальных сигналов во время морфогенеза эктодермальных структур у человека (Bayés et al., 1998; Mikkola, Thesleff, 2003).

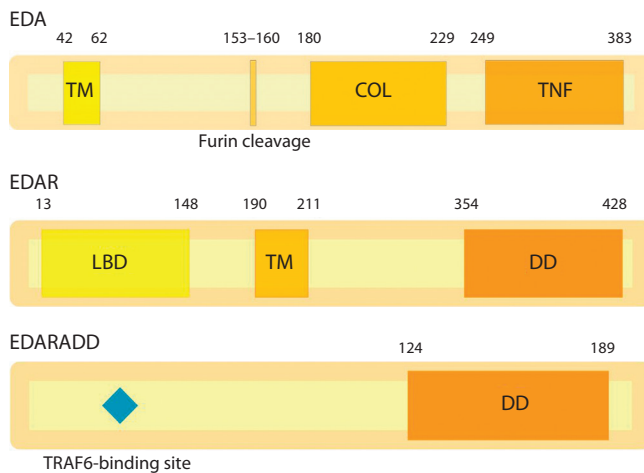
Ген *EDA* (эктодисплазина А) картирован на X-хромосоме в локусе Xq13.1. Согласно основному транскрипту (NM\_001399.5), содержит восемь экзонов со стар- и стоп-кодонами в первом и последнем экзонах соответственно. Всего описано восемь белок-кодирующих изоформ, различных по длине и функции, между тем именно изоформа 1 (*EDA-A1*), состоящая из 391 аминокислоты, является основной и представляет собой лиганд для рецептора EDAR. Другая изоформа, известная как *EDA-2*, отличается отсутствием Val307 и Glu308 в TNF-домене и связывается только с *EDA2R*, обеспечивая последующее корректное постэмбриональное функционирование различных структур и тканей (Kere et al., 1996). Обе изоформы, *EDA1* и *EDA2*, через рецепторы EDAR и *EDA2R*

активируют сигнальный путь NFκB, но только взаимодействии EDA1/EDAR имеет значение в развитии производных эктодермы и, соответственно, заболевания (Newton et al., 2004). Доподлинно неизвестно, почему нарушение взаимодействия EDA-A2/XEDAR не приводит к фенотипу эктодермальных дисплазий, однако исследования показали, что EDA-A2 экспрессируется в основном в стареющих жировых тканях, артериях, сердце, легких, мышцах и коже, а также может регулировать метаболизм глюкозы и служить предиктором аггравации стеатоза у больных с неалкогольной жировой дистрофией печени (Yang et al., 2015; Cai et al., 2021).

Помимо С-концевого TNF-домена (249–383 аминокислоты (ак)), эктодисплазин А содержит коллагеновый домен (180–229 ак), сайт расщепления фурином (153–160 ак) и трансмембранный N-концевой домен (42–62 ак) (Chen et al., 2001; [www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi); [www.uniprot.org/uniprot/Q92838](http://www.uniprot.org/uniprot/Q92838)) (рис. 2). Эктодисплазин А, как член TNF-лигандного семейства, может функционировать локально через прямые межклеточные контакты в виде полной мембранной формы и все же в основном осуществляет работу в виде секретируемой формы, когда при протеолитическом процессинге в консенсусном сайте фурина С-концевая часть белка высвобождается в виде растворимого тримерного лиганда и активирует нижележащие белки (Elomaa, 2001) (см. рис. 1).

EDAR – еще один ключевой белок в данном молекулярно-генетическом пути, кодируемый одноименным геном в локусе chr2q12.3. Рецептор эктодисплазина А с точки зрения топологии имеет экстрацеллюлярную часть, включающую лиганд-связывающий домен (LBD) (13–148 ак), кодируемый экзонами 2–5, и цитоплазматическую часть, представленную доменом смерти, кодируемым экзон 12 (354–428 ак) для взаимодействия с β-изоформой EDARADD (Sadier et al., 2015; Zhang et al., 2020; [www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml)). Последняя, в свою очередь, через EDAR-ассоциированный домен смерти (124–189 ак) и сайт связывания с TRAF6 (27–31 ак) приводит к последующей активации NF-κB-пути (Morlon et al., 2005; Asano et al., 2021) (см. рис. 1).

Благодаря высокой степени гомологии данных генов у человека и мыши, в 1990-х гг. было получено несколько мутантных мышинных линий (Headon, Overbeek, 1999; Trzeciak, Koczogowski, 2015). EDA2R(XEDAR)-дефицитные особи закономерно не демонстрировали признаков эктодермальной дисплазии (Newton et al., 2004), а особи, несущие рецессивную (*downless*) и доминантную (*Sleek*) мутацию в гене EDAR, имели выраженное нарушение развития эктодермальных структур: редкую шерсть, отсутствие покрова в заушной области, наличие аномальных зубов, особенно резцов (Crocker, Cattanch, 1979). Самцы, мутантные по *Tabby* (аналог EDA человека), имели в фенотипе очаговую алопецию за ушами, алопецию хвоста, отсутствие некоторых вибрисс, аномальную текстуру шерсти из-за отсутствия зигзагообразных и защитных волосков, а также отсутствие потовых желез, в норме обнаруживаемых на подушечках лап (Ferguson et al., 1997; Srivastava et al., 1997). У мышей *crinkled* и *swh/swh* вследствие гомозиготных вариантов в гене EDARADD наблюдался аналогичный фенотип эктодермальной дис-



**Рис. 2.** Доменная структура основных белков, вовлеченных в EDA-опосредованный путь.

TM – трансмембранный домен; Furin cleavage – сайт узнавания фурин-протеазой; COL – коллагеновый домен; TNF – домен фактора некроза опухоли; LBD – лиганд-связывающий домен; DD – домен смерти; TRAF6-binding site – TRAF6-связывающий сайт.

плазии, а женские особи были не способны выкормить потомство из-за недоразвития молочных желез (Yan et al., 2002; Kuramoto et al., 2005, 2011).

Консервативность всего EDA-опосредованного пути позволяет наблюдать схожий фенотип и у других представителей позвоночных, имеющих мутации в генах интереса (Pantalacci et al., 2008). У четырех телят мужского пола с протяженной делецией, захватывающей экзон 3 гена EDA, количество волосяного покрова на голове, ушных раковинах, шее, спине и хвосте было заметно снижено, немногочисленные волосы на этих частях тела были короткими и тонкими, а аномалии со стороны зубов проявлялись преимущественно в виде частичной адентии и наличия зубов аномальной конической формы (Drögemüller et al., 2001, 2002). У кобелей с гемизиготной мутацией в акцепторном сайте сплайсинга экзона 8 гена EDA отсутствовали все потовые железы; животные были полностью лишены шерсти в лобной части и в области таза на спине. Большинство премоляров и некоторые резцы отсутствовали, а имеющиеся зубы в основном имели коническую форму. Более того, у пораженных собак наблюдались повышенная заболеваемость и смертность от легочных инфекционных заболеваний по сравнению с другими собаками в той же среде (Casal et al., 2005). У мутантных особей зебрафиш и медака с нарушениями в EDA-сигналинге (гены EDA и EDAR) отмечалась потеря плавников и чешуи, отсутствие зубов или аномальная форма зубов (Harris et al., 2008; Atukorala et al., 2010). Аналогичным образом ситуация обстоит с морскими и пресноводными колюшками: морские представители *Gasterosteus aculeatus*, у которых экспрессия гена EDA значительно выше, демонстрировали более развитый покров с 32 боковыми пластинками, пресноводные же особи ограничивались 0–9 латеральными пластинками (O’Brown et al., 2015). Исходя из этих данных, EDA-путь, вероятно, контролирует развитие производных эктодермы у всех позвоночных (Sadier et al., 2014).

Экспрессируется *EDA* наибольшим образом в эндокринных органах (надпочечники, щитовидная железа, яичники), различных отделах головного мозга и сердца, наименьший уровень экспрессии наблюдается в клетках крови (TPM 0.18). Для культивируемых фибробластов данный показатель составляет 0.89, что делает их наиболее доступным объектом для изучения *EDA*-транскриптов ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)). Экспрессия *EDAR* и *EDARADD* преимущественно происходит в мочевом пузыре, слизистой пищевода и коже. В то же время исследование паттернов экспрессии *EDARADD* также эффективнее проводить на культуре фибробластов, тогда как изучение структуры мРНК и нарушений сплайсинга *EDAR*-транскриптов возможно преимущественно при использовании лейкоцитов крови ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)).

Согласно базе HGMD, мутации в *EDA*, *EDAR* и *EDARADD* относительно равномерно распределены по всему гену и затрагивают все значимые домены ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk)). К настоящему моменту в гене *EDA* описан 371 патогенный вариант, в *EDAR* – 83, а в *EDARADD* – 19, включая миссенс- и нонсенс-мутации, составляющие мажорную часть, делеции и инсерции, в том числе протяженные, а также сплайс-варианты, затрагивающие канонические сайты сплайсинга, а также приводящие к активации криптических ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk)).

Классических частых мутаций для генов *EDA*-опосредованного пути не описано ни в одной популяции, однако, согласно оценкам некоторых авторов, варианты в *EDA*, затрагивающие аминокислоты R155 и R156 в перекрывающихся сайтах расщепления фурина, могут составлять от 7 до 30 % (Vincent et al., 2001; Chaudhary et al., 2022). Данное явление может быть, в частности, объяснено наличием CrG-богатой последовательности в экзоне 3 в кодонах аргинина 155, 156, которая в замаскированном состоянии обуславливает так называемую C-T транзицию (Chen et al., 2001).

Интересен также тот факт, что большинство мутаций в гене *EDA* приводит к картине X-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии (OMIM 305100) с классическими проявлениями в виде гипотрихоза волосяной части головы, олигодонтии с коническими резцами, дистрофии ногтей и гипогидроза ([www.omim.org](http://www.omim.org)). Пациенты мужского пола закономерно имеют более тяжелый фенотип, тем не менее у женщин, даже при отсутствии неравного паттерна инактивации X-хромосомы, могут наблюдаться клинические проявления (Vincent et al., 2001). До 70 % гетерозиготных носительниц патогенных вариантов в гене *EDA* демонстрируют одно или несколько нарушений: та или иная степень гипотрихоза, сниженное потоотделение, отсутствие закладки одного или нескольких зубов, недоразвитие молочных желез или проблемы с кормлением грудью – последние между тем могут быть полноценно оценены только после наступления пубертата или беременности соответственно (Wahlbuhl-Becker et al., 2017; Wohlfart et al., 2020). Более того, даже в рамках одной семьи наблюдается определенная вариабельность фенотипа (Cañueto et al., 2011; Han et al., 2020). Известны случаи селективной агенезии зубов (OMIM 313500) X-сцепленного типа наследования, причиной которых тоже были патогенные варианты в гене *EDA*. Несмотря на

то что мутации, приводящие к такому фенотипу, описаны в разных белковых доменах эктодисплазина А, ключевым фактором, вероятно, является наличие резидуальной активности белка и возможность связывания его с рецептором EDAR (Mues et al., 2010).

Для генов *EDAR* и *EDARADD* показаны как аутосомно-доминантные, так и аутосомно-рецессивные формы ангидротической эктодермальной дисплазии. Некоторые авторы полагают, что доминантные мутации в основном локализованы в доменах межбелковых взаимодействий, что приводит к нарушению олигомеризации и доминантному отрицательному эффекту (Sadier et al., 2014). Тем не менее данное предположение не полностью оправдано. Так, при проведении функционального анализа миссенс-мутаций p.D120Y, p.L122R, p.D123N, расположенных около домена смерти EDARADD, была доказана не только их доминантная природа, но и способность значительно снижать взаимодействие с TRAF6 и подавлять последующую активацию NF-κB. А мутация p.E152K в гетерозиготном состоянии, расположенная непосредственно в EDAR-ассоциированном домене смерти, напротив, была рецессивной природы и показывала лишь небольшое снижение сродства к TRAF6 (Asano et al., 2021).

Вариант V370A – консервативная аминокислотная замена в гене *EDAR*, идентифицированная в азиатских и латиноамериканской популяциях при полногеномном секвенировании (Park et al., 2012). Она считается мутацией с усилением функции (gain-of-function), приводит к двукратному увеличению активации работы NF-κB-пути (Kataoka et al., 2021) и, соответственно, коррелирует с увеличенной толщиной волос и особой морфологией зубов у представителей Азии и коренных народов Америки (Bryk et al., 2008). Интересный факт: данный вариант отобрался предположительно в Центральном Китае около 30 тыс. лет назад, и его наличие в генотипе уменьшает тяжесть клинических проявлений X-сцепленной ангидротической эктодермальной дисплазии (Cluzeau et al., 2011).

NEMO – еще один белок, вовлеченный в патогенетический каскад. Ввиду того, что NF-κB контролирует в том числе иммунный ответ и апоптоз, клинические проявления при мутациях в гене *NEMO* не только ограничены поражением эктодермальных структур, но и включают нарушения иммунной системы с развитием, в частности, ангидротической эктодермальной дисплазии с иммунодефицитом 1 (OMIM 300291) (Smahi et al., 2002).

Мутации в гене *WNT10A* являются самой частой причиной несиндромальной селективной агенезии зубов (Xu et al., 2017; Yu et al., 2019). К тому же они ассоциированы с развитием гипогидротической эктодермальной дисплазии, одонто-онихо-дермальной дисплазии и синдромом Шёпфа–Шульца–Пассаржа. Ген *WNT10A* кодирует одноименный белок – компонент канонического сигнального пути Wnt/β-катенина, который играет важную роль на нескольких стадиях морфогенеза зубов, включая активацию мезенхимального одонтогенного потенциала во время раннего развития зубов, а также индукцию и поддержание первичных и вторичных эмалевых узлов (Xu et al., 2017). Ведутся также обсуждения касательно роли Wnt-сигналинга в морфогенезе волосяных фолликулов и кожных структур (Adaimy et al., 2007). Семейство генов *Wnt* человека вклю-



чает гены, демонстрирующие значительное сходство с последовательностями *wingless*-генов мыши, в связи с чем у *WNT10A*-дефицитных мышинных особей (*WNT10A*<sup>-/-</sup>) закономерно наблюдается алопеция, помимо задержки физического развития, кифоза и нарушения репродуктивной функции (Wang et al., 2018).

В настоящее время в базе HGMD описано 94 варианта для *WNT10A*, но лишь для p.Cys107Ter (rs121908119) и p.Phe228Ile (rs121908120) было высказано предположение о расположении в горячих точках. Данные мутации наиболее часто встречались среди больных польского и итальянского происхождения с *WNT10A*-обусловленной эктодермальной дисплазией (Castori et al., 2011; Mostowska et al., 2012).

### Подходы к лечению эктодермальных дисплазий

Текущие варианты лечения ЭД ограничены симптоматической терапией с целью предотвращения осложнений. Эффективное таргетное лечение остается не разработанным. Тем не менее на сегодняшний день ведется набор на клинические испытания второй фазы препарата ER004 с целью его интраамниотического введения плодам мужского пола с подтвержденной X-сцепленной эктодермальной дисплазией (NCT04980638). ER004 представляет собой первую в своем классе молекулу-замениватель сигнального белка, предназначенную для специфического высокоаффинного связывания с эндогенным рецептором EDAR. Предполагаемый механизм действия ER004 заключается в замене отсутствующего белка – эктодисплазина А – у пациентов с патогенными вариантами в гене *EDA* с целью активации нормального развития ключевых эктодермальных структур. Предлагаемая доза, путь и интервал введения – внутриматриотически, 100 мг/кг расчетной массы плода на инъекцию, в общей сложности три инъекции с интервалом 3 недели, начиная с 26-й недели беременности. По итогу предполагается 5-летнее наблюдение за пролеченными индивидуумами. Окончание испытаний запланировано на апрель 2029 г. ([www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04980638](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04980638)).

Идут разработки и другого препарата – EDI200, введение которого предполагается постнатально между 2-м и 14-м днем жизни больных мужского пола с X-сцепленной эктодермальной дисплазией, в общей сложности пять инъекций 3 мг/кг. EDI200 представляет собой молекулу человеческого эктодисплазина А и также нацелен на активацию EDA-опосредованного пути. Эксперименты, проведенные *in vivo* на животных, пораженных XLHED, показали, что дефицит EDA корректируется однократным курсом терапии EDI200, вводимой либо пренатально (мыши), либо постнатально (новорожденные мыши и собаки). На сегодняшний день осуществляется долгосрочное наблюдение за пациентами, получавшими лечение EDI200, до достижения ими 10-летнего возраста (до марта 2025 г.) ([www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01992289](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01992289)).

### Заключение

В России молекулярно-генетических исследований эктодермальных дисплазий до настоящего времени не проводилось, вклад мутаций различных генов в развитие той

или иной формы ЭД остается неизвестным. Изучение полного спектра мутаций в генах ЭД позволит разработать алгоритм молекулярно-генетической диагностики эктодермальной дисплазии.

### Список литературы / References

- Козлова С.И., Демикова Н.С. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование: атлас-справочник. М.: Т-во науч. изданий КМК; Авторская академия, 2007.  
[Kozlova S.I., Demikova N.S. Hereditary Disorders and Genetic Counseling: Guide Atlas. Moscow: KMK–Avtorskaya Akademiya Publ., 2007. (in Russian)]
- Adaimy L., Chouery E., Megarbane H., Mroueh S., Delague V., Nicolas E., Belguith H., de Mazancourt P., Megarbane A. Mutation in *WNT10A* is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(4):821-828. DOI 10.1086/520064.
- Asano N., Yasuno S., Hayashi R., Shimomura Y. Characterization of *EDARADD* gene mutations responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J. Dermatol.* 2021;48(10):1533-1541. DOI 10.1111/1346-8138.16044.
- Atukorala A., Inohaya K., Baba O., Tabata M., Ratnayake R., Abduweli D., Kasugai S., Mitani H., Takano Y. Scale and tooth phenotypes in medaka with a mutated ectodysplasin-A receptor: implications for the evolutionary origin of oral and pharyngeal teeth. *Arch. Histol. Cytol.* 2010;73(3):139-148. DOI 10.1679/aohc.73.139.
- Bayés M., Hartung A., Ezer S., Pispis J., Thesleff I., Srivastava A., Kere J. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (*EDA*) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum. Mol. Genet.* 1998;7(11):1661-1669. DOI 10.1093/hmg/7.11.1661.
- Bryk J., Hardouin E., Pugach I., Hughes D., Strotmann R., Stoneking M., Myles S. Positive selection in East Asians for an *EDAR* allele that enhances NF-κB activation. *PLoS One.* 2008;3(5):e2209. DOI 10.1371/journal.pone.0002209.
- Cai Z., Deng X., Jia J., Wang D., Yuan G. Ectodysplasin A/ectodysplasin A receptor system and their roles in multiple diseases. *Front. Physiol.* 2021;12:788411. DOI 10.3389/fphys.2021.788411.
- Cañueto J., Zafra-Cobo M., Ciria S., Unamuno P., González-Sarmiento R. A novel *EDA* gene mutation in a Spanish family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Actas Dermosifiliogr.* 2011; 102(9):722-725. DOI 10.1016/j.adengl.2011.11.012.
- Casal M., Scheidt J., Rhodes J., Henthorn P., Werner P. Mutation identification in a canine model of X-linked ectodermal dysplasia. *Mamm. Genome.* 2005;16(7):524-531. DOI 10.1007/s00335-004-2463-4.
- Castori M., Castiglia D., Brancati F., Foglio M., Heath S., Florida G., Madonna S., Fischer J., Zambruno G. Two families confirm Schöpf-Schulz-Passarge syndrome as a discrete entity within the *WNT10A* phenotypic spectrum. *Clin. Genet.* 2011;79(1):92-95. DOI 10.1111/j.1399-0004.2010.01513.x.
- Chaudhary A.K., Ghose A., Nagarajaram H.A., Dalal A.B., Gupta N., Dutta A.K., Danda S., Gupta R., Sankar H.V., Bhavani G.S., Girisha K.M., Phadke S.R., Ranganath P., Bashyam M.D. Ectodysplasin pathogenic variants affecting the furin-cleavage site and unusual clinical features define X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia in India. *Am. J. Med. Genet. A.* 2022;188(3):788-805. DOI 10.1002/ajmg.a.62579.
- Chen Y., Molloy S., Thomas L., Gambiae J., Bächinger H., Ferguson B., Zonana J., Thomas G., Morris N. Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(13):7218-7223. DOI 10.1073/pnas.131076098.
- Clouston H. The major forms of hereditary ectodermal dysplasia. (With an autopsy and biopsies on the anhidrotic type). *Can. Med. Assoc. J.* 1939;40(1):1-7.
- Cluzeau C., Hadj-Rabia S., Bal E., Clauss F., Munnich A., Bodemer C., Headon D., Smahi A. The EDAR370A allele attenuates the severity

- of hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by EDA gene mutation. *Br. J. Dermatol.* 2012;166(3):678-681. DOI 10.1111/j.1365-2133.2011.10620.x. Epub 2011 Dec. 5.
- Crocker M., Cattanach B.M. The genetics of Sleek: a possible regulatory mutation of the tabby-crikkled-downless syndrome. *Genet. Res.* 1979;34(3):231. DOI 10.1017/s0016672300019479.
- Deshmukh S., Prashanth S. Ectodermal dysplasia: a genetic review. *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.* 2012;5(3):197-202. DOI 10.5005/jp-journals-10005-1165.
- Drögemüller C., Distl O., Leeb T. Partial deletion of the bovine *EDA* gene causes anhidrotic ectodermal dysplasia in cattle. *Genome Res.* 2001;11(10):1699-1705. DOI 10.1101/gr.182501.
- Drögemüller C., Kuiper H., Peters M., Guionaud S., Distl O., Leeb T. Congenital hypotrichosis with anodontia in cattle: a genetic, clinical and histological analysis. *Vet. Dermatol.* 2002;13(6):307-313. DOI 10.1046/j.1365-3164.2002.00313.x.
- Elomaa O. Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the *EDAR* protein. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(9):953-962. DOI 10.1093/hmg/10.9.953.
- Felsher Z. Hereditary ectodermal dysplasia: report of a case, with experimental study. *Arch. Derm. Syphilol.* 1944;49(6):410-414. DOI 10.1001/archderm.1944.01510120024005.
- Ferguson B., Brockdorff N., Formstone E., Ngyuen T., Kronmiller J., Zonana J. Cloning of *Tabby*, the murine homolog of the human *EDA* gene: evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Hum. Mol. Genet.* 1997;6(9):1589-1594. DOI 10.1093/hmg/6.9.1589.
- Freire-Maia N. Ectodermal dysplasias. *Hum. Hered.* 1971;21(4):309-312. DOI 10.1159/000152419.
- Freire-Maia N., Pinheiro M. Ectodermal dysplasias – some recollections and a classification. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 1988;24:3-14.
- Han Y., Wang X., Zheng L., Zhu T., Li Y., Hong J., Xu C., Wang P., Gao M. Pathogenic *EDA* mutations in Chinese Han families with hypohidrotic ectodermal dysplasia and genotype-phenotype: a correlation analysis. *Front. Genet.* 2020;11:21. DOI 10.3389/fgene.2020.00021.
- Harris M., Rohner N., Schwarz H., Perathoner S., Konstantinidis P., Nüsslein-Volhard C. Zebrafish *eda* and *edar* mutants reveal conserved and ancestral roles of ectodysplasin signaling in vertebrates. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000206. DOI 10.1371/journal.pgen.1000206.
- Headon D., Overbeek P. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat. Genet.* 1999;22(4):370-374. DOI 10.1038/11943.
- Itin P., Fistarol S. Ectodermal dysplasias. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2004;131C(1):45-51. DOI 10.1002/ajmg.c.30033.
- Kataoka K., Fujita H., Isa M., Gotoh S., Arasaki A., Ishida H., Kimura R. The human *EDAR* 370V/A polymorphism affects tooth root morphology potentially through the modification of a reaction-diffusion system. *Sci. Rep.* 2021;11(1):5143. DOI 10.1038/s41598-021-84653-4.
- Kere J., Srivastava A.K., Montonen O., Zonana J., Thomas N., Ferguson B., Munoz F., Morgan D., Clarke A., Baybayan P., Chen E.Y., Ezer S., Saarialho-Kere U., de la Chapelle A., Schlessinger D. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat. Genet.* 1996;13(4):409-416. DOI 10.1038/ng0895-409.
- Kuramoto T., Morimura K., Nomoto T., Namiki C., Hamada S., Fukushima S., Sugimura T., Serikawa T., Ushijima T. Sparse and wavy hair: a new model for hypoplasia of hair follicle and mammary glands on rat chromosome 17. *J. Hered.* 2005;96(4):339-345. DOI 10.1093/jhered/esi053.
- Kuramoto T., Yokoe M., Hashimoto R., Hiai H., Serikawa T. A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the *Edaradd* gene. *BMC Genet.* 2011;12(1):91. DOI 10.1186/1471-2156-12-91.
- Mikkola M. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A.* 2009;149A(9):2031-2036. DOI 10.1002/ajmg.a.32855.
- Mikkola M., Thesleff I. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):211-224. DOI 10.1016/s1359-6101(03)00020-0.
- Morlon A., Munnich A., Smahi A. TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF- $\kappa$ B activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptor Edaradd. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(23):3751-3757. DOI 10.1093/hmg/ddi405.
- Mostowska A., Biedziak B., Zadurska M., Dunin-Wilczynska I., Lianeri M., Jagodzinski P. Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis. *Clin. Genet.* 2012;84(5):429-440. DOI 10.1111/cge.12061.
- Mues G., Tardivel A., Willen L., Kapadia H., Seaman R., Frazier-Bowers S., Schneider P., D'Souza R. Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010;18(1):19-25. DOI 10.1038/ejhg.2009.127.
- Newton K., French D., Yan M., Frantz G., Dixit V. Myodegeneration in *EDA-A2* transgenic mice is prevented by *XEDAR* deficiency. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24(4):1608-1613. DOI 10.1128/MCB.24.4.1608-1613.2004.
- Nguyen-Nielsen M., Skovbo S., Svaneby D., Pedersen L., Fryzek J. The prevalence of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) in Denmark, 1995–2010. *Eur. J. Med. Genet.* 2013;56(5):236-242. DOI 10.1016/j.ejmg.2013.01.012.
- O'Brown N., Summers B., Jones F., Brady S., Kingsley D. A recurrent regulatory change underlying altered expression and Wnt response of the stickleback armor plates gene *EDA*. *eLife.* 2015;4:e05290. DOI 10.7554/eLife.05290.
- Pantalacci S., Chaumont A., Benoît G., Sadier A., Delsuc F., Douzery E., Laudet V. Conserved features and evolutionary shifts of the *EDA* signaling pathway involved in vertebrate skin appendage development. *Mol. Biol. Evol.* 2008;25(5):912-928. DOI 10.1093/molbev/msn038.
- Park J.H., Yamaguchi T., Watanabe C., Kawaguchi A., Haneji K., Takeda M., Kim Y.I., Tomoyasu Y., Watanabe M., Oota H., Hanihara T., Ishida H., Maki K., Park S.B., Kimura R. Effects of an Asian-specific nonsynonymous *EDAR* variant on multiple dental traits. *J. Hum. Genet.* 2012;57(8):508-514. DOI 10.1038/jhg.2012.60.
- Sadier A., Viriot L., Pantalacci S., Laudet V. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends Genet.* 2014;30(1):24-31. DOI 10.1016/j.tig.2013.08.006.
- Sadier A., Lambert E., Chevret P., Décimo D., Sémon M., Tohmé M., Ruggiero F., Ohlmann T., Pantalacci S., Laudet V. Tinkering signaling pathways by gain and loss of protein isoforms: the case of the *EDA* pathway regulator *EDARADD*. *BMC Evol. Biol.* 2015;15:129. DOI 10.1186/s12862-015-0395-0.
- Siemens H.W. Studien über Vererbung von Hautkrankheiten. XII. Anhidrosis hypotrichotica. *Arch. Dermat. Syph.* 1937;175:565-577. DOI 10.1007/BF02058385.
- Smahi A., Courtois G., Rabia S., Döffinger R., Bodemer C., Munnich A., Casanova J., Israël A. The NF- $\kappa$ B signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 2002;11(20):2371-2375. DOI 10.1093/hmg/11.20.2371.
- Srivastava A., Pispis J., Hartung A., Du Y., Ezer S., Jenks T., Shimada T., Pekkanen M., Mikkola M., Ko M., Thesleff I., Kere J., Schlessinger D. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the *EDA* gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94(24):13069-13074. DOI 10.1073/pnas.94.24.13069.
- Trzeciak W., Koczorowski R. Molecular basis of hypohidrotic ectodermal dysplasia: an update. *J. Appl. Genet.* 2015;57(1):51-61. DOI 10.1007/s13353-015-0307-4.

- Vincent M., Biancalana V., Ginisty D., Mandel J., Calvas P. Mutational spectrum of the ED1 gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2001;9(5):355-363. DOI 10.1038/sj.ejhg.5200635.
- Wahlbuhl-Becker M., Faschingbauer F., Beckmann M., Schneider H. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: breastfeeding complications due to impaired breast development. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2017;77(4):377-382. DOI 10.1055/s-0043-100106.
- Wang K., Yamada S., Izumi H., Tsukamoto M., Nakashima T., Tasaki T., Guo X., Uramoto H., Sasaguri Y., Kohno K. Critical *in vivo* roles of WNT10A in wound healing by regulating collagen expression/synthesis in WNT10A-deficient mice. *PLoS One.* 2018;13(3):e0195156. DOI 10.1371/journal.pone.0195156.
- Weech A. Hereditary ectodermal dysplasia (congenital ectodermal defect): a report of two cases. *Am. J. Dis. Child.* 1929;37(4):766-790. DOI 10.1001/archpedi.1929.01930040075005.
- Wohlfart S., Meiller R., Hammersen J., Park J., Menzel-Severing J., Melichar V., Huttner K., Johnson R., Porte F., Schneider H. Natural history of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: a 5-year follow-up study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2020;15(1):7. DOI 10.1186/s13023-019-1288-x.
- Wright J.T., Fete M., Schneider H., Zinser M., Koster M.I., Clarke A.J., Hadj-Rabia S., Tadini G., Pagnan N., Visinoni A.F., Bergendal B., Abbott B., Fete T., Stanford C., Butcher C., D'Souza R.N., Sybert V.P., Morasso M.I. Ectodermal dysplasias: classification and organization by phenotype, genotype and molecular pathway. *Am. J. Med. Genet. A.* 2019;179(3):442-447. DOI 10.1002/ajmg.a.61045.
- Xu M., Horrell J., Snitow M., Cui J., Gochnauer H., Syrett C.M., Kallish S., Seykora J.T., Liu F., Gaillard D., Katz J.P., Kaestner K.H., Levin B., Mansfield C., Douglas J.E., Cowart B.J., Tordoff M., Liu F., Zhu X., Barlow L.A., Rubin A.I., McGrath J.A., Morrissey E.E., Chu E.Y., Millar S.E. WNT10A mutation causes ectodermal dysplasia by impairing progenitor cell proliferation and KLF4-mediated differentiation. *Nat. Commun.* 2017;8:15397. DOI 10.1038/ncomms15397.
- Yan M., Zhang Z., Brady J., Schilbach S., Fairbrother W., Dixit V. Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated in crinkled mice. *Curr. Biol.* 2002;12(5):409-413. DOI 10.1016/s0960-9822(02)00687-5.
- Yang J., Huang T., Petralia F., Long Q., Zhang B., Argmann C., Zhao Y., Mobbs C., Schadt E., Zhu J., Tu Z., GTEX Consortium. Synchronized age-related gene expression changes across multiple tissues in human and the link to complex diseases. *Sci. Rep.* 2015;5:15145. DOI 10.1038/srep15145. Erratum in: *Sci. Rep.* 2016;6:19384. [corrected to Goldmann J.].
- Yu M., Wong S., Han D., Cai T. Genetic analysis: Wnt and other pathways in nonsyndromic tooth agenesis. *Oral Dis.* 2019;25(3):646-651. DOI 10.1111/odi.12931.
- Zhang L., Yu M., Wong S.W., Qu H., Cai T., Liu Y., Liu H., Fan Z., Zheng J., Zhou Y., Feng H., Han D. Comparative analysis of rare EDAR mutations and tooth agenesis pattern in EDAR- and EDA-associated nonsyndromic oligodontia. *Hum. Mutat.* 2020;41(11):1957-1966. DOI 10.1002/humu.24104.

---

#### ORCID ID

V.A. Kovalskaia orcid.org/0000-0002-8728-8574  
O.P. Ryzkova orcid.org/0000-0003-1285-9093

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.08.2022. После доработки 06.02.2023. Принята к публикации 24.03.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Проблемы изучения направленного естественного отбора у человека

С.В. Михайлова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
✉ [mikhail@bionet.nsc.ru](mailto:mikhail@bionet.nsc.ru)

**Аннотация.** В обзоре описаны основные методы оценки направленного отбора в популяциях человека. В их числе биоинформатический анализ последовательностей ДНК, основанный на выявлении неравновесия по сцеплению и отклонения от случайного распределения частот генетических вариантов; демографические и антропометрические исследования, заключающиеся в поиске корреляции рождаемости с фенотипическими признаками; полногеномные оценки ассоциаций фертильности с генетическими локусами и полигенными индексами, а также сравнение частот аллелей между поколениями (как в современных выборках, так и в полученных из захоронений ДНК). Каждый из этих подходов имеет свои ограничения и применим к разным периодам эволюции *Homo sapiens*. Основными источниками ошибок в таких исследованиях считаются стратификация выборок, ограниченное число исследований на неевропеоидном населении, невозможность полного сопоставления найденных ассоциаций и функционально значимых каузативных вариантов, а также сложность учета всех негенетических факторов, определяющих фертильность в современных популяциях. Полученные с помощью разных методов результаты свидетельствуют о том, что направление адаптации человека к новым для него пищевым продуктам не меняется в ходе эволюции с неолита; многие из вариантов генов иммунитета, ассоциированных в современных популяциях с воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, подверглись положительному отбору в период последних 2–3 тыс. лет в связи с распространением бактериальных и вирусных инфекций. По некоторым генетическим вариантам и полигенным признакам показана смена направления естественного отбора на территории Европы, среди них связанные с иммунным ответом и когнитивными способностями. Анализ корреляции фертильности и уровня образования дает противоречивые результаты. В современных популяциях в большей степени, чем ранее, наблюдается отбор по вариантам генов, отвечающих за социальную адаптацию и поведенческие фенотипы. В том числе в нескольких работах показана положительная корреляция фертильности с полигенными индексами синдрома дефицита внимания/гиперактивности. Ключевые слова: естественный отбор; *Homo sapiens*; фертильность; адаптация; полигенный индекс; полногеномный анализ ассоциаций.

**Для цитирования:** Михайлова С.В. Проблемы изучения направленного естественного отбора у человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):684-693. DOI 10.18699/VJGB-23-79

## Problems with studying directional natural selection in humans

S.V. Mikhailova

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
✉ [mikhail@bionet.nsc.ru](mailto:mikhail@bionet.nsc.ru)

**Abstract.** The review describes the main methods for assessing directional selection in human populations. These include bioinformatic analysis of DNA sequences via detection of linkage disequilibrium and of deviations from the random distribution of frequencies of genetic variants, demographic and anthropometric studies based on a search for a correlation between fertility and phenotypic traits, genome-wide association studies on fertility along with genetic loci and polygenic risk scores, and a comparison of allele frequencies between generations (in modern samples and in those obtained from burials). Each approach has its limitations and is applicable to different periods in the evolution of *Homo sapiens*. The main source of error in such studies is thought to be sample stratification, the small number of studies on nonwhite populations, the impossibility of a complete comparison of the associations found and functionally significant causative variants, and the difficulty with taking into account all nongenetic determinants of fertility in contemporary populations. The results obtained by various methods indicate that the direction of human adaptation to new food products has not changed during evolution since the Neolithic; many variants of immunity genes associated with inflammatory and autoimmune diseases in modern populations have undergone positive selection over the past 2–3 thousand years owing to the spread of bacterial and viral infections. For some genetic variants and polygenic traits, an alteration of the direction of natural selection in Europe has been documented, e.g., for those associated with an immune response and cognitive abilities. Examination of the correlation between fertility and educational attainment yields conflicting results. In modern populations, to a greater

extent than previously, there is selection for variants of genes responsible for social adaptation and behavioral phenotypes. In particular, several articles have shown a positive correlation of fertility with polygenic risk scores of attention deficit/hyperactivity disorder.

Key words: natural selection; *Homo sapiens*; fertility; adaptation; polygenic index; genome-wide association study.

**For citation:** Mikhailova S.V. Problems with studying directional natural selection in humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):684-693. DOI 10.18699/VJGB-23-79

## Введение

В популяциях человека по всему миру растет распространенность целого ряда заболеваний. В их числе ожирение и связанные с ним сахарный диабет 2-го типа и ишемическая болезнь сердца, синдром дефицита внимания/гиперактивности (СДВГ), расстройства аутистического спектра, аллергические заболевания (Charpin, Gouita, 2001; Saklayen, 2018; Zeidan et al., 2022; Wolf et al., 2023). Эта ситуация требует новых подходов в медицине, социальном обслуживании, образовании, организации досуга и питания детей и подростков.

Однозначного мнения о причинах наблюдаемых изменений нет; проводятся многочисленные исследования связи заболеваний с образом жизни, материнским стрессом, экологией. «Окружающая среда» человека резко изменилась в последнем столетии с появлением новых химических соединений, ростом антропогенного загрязнения, прогрессом медицины, включая репродуктивные технологии. Урбанизация привела к увеличению плотности населения и повышенному социальному стрессу (Suvorov, 2021). Демографический переход вызвал «старение» популяций, рост средней продолжительности жизни повлиял на заболеваемость метаболическими расстройствами и сердечно-сосудистыми патологиями. Помимо этого, актуальным остается изучение вклада в наблюдаемый рост заболеваемости генетических факторов. Стандартные подходы медицинской генетики, направленные на поиск ассоциаций генетических вариантов с заболеваниями, не позволяют ответить на вопрос о направлении отбора у современных людей, поскольку наличие заболеваний, особенно в пострепродуктивном периоде, не связано напрямую с количеством потомков индивида. Гомо- и гетерозиготное носительство генетического варианта может по-разному влиять на приспособленность, большинство заболеваний мультифакториальны, не говоря уже о чертах личности. В настоящее время используется несколько подходов к оценке естественного отбора в популяциях человека.

## Биоинформатические методы

Анализ последовательностей ДНК на больших выборках людей позволяет оценивать направление отбора в течение последних тысячелетий. Для этого были разработаны методы, алгоритмы и пакеты программ, основанные на оценках частоты полиморфных вариантов и неравновесия по сцеплению в областях их расположения (Grossman et al., 2013; Field et al., 2016; Palamara et al., 2018; Speidel et al., 2019; Abondio et al., 2022). Предполагается, что наличие в каком-либо районе генома более длинных гаплотипов (участков, не подвергавшихся рекомбинации), повышение частот производных аллелей в рядом расположенных локусах, большая, чем можно было ожидать

при генетическом дрейфе, разница частот аллеля между популяциями, а также более высокая скорость замен для каждой позиции, рассчитанная на основе геномного выравнивания 100 видов позвоночных, могут являться признаками направленного отбора в этом геномном регионе.

В работе, проведенной на базе данных «1000 геномов», были проанализированы 412 отобранных по признакам наличия направленного отбора регионов (Grossman et al., 2013). Показано, что эти области обогащены кодирующими вариантами: обнаружено 235 областей, содержащих один или несколько белок-кодирующих генов, и 177 областей без генов, кодирующих известные белки. В этих регионах найдено также 48 длинных межгенных некодирующих РНК. Среди 33 генов, содержащих наиболее высокорейтинговые однонуклеотидные варианты (ОНВ), – *SCL24A5* и *MATP*, ассоциированные со сниженной пигментацией кожи, *EDAR* (влияющий на формирование волос, потовых желез и зубов), *ARHGEF3* (влияющий на минеральную плотность костей), *BTLA* (ассоциированный с ревматоидным артритом), *CTNS* (влияющий на метаболизм цистеина), *ITPR3* (ассоциированный с сахарным диабетом 1-го типа), ген рецептора врожденного иммунитета *TLR5*, а также *ITGAE* (участвующий в клеточной адгезии и активации лимфоцитов) и *AP4B1* (ассоциированный с детским церебральным параличом). Всего обнаружено 11 областей с вариантами, связанными с ростом и пигментацией, и 79 – с предрасположенностью к инфекционным и аутоиммунным заболеваниям. При этом ген *SLC24A5*, помимо пигментации, определяет устойчивость к проказе. В локусах, ассоциированных с устойчивостью к инфекциям и имеющих признаки отбора, находятся также гены *ALMS1*, *CCR9*, *CXCR4* и *VDR*.

В другом исследовании, выполненном на данных 2478 человек разного происхождения из базы данных «1000 геномов», идентифицировано несколько регионов с положительным отбором по мультиаллельным признакам, включая число эритроцитов и белых кровяных клеток, цвет волос и индекс массы тела (ИМТ) (Speidel et al., 2019). Среди мишеней положительного отбора наблюдается обогащение по ОНВ в функциональных участках генома. Признаки положительного отбора найдены в том числе в локусах главного комплекса гистосовместимости (МНС), генов *LCT* (толерантность к лактозе), *EDAR* и *EDARADD*, *HERC1* (синдромальная умственная отсталость), *ATXN2* (сахарный диабет 1-го типа, ожирение и гипертензия). В этом же исследовании предложенный метод поиска признаков положительного отбора был использован на данных Британского биобанка, в результате получен сигнал для ОНВ, связанных с более светлым цветом волос у европейцев. Наиболее значимый из выявленных сигналов относится к ОНВ, ассоциированным со сниженным ИМТ у американцев европейского происхождения.

Максимальное количество локусов с признаками отбора найдено у европейцев, жители Восточной Азии имеют наименьшее количество сигналов (предположительно из-за эффекта «бутылочного горлышка») (Speidel et al., 2019).

При исследовании данных Британского биобанка обнаружено 12 сигналов направленного отбора, в том числе находящихся вблизи генов иммунного ответа (*TLR1-6-10*, *HLA*, *IGHG*, *STAT4*, *MUC5B*, *FAM19A5*, *ANXA*), вблизи генов, определяющих пигментацию (*GRM5* и *MC1R*), а также вблизи *LCT* (Palamara et al., 2018). В результате анализа 3195 геномов британского проекта UK10K обнаружены признаки отбора в течение последних 2–3 тыс. лет в локусах МНС, *LCT*, *WDFY4* (активация Т-клеток при вирусных инфекциях), а также в генах, отвечающих за пигментацию кожи и волос (*KITLG*, *OCA2/HERC2*, *ASIP*, *SLC24A4*). Полигенный отбор выявлен по вариантам, предрасполагающим к высокому росту и снижению общего холестерина у обоих полов и к снижению ИМТ у мужчин (Field et al., 2016). Используя этот же метод на данных Британского биобанка W. Song с коллегами (Song et al., 2021) проанализировали сигналы отбора для 870 полигенных признаков, ассоциированных с заболеваниями, и для 15 различных, не связанных с болезнями категорий фенотипических признаков. Показано, что на протяжении последних 2–3 тыс. лет 88 % полигенных признаков подвергались отбору. Наибольшие коэффициенты получены для генов, определяющих быстроту загара и более светлые волосы. Отбор по большинству связанных с заболеваниями локусов, включая ассоциированные с расстройствами аутистического спектра и повышенным уровнем холестерина, был негативным; исключение составили гены предрасположенности к болезни Крона и СДВГ. Для полигенных индексов интеллекта и бессонницы предсказана резкая смена направления адаптации около 133 поколений назад.

На материалах биобанка Японии идентифицировано 29 генетических локусов с признаками направленного отбора (Yasumizu et al., 2020). Максимальная статистическая значимость выявлена для локуса кластера алкогольдегидрогеназы (*ADH*), а также для генов *C1A02A* (связывание ионов металлов), *MYOF* (регенерация клеточных мембран), *GRIA2* (рецептор глутамата) и *ASAP2* (везикулярный транспорт). В этом исследовании подтвердилось также ранее показанное давление отбора в японской популяции на гены *EDAR* и область генов МНС.

Несколько работ были посвящены отдельно изучению эволюции генов, ассоциированных с воспалительными заболеваниями. При оценке длины гаплотипов, содержащих 588 ОНВ, ассоциированных с десятью воспалительными заболеваниями в европейских популяциях, найден 21 locus с признаками относительно недавнего (в пределах 1200–2600 лет) положительного отбора; при этом отбирались именно ассоциированные с заболеваниями, а не протективные аллели (Raj et al., 2013). В результате сравнения нескольких распространенных мультифакторальных заболеваний и фенотипических признаков по количеству ассоциированных с ними ОНВ, находившихся под положительным отбором, больше всего таких ОНВ обнаружено именно для воспалительных заболеваний. Найденные генетические варианты входят в основном

в молекулярные пути, участвующие в активации Th17 лимфоцитов (*STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, *IRF1*, *CSF2*, *IL2*, *IL3*, *IL12A*, *IL2RA*, *SOCS1*) (Raj et al., 2013). На материале Эстонского биобанка (2300 полногеномных сиквенсов) был проведен поиск признаков направленного отбора по 535 локусам, ассоциированным с 21 аутоиммунным заболеванием. Для 153 локусов были выявлены признаки отбора, при этом 29 из них отбирались из-за сцепления с другими вариантами (Pankratov et al., 2022). Наибольшее количество из найденных в этой работе локусов было ассоциировано с активацией лейкоцитов и синтезом цитокинов.

Поиск генетических вариантов, подвергшихся селекции в ходе эволюции, с помощью методов биоинформатики затруднен тем, что значительное количество областей генома, содержащих сигналы направленного отбора, находятся в межгенных областях (Grossman et al., 2013; Yasumizu et al., 2020), для которых в настоящее время невозможно предсказать какую-либо функциональную значимость. В результате нет ответа на вопрос, объясняется это только недостаточным уровнем знаний о некодирующих участках генома или связано с неточностью используемых алгоритмов.

### Сравнение геномов ископаемых останков и современных людей

Накопление числа данных о последовательностях ДНК ископаемых останков людей позволяет сравнивать их с генотипами из современных баз данных. Особый интерес представляет сопоставление генотипов людей, проживавших в разное время на одной и той же территории.

При сравнении древних и современных геномов людей из Британии идентифицировано семь локусов с признаками направленного отбора за последние 4500 лет (Mathieson, Terhorst, 2022). Большинство из них связано с уровнем витамина D или кальция. При этом сила отбора по отдельным локусам менялась с течением времени, что позволяет предположить появление каких-то факторов, смягчавших его. Среди 28 проанализированных в работе сложных антропометрических и метаболических признаков свидетельства полигенного отбора были найдены только для пигментации кожи.

В останках 151 человека во временных рядах данных из Северной и Восточной Польши (I–XVIII вв. н.э.) исследовали полиморфные сайты в генах врожденного иммунитета (*SLC11A1*, *MBL2*, *TLR2*, *P2RX7*, *IL10*, *TNFA*), ассоциированных с предрасположенностью к микобактериальным инфекциям (Lewandowska et al., 2018). Анализ ДНК показал большую роль генетического дрейфа в эволюции людей этого региона, однако два ОНВ: rs17235409 транспортера дивалентных катионов *SLC11A1* и rs1800896 интерлейкина *IL10*, имели признаки неслучайной эволюции.

На коллекции из 1013 геномов европейского происхождения периода 10000 лет от мезолита до Средневековья был проведен анализ частоты варианта rs34536443 гена *TYK2*, кодирующего тирозинкиназу, которая участвует в передаче сигнала от цитокиновых рецепторов (Kerner et al., 2021). Для минорного аллеля этого ОНВ ранее была найдена ассоциация с предрасположенностью к тубер-

кулезу. Авторы обнаружили, что данный ОНВ появился вследствие единственного мутационного события во время раннего неолита ~8500 лет назад на Анатолийском полуострове, а затем распространился в Центральную Европу, где его частота сохранялась в пределах 3 % примерно до 5000 лет назад. В бронзовом веке, около 3000 лет назад частота достигла максимума (10 %), а после железного века началось ее резкое снижение до 2.9 %. Наблюдаемые изменения частоты rs34536443 связывают с распространением туберкулеза в Европе. Также был исследован вариант rs1800562 гена-регулятора метаболизма железа *HFE* (Kerner et al., 2021). Максимум его частоты в Европе (около 10 %) был достигнут в Средневековье, а затем она снизилась в Европе в среднем до 4 %.

Еще в одной работе исследованы 827 древних образцов европейского происхождения (с 25000 лет до н. э. до настоящего времени) (Kuijpers et al., 2022). В соответствии с имеющимися данными по полногеномным полигенным индексам наследуемых признаков у европейцев было проведено сравнение геномов на разных временных отрезках. Показано, что после неолита у европейского населения увеличились рост и интеллект, уменьшилась пигментация кожи, при этом увеличился риск ишемической болезни сердца за счет снижающихся концентраций липопротеинов высокой плотности. Выдвинуто предположение, что последний тренд связан с когнитивными функциями, так как вариации уровней липопротеинов коррелируют с интеллектом, обучаемостью и памятью. Для идентификации локусов, подвергавшихся селекции во время эпидемии бубонной чумы в Европе (1347–1351 гг. н. э.), был проведен анализ ассоциаций для генов иммунитета в 206 образцах ДНК, происходящих из захоронений двух разных европейских популяций до, во время и после этой эпидемии: Лондон – ~1000–1250 и 1350–1539 гг., Дания – ~850–1350 и ~1350–1800 гг. (Klunk et al., 2022). Найдено четыре локуса с признаками положительного отбора, общих для британских и датских захоронений: rs2549794, влияющий на сплайсинг мРНК гена *ERAP2*, и три ОНВ в некодирующих областях – rs11571319, rs17473484 и rs1052025. Гены *ERAP1*, *ERAP2*, *LNPEP*, *CTLA4*, *ICOS*, *TICAM2*, *TMED7*, находящиеся вблизи этих ОНВ, дифференциально экспрессируются в макрофагах в ответ на инфекцию *Yersinia pestis*.

Анализ 187 полигенных признаков в трех наборах данных о геноме древнего человека (8000–4200, ~14000–3400 и ~45000–7000 лет назад) показал, что в геномах Ближнего Востока сигналы отбора по генам, определяющим загар, варьировали в зависимости от широты; при этом признаки положительного отбора наблюдаются в регионах низких широт, а отрицательного – в высоких широтах (Song et al., 2021). Сигналы позитивной селекции в этой работе были найдены для локусов 13 заболеваний, включая болезнь Крона, атопический дерматит и периодонтит.

В ходе анализа комбинированной выборки из базы данных «1000 геномов» и 230 останков жителей Евразии, датированных с 6500 по 1000 г. до н. э., максимальный сигнал селекции выявлен вблизи локуса *LCT* (rs4988235) (Mathieson et al., 2015). Два других независимых сигнала, связанных с диетой, найдены вблизи генов *FADS1* (rs174546) и *DHCR7/NADSYN1* (rs7940244). *FADS1* и

*FADS2* – десатуразы жирных кислот, участвующие в синтезе длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот из короткоцепочечных предшественников, и вариации в этом локусе связаны с концентрацией жирных кислот в плазме. Наиболее значимый ОНВ локуса (rs174546) ассоциирован также со сниженным уровнем триглицеридов. Кодлируемая геном *DHCR7* 7-дегидрохолестеролредуктаза участвует в метаболизме холестерина и витамина D. Кроме того, направленный отбор был показан для локусов генов иммунитета МНС и *TLR1-6-10*, генов *HERC2* и *SLC45A2*, отвечающих за пигментацию, а также локусов вблизи *ATXN2*, *GRM5* (рецептор глутамата), *ZKSCAN3* (регуляция транскрипции), *SLC22A4* (переносчик органических катионов).

Ограничения такого подхода к анализу направленного отбора у человека состоят в том, что данные из захоронений фрагментарны, а наблюдаемые изменения в геномах могут быть связаны с миграциями населения из разных регионов, где генетический пул формировался в том числе под действием эффектов «бутылочного горлышка» (Kerner et al., 2021) и ассортативного спаривания (Mills, Mathieson, 2022). В исследовании (Marnetto et al., 2022), выполненном на данных эстонского биобанка и банка данных древних геномов Allen Ancient DNA Resource (AADR) V44.3, обнаружено, что в смешанной популяции, сформировавшейся из ранее изолированных популяций пастухов, охотников-собирателей и земледельцев, некоторые фенотипы ассоциированы с носительством специфических для предковых популяций последовательностей в определенных районах генома. Среди прочего: уровни холестерина в крови современных эстонцев положительно коррелируют со сходством их геномов с носителями ямной культуры в областях, ассоциированных с уровнем холестерина. Таким образом, при формировании популяции наблюдаемая разница в частотах аллелей относительно предковой популяции может не говорить о направленном отборе.

### Анализ числа потомков у носителей разных фенотипов и генотипов

Помимо изменения распространенности генетических вариантов или фенотипических признаков во времени, о наличии направленного естественного отбора говорит различающееся число потомков у носителей определенных генотипов или признаков. После произошедшего во многих странах демографического перехода, характеризующегося снижением младенческой и детской смертности с одновременным снижением рождаемости, для изучения современного направленного отбора в популяциях человека именно оценка числа потомков является наиболее точным методом. При этом одномоментное исследование в выборках молодых людей не отражает реальное количество потомков, так как наблюдается тенденция к откладыванию рождения первого и, соответственно, последующих детей (Balbo et al., 2013). При обследовании выборки старше 50 лет выпадают из поля зрения умершие или погибшие индивидуумы, которые тем не менее оставили потомков. Поэтому наиболее перспективны долговременные исследования, в особенности позволяющие сравнивать между собой последовательные поколения. Чаще всего для характеристики рождаемости рассматривают общее

количество рожденных в течение репродуктивного периода потомков (ОКП) для женщин старше 45 лет и для мужчин старше 55 лет, возраст рождения первого ребенка у женщин, который демонстрирует сильную обратную корреляцию с ОКП (Tropf et al., 2015; Kong et al., 2017; Sanjak et al., 2018; Архангельский и др., 2020), показатель относительного репродуктивного успеха (число детей индивида, деленное на среднее число детей в популяции) и бездетность.

### Демографические и антропометрические исследования

Рождаемость является предметом изучения демографии. Особое внимание на проблемы воспроизводства населения обращено в государствах, совершивших демографический переход, поскольку наблюдающееся падение рождаемости приводит к «старению» населения, уменьшению доли трудоспособных граждан и, как следствие, к снижению темпов экономического роста. Демографы стремятся дать прогноз численности населения и рождаемости, а также найти ее ассоциации с социально-экономическими факторами, что позволило бы государствам регулировать воспроизводство населения. Таким образом, демография по сути изучает ассоциацию фенотипических признаков с естественным отбором в популяции.

Поиск связи рождаемости с показателями дохода, уровня образования, религиозностью и антропометрическими данными дал неоднозначные результаты (табл. 1).

В ряде исследований наблюдалась обратная корреляция числа детей с доходом индивидуумов и домохозяйств (Архангельский и др., 2021; Turner, Robbins, 2023), в некоторых – разнонаправленные корреляции для мужчин и женщин (Fieder, Huber, 2022). Отмечалось также, что при разделении выборки на подгруппы по уровню дохода направление корреляции изменяется (Cohen et al., 2013; Архангельский и др., 2021). Отдельное внимание демография уделяет анализу корреляции рождаемости и уровня образования. В большинстве исследований используемые показатели образования и когнитивных способностей демонстрируют обратную корреляцию с количеством потомков (Beauchamp, 2016; Reeve et al., 2018; Sanjak et al., 2018; Архангельский и др., 2020; Fieder, Huber, 2022) (см. табл. 1). Однако у мужчин уровень образования коррелирует с доходом, за счет этого эффект может меняться (Fieder, Huber, 2022). В ходе опроса 9452 женщин из 27 стран Евросоюза оказалось, что предполагаемое ОКП выше у женщин с более высоким образованием, однако в данном исследовании речь идет о намерениях, а не о фактически рожденных потомках (Testa, 2014).

В антропометрических исследованиях обнаружено медленное изменение некоторых параметров в популяциях. Например, с 1950-х гг. отмечено увеличение на 0.5 % числа случаев фетотазовой диспропорции при родах, что связывают с ослаблением естественного отбора в результате массового применения кесарева сечения (Mitteroecker et al., 2016). Показана положительная корреляция ОКП с фи-

**Таблица 1.** Описанные корреляции общего числа потомков с демографическими и антропометрическими признаками (если пол не указан – для обоих полов)

Фенотипический признак	Пол	Направление корреляции	Страна	Литературный источник
ИМТ		+	США	Beauchamp, 2016
Уровень образования		–		
Рост	Жен.	–		
ИМТ, вес, обхват талии	Муж.	+	Британия	Sanjak et al., 2018
Уровень образования		–		
Процент жира в организме	Муж.	+		
Кэффициент подвижного интеллекта	Жен.	–		
Рост	Жен.	–		
Доход		–	США	Turner, Robbins, 2023
Доход		–	Россия	Архангельский и др., 2021
Уровень образования	Жен.	–	Россия	Архангельский и др., 2020
Процент жира в организме	Жен.	+	Британия	Arner et al., 2021
Годы обучения		–	США	Fieder, Huber, 2022
Посещение религиозных служб		+		
Уровень образования	Муж.	+		
Доход	Муж.	+		
Доход	Жен.	–		
Кэффициент общей когнитивной способности		–	Азия, Европа и США	Reeve et al., 2018
Рост	Жен.	–	Европа	Byars et al., 2010
Вес		+		
Уровень общего холестерина		–		



зическими характеристиками: весом, ИМТ, процентным содержанием жира и др. (Byars et al., 2010; Beauchamp, 2016; Sanjak et al., 2018; Arner et al., 2021) (см. табл. 1). Современные данные об отборе по росту противоречат полученным на ископаемых образцах: число потомков у женщин отрицательно коррелирует с ростом (Byars et al., 2010; Beauchamp, 2016). Во Фрамингемском исследовании, проведенном на двух последовательных поколениях (Byars et al., 2010), выявлено также снижение уровня общего холестерина и систолического кровяного давления в европейских популяционных выборках.

Однако ОКП зависит от исторической, культурной, экономической и социальной среды (например, доступность средств контрацепции и ухода за детьми) (Barban et al., 2016). В подобных исследованиях часто невозможно установить причинно-следственные связи наблюдаемых явлений и учесть все негенетические факторы, что затрудняет использование полученных данных для целей планирования и регулирования рождаемости. В связи с этим выдвигаются предложения об интеграции генетических и демографических исследований (Hugh-Jones, Abdellaoui, 2022).

#### Анализ ассоциации рождаемости с генетическими маркерами

Общее число детей индивидуума имеет одну из самых высоких степеней полигенности среди всех признаков (Mathieson et al., 2023). При этом наследуемость ОКП в разных исследованиях оценивается в пределах 14–46 % (Barban et al., 2016). В выборках женщин Великобритании и Нидерландов до 10 % дисперсии ОКП определяют распространенные генетические варианты (Tropf et al., 2015). Основной способ оценки влияния генотипа на рождаемость – полногеномный анализ ассоциации показате-

лей рождаемости в выборках современных людей. Результаты таких исследований приведены в табл. 2 и 3.

Метаанализ исследований полногеномных ассоциаций ОКП (343072 человека) выявил три основных локуса: rs10908474 (вблизи генов *SLC27A3* и *GATAD2B*), rs13161115 (между генами *EFNA5* и *FBXL17*) и rs2415984 в интроне гена длинной межгенной некодирующей РНК *LINC00871* (максимальный сигнал). Дополнительное исследование выявило локус вблизи rs2415984, содержащий гены *ARHGAP27*, *PLEKHM1* и *MIR4315-1*. Анализ потенциальной функциональной значимости этих вариантов показал неравновесие по сцеплению rs13161115 с сайтом метилирования вблизи гена *EFNA5* (Barban et al., 2016) (см. табл. 2). Для найденных в этом исследовании локусов, ассоциированных с возрастом рождения первого потомка, получена обратная корреляция с уровнем образования, а для полигенного индекса ОКП – обратная корреляция с количеством лет обучения (см. табл. 3). Большинство обнаруженных в вышеописанном метаанализе корреляций для полигенных индексов ОКП и возраста рождения первого ребенка относятся к поведенческим и репродуктивным фенотипам.

В ходе недавно проведенного поиска полногеномных ассоциаций ОКП и бездетности на выборке из 785 604 человек европейского происхождения найдено 43 геномных локуса, ассоциированных со сроками полового созревания, возрастом при рождении первого ребенка, регуляцией половых гормонов, эндометриозом и возрастом наступления менопаузы (Mathieson et al., 2023) (см. табл. 2). Среди них 28 были общими для мужчин и женщин и шесть пол-специфичными для ОКП, а девять, включая один пол-специфичный, были ассоциированы с бездетностью. Вариант rs12949256, p.Ala117Thr в *ARHGAP27* был связан с более высоким ОКП, но более коротким репродуктив-

**Таблица 2.** Полногеномные ассоциации, выявленные для общего количества потомков индивида (если пол не указан – для обоих полов)

Генетический локус и его функциональная значимость	Ассоциированный с близлежащими генами фенотип, согласно <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/</a>	Пол	Литературный источник
<i>SLC27A3</i> , <i>GATAD2B</i> ; метаболизм липидов, транскрипционный репрессор	Аутизм, умственная отсталость		Barban et al., 2016
<i>EFNA5</i> , <i>FBXL17</i> ; развитие центральной нервной системы, рост кровеносных сосудов	Дегенеративное заболевание нервной системы	Муж.	
<i>LINC00871</i> ( <i>ARHGAP27</i> , <i>PLEKHM1</i> и <i>MIR4315-1</i> ); эндоцитоз, везикулярный транспорт			
<i>MC1R</i> ; рецептор меланокортина 1	Пигментация волос		Mathieson et al., 2023
<i>FADS1/2</i> ; ферменты синтеза жирных кислот	Уровень триглицеридов сыворотки крови		
<i>ARHGAP27</i> ; клатрин-опосредованный эндоцитоз			
<i>PLEKHM1</i> ; везикулярный транспорт	Аутосомно-рецессивный остеопетроз 6-го типа		
<i>PIK3IP1</i> ; регулятор клеточного цикла	Ингибирование активации Т-клеток		
<i>ZFP82</i> ; регулятор транскрипции	Супрессия опухолей		
<i>LRP4</i> ; регулятор сигнального пути WNT	Синдром Сенани–Ленца		
<i>GLDN</i> ; формирование периферических нейронов	Летальный синдром врожденной контрактуры		
<i>RPS11</i> ; белок рибосомального комплекса			
<i>PGGHG</i> ; метаболизм углеводов			

**Таблица 3.** Полигенные ассоциации, найденные для общего количества потомков (если пол не указан – для обоих полов)

Полигенный признак	Направление корреляции с ОКП	Пол	Литературный источник
Риск СДВГ	+		Demontis et al., 2019
PolyEduc – полигенный индекс предрасположенности к образованию	–	Муж.	Fieder, Huber, 2022
POLYEDU – полигенный индекс предрасположенности к образованию	–		Kong et al., 2017
Рост	+	Муж.	Song et al., 2021
Цвет кожи	+	Муж.	
Высокие умственные способности	–		
Доход	–		Hugh-Jones, Abdellaoui, 2022
Уровень образования	–		
Риск СДВГ, депрессивного расстройства	+		
Риск ишемической болезни сердца	+		
ИМТ	+		
Экстраверсия	+		
Число лет обучения	–		Barban et al., 2016
Риск расстройства аутичного спектра	–		

ным периодом. Кодирующие варианты, ассоциированные с ОКП, найдены в генах *PIK3IP1* (rs2040533, p. Thr251Ser), *ZFP82* (rs17206365, p. Leu59Met), *LRP4* (rs6485702, p. Ile1086Val). Сравнение с данными, полученными на ископаемых останках европейцев (Mathieson et al., 2015) показало, что в локусе *FADS1/2* (биосинтез липидов  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6) направленный отбор продолжается на протяжении нескольких тысяч лет. Обнаружена неизвестная пока роль гена рецептора меланокортина 1 (*MC1R*) в репродуктивной биологии. Его влияние на число потомков сильнее у женщин. Несмотря на то что варианты этого гена определяют ~73 % наследуемости рыжего цвета волос, фенотипически рыжий цвет в исследованной выборке не был ассоциирован с ОКП. После исключения из анализа рыжеволосых женщин его эффект на число потомков в Британском биобанке сохранялся. Также не обнаружено связи между эффектами конкретных ОНВ на цвет волос и на ОКП. Интронный инсерционно/делеционный полиморфизм экспрессирующегося в мозге гена *CADM2* показал максимальную ассоциацию с бездетностью; для этого гена, кодирующего молекулу клеточной адгезии, ранее выявлены сильный сигнал балансирующего отбора и ассоциация с рискованным поведением (Boutwell et al., 2017). Специфичную для женщин ассоциацию с бездетностью выявили для гена регулятора транскрипции *PPP3R1* (Mathieson et al., 2023). Полученные результаты подтверждены на выборке 34367 женщин FinnGen для 35 найденных локусов (Mathieson et al., 2023). Ни один из идентифицированных в этом исследовании сигналов не продемонстрировал значимых полногеномных ассоциаций с уровнем образования, посещаемостью церкви или индексами социальной депривации. При оценке потенциальной функциональной значимости найденных вариантов было показано, что значительная часть сигналов современного направленного отбора относится к гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, регулирующей фертильность и репродуктивное старение.

Несколько работ посвящено отдельно изучению связи уровня образования с числом потомков. На выборке 129808 исландцев, рожденных в период 1910–1990 гг., полигенный индекс уровня образования POLYEDU отрицательно коррелировал с ОКП, при этом отмечено постепенное его снижение в ряду наблюдаемых поколений (Kong et al., 2017). В частности, показано увеличение частоты варианта rs62056842 в интроне экспрессирующегося в клетках нервной системы гена *MAPT*, ассоциированного с пониженным уровнем образования. При исключении из анализа детей, рожденных матерями в возрасте 21 года или младше (18 % всех детей в выборке), и детей, рожденных мужчинами в возрасте 22 лет или младше (13 %), корреляция пропала (Kong et al., 2017).

Еще в одном исследовании показана пограничная по величине обратная корреляция ОКП с полигенным индексом уровня образования для мужчин, при этом количество детей значительно положительно регрессировало при взаимодействии заработной платы и полигенного индекса PolyEduc, что говорит о положительной связи заработной платы и количества детей у мужчин с более высокой генетической предрасположенностью к высшему образованию (Fieder, Huber, 2022). В ходе анализа ассоциации полигенных индексов фертильности с 33 полигенными признаками в двух поколениях европейцев из Британского биобанка (348595 человек европейского происхождения, с учетом числа сиблингов и числа потомков) полигенные показатели, предсказывающие более высокие доходы и уровень образования, коррелировали со сниженной рождаемостью. Полигенные индексы риска СДВГ, депрессивного расстройства и ишемической болезни сердца, а также более высокий ИМТ и экстраверсия, наоборот, предсказывают большее число потомков (Hugh-Jones, Abdellaoui, 2022). В исследовании было показано, что образовательный уровень, риск СДВГ и депрессивного расстройства отбираются среди молодых матерей (возраст рождения первого ребенка до 22 лет), но отбор имеет

обратное направление среди более старших. Несколько полигенных оценок антропометрических показателей, напротив, отбираются только среди матерей старшего возраста. При этом наибольший по размеру изученной выборки анализ (Mathieson et al., 2023) не выявил отбора против уровня образования.

В современном обществе с ОКП из 15 выделенных категорий генов, определяющих фенотипические признаки, коррелируют гены, отвечающие за метаболизм, особенности питания, психиатрические характеристики, дерматологические признаки (только у мужчин), социальное познание и репродукцию (Song et al., 2021).

Положительная корреляция полигенных индексов риска СДВГ и фертильности была найдена также при сравнении выборки 20 183 человек с диагностированным СДВГ и контрольной выборки, состоящей из 35 191 жителя Европы и США (Demontis et al., 2019).

Ограничение метода анализа полногеномных ассоциаций состоит в том, что он позволяет обнаружить только генетический локус, а не конкретный ген или полиморфный сайт, ассоциированный с определенным признаком. Как и при биоинформационном анализе, существенная часть ассоциаций попадает в межгенные области и не всегда может быть интерпретирована. Много споров вызывает стратификация исследуемых выборок, которая может существенно влиять на полученные результаты (Sohail et al., 2019; Mills, Mathieson, 2022). Исследователи подчеркивают неслучайное формирование когорт, так как само согласие на участие в исследовании коррелирует, например, с уровнем образования не только в часто используемой американской коммерческой выборке 23andMe, но и в Британском биобанке (Mills, Mathieson, 2022; Schork et al., 2022). Показано, что метаанализ небольших локальных выборок европейцев может дать неверные результаты по причине разной доли предковых популяций пастухов, охотников-собирателей и земледельцев, участвовавших в формировании современного населения Европы в разных регионах. При обследовании больших популяций, расселенных в разных климатических районах, необходимо учитывать влияние климатических факторов на фенотип. На территории Великобритании отмечена географическая кластеризация генетических вариантов, влияющих на сложные признаки, включая аллели, ассоциированные с уровнем образования, что предполагает влияние демографических факторов на корреляцию между генами и окружающей средой (Abdellaoui et al., 2019). Большинство исследований по поиску полногеномных ассоциаций проведено на выборках европейского происхождения, поэтому полученные выводы не могут быть автоматически экстраполированы на человечество в целом. Кроме того, количество выборок, достаточных по размеру для получения статистически значимых результатов, ограничено.

### Анализ частот генетических вариантов в последовательности близких поколений

Направление отбора можно оценивать, сравнивая генотипы людей близко расположенных поколений, рожденных в одной и той же популяции в периоды, примыкающие к значимым природным, социально-экономическим или политическим событиям в регионе их рождения. Разница в

частотах аллелей при этом может отражать повышенную перинатальную, пренатальную и младенческую смертность либо разницу в числе потомков у населения репродуктивного возраста с разными генотипами в период изучаемых событий.

Подобная работа сделана на основании данных Британского биобанка (Wu et al., 2022). Был выполнен поиск полногеномных ассоциаций уровня младенческой смертности в зависимости от места и года рождения. В возрастных когортах, родившихся между 1936 и 1970 гг. на территории Англии и Уэльса, наблюдалось снижение младенческой смертности со всплесками в период Второй мировой войны. Найдено несколько значимых локусов, включая миссенс-вариант rs1446585 гена *R3HDM1* вблизи гена *LCT* и миссенс-вариант rs5743618 гена *TLR1*, а также rs2852853 в интроне гена 7-дегидрохолестеролредуктазы *DHCR7* (метаболизм витамина D), rs9944197 в интроне гена рибосомного белка *EFL1* и межгенный rs10521293. Авторы особенно заинтересовали локусы *LCT* и *TLR1/6/10*, для которых ранее выявлен отбор среди европейцев (Mathieson et al., 2015). Частота этих аллелей не различалась по годам рождения в регионах с низкой младенческой смертностью, но различалась в регионах с высокой. Максимум разницы приходился на 1942 г. (спустя год после максимума германских бомбардировок), но плотность бомбардировок по регионам не совпадала с уровнем младенческой смертности, поэтому авторы связывают наблюдаемый эффект с тяжелыми жизненными условиями и дефицитом продуктов.

В недавно опубликованной нами работе (Mikhailova et al., 2022) сравнивались частоты аллелей некоторых распространенных генетических вариантов, для которых ранее была показана ассоциация со стрессоустойчивостью и стресс-индуцированными расстройствами, в выборках 14–17-летних подростков, рожденных до, во время и после социально-экономического кризиса 1990-х гг. в России и обучавшихся в одних и тех же школах в типичном промышленном районе г. Новосибирска. Обнаружено статистически значимое повышение частот протективного против стресса варианта rs4680 G гена *COMT* и длинных (7R+8R) тандемных повторов в экзоне 3 гена *DRD4*. Оба эти гена относятся к дофаминергической системе регуляции. Предполагается, что в условиях продолжительного социального стресса носители определенных генотипов оставили больше потомков благодаря лучшей адаптации к условиям социально-экономической депривации, так как известно, что социальный стресс влияет на рождаемость.

Ограничение таких работ состоит в том, что локальные по времени изменения в частотах аллелей могут не влиять на общий генетический пул популяции, особенно в связи с падением рождаемости в популяциях в периоды значимых деструктивных событий. Кроме того, сложно учесть все факторы, которые потенциально могли вызвать изменение частот аллелей.

### Заключение

Таким образом, несмотря на ограничения каждого подхода, а также недостаточность информации о признаках направленного отбора в африканских и азиатских популяциях, найдены несколько десятков генетических вариан-

тов и ряд полигенных признаков, подвергавшихся отбору в ходе эволюции человека. Выявлены генетические локусы и фенотипические признаки, вектор направленного отбора по которым неизменен на протяжении от неолита до нашего времени, хотя интенсивность отбора изменяется (*LCT*, *FAD1/2*). Для некоторых генетических вариантов направление отбора изменялось, вероятно, в результате столкновения с патогенами (rs34536443 гена *ТУК2*). В современных популяциях отмечен разворот направленного отбора относительно предшествующей эволюции для полигенных индексов роста у женщин и ИМТ у мужчин. Для значительного числа генетических вариантов, демонстрирующих в современных исследованиях ассоциацию с воспалительными заболеваниями (включая болезнь Крона и атопический дерматит), отмечен позитивный направленный отбор в прошлом, однако не ясно, находятся ли эти варианты под давлением отбора сейчас или наблюдающееся соотношение генотипов уже является результатом балансирующего отбора вследствие антагонистической плейотропии. Противоречивые данные получены для отбора по относительно недавно появившимся полигенным признакам дохода и уровня образования. Показано, что механизмы действия естественного отбора в популяциях человека изменились, а мишенями селекции в большей степени, чем в предыдущие века, становятся гены, отвечающие за социальную адаптацию и поведенческие фенотипы. Например, наблюдаемая несколькими исследователями позитивная ассоциация полигенного индекса СДВГ с фертильностью свидетельствует об отборе по этому фенотипу в современных популяциях.

## Список литературы / References

- Архангельский В.Н., Шульгин С.Г., Зинькина Ю.В. Репродуктивное поведение российских женщин в зависимости от образовательного статуса. *Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Социология*. 2020;20(3):546-559. DOI 10.22363/2313-2272-2020-20-3-546-559.
- [Arkhangelskiy V.N., Shulgin S.G., Zinkina Yu.V. Reproductive behavior of Russian women as depending on their level of education. *Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhby Narodov. Seriya: Sotsiologiya = RUDN Journal of Sociology*. 2020;20(3):546-559. DOI 10.22363/2313-2272-2020-20-3-546-559. (in Russian)]
- Архангельский В.Н., Ростовская Т.К., Васильева Е.Н. Влияние уровня жизни на репродуктивное поведение россиян: гендерный аспект. *Женщина в рос. обществе*. 2021; Спец. вып.:3-24. DOI 10.21064/WinRS.2021.0.1.
- [Arkhangelskiy V.N., Rostovskaya T.K., Vasilieva E.N. Influence of the standard of living on the reproductive behavior of Russians: gender aspect. *Zhenshchina v Rossiyskom Obshchestve = Woman in Russian Society*. 2021;Spec.iss.:3-24. DOI 10.21064/WinRS.2021.0.1. (in Russian)]
- Abdellaoui A., Hugh-Jones D., Yengo L., Kemper K.E., Nivard M.G., Veul L., Holtz Y., Zietsch B.P., Frayling T.M., Wray N.R., Yang J., Verweij K.J.H., Visscher P.M. Genetic correlates of social stratification in Great Britain. *Nat. Hum. Behav.* 2019;3(12):1332-1342. DOI 10.1038/s41562-019-0757-5.
- Abondio P., Cilli E., Luiselli D. Inferring signatures of positive selection in whole-genome sequencing data: an overview of haplotype-based methods. *Genes*. 2022;13(5):926. DOI 10.3390/genes13050926.
- Arner A.M., Grogan K.E., Grabowski M., Reyes-Centeno H., Perry G.H. Patterns of recent natural selection on genetic loci associated with sexually differentiated human body size and shape phenotypes. *PLoS Genet.* 2021;17(6):e1009562. DOI 10.1371/journal.pgen.1009562.
- Balbo N., Billari F.C., Mills M. Fertility in advanced societies: a review of research: La fécondité dans les sociétés avancées: un examen des recherches. *Eur. J. Popul.* 2013;29(1):1-38. DOI 10.1007/s10680-012-9277-y.
- Barban N., Jansen R., de Vlaming R., Vaez A., Mandemakers J.J., Tropf F.C., Shen X., Wilson J.F., Chasman D.I., Nolte I.M., ... Lee J.J., Benjamin D.J., Cesarini D., Koellinger P.D., den Hoed M., Snieder H., Mills M.C. Genome-wide analysis identifies 12 loci influencing human reproductive behavior. *Nat. Genet.* 2016;48(12):1462-1472. DOI 10.1038/ng.3698.
- Beauchamp J.P. Genetic evidence for natural selection in humans in the contemporary United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(28):7774-7779. DOI 10.1073/pnas.1600398113.
- Boutwell B., Hinds D.; 23andMe Research Team; Tielbeek J., Ong K.K., Day F.R., Perry J.R.B. Replication and characterization of *CADM2* and *MSRA* genes on human behavior. *Heliyon*. 2017;3(7):e00349. DOI 10.1016/j.heliyon.2017.e00349.
- Byars S.G., Ewbank D., Govindaraju D.R., Stearns S.C. Colloquium papers: natural selection in a contemporary human population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(Suppl.1):1787-1792. DOI 10.1073/pnas.0906199106.
- Charpin D., Gouitaa M. Why is the prevalence of allergic diseases increasing? A critical assessment of some classical risk factors. *Mediators Inflamm.* 2001;10(6):292-294. DOI 10.1080/09629350152700920.
- Cohen A., Dehejia R., Romanov D. Financial incentives and fertility. *Rev. Econ. Stat.* 2013;95(1):1-20. DOI 10.1162/REST\_a\_00342.
- Demontis D., Walters R.K., Martin J., Mattheisen M., Als T.D., Agerto E., Baldursson G., Belliveau R., Bybjerg-Grauholm J., Bækvad-Hansen M., ... Werge T., Mors O., Mortensen P.B., Daly M.J., Faraone S.V., Børglum A.D., Neale B.M. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat. Genet.* 2019;51(1):63-75. DOI 10.1038/s41588-018-0269-7.
- Fieder M., Huber S. Contemporary selection pressures in modern societies? Which factors best explain variance in human reproduction and mating? *Evol. Hum. Behav.* 2022;43(1):16-25. DOI 10.1016/j.evolhumbehav.2021.08.001.
- Field Y., Boyle E.A., Telis N., Gao Z., Gaulton K.J., Golan D., Yengo L., Rocheleau G., Froguel P., McCarthy M.I., Pritchard J.K. Detection of human adaptation during the past 2000 years. *Science*. 2016;354(6313):760-764. DOI 10.1126/science.aag0776.
- Grossman S.R., Andersen K.G., Shlyakhter I., Tabrizi S., Winnicki S., Yen A., Park D.J., Griesemer D., Karlsson E.K., Wong S.H., Cabili M., Adegbola R.A., Bamezai R.N., Hill A.V., Vannberg F.O., Rinn J.L.; 1000 Genomes Project; Lander E.S., Schaffner S.F., Sabeti P.C. Identifying recent adaptations in large-scale genomic data. *Cell*. 2013;152(4):703-713. DOI 10.1016/j.cell.2013.01.035.
- Hugh-Jones D., Abdellaoui A. Human capital mediates natural selection in contemporary humans. *Behav. Genet.* 2022;52(4-5):205-234. DOI 10.1007/s10519-022-10107-w.
- Kerner G., Laval G., Patin E., Boisson-Dupuis S., Abel L., Casanova J.L., Quintana-Murci L. Human ancient DNA analyses reveal the high burden of tuberculosis in Europeans over the last 2,000 years. *Am. J. Hum. Genet.* 2021;108(3):517-524. DOI 10.1016/j.ajhg.2021.02.009.
- Klunk J., Vilgalys T.P., Demeure C.E., Cheng X., Shiratori M., Madej J., Beau R., Elli D., Patino M.I., Redfern R., DeWitte S.N., Gamble J.A., Boldsen J.L., Carmichael A., Varlik N., Eaton K., Grenier J.C., Golding G.B., Devault A., Rouillard J.M., Yotova V., Sindeaux R., Ye C.J., Bikaran M., Dumaine A., Brinkworth J.F., Missiakas D., Rouleau G.A., Steinrücken M., Pizarro-Cerdá J., Poinar H.N., Barreiro L.B. Evolution of immune genes is associated with the Black Death. *Nature*. 2022;611(7935):312-319. DOI 10.1038/s41586-022-05349-x.
- Kong A., Frigge M.L., Thorleifsson G., Stefansson H., Young A.I., Zink F., Jonsdottir G.A., Okbay A., Sulem P., Masson G., Gudbjartsson D.F., Helgason A., Bjornsdottir G., Thorsteinsdottir U., Stefansson K. Selection against variants in the genome associated with

- educational attainment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114(5): E727-E732. DOI 10.1073/pnas.1612113114.
- Kuijpers Y., Domínguez-Andrés J., Bakker O.B., Gupta M.K., Grasshoff M., Xu C.J., Joosten L.A.B., Bertranpetit J., Netea M.G., Li Y. Evolutionary trajectories of complex traits in European populations of modern humans. *Front. Genet.* 2022;13:833190. DOI 10.3389/fgene.2022.833190.
- Lewandowska M., Jędrychowska-Dańska K., Płoszaj T., Witas P., Zamerska A., Mańkowska-Pliszka H., Witas H.W. Searching for signals of recent natural selection in genes of the innate immune response – ancient DNA study. *Infect. Genet. Evol.* 2018;63:62-72. DOI 10.1016/j.meegid.2018.05.008.
- Marnetto D., Pankratov V., Mondal M., Montinaro F., Pärna K., Valini L., Molinaro L., Saag L., Loog L., Montagnese S., Costa R.; Estonian Biobank Research Team; Metspalu M., Eriksson A., Paganini L. Ancestral genomic contributions to complex traits in contemporary Europeans. *Curr. Biol.* 2022;32(6):1412-1419.e3. DOI 10.1016/j.cub.2022.01.046.
- Mathieson I., Terhorst J. Direct detection of natural selection in Bronze Age Britain. *Genome Res.* 2022;32(11-12):2057-2067. DOI 10.1101/gr.276862.122.
- Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N., Mallick S., Patterson N., Roodenberg S.A., Harney E., Stewardson K., Fernandes D., Novak M., Sirak K., Gamba C., Jones E.R., Llamas B., Dryomov S., Pickrell J., Arsuaga J.L., de Castro J.M., Carbonell E., Gerritsen F., Khokhlov A., Kuznetsov P., Lozano M., Meller H., Mochalov O., Moiseyev V., Guerra M.A., Roodenberg J., Vergès J.M., Krause J., Cooper A., Alt K.W., Brown D., Anthony D., Lalueza-Fox C., Haak W., Pinhasi R., Reich D. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature.* 2015;528(7583):499-503. DOI 10.1038/nature16152.
- Mathieson I., Day F.R., Barban N., Tropf F.C., Brazel D.M.; eQTLGen Consortium; BIOS Consortium; Vaez A., van Zuydam N., Bitarello B.D., ... Zhao W., Zhao Y., Snieder H., den Hoed M., Ong K.K., Mills M.C., Perry J.R.B. Genome-wide analysis identifies genetic effects on reproductive success and ongoing natural selection at the FADS locus. *Nat. Hum. Behav.* 2023;7(5):790-801. DOI 10.1038/s41562-023-01528-6.
- Mikhailova S.V., Ivanoshchuk D.E., Yushkevich E.A., Bairqdar A., Anisimenko M.S., Shcherbakova L.V., Denisova D.V., Orlov P.S. Prevalence of common alleles of some stress resilience genes among adolescents born in different periods relative to the socioeconomic crisis of the 1990s in Russia. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022;45(1):51-65. DOI 10.3390/cimb45010004.
- Mills M.C., Mathieson I. The challenge of detecting recent natural selection in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022; 119(15):e2203237119. DOI 10.1073/pnas.2203237119.
- Mitteroecker P., Huttegger S.M., Fischer B., Pavlicev M. Cliff-edge model of obstetric selection in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(51):14680-14685. DOI 10.1073/pnas.1612410113.
- Palamara P.F., Terhorst J., Song Y.S., Price A.L. High-throughput inference of pairwise coalescence times identifies signals of selection and enriched disease heritability. *Nat. Genet.* 2018;50(9):1311-1317. DOI 10.1038/s41588-018-0177-x.
- Pankratov V., Yunusbaeva M., Ryakhovsky S., Zarodniuk M.; Estonian Biobank Research Team; Yunusbayev B. Prioritizing autoimmunity risk variants for functional analyses by fine-mapping mutations under natural selection. *Nat. Commun.* 2022;13(1):7069. DOI 10.1038/s41467-022-34461-9.
- Raj T., Kuchroo M., Replogle J.M., Raychaudhuri S., Stranger B.E., De Jager P.L. Common risk alleles for inflammatory diseases are targets of recent positive selection. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;92(4): 517-529. DOI 10.1016/j.ajhg.2013.03.001.
- Reeve C.L., Heeney M.D., Woodley of Menie M.A. A systematic review of the state of literature relating parental general cognitive ability and number of offspring. *Pers. Individ. Differ.* 2018;134:107-118. DOI 10.1016/j.paid.2018.05.036.
- Saklayen M.G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018;20(2):12. DOI 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Sanjak J.S., Sidorenko J., Robinson M.R., Thornton K.R., Visscher P.M. Evidence of directional and stabilizing selection in contemporary humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(1):151-156. DOI 10.1073/pnas.1707227114.
- Schork A.J., Peterson R.E., Dahl A., Cai N., Kendler K.S. Indirect paths from genetics to education. *Nat. Genet.* 2022;54(4):372-373. DOI 10.1038/s41588-021-00999-5.
- Sohail M., Maier R.M., Ganna A., Bloemendal A., Martin A.R., Turchin M.C., Chiang C.W., Hirschhorn J., Daly M.J., Patterson N., Neale B., Mathieson I., Reich D., Sunyaev S.R. Polygenic adaptation on height is overestimated due to uncorrected stratification in genome-wide association studies. *eLife.* 2019;8:e39702. DOI 10.7554/eLife.39702.
- Song W., Shi Y., Wang W., Pan W., Qian W., Yu S., Zhao M., Lin G.N. A selection pressure landscape for 870 human polygenic traits. *Nat. Hum. Behav.* 2021;5(12):1731-1743. DOI 10.1038/s41562-021-01231-4.
- Speidel L., Forest M., Shi S., Myers S.R. A method for genome-wide genealogy estimation for thousands of samples. *Nat. Genet.* 2019; 51(9):1321-1329. DOI 10.1038/s41588-019-0484-x.
- Suvorov A. Population numbers and reproductive health. *Endocrinology.* 2021;162(11):bqab154. DOI 10.1210/endo/bqab154.
- Testa M.R. On the positive correlation between education and fertility intentions in Europe: individual- and country-level evidence. *Adv. Life Course Res.* 2014;21:28-42. DOI 10.1016/j.alcr.2014.01.005.
- Tropf F.C., Stulp G., Barban N., Visscher P.M., Yang J., Snieder H., Mills M.C. Human fertility, molecular genetics, and natural selection in modern societies. *PLoS One.* 2015;10(6):e0126821. DOI 10.1371/journal.pone.0126821.
- Turner N., Robbins K. Association between county-level natality and income in the US, 2000–2020. *JAMA Pediatr.* 2023;177(2):198-202. DOI 10.1001/jamapediatrics.2022.4814.
- Wolf E., Sonenklar N., Schefft M., Haskell H., James J. Is there evidence of ADHD overdiagnosis in children? *Am. Fam. Physician.* 2023;107(3):292-296.
- Wu Y., Furuya S., Wang Z., Nobles J.E., Fletcher J.M., Lu Q. GWAS on birth year infant mortality rates provides evidence of recent natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022;119(12):e2117312119. DOI 10.1073/pnas.2117312119.
- Yasumizu Y., Sakaue S., Konuma T., Suzuki K., Matsuda K., Murakami Y., Kubo M., Palamara P.F., Kamatani Y., Okada Y. Genome-wide natural selection signatures are linked to genetic risk of modern phenotypes in the Japanese population. *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(5):1306-1316. DOI 10.1093/molbev/msaa005.
- Zeidan J., Fombonne E., Scora J., Ibrahim A., Durkin M.S., Saxena S., Yusuf A., Shih A., Elsabbagh M. Global prevalence of autism: a systematic review update. *Autism Res.* 2022;15(5):778-790. DOI 10.1002/aur.2696.

**ORCID ID**

S.V. Mikhailova orcid.org/0000-0002-0897-5473

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-28-00866.**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.04.2023. После доработки 03.07.2023. Принята к публикации 03.07.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Исследование сообществ макробеспозвоночных животных в бухте Большие Коты озера Байкал с использованием ДНК метабаркодинга

Л.С. Кравцова<sup>1</sup>✉, Т.Е. Перетолчина<sup>1</sup>, Т.И. Трибой<sup>1</sup>, И.А. Небесных<sup>1</sup>, А.Е. Тупикин<sup>2</sup>, М.Р. Кабилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ lk@lin.irk.ru

**Аннотация.** Приводятся сведения о разнообразии макробеспозвоночных животных, структуре их сообществ в бухте Большие Коты оз. Байкал, полученные методом ДНК метабаркодинга на основе NGS-технологии (Illumina, MiSeq). Для ДНК метабаркодинга макробеспозвоночных был использован внутренний праймер *mCOLintF* в комбинации с *jhHCO2198* для амплификации фолмеровского фрагмента гена *COI*. Всего получено 118009 прочтений фрагмента гена *COI* (длиной не менее 313 п.н.). Показано, что количество прочтений может служить опосредованной характеристикой обилия вида (операционной таксономической единицы – ОТЕ). Корреляция количества прочтений с численностью макробеспозвоночных в пробах до экстракции ДНК по коэффициенту Спирмена составляет 0.6 ( $p < 0.05$ ). Выявлено 115 ОТЕ, принадлежащих высшим таксонам макробеспозвоночных животных: Porifera – 1, Platyhelminthes – 3, Annelida – 38, Arthropoda – 55, Mollusca – 18. На видовом уровне (при гомологии с референсными последовательностями GenBank  $\geq 95\%$  и покрытии не менее 90%) зарегистрировано 46 таксонов макробеспозвоночных, формирующих три сообщества: одно – с доминированием моллюсков *Choanomphalus* conf. *maacki* и два – с доминированием хирономид *Orthocladius gregarius* Linev., *Sergentia baicalensis* Tshern. Сообщества характеризуются невысоким видовым разнообразием по Шеннону (от 0.7 до 1.2 бит), высокой концентрацией доминирования по Симпсону (от 0.5 до 0.7) и низкой выравненностью по Пиелу (от 0.3 до 0.4). На долю доминантов и субдоминантов в сообществах приходится от 91 до 96% прочтений фрагмента гена *COI*. На пространственное распределение доминирующих видов сообществ влияют геоморфологические особенности дна в исследуемом районе и состав донных отложений. Предложенный подход для изучения структуры сообществ макробеспозвоночных на основе ДНК метабаркодинга может быть рекомендован для экспресс-оценки состояния водных экосистем при мониторинге.  
Ключевые слова: сообщества макробеспозвоночных; разнообразие; ДНК метабаркодинг; *COI*; высокопроизводительное секвенирование; Байкал.

**Для цитирования:** Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Трибой Т.И., Небесных И.А., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р. Исследование сообществ макробеспозвоночных животных в бухте Большие Коты озера Байкал с использованием ДНК метабаркодинга. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):694-702. DOI 10.18699/VJGB-23-80

## A study of macroinvertebrate communities in Bolshiye Koty Bay of Lake Baikal using DNA metabarcoding

L.S. Kravtsova<sup>1</sup>✉, T.E. Peretolchina<sup>1</sup>, T.I. Triboy<sup>1</sup>, I.A. Nebesnykh<sup>1</sup>, A.E. Tupikin<sup>2</sup>, M.R. Kabilov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ lk@lin.irk.ru

**Abstract.** The diversity of macroinvertebrates, the structure of their communities in Bolshiye Koty Bay (Lake Baikal) was studied by a DNA metabarcoding approach using an Illumina MiSeq system. Internal primer *mCOLintF* in combination with *jhHCO2198* of the Folmer fragment of the *COI* gene were used for macroinvertebrate metabarcoding. A total of 118009 reads of the *COI* gene fragment (at least 313 bp in length) were obtained. The correlation of the Spearman coefficient ( $S = 0.6$ ,  $p < 0.05$ ) with the abundance of macroinvertebrates in the samples before DNA extraction showed that the number of reads can serve as an indirect characteristic of the abundance of a species (operational taxonomic unit, OTU). 115 OTUs belonging to the higher taxa of macroinvertebrates were identified: Porifera, 1; Platyhelminthes, 3; Annelida, 38; Arthropoda, 55; Mollusca, 18. At a high level of resolution (with homology with GenBank reference sequences  $\geq 95\%$ , coverage  $\geq 90\%$ ), 46 taxa of macroinvertebrates comprising three communities were registered: one dominated by molluscs (*Choanomphalus* conf. *maacki*) and two dominated by chironomids (*Orthocladius gregarius* Linev., *Sergentia baicalensis* Tshern.). Communities are characterized by low species diversity according to Shannon (from 0.7 to 1.2 bits), high concentration of dominance according to Simpson (from 0.5 to 0.7) and low

evenness according to Pielou (from 0.3 to 0.4). Dominants and subdominants in the communities account for 91 to 96 % of *COI* gene fragment reads. The spatial distribution of the dominant species identified in the communities is influenced by the geomorphological features of the bottom and the composition of sediments in the area studied. The approach proposed for studying the structure of macroinvertebrate communities based on DNA metabarcoding and next generation sequencing can be recommended for express assessment of the state of aquatic ecosystems in the monitoring.

Key words: communities of macroinvertebrates; diversity; DNA metabarcoding; *COI*; high-throughput sequencing technologies; Lake Baikal.

**For citation:** Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Nebesnykh I.A., Tupikin A.E., Kabilov M.R. A study of macroinvertebrate communities in Bolshiye Koty Bay of Lake Baikal using DNA metabarcoding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):694-702. DOI 10.18699/VJGB-23-80

## Введение

Структура сообществ водных организмов, в частности макробеспозвоночных, служит одним из показателей, характеризующих состояние водоемов. Исследования в этом направлении актуальны в связи с глобальным изменением климата и возрастающим антропогенным воздействием на водные экосистемы (O'Reilly et al., 2003; Bonada et al., 2007; Burgmer et al., 2007; Moss et al., 2011; Hampton et al., 2018).

Сообщества организмов представляют собой совокупность популяций разных видов, сосуществующих в пространстве и времени (Бигон и др., 1989). Структура их формируется под влиянием как абиотических факторов среды (Brauns et al., 2007; McGoff et al., 2013; Rezende et al., 2014; Worrall et al., 2014), так и биотических взаимодействий (van den Berg et al., 1997; Arbačiauskas et al., 2008; Nalera et al., 2009). Базовыми характеристиками структуры сообществ, как правило, являются видовое разнообразие и обилие организмов. Исследование разнообразия организмов на высоком уровне разрешения – видовом, обычно проводится с привлечением большого числа специалистов-морфологов и сопряжено с трудоемким процессом идентификации таксонов. В настоящее время альтернативой классическим методам изучения таксономического разнообразия водных экосистем служат молекулярно-генетические – ДНК метабаркодинг с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования. Этот метод широко применяется для оценки разнообразия как морской, так и пресноводной фауны (Porazinska et al., 2009; Hajibabaei et al., 2011; Aylagas et al., 2014; Elbrecht et al., 2017; Haenel et al., 2017; Kuntke et al., 2020).

В начале 2000-х гг. митохондриальный ген *COI* был принят в качестве стандарта для ДНК баркодинга таксонов животных (Hebert et al., 2003) благодаря широкому применению универсальных праймеров (*LCOI490* и *HCO2198*) для амплификации фрагмента *M1–M6* (Folmer et al., 1994). Тем не менее в отдельных случаях для получения более четкого филогенетического сигнала используют другие переменные участки гена *COI*, например регион *I3–M11* у морских нематод (Derycke et al., 2010). Спустя некоторое время при учете разнообразия Metazoa в водных экосистемах стал популярен мини-баркод фолмеровского фрагмента *COI* с праймерами *mlCOIintF* и *jhHCO2198* (Meusnier et al., 2008; Leray et al., 2013), который оказался также приемлемым для изучения фауны

донных беспозвоночных в Лиственничном заливе озера Байкал (Кравцова и др., 2021).

В последнее десятилетие возрос интерес к использованию ДНК, выделенной из окружающей среды (eDNA), для экспресс-оценки разнообразия населения водной толщи и донных отложений (Yu et al., 2012; Lacoursière-Roussel et al., 2018). Преимущество этого метода заключается в быстром получении результата, так как не требуется предварительной изоляции каких-либо организмов из небольшого объема проб. Однако для исследования разнообразия Metazoa в водоемах он оказался менее эффективным. Показано, что метабаркодирование ДНК тканей беспозвоночных дает более точное представление о локальном разнообразии многоклеточных организмов (99 % прочтений), чем ДНК из окружающей среды (всего 12 %) (Gleason et al., 2021). В настоящей работе мы попытались выяснить возможность применения метода метабаркодинга ДНК из ткани организмов для оценки не только разнообразия макробеспозвоночных животных, но и количественного соотношения видов, формирующих сообщества.

Цель работы – охарактеризовать особенности структурной организации сообществ макробеспозвоночных животных, распространенных в прибрежной зоне открытого Байкала, с использованием ДНК метабаркодинга.

## Материалы и методы

Количественные пробы зообентоса были собраны в июле 2019 г. в бухте Большие Коты оз. Байкал на участке протяженностью 1 км вдоль береговой линии (рис. 1).

На трех станциях (№ 1–3) сбор макробеспозвоночных проводили с разных типов донных отложений (см. рис. 1). К первому типу донных отложений относили крупную и мелкую гальку с отдельными валунами, расположенными в субаквальной части пляжа (глубины 0.3–0.4 м). Второй тип донных отложений был представлен валунами, неокатанными обломками пород с щебнем, а третий – заиленным песком. Два последних типа отложений встречались преимущественно на мелководной террасе на глубинах 2–5 м (см. рис. 1). На пляже пробы отбирали вручную, а на мелководной террасе – с помощью водолазов. Для каждого типа донных отложений было собрано по пять количественных проб зообентоса с использованием учетной рамки площадью 0.1 м<sup>2</sup>. Беспозвоночных животных с поверхности камней счищали щеткой в кювету с водой, а из песка разной степени заиленности их извлекали путем флотации в насыщенном растворе сахара с удельным ве-

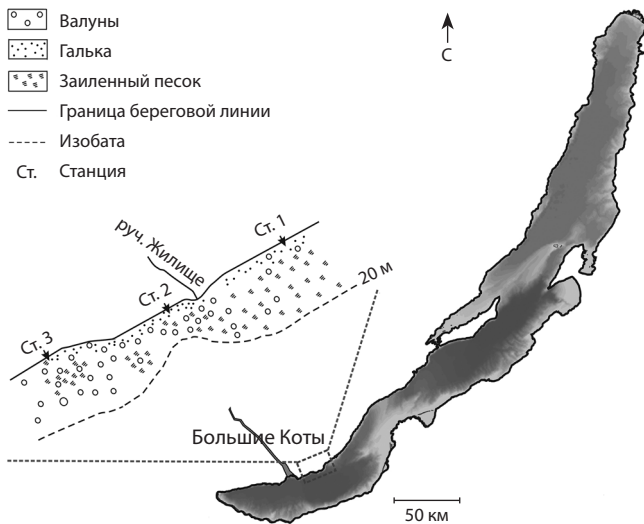


Рис. 1. Карта-схема отбора проб макрозообентоса в бухте Большие Коты оз. Байкал, июль 2019 г.

сом 1.12 г/л. Пробы промывали через сачок из мельничного сита № 23 и фиксировали 96 % этанолом. Всего собрано и разобрано в лабораторных условиях под микроскопом МБС-10 (при 20-кратном увеличении) 15 количественных проб зообентоса.

Согласно (Elbrecht et al., 2017), предварительная сортировка организмов по размерам существенно улучшает результат секвенирования всех таксонов независимо от биомассы организма. Поскольку зообентос в Байкале представлен разными размерными группами: мега-, макро-, мейоорганизмами, то в этой работе мы ограничились лишь одной размерной группой – макробеспозвоночными животными. Размеры их в пробах варьировали от 2 до 50 мм. Для выделения ДНК использовали всех макробеспозвоночных, найденных в пробе. Сначала их вымачивали в течение 1 ч в дистиллированной воде, мелкие организмы (2–3 мм) брали целиком, а от крупных особей (более 5 мм) отрезали кусочки ткани по 2–3 мм, чтобы нивелировать разброс биомассы по размеру. Затем кусочки ткани и небольшие организмы, собранные с одного и того же типа донных отложений, объединяли в одну пробу, помещали в фарфоровую чашку и растирали пестиком с добавлением 2 % раствора СТАВ. ДНК экстрагировали по модифицированной методике (Doyle, Dickson, 1987), используя хлороформ вместо фенол-хлороформ-изоамиловой смеси. Всего для метабаркодинга было подготовлено три пробы геномной ДНК (не менее 20 нг в каждой) беспозвоночных животных.

Для получения ампликонов гена *COI* использовали праймеры *mICOIintF*: GGWACWGGWGTGAACWGTWTAUCCYCC (Leray et al., 2013) и *tgHCO2198*: TAIAC YTCIGRTGICRAARAAYCA (Geller et al., 2013), где I – инозин. Амплификацию выполняли в объеме 20 мкл, содержащем 0.2 мМ каждого dNTP, 0.5 мкМ каждого праймера, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мкМ SYTO9, 10 нг ДНК, 25 ед./мл полимеразы Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Литва). ПЦР в режиме реального времени про-

водили на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR system (Bio-Rad, США) по программе: первоначальная денатурация 95 °С – 4 мин; 32 цикла при 95 °С – 30 с, 48 °С – 30 с и 72 °С – 30 с. Температура отжига праймеров подобрана с помощью ПЦР с градиентом. Продукты ПЦР анализировали на системе MCE-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System с использованием набора DNA 12000 Reagent Kit (Shimadzu, Япония). Выделенные ампликоны квантифицировали на флуориметре Qubit 2.0 с набором реактивов Qubit DNA High Sensitivity Assay Kits (Invitrogen, США). ДНК-библиотеки из ампликонов получали с использованием наборов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina и двусторонних баркодов NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) (NEB, Великобритания). Квантификацию библиотек проводили при помощи набора Kapa SYBR Fast Universal qPCR Kit (KapaBiosystems, США). Секвенирование библиотек осуществляли с набором MiSeq Reagent Standard Kit v3 PE300 на MiSeq (Illumina, США) на базе ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН).

Парные прочтения анализировали с помощью UPARSE скриптов (Edgar, 2013), используя Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010). Биоинформатическая обработка включала перекрытие парных прочтений, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер, а также получение ОТЕ (операционной таксономической единицы). Таксономическую принадлежность последовательностей ОТЕ определяли с использованием алгоритмов SINTAX (Edgar, 2016) и референсной базы MIDORI\_UNIQUE\_20180221\_COI\_SINTAX (Machida et al., 2017), а также BLAST. Репрезентативность выборок ОТЕ анализировали в iNEXT 2.0.15 (Hsieh et al., 2016). Нуклеотидные последовательности выявленных ОТЕ были протестированы на наличие стоп-кодонов в программе SeqKit v0.16.1 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>).

Для оценки связи между исходной численностью организмов высших таксонов в пробах (до экстракции ДНК) и количеством прочтений фрагмента гена *COI* рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (S).

Сообщества макробеспозвоночных животных выделяли путем кластеризации ОТЕ видового ранга и принадлежащих на них прочтений фрагмента гена *COI* методом Варда, в качестве меры расстояния использовали евклидову метрику. Доминантов и субдоминантов в сообществах определяли путем ранжирования по убыванию модифицированного (встречаемость ОТЕ в пробах и их относительное обилие = прочтения, %) индекса плотности (Броцкая, Зенкевич, 1939; Константинов, 1986). Сообщества макробеспозвоночных называли по доминирующим видам, имеющим максимальный индекс плотности  $\geq 10\%$ . Виды с индексом плотности  $\leq 10\%$  считали второстепенными. Для характеристики степени сложности структуры сообществ использовали индексы разнообразия Шеннона (H, бит), доминирования по Симпсону (D) и выравненности по Пиелу (e) (Одум, 1986).

Пространственное распределение доминантов и субдоминантов сообществ в бухте Большие Коты анализировали методом главных компонент, где в качестве пе-



ременных служили показатели относительного обилия ОТЕ, состав донных отложений. Данные для расчетов с использованием многомерной статистики предварительно были трансформированы по функции  $\log(X+1)$ . Расчеты проводили в статистической среде программирования R 3.0.0, пакет *vegan* 2.0-7.

## Результаты

В результате высокопроизводительного секвенирования всего получено 118009 прочтений фрагмента гена *COI* (длиной не менее 313 п. н.). Биоинформатический анализ показал, что доля неклассифицированных последовательностей *COI* составила менее 1 % от общего числа (1157). 116852 прочтения приходятся на 115 ОТЕ, относящихся к высшим таксонам макробеспозвоночных животных: Porifera – 1, Platyhelminthes – 3, Annelida – 38, Arthropoda – 55, Mollusca – 18.

Коэффициент корреляции Спирмена (*S*) между численностью макробеспозвоночных высших таксонов (Platyhelminthes, Hirudinea, Polychaeta, Oligochaeta, Isopoda, Amphipoda, Trichoptera, Chironomidae, Bivalvia, Gastropoda), найденных в пробах до экстракции ДНК, и числом прочтений фрагмента гена *COI* составляет 0.6 ( $p < 0.05$ ), что позволяет принять показатели последних за эквивалент относительного обилия организмов.

Идентифицировано 46 таксонов видового и родового ранга при гомологии с последовательностями из GenBank

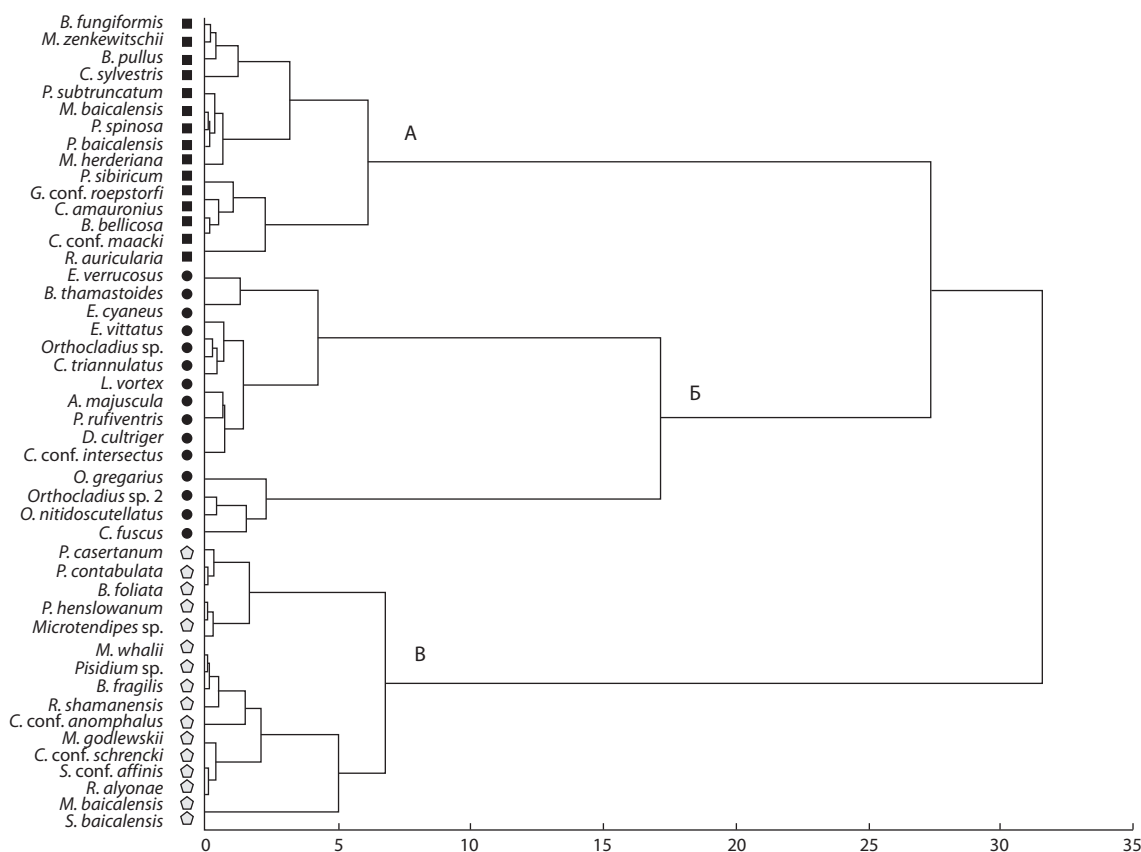
$\geq 98$  % и  $\geq 95$  % соответственно, с покрытием не менее 90 % (табл. 1). На них приходится 88 % прочтений фрагмента гена *COI*.

В районе исследования выявлено три сообщества макробеспозвоночных, из них одно – с доминированием моллюсков *Choanomphalus* conf. *maacki* (А), два – с доминированием хирономид *Orthocladius gregarius* Linev. (Б) и *Sergentia baicalensis* Tshern. (В) (рис. 2).

Сообщества характеризуются несложной структурой, в их составе отмечено 15–16 видов (табл. 2). Показатели индекса Шеннона невысоки, колеблются от 0.7 до 1.2 бит. При этом в сообществах наблюдается высокая концентрация доминирования одного вида (*D* варьирует от 0.5 до 0.7) и низкая выравненность (от 0.3 до 0.4).

В сообществе *C.* conf. *maacki* среди субдоминантов встречаются моллюски *Pseudancylastrum sibiricum* (Gerstf.), *Gerstfeldtancylus* conf. *roepstorfi*. В составе сообщества *O. gregarius* к субдоминантам относятся ручейники *Baicalina thamastoides* Mart., хирономиды *Orthocladius* sp. 2, *O. nitidoscutellatus* Lundstr., *Cricotopus fuscus* (Kieff.). В сообществе с доминированием *S. baicalensis* многочисленны полихеты *Manayunkia godlewskii* (Nusb.), моллюски *Choanomphalus* conf. *anomphalus*. На долю доминантов и субдоминантов в сообществах приходится от 91 до 96 % прочтений фрагмента гена *COI*.

Пространственное распределение доминирующих видов сообществ макробеспозвоночных в зависимости от



**Рис. 2.** Дендрограмма ОТЕ макробеспозвоночных животных, построенная методом кластеризации Варда с использованием евклидовой метрики в качестве меры расстояния.

Кластеры А, Б, В – сообщества макробеспозвоночных, выделенные на основе прочтений фрагмента гена *COI*.

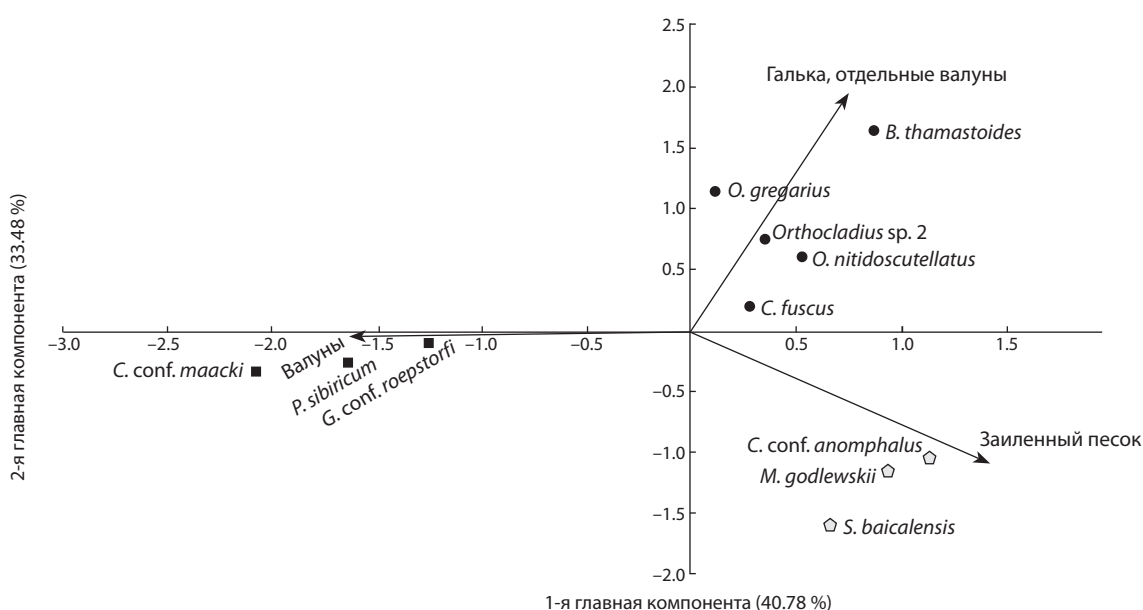
**Таблица 1.** Состав ОТЕ, имеющих сходство с референсными последовательностями GenBank  $\geq 95\%$

Таксон	Вид	Номер референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательностью из GenBank, %
Porifera	<i>Baikalospongia fungiformis</i> Mak.	MH985288	99.7
Polychaeta/Fabriciidae	<i>Manayunkia baicalensis</i> (Nusb.)	MK393734	97.6
	<i>Manayunkia godlewskii</i> (Nusb.)	MK393737	99.3
	<i>Manayunkia zenkewitschii</i> Sit., Shcherb. et Kharch.	KF289863	99.2
Oligochaeta	<i>Rhynchelmis alyonae</i> Mart., Ferrag. et Kayg.	GU328670	98.3
	<i>Rhynchelmis</i> sp.	AJ577632	95.0
Amphipoda	<i>Baikalogammarus pullus</i> (Dyb.)	FJ756303	99.7
	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i> (Dyb.)	MK887720	99.7
	<i>Eulimnogammarus verrucosus</i> (Gerstf.)	MK887569	100.0
	<i>Eulimnogammarus vittatus</i> (Dyb.)	MK887750	99.7
	<i>Linevichella vortex</i> (Dyb.)	MN148355	99.7
	<i>Micruropus whalii</i> (Dyb.)	MN148354	99.7
Diptera/Chironomidae	<i>Microtendipes</i> sp.	LC329125	95.0
	<i>Paratanytarsus baicalensis</i> (Tshern.)	MT020734	99.3
	<i>Sergentia baicalensis</i> Tshern.	AF116586	99.0
	<i>Sergentia</i> conf. <i>affinis</i>	AF116588	96.5
	<i>Cricotopus fuscus</i> (Kieff.)	MN673037	98.6
	<i>Cricotopus</i> conf. <i>intersectus</i>	MN683031	96.9
	<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabr.)	KC250789	100.0
	<i>Cricotopus triannulatus</i> (Macq.)	KJ439943	99.6
	<i>Diplocladius cultriger</i> Kieff.	HQ941599	98.6
	<i>Orthocladius gregarius</i> Linev.	KC879234	100.0
	<i>Orthocladius nitidoscutellatus</i> Lundstr.	MT048130	98.6
	<i>Orthocladius</i> sp.	KT248920	100.0
	<i>Orthocladius</i> sp. 2	KT248920	100.0
	<i>Paratrichocladius rufiventris</i> (Meig.)	HQ941597	99.3
Trichoptera	<i>Apatania majuscula</i> MacLach.	KX103052	99.3
	<i>Baicalina bellicosa</i> Mart.	KR153132	99.7
	<i>Baicalina thamastoides</i> Mart.	KR153144	99.6
	<i>Baicalinella foliata</i> (Mart.)	KR153101	99.7
	<i>Protobaicalina spinosa</i> (Mart.)	KR153124	98.9
Mollusca/Bivalvia	<i>Pisidium casertanum</i> (Poli)	KF483386	99.6
	<i>Pisidium henslowanum</i> (Shepp.)	KF483398	98.9
	<i>Pisidium</i> sp.	KF000182	99.3
	<i>Pisidium</i> sp. 1	KF483372	95.0
Mollusca/Gastropoda	<i>Benedictia fragilis</i> W. Dyb.	KX241839	99.3
	<i>Choanomphalus amauronius</i> Bourg.	Y14721	98.0
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>anomphalus</i>	Y14714	95.4
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>maacki</i>	LC429414	95.3
	<i>Choanomphalus</i> conf. <i>schrencki</i>	Y14713	96.1
	<i>Gerstfeldtiancylus</i> conf. <i>roepstorfi</i>	KR822550	96.2
	<i>Maackia herderiana</i> (Lindh.)	KY697388	99.7
	<i>Megalovalvata baicalensis</i> (Gerstf.)	LC377798	99.7
	<i>Pseudancylastrum sibiricum</i> (Gerstf.)	KR822557	100.0
	<i>Pseudobaikalia contabulata</i> (W. Dyb.)	Z92987	99.7
	<i>Radix auricularia</i> (Linn.)	MH190039	100.0

**Таблица 2.** Структурные параметры сообществ макробеспозвоночных животных, выявленных в бухте Большие Коты оз. Байкал, июль 2019 г.

Сообщество	Число видов	Доля прочтений доминантов, %	H, бит	D	e	Количество прочтений на сообщество
<i>Orthocladius gregarius</i>	15	96	1.20	0.45	0.44	39941
<i>Choanomphalus conf. maacki</i>	15	93	0.74	0.70	0.28	32573
<i>Sergentia baicalensis</i>	16	91	0.70	0.74	0.25	30118

Примечание. H – видовое разнообразие по Шеннону; D – индекс доминирования по Симпсону; e – индекс выравненности по Пиелу.



**Рис. 3.** Распределение доминирующих видов (ОТЕ) сообществ макробеспозвоночных (А–В) в пространстве двух первых главных компонент, учитывающих 74 % вариабельности массива данных относительного обилия.

факторов среды показано на рис. 3. Первая главная компонента характеризует распространение сообществ в зависимости от состава донных отложений. Доминирующие виды сообществ макробеспозвоночных, встречающиеся на мелкообломочном материале (гальке, заиленном песке), имеют положительные нагрузки на первую главную компоненту, а на грубообломочном (валунах, обломках пород) – отрицательные. Вторая главная компонента характеризует распределение доминантов исследованных сообществ макробеспозвоночных в зависимости от геоморфологии дна. Виды, встречающиеся в зоне пляжа, имеют положительные нагрузки, а на мелководной террасе – отрицательные.

### Обсуждение

Исследования Р. Бэйли с коллегами (Bailey et al., 2001) указывают на эффективность мониторинговых наблюдений за состоянием водоемов при использовании таксономии на уровне рода или вида. Метабаркодинг как современный генетический инструмент широко применяется для экспресс-оценки биоразнообразия в экосистемах (Elbrecht, Leese, 2015). Авторы работы рекомендуют использовать метрику «присутствие/отсутствие» для харак-

теристики разнообразия, так как высокая разрешающая способность праймеров позволяет учесть массовые и минорные виды. Однако этот подход не дает возможности измерить абсолютные значения численности или биомассы организмов в пробах, тогда как для изучения структуры сообществ необходимы показатели, характеризующие не только состав таксонов, но и их количественное соотношение. Количество прочтений, по всей видимости, можно отнести к опосредованной характеристике обилия вида (ОТЕ). Это подтверждает наличие положительной корреляции между численностью макробеспозвоночных до экстракции ДНК и представленностью ОТЕ не только в пробах, собранных в оз. Байкал в бухте Большие Коты ( $S = 0.6, p < 0.05$ ), но и в Лиственничном заливе ( $S = 0.5$ ) (Кравцова и др., 2021). Кроме того, отмечена положительная корреляция количества прочтений с биомассой организмов, собранных в прудах Германии (Elbrecht, Leese, 2015). Поэтому при анализе структуры сообществ макробеспозвоночных акцент был сделан на количестве прочтений, приходящихся на ОТЕ, а также на встречаемости ОТЕ в пробах. Чтобы понять, насколько молекулярно-генетический метод и NGS-технология эффективны в исследованиях сообществ макробеспозвоночных, для

сравнения был использован тот же подход, что и при изучении экологии водоемов на основе классических гидробиологических методов (Броцкая, Зенкевич, 1939; Константинов, 1986; Бигон и др., 1989).

Фауна макробеспозвоночных животных на мелководной террасе и в подводной части пляжа в бухте Большие Коты (без учета населения подводного склона и каньона) довольно разнообразна. В 1988 г. в ее составе было отмечено не менее 177 видов (Кравцова и др., 2003). Большинство видов, найденных с помощью ДНК метабаркодирования в 2019 г., встречались здесь ранее, но в целом разнообразие донной фауны (см. табл. 1), выявленное с помощью молекулярно-генетических методов, ниже. Это можно объяснить, с одной стороны, меньшим объемом собранных количественных проб макрозообентоса, а с другой – отсутствием в GenBank последовательностей *COI* богатых видами байкальских групп, например олигохет. В Байкале отмечено 202 вида олигохет, среди них 165 – эндемики (Семерной, 2004). Возможно, представленность в GenBank последовательностей *COI* этой группы беспозвоночных невелика в связи со слабой изученностью фауны из-за высокого ее эндемизма. Всего на Annelida приходится около 30 % от общего количества ОТЕ, идентифицированных с помощью ДНК метабаркодирования как из бухты Большие Коты, так и из Лиственничного залива оз. Байкал (Кравцова и др., 2021).

Небогатые видами многощетинковые черви Polychaeta также входят в состав Annelida, но ранее они не были указаны в списке таксонов из бухты Большие Коты (Кравцова и др., 2003), так как определение их по морфологии не проводилось. Тем не менее с помощью ДНК метабаркодирования в 2019 г. в составе фауны здесь были найдены с высокой гомологией (98–99 %) с последовательностями из GenBank (см. табл. 1) все три вида полихет, встречающиеся в Байкале (Пудовкина и др., 2014): *Manayunkia baicalensis* (Nusb.), *M. godlewskii*, *M. zenkewitschii* Sit., Shcherb. et Kharch.

Хирономиды (Diptera) относятся к объектам, у которых идентифицировать виды по морфологическим признакам личинок крайне сложно, часто их определяют до группы видов (gr.) или species (sp.). Не исключено, что *O. gregarius* – доминант одного из трех выявленных в 2019 г. сообществ, ранее значился в списке таксонов из бухты Большие Коты как *O. gr. thienemanni*, а субдоминант *O. nitidoscutellatus* был в составе *O. gr. olivaceus* (Кравцова и др., 2003). Хотя эти виды и встречались в бухте Большие Коты в 1988 г., они не играли сообществообразующую роль среди других макробеспозвоночных (Kravtsova et al., 2004). Виды *O. gregarius* и *O. nitidoscutellatus*, как показали дальнейшие молекулярно-генетические исследования (Kravtsova et al., 2014), имеют длительную эволюционную историю, и их существование в Байкале не вызывает сомнения (Макаренко Е.А., Макаренко М.А., 2008).

Невысокое разнообразие ОТЕ видового ранга свидетельствует о том, что сообщества макробеспозвоночных с доминированием *C. conf. maacki*, *O. gregarius* и *S. baicalensis* в бухте Большие Коты характеризуются несложной структурой (см. табл. 2) в связи с указанными выше причинами.

Известно, что абиотические факторы среды играют важную роль в распространении и формировании разнообразия сообществ макробеспозвоночных (Rezende et al., 2014). Пространственное распределение доминантов и субдоминантов сообществ макробеспозвоночных из бухты Большие Коты согласуется с особенностями распространения этих видов в прибрежной зоне Байкала. Так, сообщество с доминированием *C. conf. maacki* приурочено, как и ранее, к каменистым донным отложениям мелководной террасы. Сообщество *O. gregarius* распространено на гальке с отдельными валунами в зоне пляжа, а с доминированием *S. baicalensis* – на заиленных песках мелководной террасы, характерном биотопе для этого вида. В Байкале представители рода *Orthocladius* предпочитают селиться в гидродинамически активной зоне волнового перемешивания и водного потока, а *Sergentia* – в условиях, где седиментационные процессы преобладают над размывом и переносом терригенного материала, органического вещества.

Исследование структуры сообществ макробеспозвоночных в водных экосистемах с использованием ДНК метабаркодирования имеет свои особенности, в отличие от экспресс-оценки разнообразия фауны (на основе метрики «присутствие/отсутствие»). В первую очередь необходимо обратить внимание на степень изученности разнообразия донной фауны водоема, размерные группы ее представителей. Немаловажное значение для оценки разнообразия имеет наличие последовательностей изучаемого фрагмента гена в базе данных GenBank и др. Для получения адекватной характеристики относительного обилия (прочтений фрагмента гена *COI*) организмов в сообществе отбор количественных проб макрозообентоса должен производиться с определенной площади с учетом биотопической неоднородности дна. Во избежание влияния размеров тела организмов на количество прочтений, входящих на ОТЕ, при подготовке проб для выделения ДНК необходимо отбирать одинаковые по величине кусочки ткани от всех особей, найденных в количественных пробах. Это дает возможность получить интегральную характеристику относительного обилия организма (количество прочтений), учитывающую его нивелированную по разбросу (из-за размеров тела) биомассу, а также численность. Поскольку макробеспозвоночные животные составляют третью часть от представителей уникальной фауны Байкала (2565 видов и подвидов (Timoshkin, 1997)), то для объективной оценки  $\alpha$ -разнообразия требуется создание более полной базы данных референсных последовательностей *COI*.

## Закключение

ДНК метабаркодирование с комбинацией праймеров *mICOIntF* и *jcHCO2198* для амплификации фрагмента гена *COI* показал свою эффективность в исследованиях разнообразия и структуры сообществ байкальских макробеспозвоночных. В составе фауны бухты Большие Коты найдены типичные представители большинства групп макробеспозвоночных, населяющие прибрежную зону озера Байкал. Показано, что количество прочтений как характеристика относительного обилия таксонов может быть рекомендо-

вано для анализа особенностей структурной организации сообществ макробеспозвоночных. В целом предложенный подход приемлем для оценки стабильности сообществ макробеспозвоночных во временном аспекте при мониторинге водных экосистем.

## Список литературы / References

Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. М.: Мир, 1989.

[Begon M., Harper J., Townsend K. Ecology: From Individuals to Ecosystems. Malden, MA: Blackwell Publishing, 1986. (Russ. ed.: Begon M., Harper J., Taunsend K. Ekologiya. Moscow: Mir Publ., 1989)]

Броцкая В.А., Зенкевич Л.А. Количественный учет донной фауны Баренцева моря. *Труды Всерос. науч.-исслед. ин-та рыб. хоз-ва и океанографии*. 1939;4:5-98.

[Brotskaya V.A., Zenkevich L.A. Quantitative accounting of the benthic fauna of the Barents Sea. *Proceedings of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography*. 1939;4:5-98. (in Russian)]

Константинов А.С. Общая гидробиология. М., 1986.

[Konstantinov A.S. General Hydrobiology. Moscow, 1986. (in Russian)]

Кравцова Л.С., Карабанов Е.Б., Камалтынов Р.М., Механикова И.В., Ситникова Т.Я., Рожкова Н.А., Слугина З.В., Ижболдина Л.А., Вейнберг И.В., Акиншина Т.В., Кривонов С.К., Щербаков Д.Ю. Макрозообентос субаквальных ландшафтов мелководной зоны Южного Байкала. 1. Локальное разнообразие донного населения и особенности его пространственного распределения. *Зоол. журн.* 2003;82(3):307-317.

[Kravtsova L.S., Karabanov E.B., Kamaltynov R.M., Mekhanikova I.V., Sitnikova T.Ya., Rozhkova N.A., Slugina Z.V., Izhboldina L.A., Weinberg I.V., Akinshina T.V., Krivonogov S.K., Shcherbakov D.Yu. Macrozoobenthos of subaqueous landscapes in the shoal of southern Lake Baikal: 1. Local diversity of bottom populations and features of their spatial distribution. *Zoologicheskii Zhurnal = Zoological Journal*. 2003;82(3):307-317. (in Russian)]

Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Трибой Т.И., Небесных И.А., Купчинский А.Б., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р. Исследование разнообразия гидробионтов Лиственничного залива озера Байкал с использованием ДНК-метабаркодинга. *Генетика*. 2021; 57(4):445-453. DOI 10.31857/S0016675821040056.

[Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Nebesnykh I.A., Kupchinskiy A.B., Tupikin A.E., Kabilov M.R. The study of the diversity of hydrobionts from Listvennichny Bay of Lake Baikal by DNA metabarcoding. *Russ. J. Genet.* 2021;57(4):460-467. DOI 10.1134/S1022795421040050.]

Макарченко Е.А., Макарченко М.А. Новые находки хирономид (Diptera, Chironomidae, Orthocladiinae) на Дальнем Востоке и сопредельных территориях. III. *Orthocladius van der Wulp*. *Евразийский энтомол. журн.* 2008;7(3):243-262.

[Makarchenko E.A., Makarchenko M.A. New findings of chironomids (Diptera, Chironomidae, Orthocladiinae) in Far East and bordering territories. III. *Orthocladius van der Wulp*. *Evroziatskii Entomologicheskii Zhurnal = Euroasian Entomological Journal*. 2008; 7(2):243-262. (in Russian)]

Одум Ю. Экология. М., 1986.

[Odum Yu. Basic Ecology. Philadelphia–New York–Chicago–San Francisco–Montreal–Toronto–London–Sydney–Tokyo–Mexico City–Rio de Janeiro–Madrid: Saunders College Publ., 1983. (Russ. ed.: Odum Yu. Ekologiya. Moscow, 1986)]

Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Матвеев А.Н., Щербаков Д.Ю. Родственные связи байкальских полихет рода *Manayunkia* [Polychaeta: Sedentaria: Sabellidae] по данным анализа CO1 с анализом истории расселения. *Экол. генетика*. 2014;12(3):32-42.

[Pudovkina T.A., Sitnikova T.Y., Matveyev A.N., Shcherbakov D.Y. Kindred relations of Baikal polychaete of the *Manayunkia* genus [Polychaeta: Sedentaria: Sabellidae] according to CO1 and settle-

ment history analysis. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(2):129-137. DOI 10.1134/S207905971602009X.]

Семерной В.П. Олигохеты озера Байкал. Новосибирск: Наука, 2004.

[Semernoy V.P. Oligochaeta of Lake Baikal. Novosibirsk: Nauka Publ., 2004. (in Russian)]

Arbačiauskas K., Semenchenko V., Grabovski M., Leuven R., Pounović M., Son M., Csanyi B., Gumuliauskaitė S., Konopacka A., Nehring S., van der Velde G., Vezhnovetz V., Panov V. Assessment of biocontamination of benthic macroinvertebrate communities in European inland waterways. *Aquat. Invasions*. 2008;3(2):211-230. DOI 10.3391/ai.2008.3.2.12.

Aylagas E., Borja A., Rodríguez-Ezpeleta N. Environmental status assessment using DNA metabarcoding: towards a genetics based marine biotic index (gAMBI). *PLoS One*. 2014;9(3):e90529. DOI 10.1371/journal.pone.0090529.

Bailey R.C., Norris R.H., Reynoldson T.B. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *J. North Am. Benthol. Soc.* 2001;20(2):280-286. DOI 10.2307/1468322.

Bonada N., Dolédec S., Statzner B. Taxonomic and biological trait differences of stream macroinvertebrate communities between mediterranean and temperate regions: implications for future climatic scenarios. *Glob. Chang. Biol.* 2007;13(8):1658-1671. DOI 10.1111/j.1365-2486.2007.01375.x.

Brauns M., Garcia X.-F., Pusch M.T., Walz N. Eulittoral macroinvertebrate communities of lowland lakes: discrimination among trophic states. *Freshw. Biol.* 2007;52(6):1022-1032. DOI 10.1111/j.1365-2427.2007.01.

Burgmer T., Hillebrand H., Pfenninger M. Effects of climate-driven temperature changes on the diversity of freshwater macroinvertebrates. *Oecologia*. 2007;151(1):93-103. DOI 10.1007/s00442-006-0542-9.

Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A., Backeljau T., Moens T. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS One*. 2010;5(10):e13716. DOI 10.1371/journal.pone.0013716.

Doyle J.J., Dickson E.E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 1987;36(4):715-722. DOI 10.2307/1221122.

Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2460-2461. DOI 10.1093/bioinformatics/btq461.

Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*. 2013;10(10):996-998. DOI 10.1038/nmeth.2604.

Edgar R.C. SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv*. 2016. DOI 10.1101/074161.

Elbrecht V., Leese F. Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass – sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130324. DOI 10.1371/journal.pone.0130324.

Elbrecht V., Vamos E.E., Meissner K., Aroviita J., Leese F. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods Ecol. Evol.* 2017;8(10):1265-1275. DOI 10.1111/2041-210X.12789.

Folmer O., Hoeh W.R., Black M.B., Vrijenhoek R.C. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994;3(5):294-299.

Geller J., Meyer C., Parker M., Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 2013;13(5):851-861. DOI 10.1111/1755-0998.12138.

Gleason J.E., Elbrecht V., Braukmann T.W.A., Hanner R.H., Cottenie K. Assessment of stream macroinvertebrate communities with eDNA is not congruent with tissue-based metabarcoding. *Mol. Ecol.* 2021;30(13):3239-3251. DOI 10.1111/mec.15597.

Haanel Q., Holovachov O., Jondelius U., Sundberg P., Bourlat S.J. NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal

- eukaryotes in shell sand from Hällö island, Smögen, and soft mud from Gullmar Fjord, Sweden. *Biodivers. Data J.* 2017;5:e12731. DOI 10.3897/BDJ.5.e12731.
- Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X., Singer G.A.C., Baird D.J. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One.* 2011; 6(4):e17497. DOI 10.1371/journal.pone.0017497.
- Hampton S.E., McGowan S., Ozersky T., Virdis S.G.P., Vu T.T., Spanbauer T.L., Kraemer B.M., Swann G., Mackay A.W., Powers S.M., Meyer M.F., Labou S.G., O'Reilly C.M., DiCarlo M., Galloway A.W.E., Fritz S.C. Recent ecological change in ancient lakes. *Limnol. Oceanogr.* 2018;63(5):2277-2304. DOI 10.1002/lno.10938.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 2003;270(1512): 313-321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hsieh T.C., Ma K.H., Chao A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.* 2016;7(12):1451-1456. DOI 10.1111/2041-210X.12613.
- Kravtsova L.S., Kamal'tynov R.M., Karabanov E.B., Mekhanikova I.V., Sitnikova T.Ya., Rozhkova N.F., Slugina Z.V., Izhboldina L.A., Weinberg I.V., Akinshina T.V., Sherbakov D.Yu. Macrozoobenthic communities of underwater landscapes in the shallow-water zone of southern Lake Baikal. *Hydrobiol.* 2004;522:193-205. DOI 10.1023/B:HYDR.0000029979.68265.3e.
- Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Sherbakov D.Y. The evolutionary history of two species of Orthocladinae (Diptera: Chironomidae) from Lake Baikal (Eastern Siberia). *Aquat. Insects.* 2014;36(3-4):171-185. DOI 10.1080/01650424.2015.1062111.
- Kuntke F., de Jonge N., Hesseløe M., Nielsen J.L. Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates. *Ecol. Indic.* 2020; 111:105982. DOI 10.1016/j.ecolind.2019.105982.
- Lacoursière-Roussel A., Howland K., Normandeau E., Grey E.K., Archambault P., Deiner K., Lodge D.M., Hernandez C., Leduc N., Bernatchez L. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecol. Evol.* 2018;8(16):7763-7777. DOI 10.1002/ece3.4213.
- Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P., Mills S.C., Agudelo N., Ranwez V., Boehm J.T., Machida R.J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zool.* 2013;10(1):34. DOI 10.1186/1742-9994-10-34.
- Machida R.J., Leray M., Ho S.-L., Knowlton N. Metazoan mitochondrial gene sequence reference datasets for taxonomic assignment of environmental samples. *Sci. Data.* 2017;4(1):170027. DOI 10.1038/sdata.2017.27.
- McGoff E., Aroviita J., Pilotto F., Miler O., Solimini A.G., Porst G., Jurca T., Donohue L., Sandin L. Assessing the relationship between the Lake Habitat Survey and littoral macroinvertebrate communities in European lakes. *Ecol. Indic.* 2013;25:205-214. DOI 10.1016/j.ecolind.2012.09.018.
- Meusnier I., Singer G.A.C., Landry J.-F., Hickey D.A., Hebert P.D.N., Hajibabaei M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics.* 2008;9(1):214. DOI 10.1186/1471-2164-9-214.
- Moss B., Kosten S., Meerhoff M., Battarbee R.W., Jeppesen E., Mazzeo N., Havens K., Lacerot G., Liu Z., de Meester L., Paerl H., Scheffer M. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters.* 2011;1(2):101-105. DOI 10.5268/IW-1.2.359.
- Nalepa T.F., Fanslow D.L., Lang G.A. Transformation of the offshore benthic community in Lake Michigan: recent shift from the native amphipod *Diporeia* spp. to the invasive mussel *Dreissena rostriformis bugensis*. *Freshw. Biol.* 2009;54(3):466-479. DOI 10.1111/j.1365-2427.2008.02123.x.
- O'Reilly C.M., Alin S.R., Plisnier P.-D., Cohen A.S., McKee B.A. Climate change decreases aquatic ecosystem productivity of Lake Tanganyika, Africa. *Nature.* 2003;424(6950):766-768. DOI 10.1038/nature01833.
- Porazinska D.L., Giblin-Davis R.M., Faller L., Farmerie W., Kanzaki N., Morris K., Powers T.O., Tucker A.E., Sung W.A.Y., Thomas W.K. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Mol. Ecol. Resour.* 2009;9(6):1439-1450. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02611.x.
- Rezende R.S., Santos A.M., Henke-Oliveira C., Gonçalves J.F., Jr. Effects of spatial and environmental factors on benthic macroinvertebrate community. *Zoologia.* 2014;31(5):426-434. DOI 10.1590/S1984-46702014005000001.
- Timoshkin O.A. Biodiversity of Baikal fauna: state-of-the-art (Preliminary analysis). In: New Scope on Boreal Ecosystems in East Siberia. Proc. of the Intern. Workshop, Kyoto, Japan, 23-25 Nov. 1994. Novosibirsk: Russ. Acad. Sci. Publ. Siberian Branch, 1997; 35-76.
- van den Berg M.S., Coops H., Noordhuis R., van Schie J., Simons J. Macroinvertebrate communities in relation to submerged vegetation in two Chara-dominated lakes. *Hydrobiologia.* 1997;342:143-150. DOI 10.1023/A:1017094013491.
- Worrall T.P., Dunbar M.J., Extence C.A., Laize C.L.R., Monk W.A., Wood P.J. The identification of hydrological indices for the characterization of macroinvertebrate community response to flow regime variability. *Hydrol. Sci. J.* 2014;59(3-4):645-658. DOI 10.1080/02626667.2013.825722.
- Yu D.W., Ji Y., Emerson B.C., Wang X., Ye C., Yang C., Ding Z. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol. Evol.* 2012;3(4):613-623. DOI 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x.

#### ORCID ID

L.S. Kravtsova orcid.org/0000-0003-0862-4726  
T.E. Peretolchina orcid.org/0000-0002-2950-9762  
T.I. Triboy orcid.org/0000-0002-4830-0155  
I.A. Nebesnykh orcid.org/0000-0001-5961-0514  
A.E. Tupikin orcid.org/0000-0002-8194-0322  
M.R. Kabilov orcid.org/0000-0003-2777-0833

**Благодарности.** Работа выполнена по проекту Российского фонда фундаментальных исследований № 19-05-00398 а. Сбор и разбор проб частично проведены в рамках ГЗ № 121032300196-8, биоинформатический анализ частично выполнен в рамках ГЗ № 121031300042-1.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.02.2023. После доработки 16.05.2023. Принята к публикации 16.05.2023.

# Soil Alveolata diversity in the undisturbed steppe and wheat agrocenoses under different tillage

N.B. Naumova<sup>1</sup>✉, P.A. Barsukov<sup>1</sup>, O.A. Baturina<sup>2</sup>, O.A. Rusalimova<sup>1</sup>, M.R. Kabilov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Soil Science and Agrochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ naumova@issa-siberia.ru

**Abstract.** Microeukaryotes are vital for maintaining soil quality and ecosystem functioning, however, their communities are less studied than bacterial and fungal ones, especially by high throughput sequencing techniques. Alveolates are important members of soil microbial communities, being consumers and/or prey for other microorganisms. We studied alveolate diversity in soil under the undisturbed steppe (US) and cropped for wheat using two tillage practices (conventional, CT, and no-till, NT) by amplifying the ITS2 marker with ITS3\_KYO2/ITS4 primers and sequencing amplicons using Illumina MiSeq. A total of 198 Alveolata OTUs were identified, with 158 OTUs attributed to the Ciliophora phylum, containing five classes: Litostomatea, Spirotrichea and Oligohymenophorea, Nassophorea and Phyllopharyngea. Litostomatea and Phyllopharyngea were more abundant in US as compared with CT and NT. The observed OTU richness was higher in US than in CT and NT. The  $\beta$ -biodiversity of soil ciliates also very distinctly differentiated the US field from CT and NT. In the US, Nassophorea and Spirotrichea correlated positively with sand and negatively with clay, silt and SOM contents. This is the first report about soil ciliates diversity in Siberia as assessed by metabarcoding technique. The revealed clear effect of land use on the relative abundance of some taxa and a lack of tillage effect suggest the importance of the quantity and quality of plant material input for shaping the prey for ciliates. The ITS-metabarcoding technique was used for the first time in the research of ciliates diversity; further studies, embracing diverse aspects of soil ciliates by combining -omics methodology with the traditional one, are needed to get a better insight on the ecological roles of the main ciliate taxa in the complex soil system.

Key words: ITS region; ciliates; Chernozem; conventional tillage; no tillage.

**For citation:** Naumova N.B., Barsukov P.A., Baturina O.A., Rusalimova O.A., Kabilov M.R. Soil Alveolata diversity in the undisturbed steppe and wheat agrocenoses under different tillage. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):703-711. DOI 10.18699/VJGB-23-81

## Разнообразие почвенных Alveolata в ненарушенной степи и агроценозах пшеницы при разной обработке почвы

Н.Б. Наумова<sup>1</sup>✉, П.А. Барсуков<sup>1</sup>, О.А. Батурина<sup>2</sup>, О.А. Русалимова<sup>1</sup>, М.Р. Кабилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт почвоведения и агрохимии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ naumova@issa-siberia.ru

**Аннотация.** Микроскопические эукариоты крайне важны для обеспечения качества почвы и функционирования экосистем. Однако сообщества почвенных микроэукариот менее изучены по сравнению с сообществами бактерий и грибов, особенно с применением методов высокопроизводительного секвенирования. Значимыми компонентами почвенных микробных сообществ являются альвеоляты, участвующие в ключевых процессах почвенных экосистем (разложение органического вещества, трансформация питательных элементов и др.). Цель работы заключалась в изучении разнообразия альвеолят в почве под ненарушенной степной растительностью и при возделывании пшеницы с помощью двух методов обработки почвы (традиционная вспашка и нулевая обработка) путем амплификации маркера ITS2 с праймерами ITS3\_KYO2/ITS4 и последующего секвенирования ампликонов (Illumina MySeq). Всего идентифицировано 198 ОТЕ альвеолят, из которых 158 относились к типу Ciliophora и пяти его классам: Litostomatea, Spirotrichea, Oligohymenophorea, Nassophorea и Phyllopharyngea. Litostomatea и Phyllopharyngea оказались более обильны в почве под ненарушенной степной растительностью по сравнению с почвой под пшеницей обоих вариантов обработки. Богатство ОТЕ в верхнем слое ненарушенной почвы под степной растительностью было также заметно выше, чем в обоих вариантах возделываемых полей, которые четко отличались от степи и по  $\beta$ -биоразнообразию. Nassophorea и Spirotrichea положительно коррелировали с содержанием песка в ненарушенной и пахотной почве; в последней к ним присоединились Litostomatea. Данная работа представляет собой первое исследование разнообразия почвенных альвеолят с применением метода метабаркодирования. Выявленное воздействие земледельческого использования на относительное обилие некоторых таксонов наряду с отсутствием влияния

обработки почвы свидетельствует о важном значении количества и качества поступающего в почву растительного материала для формирования сообществ микроорганизмов, поедаемых инфузориями. Дальнейшие исследования с применением методологии -омик и традиционных способов необходимы для лучшего понимания экологической роли инфузорий в частности и альвеолят в целом в сложной почвенной системе. Ключевые слова: ITS район; инфузории; чернозем; традиционная вспашка; нулевая обработка.

## Introduction

As it is currently argued, “bridging the gaps between biodiversity science and agricultural practices is crucial to meet food security in the Anthropocene” (Cappelli et al., 2022. P. 674). Therefore, belowground biodiversity is an ultimately important part/mediator of such efforts. Eukaryotic microorganisms, such as fungi, alveolates, metazoans, algae and other organisms with  $\leq 5000 \mu\text{m}^3$  of body volume (Coleman, 1985) are important players in biotic interactions in soil, and, as such, involved in key ecosystem processes: organic matter transformation, nutrient cycling, etc. (Bardgett, Putten, 2014). Protozoa were shown to benefit plant growth (Bonkowski, 2004), for instance, by improving N mineralization from soil organic matter via stimulating bacterial biomass turnover (Kuikman et al., 1990). Thus, microeukaryotes presence is vital for maintaining soil quality and ecosystem functioning and sustainability. However, soil microbial eukaryotic communities are much less studied as compared with bacterial and fungal ones, and especially by the high throughput sequencing techniques. Alveolates are important members of soil microbial assemblages, where they serve as consumers or prey for other microorganisms. The abundance and taxonomic diversity of alveolates used to be studied by culturing (by the so-called most probable numbers technique) and microscopy. Currently microscopy is the main methodology for the enumeration of alveolates (Adl et al., 2008), but species identification, requiring a complicated staining protocol (Acosta-Mercado, Lynn, 2003), is rather laborious and sometimes not definitive. Therefore, metagenomic approach and state-of-the-art high throughput sequencing has greatly extended the methodology for assessing the biodiversity of alveolates in soil.

In agricultural ecosystems soil and its residential biota is strongly affected by all aspects of production technologies, such as tillage, fertilization, crops, pesticides and others. Over the last decades the possibility to reduce damage to soil by minimizing tillage has gained much attention from both researchers and practitioners. Although there are many reports about bacterial and fungal biodiversity estimated metagenomically under minimal and/or no tillage, alveolates have remained relatively understudied (Ritter et al., 2021). While assessing the ITS2 region DNA sequence reads diversity, using the ITS3\_KYO2/ITS4 primer set (Liu K. et al., 2012), under different tillage practices in the chernozem in the south of West Siberia (Naumova et al., 2022), we found that those fungal primers also amplified DNA belonging to other domains, specifically Alveolata, Amoebozoa, Heterolobosea, Metazoa, Rhizaria and Eukaryota kingdoms of uncertain taxonomic attribution. All those reads were discarded for the mycobiome analysis (Naumova et al., 2022); however, a substantial number of alveolate operational taxonomic units (OTUs), with their rarefaction curves reaching plateau with increasing number of sequence reads, convinced us to proceed with analyzing alveolate ITS-based diversity.

## Materials and methods

**Experimental site and conditions.** The field trial was described earlier (Naumova et al., 2022) (<https://www.mdpi.com/2075-1729/12/8/1169>). Briefly, the study area is the forest-steppe zone (54°4'6" N, 79°36'3" E) with a sharply continental climate<sup>1</sup>, the mean monthly temperature in the area of experimental site location in October is 3.5 °C with Luvic Endocalcic Chernozem (Siltic) (World Reference Base for Soil Resources..., 2015) as the widely spread and agriculturally significant soil of the region.

**Experimental setup.** The field trail was described earlier as well (Naumova et al., 2022). Briefly, it was started in 2009 on the area of 40 ha when a portion of the conventionally tilled soil (CT, mouldboard ploughing in the fall and disking in the spring) was subjected to the no-till technology (NT); both plots were getting the same rates of herbicides and fertilizers simultaneously.

The wheat grain yield, harvested at the beginning of September 2021, reached 4.8 t ha<sup>-1</sup> in the NT field and 4.1 t ha<sup>-1</sup> in the CT field. An undisturbed site (Un), located near the experimental field and covered by a true bunchgrass steppe (with *Stipa capillata*, *Festuca valesiaca*, some *Poa* spp. and *Puccinellia* sp.), was used to get the data about the zonal soil bacteriobiome as a reference.

**Soil sampling and chemical analyses.** Soil was sampled in October 2021 from the 0–5 and 5–15 cm layers in five individual replicates from each layer. In total, 30 soil samples were collected and chemically analyzed as described before (Naumova et al., 2022): soil pH ranged 6.3–6.8, total soil carbon content ranged 3.6–4.2 %, and total soil nitrogen content was 0.29–0.37 %.

**DNA extraction, amplification and sequencing.** Total DNA was extracted with the DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. The bead-beating was performed using TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 10 min at 30 Hz. Agarose gel electrophoresis was used to assess the quality of the extracted DNA; additional DNA purification was not necessary.

The ITS2 gene marker was amplified with the primer pairs ITS3\_KYO2/ITS4, combined with Illumina adapter sequences (Fadrosh et al., 2014). PCR amplification was performed as described earlier (Kryukov et al., 2020). A total of 200 ng PCR product from each sample was pooled together and purified using the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The obtained amplicon libraries were sequenced with 2x300 bp paired-ends reagents on MiSeq (Illumina, CA, USA) in the SB RAS Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS, Novosibirsk, Russia). The read data reported in this study were submitted to the NCBI Short Read Archive under bioproject accession number PRJNA845814.

<sup>1</sup> Hydrometcenter of Russia. Available online at: <https://meteoinfo.ru/en/climate/monthly-climate-means-for-towns-of-russia-temperature-and-precipitation> (accessed on March 27, 2022).



**Bioinformatic analysis.** Raw sequences were analyzed with the UPARSE pipeline (Edgar, 2013) using Usearch v.11.0.667. The UPARSE pipeline included merging paired reads; read quality filtering (-fastq\_maxee 0.005); length trimming (remove less 100 nt); merging identical reads (de-replication); discarding singleton reads; removing chimeras and OTU clustering using the UPARSE-OTU algorithm. The OTU sequences were assigned a taxonomy using SINTAX (Edgar, 2013) and ITS UNITE USEARCH/UTAX v.8.3 (Abarenkov et al., 2021) as a reference. Taxonomic structure of sequences thus obtained was estimated by the ratio of the number of taxon-specific sequence reads (with non-fungal removed from the data matrix) to the total number of sequence reads, i.e. by the relative abundance of taxa, expressed as percentage.

The OTUs datasets were analyzed by individual rarefaction with the help of the PAST software (Hammer et al., 2001): the number of alveolate OTUs detected, reaching plateau with increasing number of sequences, showed that the sampling effort was close to saturation for all samples, thus being enough for comparing biodiversity (Hughes, Hellmann, 2005).

**Statistical analyses.** Statistical analyses (descriptive statistics, ANOVA and correlation analyses) were performed by using Statistica v.13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Rarefaction curves, OTUs-based  $\alpha$ -diversity indices were calculated and principal coordinates analysis was performed using PAST software. Factor effects and mean differences in *post-hoc* comparisons by Fisher's LSD test were considered statistically significant at the  $p \leq 0.05$  level.

## Results

**Alveolata taxonomic diversity.** After quality filtering, chimeras and other domains' sequences removal, a total of 198 different Alveolata OTUs were identified at 97 % sequence identity level, with 158 OTUs attributed to the Ciliophora phylum, the rest remaining unclassified below the domain level. The rarefaction curves showed that the sampling effort was enough to compare diversity (Hughes, Hellmann, 2005), as the number of OTUs dependent on the total number of sequence reads reached plateau (Fig. 1).

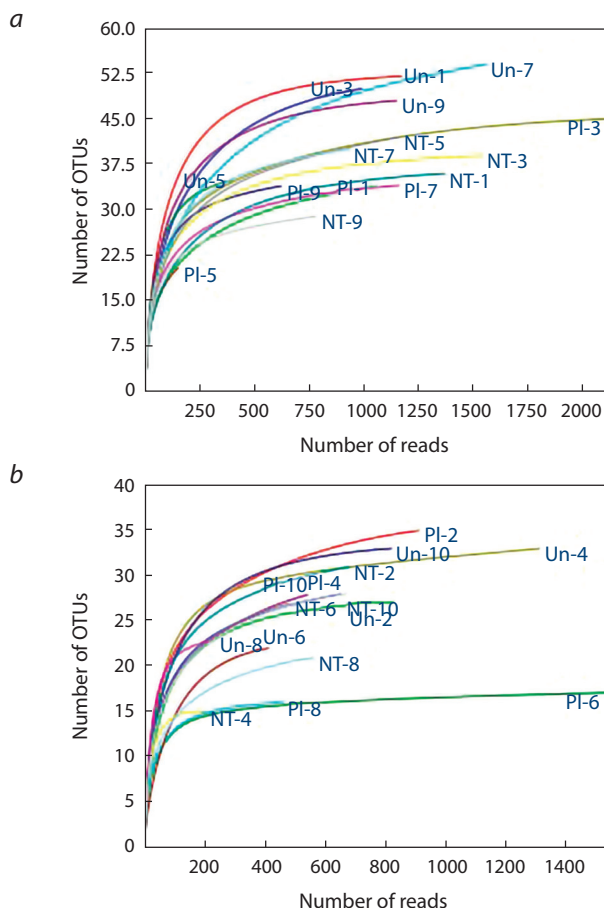
Five Ciliophora classes were identified: Litostomatea with 32 OTUs being the most OTU-rich one, followed by Spirotrichea and Oligohymenophorea with 25 OTUs each, Nassophorea and Phyllopharyngea being represented by just three OTUs each. Of the total number of Ciliophora OTUs, many (70, or 44 %) remained unassigned to the lower taxonomic levels.

### Taxonomic composition and structure in different fields.

The relative abundance of the Ciliophora phylum did not differ between the fields and the layers (Table 1), whereas at the class level there were some differences: Litostomatea was much more abundant in the undisturbed soil as compared to both cropped ones, and Phyllopharyngea, albeit being a minor member of the ciliate assemblage, was also markedly increased in the undisturbed soil. At the order level, Sporadotrichida was almost seven times more abundant in the 0–5 cm layer of the undisturbed soil than in the no-till one. Oligohymenophorea is, an order-level cluster, had almost five times higher abundance in the 5–15 cm layer of the no-till soil as compared with the undisturbed one (Table 1). Haptorida

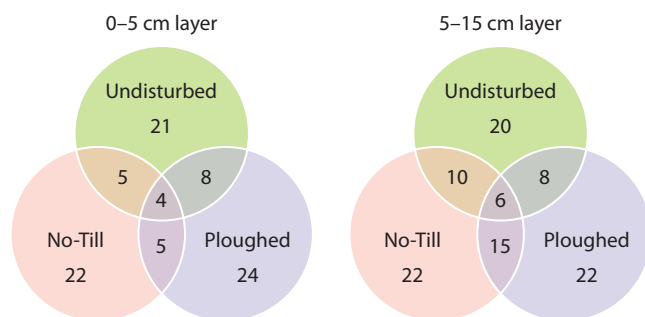
(Litostomatea), Hymenostomatida (Oligohymenophorea) and Cyrtophorida (Phyllopharyngea) displayed much higher abundance in the undisturbed soil.

The number of dominant OTUs slightly exceeded 20 in each field and both layers (Fig. 2). The sets, bulked over both soil layers, comprised 30–43 dominant OTUs, the number of the dominant OTUs being maximal in the undisturbed soil. Three OTUs were common for all fields, with two OTUs not



**Fig. 1.** The rarefaction curves for alveolate OTUs in the 0–5 (a) and 5–15 (b) cm soil.

Un – undisturbed soil, PI – ploughed and NT – no-till soil; the numbers indicate individual soil replicates from a tillage treatment.



**Fig. 2.** Venn's diagram of the number of the dominant Alveolata OTUs in soil under different tillage treatment. OTUs were considered dominant if they accounted for  $\geq 1$  % of the total number of sequence reads.

**Table 1.** Relative abundance (% , mean) of the dominant Alveolata taxa in Chernozem 0–5 and 5–15 cm layers in the experimental fields in the south of West Siberia

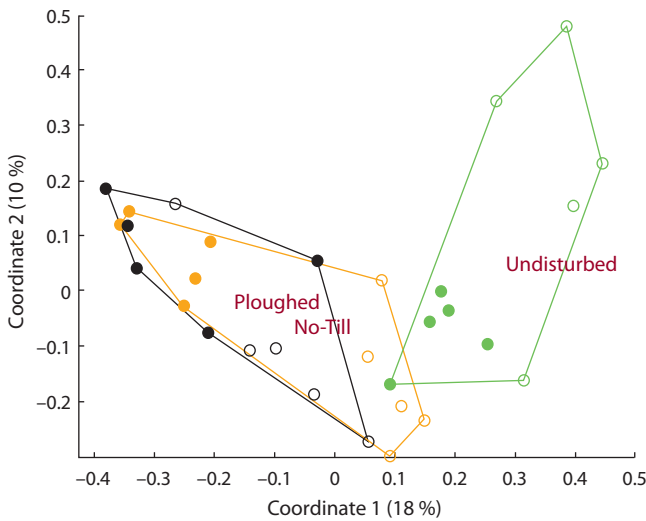
Taxon	Undisturbed		Ploughed		No-till	
	0–5 cm	5–15 cm	0–5 cm	5–15 cm	0–5 cm	5–15 cm
Phylum level						
Ciliophora	86.1	87.9	88.0	88.4	86.8	91.6
un. Alveolata	13.9	12.1	12.0	11.6	13.2	8.4
Class level						
un. Ciliophora	36.3	34.8	33.1	41.0	39.7	50.7
Spirotrichea	25.2	40.1	35.0	34.1	23.7	20.5
Oligohymenophorea	15.9 <sup>ab</sup>	6.1 <sup>a</sup>	17.4 <sup>ab</sup>	12.5 <sup>ab</sup>	19.4 <sup>b</sup>	18.9 <sup>b</sup>
Litostomatea	5.5 <sup>b</sup>	6.8 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>
Nassophorea	2.8 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	0.2 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>
Phyllopharyngea	0.4 <sup>b</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>
Order level						
un. Spirotrichea	12.3	31.1	31.2	27.9	21.8	14.7
Sporadotrichida	12.9 <sup>b</sup>	8.9 <sup>ab</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	6.2 <sup>ab</sup>	1.9 <sup>a</sup>	5.8 <sup>ab</sup>
Oligohymenophorea_is	13.8 <sup>ab</sup>	3.9 <sup>a</sup>	17.4 <sup>b</sup>	11.7 <sup>ab</sup>	19.4 <sup>b</sup>	18.9 <sup>b</sup>
Haptorida	4.9 <sup>b</sup>	6.8 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>
Hymenostomatida	2.1 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>
Nassulida	2.8 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	0.2 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>
Philasterida	0.0	0.0	0.0	0.4	0.00	0.00
un. Litostomatea	0.6 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.1 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>a</sup>
Cyrtophorida	0.30 <sup>b</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
Exogenida	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Note: "un." stands for unclassified. Letters in rows indicate that the values are different ( $p \leq 0.05$ , Fisher's LSD test); the absence of letters after the values in a row indicates that there was no difference.

**Table 2.** Alpha-biodiversity indices (calculated on the OTU's basis) of Alveolata OTUs assemblages in the Chernozem in the experimental fields in the south of West Siberia

Index	Undisturbed		Ploughed		No-till	
	0–5 cm	5–15 cm	0–5 cm	5–15 cm	0–5 cm	5–15 cm
OTU richness	48 <sup>d</sup>	28 <sup>ab</sup>	34 <sup>bc</sup>	25 <sup>a</sup>	37 <sup>c</sup>	24 <sup>a</sup>
Chao1	50 <sup>d</sup>	29 <sup>ab</sup>	35 <sup>bc</sup>	26 <sup>ab</sup>	41 <sup>cd</sup>	25 <sup>a</sup>
Simpson (S)	0.91	0.81	0.90	0.84	0.91	0.87
Shannon's	3.0 <sup>b</sup>	2.4 <sup>a</sup>	2.7 <sup>ab</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.8 <sup>ab</sup>	2.4 <sup>a</sup>
Evenness	0.42	0.44	0.47	0.44	0.43	0.49
Equitability	0.77	0.72	0.78	0.74	0.76	0.77
Berger–Parker	0.21	0.30	0.19	0.30	0.18	0.25
Dominance (1-S)	0.09	0.19	0.10	0.16	0.09	0.13

Note. Letters in rows indicate that the values are different ( $p \leq 0.05$ , Fisher's LSD test); the absence of letters after the values in a row indicates that there was no difference.



**Fig. 3.** Principal coordinates analysis of the soil alveolate assemblage composition (OTU level, Bray–Curtis dissimilarity distance) under different soil tillage in the forest-steppe zone in West Siberia: location of samples in the plane of the first two coordinates.

Solid circles indicate samples from the 0–5 cm layer, and open circles indicate samples from the 5–15 cm layer.

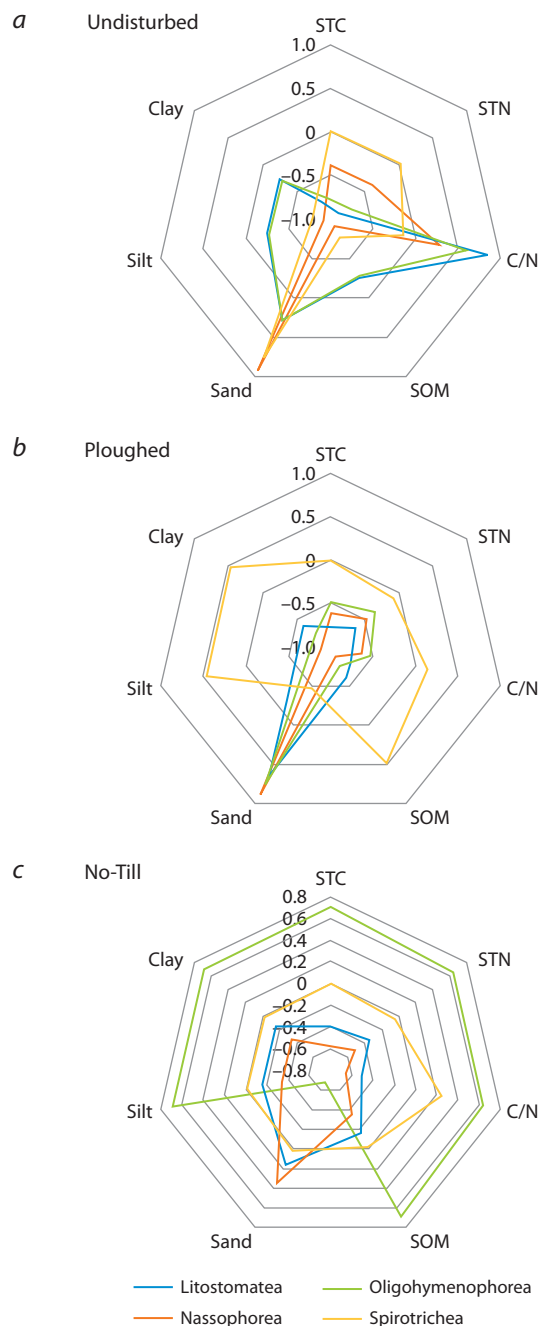
identified below the class level (Spirotrichea) and one OTU, below the phylum level (Ciliophora). As for the 0–5 cm layer, the fourth dominant OTU belonged to the Nassulida order of the Nassophorea class; in the 5–15 cm layer, in addition to the three OTU-level clusters common for all samples, there were two unidentified ones below the phylum level and one was identified to the Spirotrichida order of the Spirotrichea class.

**Alpha- and beta-biodiversity in different fields.** The observed OTU richness was notably higher in the 0–5 cm layer of the undisturbed soil (Table 2) as compared with both cropped ones; the cropped soils did not differ from each other in this index. As for the potential OTU richness, though its estimator (Chao1) in the 0–5 cm layer of the undisturbed soil was markedly higher than in the respective layer of the CT soil, the same was true, albeit to a lesser extent, for the respective layer of the NT soil. Shannon index was much increased in the 0–5 cm layer of the undisturbed soil as compared with its 5–15 cm layer, displaying no difference between the fields.

As for  $\beta$ -diversity, it clearly separated the undisturbed field from the cropped ones, and the latter were not separated from each other (Fig. 3).

**Ciliate assemblage composition and soil properties.** Correlation of the ciliate classes abundance with soil properties in the 0–5 cm layer showed specific spectra for each field (Fig. 4), albeit with few correlation coefficients being statistically significant.

In the undisturbed soil, Nassophorea and Spirotrichea correlated positively with sand and negatively with clay, silt and soil organic matter contents, being also sensitive to pH. In the same soil, Litostomatea and Oligohymenophorea showed preference for soil organic matter with a wide C/N ratio. The pattern was different in the CT soil, where all major classes, except for Spirotrichea, correlated positively with sand and negatively with clay, silt and soil organic matter ones. A different correlation pattern was revealed in the NT soil, where



**Fig. 4.** Correlation coefficients (Pearson) between the relative abundance of the dominant ciliate classes in 0–5 cm layer and soil properties: STC, STN – soil total carbon and nitrogen, SOM – soil organic matter, C/N – the STC/STN ratio in soil; undisturbed soil (a), ploughed soil (b) and no-tillage soil (c).

The coefficients  $|r| \geq 0.88$  were statistically significant at  $p \leq 0.05$  level.

Oligohymenophorea correlated positively with silt, clay, soil organic matter, soil total carbon and nitrogen and negatively with sand.

## Discussion

To assess the diversity of microscopic eukaryotes, most studies used primers to 18S rRNA genes (Ritter et al., 2021), either taxonomically broad (Chaib De Mares et al., 2017) or specific for soil ciliates (Lara et al., 2007; Ting et al., 2015). However,

even with specific primers, non-target taxa sequences are commonly amplified (Pastorelli et al., 2022). The ITS primers we used in this study were designed for fungi (Liu K. et al., 2012), but often these primers did not fail to amplify a plethora of other domains, such as Alveolata, Amoebozoa, Heterolobosea, Metazoa, Rhizaria and Eukaryota kingdoms of uncertain taxonomic attribution. That was precisely what happened in our research: we analysed and reported the mycobiome data (Naumova et al., 2022), but, besides fungal sequences, obtained many sequence clusters belonging to other domains, including Alveolata. It seemed a waste not to attempt an analysis of such sequences; the more so as the number of OTUs reached plateau with the increasing number of sequence reads, tempting us to compare diversity of amplicon sequences. The primers we used were not specifically designed for alveolates, and we are far from claiming that we examined alveolate assemblages in their entirety (though even with specific primers, such claims would be unjustified). However, the fact that diversity estimates of Alveolata OTUs showed agronomically and ecologically meaningful differences, together with our humble hope that our study would “clearly benefit from incorporating more protistology alongside the study of bacteria, fungi and animals” (Geisen et al., 2018), strongly encouraged us to discuss how ciliate diversity relates to the context of this study.

Averaged over all samples in the study, Ciliophora accounted for 88 % of the Alveolata sequence reads. As Ciliophora were shown to prefer arid and semi-arid soil environments (Bates et al., 2013), the phylum ultimate dominance in Alveolata assemblage complies with the climate of the study region, characterized as semi-arid. Less Ciliophora presence, i. e. 45 % of the total number of sequence reads, was reported for the meadow soils in the Alps (Seppey et al., 2020). However, ciliates are relatively more studied and better represented in various databases: in particular, they are highly overrepresented in molecular surveys because of their shorter SSU rRNA sequences that ease amplification, and the presence of extremely high SSU rRNA gene copy numbers (Gong et al., 2013), ranging from  $10^3$  to  $10^6$  (Wang et al., 2019). All these might have also been a factor contributing to higher Ciliophora presence in our study.

This study explicitly identified five class-level sequence reads clusters, i. e. Spirotrichea, Oligohymenophorea, Litostomatea, Nassophorea and Phyllopharyngea. The first four were the dominant ones, being commonly found in other studies (employing the same or different methodology) as the main members of soil ciliate assemblages (and even estuarine ones (Jiang et al., 2021)). In the meadow soils in the Alps, the Ciliophora phylum was mostly represented by the Spirotrichea, Oligohymenophorea, Litostomatea and Colpodea classes (Seppey et al., 2020). In soil ciliate community at the Baiyun Mountain in China, the most species-rich classes were Spirotrichea, Colpodea, Litostomatea, Oligohymenophorea, Nassophorea, Armophorea and Phyllopharyngea, as determined by microscopy (Li et al., 2010); exactly the same class-level composition (by DGGE + sequencing) was reported for the oil palm plantation in Malaysia (Ting et al., 2012). Another study reported the ultimate (55 %) dominance of colpodids (by classical methodology) (Bamforth, 2001) in a range of different soils; a notable presence of the group (found by

metatranscriptomics) was also reported (Geisen et al., 2015). Another very recent study of ciliates in Castanozems in the north-west of China identified nine classes of soil ciliates (Liu H. et al., 2022), with Spirotrichea and Litostomatea being the most species-rich and Colpodea ranking third. Unlike all those studies, here, we did not find any Colpodea. This notable and surprising discrepancy concerning the Colpodea presence may be explained by differences in methodology, primers used, ecosystems, soil, as well as weather conditions preceding soil sampling. According to BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), the primers used for this study had poor homology for Colpodea. As for the weather conditions, they could have contributed somewhat as well: we collected soil samples at the end of the growing season with air temperatures dropping to negatives at night, but in the Alps soil samples were collected in July, i. e. at the height of the growing season, whereas at the Baiyun Mountain they were collected seasonally throughout a year. Also, as Colpodea are well known as *r*-strategists (Lüftenegger et al., 1985), e. g. thriving in unstable environments, they could hardly display a notable presence after gradual change of environmental conditions at the very end of the growing season, more than a month after harvest in the cropped fields and no disturbance in all three fields. Although there exists a discrepancy between the morphological and molecular databases used in the molecular barcoding of protists (Venter et al., 2018), the factor could have hardly contributed to the absence of such conspicuous and well-studied taxon as Colpodea in our study. Therefore, the primers are the primary culprits, and this difference between the ciliate classes might be worth looking into.

Our finding that the Litostomatea class was markedly increased in the undisturbed soil, as compared with the both cropped ones, suggests that in the undisturbed soil a) there was much more prey available for these free-living predators of other protists or microscopic animals (Vd’áčný et al., 2012), or b) these ciliates or their prey were susceptible to the agronomic practices in the cropped fields, as protists were shown to be the most susceptible soil microbiome component to the application of nitrogen fertilizers (Zhao Z. et al., 2019). Anyway, the undisturbed soil environment in both layers apparently benefited Litostomatea, perhaps indirectly, via different chemical composition/stoichiometry of the versatile plant litter: nutrient characteristics of the latter were shown to be important ecological factors that affect protozoan community diversity (Jia et al., 2021). And our finding of positive Litostomatea correlation with the wider C/N ratio of soil indirectly corroborates this.

The Spirotrichea representatives are commonly found in various soil environments, ranging from the high Arctic deserts (Choe et al., 2021) to meadows in the Alps (Seppey et al., 2020). Our results showing that it was the most abundant class in all soil samples from undisturbed and cropped fields (averaging 30 %) imply increased availability of their various prey, from bacteria to other ciliates (Subphylum 2. INTRAMACRONUCLEATA..., 2010), stimulated by dead phytomass abundance at the end of the growing season. The Spirotrichea diversity was reported to be positively correlated with physicochemical parameters such as interstitial water, total organic carbon, nitrogen and phosphorous content (Abraham et al., 2019). However, within the context of our study,

i. e. small gradients of physicochemical properties, we did not reveal such a correlation at the wheat-cropped sites, but at the undisturbed site, the relative abundance of the Spirotrichea-specific sequences was found to correlate positively with sand content in soil. Such correlation suggests sensitivity of these ciliates to soil pore space and aeration, or both.

The fact that Oligohymenophorea had a substantial presence in all soil samples in our study (15 % on average) agrees with the notion that the class is a common member of soil ciliate assemblages (Zhao F. et al., 2013; Tribun et al., 2022). The finding that the class did not show any tillage-related differences (in the top layer) may suggest a broad spectrum of the class niches within the context of the study. As for the 5–15 cm layer, the Oligohymenophorea relative abundance increased from the undisturbed site to the ploughed and no-till ones: the results suggest the beneficial effect of some environmental property (unaccounted in the study) in the no-till soil.

As for the Nassophorea representatives, in this study, the class presence seemed to benefit from the unploughed soil environment similarly in both the undisturbed and no-tillage 0–5 cm layers, which indicates mostly the effect of soil properties, rather than plant species and phytomass. Although Phyllopharyngea demonstrated layer-related differential abundance, as the class was the rare member of the soil ciliate community at all sites, we would not attempt to draw any ecological inference from the finding.

It is noteworthy that in both soil layers only few OTUs were common for all three fields, belonging to the Spirotrichea class and not being explicitly attributed to any of its orders.

Our finding that ciliate relative abundance was in most cases positively correlated with sand content in the soil indicates the importance of relatively bigger pore space needed for these microscopic eukaryotes as typically they are longer than 50  $\mu\text{m}$  in body length (Lynn, 2017).

Temperature is an important factor controlling the ciliate community (Oshima et al., 2020) and affects the structure and functions of the soil microbial food web. For instance, ciliates can be destroyed by freezing temperatures, especially at soil moisture content exceeding 30 % (Müller et al., 2010). Some researchers suggested that “internally governed encystment may be an essential adaptation to an unpredictable environment in which individual protozoa cannot sense when the soil will dry out and will survive desiccation only if they have encysted in time” (Ekelund et al., 2002. P. 1096), or, extending the statement, when the soil will freeze or experience other adverse condition. In general, soil helps to preserve ciliate cysts in a viable state. Since the soil for our study was sampled at the end of October when freezing temperatures, at least at nights, are common, it is most likely that the diversity profile reflects the diversity of viable but non-active organisms.

It should be noted that relationships between ribotypic and phenotypic traits of protists across their life cycle stages remain largely unknown: recently, encystment and temperature were shown to influence intraindividual sequence polymorphisms of rDNA and rRNA (Zou et al., 2021). Thus, the rDNA copy number may affect the composition and structure of soil ciliate assemblages.

Nowadays, it is commonplace to reiterate that “conventional agricultural production systems... reduce soil biodiver-

sity” (Harkes et al., 2019); and our finding of reduced ciliate OTUs’ richness, both observed and potential, in the top 5-cm layer of conventionally ploughed soil as compared with the undisturbed one, agrees with the statement. However, the same was true for the no-till soil as far as the observed OTUs’ richness is concerned. But the potential richness, i. e. the Chao1 index, albeit being somewhat lower still, did not differ statistically from the value in the undisturbed soil, very likely indicating the ongoing, albeit slowly, process of ciliate assemblage diversification due to the no-till treatment. As for the Shannon index, it showed no difference between the soil tillage managements. The same pattern, i. e. reduced OTUs’ richness under conventional tillage as compared with the undisturbed soil, and no difference in the Shannon index, was found by us in the mycobioome of the same soil samples (Naumova et al., 2022). This finding implies that the Shannon index, calculated on the basis of sequence reads, in the case of eukaryotic microorganisms, at least such as fungi and alveolates, cannot adequately reflect biodiversity changes.

With ITS primers, this study recorded 158 Ciliophora OTUs in the soil samples collected from adjacent fields. Recently, a comprehensive study of ciliated protozoans in soils and fresh water bodies of the Russian Far East, performed by employing traditional microscopic techniques to detect and identify ciliates, found 307 species (Tribun et al., 2022), which, bearing in mind the number, biotope diversity and area surveyed (in total, about 900,000  $\text{km}^2$ ) did not strike us as seriously exceeding the species richness in our study. The core of the ciliate communities in both studies belonged to the classes Oligohymenophorea, Spirotrichea and Litostomatea, together accounting for 65 % of species richness in the Far East study and 52 % of species richness and 41–50 % of the total number of sequence reads in our study. Another very recent study in the north-west of China, also employing traditional methodology to identify and enumerate ciliates, found 114 species of ciliates among four sampling sites, varying in vegetation and land use (Liu H. et al., 2022). Thus, we can safely conclude that soil ciliates diversity data, obtained here by sequencing amplicons of ITS2 region of rRNA genes, encompassed a significant portion of true ciliate diversity in soil, providing ecologically relevant and meaningful assemblage profiles in the context of our study.

## Conclusion

This is the first report about soil ciliates diversity, as assessed by metagenomic technique, in Siberia, and specifically in Chernozem under different land use and tillage practices (undisturbed steppe vs. cropped for wheat by conventional or no tillage). We found a clear effect of land use on the relative abundance of some taxa at the order level, but did not find any effect of the tillage treatments: this strongly suggests the importance of primary producers, i. e. the quantity and quality of plant material input in soil, in shaping the prey available for ciliates. Soil ciliate  $\beta$ -diversity differentiated the undisturbed field from the cropped ones very distinctly as well. Further multifaceted studies, focusing on many aspects of soil ciliates by combining -omics methodology with the traditional one, are needed to get a better insight on the ecological roles of the main ciliate taxa in the complex soil system.

## References

- Abarenkov K., Zirk A., Piirmann T., Pöhönen R., Ivanov F., Nilsson R.H., Kõljalg U. UNITE USEARCH/UTAX release for Fungi. UNITE Community, 2021. DOI 10.15156/BIO/1280276.
- Abraham J.S., Sripoorna S., Dagar J., Jangra S., Kumar A., Yadav K., Singh S., Goyal A., Maurya S., Gambhir G., Toteja R., Gupta R., Singh D.K., El-Serehy H.A., Al-Misned F.A., Al-Farraj S.A., Al-Rasheid K.A., Maoda S.A., Makhija S. Soil ciliates of the Indian Delhi Region: Their community characteristics with emphasis on their ecological implications as sensitive bio-indicators for soil quality. *Saudi J. Biol. Sci.* 2019;26(6):1305-1313. DOI 10.1016/j.sjbs.2019.04.013.
- Acosta-Mercado D., Lynn D.H. The edaphic quantitative protargol stain: A sampling protocol for assessing soil ciliate abundance and diversity. *J. Microbiol. Meth.* 2003;53(3):365-375. DOI 10.1016/S0167-7012(03)00042-3.
- Adl S.M., Acosta-Mercado D., Lynn D.H. Protozoa. In: Carter M.R., Gregorich E.G. (Eds.). Soil sampling and methods of analysis. 2nd ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2008;77-91.
- Bamforth S. Proportions of active ciliate taxa in soils. *Biol. Fertil. Soils.* 2001;33:197-203. DOI 10.1007/s003740000308.
- Bardgett R.D., van der Putten W.H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature.* 2014;515(7528):505-511. DOI 10.1038/nature13855.
- Bates S.T., Clemente J.C., Flores G.E., Walters W.A., Parfrey L.W., Knight R., Fierer N. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *ISME J.* 2013;7(3):652-659. DOI 10.1038/ismej.2012.147.
- Bonkowski M. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytol.* 2004;162(3):617-631. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x.
- Cappelli S.L., Domeignoz-Horta L.A., Loaiza V., Laine A.L. Plant biodiversity promotes sustainable agriculture directly and via belowground effects. *Trends Plant Sci.* 2022;27(7):674-687. DOI 10.1016/j.tplants.2022.02.003.
- Chaib De Mares M., Sipkema D., Huang S., Bunk B., Overmann J., van Elsas J.D. Host specificity for bacterial archaeal and fungal communities determined for high- and low-microbial abundance sponge species in two genera. *Front. Microbiol.* 2017;8:2560. DOI 10.3389/fmicb.2017.02560.
- Choe Y-H., Kim M., Lee Y.K. Distinct microbial communities in adjacent rock and soil substrates on a high arctic polar desert. *Front. Microbiol.* 2021;11:607396. DOI 10.3389/fmicb.2020.607396.
- Coleman D. Through a ped darkly – an ecological assessment of root soil-microbial-faunal interactions. In: Fitter A.H., Atkinson D., Read D.J., Usher M.B. (Eds). Ecological interactions in the soil: plants microbes and animals. Oxford: Blackwell Science Publication, 1985;1-21.
- Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods.* 2013;10(10):996-998. DOI 10.1038/nmeth.2604.
- Ekelund F., Frederiksen H.B., Rønn R. Population dynamics of active and total ciliate populations in arable soil amended with wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(3):1096-1101. DOI 10.1128/AEM.68.3.1096-1101.2002.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome.* 2014;2:6. Available at: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-2618-2-6>
- Geisen S., Tveit A.T., Clark I.M., Richter A., Svenning M.M., Bonkowski M., Urlich T. Metatranscriptomic census of active protists in soils. *ISME J.* 2015;9:2178-2190. DOI 10.1038/ismej.2015.30.
- Geisen S., Mitchell E.A.D., Adl S., Bonkowski M., Dunthorn M., Ekelund F., Fernández L.D., Jousset A., Krashevska V., Singer D., Spiegel F.W., Walochnik J., Lara E. Soil protists: a fertile frontier in soil biology research. *FEMS Microbiol. Rev.* 2018;42(3):293-323. DOI 10.1093/femsre/fuy006.
- Gong J., Dong J., Liu X., Massana R. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates. *Protist.* 2013;164(3):369-379. DOI 10.1016/j.protis.2012.11.006.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001;4:9. Available at: [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)
- Harkes P., Suleiman A.K.A., van den Elsen S.J.J., de Haan J.J., Holterman M., Kuramae E.E., Helder J. Conventional and organic soil management as divergent drivers of resident and active fractions of major soil food web constituents. *Sci. Rep.* 2019;9(1):13521. DOI 10.1038/s41598-019-49854-y.
- Hughes J.B., Hellmann J.J. The Application of Rarefaction Techniques to Molecular Inventories of Microbial Diversity. *Methods Enzymol.* 2005;397:292-308. DOI 10.1016/S0076-6879(05)97017-1.
- Jia T., Liang X., Guo T., Chai B. Impact of nutrients on protozoa community diversity and structure in litter of two natural grass species in a copper tailings dam China. *Microorganisms.* 2021;9(11):2250. DOI 10.3390/microorganisms9112250.
- Jiang C., Liu B., Zhang J., Gu S., Liu Z., Wang X., Chen K., Xiong J., Lu Y., Miao W. Diversity and seasonal dynamics of ciliate communities in four estuaries of Shenzhen China (South China Sea). *J. Mar. Sci. Eng.* 2021;9(3):260. DOI 10.3390/jmse9030260.
- Kryukov V.Y., Kosman E., Tomilova O., Polenogova O., Rotskaya U., Tyurin M., Alikina T., Yaroslavtseva O., Kabilov M., Glupov V. Interplay between fungal infection and bacterial associates in the wax moth *Galleria mellonella* under different temperature conditions. *J. Fungi (Basel).* 2020;6(3):170. DOI 10.3390/jof6030170.
- Kuikman P.J., Jansen A.G., Veen J.A., Zehnder A.J.B. Protozoan predation and the turnover of soil organic carbon and nitrogen in the presence of plants. *Biol. Fertil. Soils.* 1990;10:22-28. DOI 10.1007/bf00336120.
- Lara E., Berney C., Harms H., Chatzinotas A. Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007;62(3):365-373. DOI 10.1111/j.1574-6941.2007.00387.x.
- Li J., Li M.-G., Yang J., Ai Y., Xu R.-L. Community characteristics of soil ciliates at Baiyun Mountain, Guangzhou, China. *Zool. Stud.* 2010;49(6):713-723. Available at: <https://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/49.6/713.pdf>
- Liu K.L., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Eichorst S.A., Xie G. Accurate rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78(5):1523-1533. DOI 10.1128/AEM.06826-11.
- Liu H., Ning Y., Yang Y., Yang H., Wang L., Chen L., Wanma Y., Shen X. Use of ciliate communities for monitoring ecological restoration of grain for the green in north-western China. *Soil Ecol. Lett.* 2022;4:264-275. DOI 10.1007/s42832-021-0105-3.
- Lüftenecker G., Foissner W., Adam H. r- and K-selection in soil ciliates: a field and experimental approach. *Oecologia.* 1985;66(4):574-579. DOI 10.1007/BF00379352.
- Lynn D.H. Ciliophora. In: Archibald J., Simpson A., Slamovits C. (Eds.). Handbook of the Protists. USA: Springer: Cham, 2017;679-730. DOI 10.1007/978-3-319-28149-0\_23.
- Müller H., Achilles-Day U.E., Day J.G. Tolerance of the resting cysts of *Colpoda inflata* (Ciliophora Colpodea) and *Meseres corlissi* (Ciliophora Spirotrichea) to desiccation and freezing. *Eur. J. Protistol.* 2010;46(2):133-142. DOI 10.1016/j.ejop.2009.12.004.
- Naumova N., Barsukov P., Baturina O., Rusalimova O., Kabilov M. Soil Mycobiome Diversity under Different Tillage Practices in the South of West Siberia. *Life (Basel).* 2022;12(8):1169. DOI 10.3390/life12081169.
- Oshima T., Shinohara Y., Asakawa S., Murase J. Susceptibility and resilience of the soil ciliate community to high temperatures. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2020;66(6):870-877. DOI 10.1080/00380768.2020.1819148.

- Pastorelli R., Cucu M.A., Lagomarsino A., Paletto A., De Meo I. Analysis of Ciliate Community Diversity in Decaying *Pinus nigra* Logs. *Forests*. 2022;13(5):642. DOI 10.3390/f13050642.
- Ritter C.D., Machado A.F., Ribeiro K.F., Dunthorn M. Metabarcoding advances for ecology and biogeography of Neotropical protists: what do we know, where do we go? *Biota Neotropica*. 2021; 21(4):e20211214. DOI 10.1590/1676-0611-BN-2021-1214.
- Seppay C.V.W., Broennimann O., Buri A., Yashiro Pinto-Figueroa E., Singer D., Blandenier Q., Mitchell E.A.D., Niculita-Hirzel H., Guisan A., Lara E. Soil protist diversity in the Swiss western Alps is better predicted by topo-climatic than by edaphic variables. *J. Biogeogr.* 2020;47(4):866-878. DOI 10.1111/jbi.13755.
- Subphylum 2. INTRAMACRONUCLEATA: Class 1. SPIROTRICHEA – Ubiquitous and Morphologically Complex. In: Lynn D.H. (Ed.) *The Ciliated Protozoa*. Dordrecht: Springer, 2010;141-173. DOI 10.1007/978-1-4020-8239-9\_7.
- Ting L.T., King W.S., Hong L.W., Ali S.R.A. Diversity of soil protozoa (ciliates) in oil palm plantation at Sungai Asap Sarawak. In: *Proceedings of the Third International Plantation Industry Conference and Exhibition*. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 2012;5.
- Ting L.T., King W.S., Hong L.W., Ali S.R.A. New combination of primer pairs for PCR-DGGE detection of soil ciliates. *Malays. Appl. Biol.* 2015;44:67-72.
- Tribun M., Panov A., Nikitina L. Fauna of ciliates (*Alveolata Ciliophora*) of the southern part of the Russian Far East. *Protistology*. 2022; 16(2):109-121. DOI 10.21685/1680-0826-2022-16-2-5.
- Venter P.C., Nitsche F., Scherwass A., Arndt H. Discrepancies between molecular and morphological databases of soil ciliates studied for temperate grasslands of Central Europe. *Protist*. 2018;169(4):521-538. DOI 10.1016/j.protis.2018.04.001.
- Vd'áčny P., Bourland W.A., Orsi W., Epstein S.S., Foissner W. Genealogical analyses of multiple loci of litostomatean ciliates (*Protista Ciliophora Litostomatea*). *Mol. Phyl. Evol.* 2012;65(2):397-411. DOI 10.1016/j.ympev.2012.06.024.
- Wang Y., Wang C., Jiang Y., Katz L.A., Gao F., Yan Y. Further analyses of variation of ribosome DNA copy number and polymorphism in ciliates provide insights relevant to studies of both molecular ecology and phylogeny. *Sci. China Life Sci.* 2019;62(2):203-214. DOI 10.1007/s11427-018-9422-5.
- World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. IUSS Working Group WRB. Rome: FAO, 2015.
- Zhao F., Xu K., Zhang D. Spatio-temporal variations in the molecular diversity of microeukaryotes in particular ciliates in soil of the Yellow River delta China. *J. Eukaryotic Microbiol.* 2013;60(3): 282-290. DOI 10.1111/jeu.12035.
- Zhao Z.B., He J.Z., Geisen S., Han L.L., Wang J.T., Shen J.P., Wei W.X., Fang Y.T., Li P.P., Zhang L.M. Protist communities are more sensitive to nitrogen fertilization than other microorganisms in diverse agricultural soils. *Microbiome*. 2019;7(1):33. DOI 10.1186/s40168-019-0647-0.
- Zou S., Fu R., Deng H., Zhang Q., Gentekaki E., Gong J. Coupling between ribotypic and phenotypic traits of protists across life cycle stages and temperatures. *Microbiol. Spectr.* 2021;9(3):e0173821. DOI 10.1128/Spectrum.01738-21.

---

#### ORCID ID

N.B. Naumova orcid.org/0000-0003-2354-5065  
M.R. Kabilov orcid.org/0000-0003-2777-0833

**Acknowledgements.** This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant No. 075-15-2021-1085). The authors are very thankful to the private farmer Mr. A.E. Weiss for his permission to sample soils from the experimental fields and to Mrs. Galina A. Bugrovskaya for carrying out soil chemical analyses.

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

**Data availability statement.** The read data reported in this study were submitted to the GenBank under the study accession PRJNA845814.

Received March 29, 2023. Revised August 3, 2023. Accepted August 7, 2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Противооспенная вакцинация на модели мышей

С.Н. Щелкунов<sup>1, 2</sup>✉, А.А. Сергеев<sup>1</sup>, С.А. Пьянков<sup>1</sup>, К.А. Титова<sup>1</sup>, С.Н. Якубицкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

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

✉ snshchel@rambler.ru

**Аннотация.** Необычно широко распространившаяся в 2022 г. эпидемия оспы обезьян среди людей привела к заключению о необходимости противооспенной вакцинации пациентов из групп риска. При этом современные варианты противооспенной вакцины вводят либо внутримышечно, либо скарификацией кожи. Внутримышечное введение не обеспечивает активного иммунного ответа, так как ткани, в которые при этом вводится вакцина, являются иммунологически бедными. Кожа эволюционно развилась в иммунологически важный орган млекопитающих, поэтому введение вакцины в дерму кожи может обеспечивать надежный протективный иммунный ответ. Исторически первым способом иммунизации стал метод инокуляции вакцины в скарифицированную кожу (с/к). Однако этот метод не обеспечивает точного дозирования вакцины, для успешного выполнения процедуры нужно использовать вакцину в высокой концентрации. Альтернативой методу с/к может служить процедура внутрикожной (в/к) инъекции вакцины, особенно при использовании ее в низкой концентрации. Целью настоящей работы было сравнение способов внутрикожной противооспенной иммунизации на модели мышей с применением прототипных вакцин второго и четвертого поколений в низкой дозе  $10^4$  БОЕ. Эксперименты выполняли на мышах линии BALB/c, штаммы L1VP или L1VP-GFP вируса осповакцины (VACV) вводили в кожу хвоста с/к или в/к способами. Через 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дней после вакцинации (дпв) у мышей проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки, в которых методом ИФА определяли титры VACV-специфичных IgM и IgG. Оба штамма VACV обуславливали более выраженную продукцию антител при в/к инъекции по сравнению со с/к инокуляцией. Для проверки уровня развившегося протективного иммунитета на 62-й дпв мышей интраназально инфицировали высоколетальной дозой вируса оспы коров. Полученные результаты показали, что в/к инъекция обеспечивает развитие протективного иммунитета у мышей в значительно большей степени, по сравнению с с/к инокуляцией обоих вариантов VACV.

Ключевые слова: оспа; оспа обезьян; вирус осповакцины; вакцинация; внутрикожная инъекция; скарификация кожи.

**Для цитирования:** Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Пьянков С.А., Титова К.А., Якубицкий С.Н. Противооспенная вакцинация на модели мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):712-718. DOI 10.18699/VJGB-23-82

## Smallpox vaccination in a mouse model

S.N. Shchelkunov<sup>1, 2</sup>✉, A.A. Sergeev<sup>1</sup>, S.A. Pyankov<sup>1</sup>, K.A. Titova<sup>1</sup>, S.N. Yakubitskiy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ snshchel@rambler.ru

**Abstract.** The monkeypox epidemic, which became unusually widespread among humans in 2022, has brought awareness about the necessity of smallpox vaccination of patients in the risk groups. The modern smallpox variants are introduced either intramuscularly or by skin scarification. Intramuscular vaccination cannot elicit an active immune response, since tissues at the vaccination site are immunologically poor. Skin has evolved into an immunologically important organ in mammals; therefore, intradermal delivery of a vaccine can ensure reliable protective immunity. Historically, vaccine inoculation into scarified skin (the s.s. route) was the first immunization method. However, it does not allow accurate vaccine dosing, and high-dose vaccines need to be used to successfully complete this procedure. Intradermal (i.d.) vaccine injection, especially low-dose one, can be an alternative to the s.s. route. This study aimed to compare the s.s. and i.d. smallpox immunization routes in a mouse model when using prototypic second- and fourth-generation low-dose vaccines ( $10^4$  pfu). Experiments were conducted using BALB/c mice; the L1VP or L1VP-GFP strains of the vaccinia virus (VACV) were administered into the tail skin via the s.s. or i.d. routes. After vaccination (7, 14, 21, 28, 42, and 56 days post inoculation (dpi)), blood samples were collected from the retro-orbital venous sinus; titers of VACV-specific IgM and IgG in the resulting sera were determined by ELISA. Both VACV strains caused more profound antibody production when injected via the i.d. route compared to s.s. inoculation. In order to assess the level of the elicited protective immunity, mice were intranasally infected with a highly lethal dose of the cowpox virus on 62 dpi. The results demonstrated that i.d. injection ensures a stronger protective immunity in mice compared to s.s. inoculation for both VACV variants.

Key words: smallpox; monkeypox; vaccinia virus; vaccination; intradermal injection; skin scarification.

**For citation:** Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Pyankov S.A., Titova K.A., Yakubitskiy S.N. Smallpox vaccination in a mouse model. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(6):712-718. DOI 10.18699/VJGB-23-82



## Введение

Оспа (от *лат. variola*) – особо опасное инфекционное заболевание, унесшее за предыдущие века жизни многих сотен миллионов людей. Смертность во время эпидемий оспы могла достигать 30–40 % среди заболевших. Инфекционным агентом этого заболевания является вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV) (Fenner et al., 1988).

Передача VARV людям происходила в основном воздушно-капельным или аэрозольным путем при тесных контактах. Инкубационный период в течение одной или двух недель предшествовал резкому началу лихорадки, головной боли и болей в крестце, за которыми через несколько дней следовали высыпания на языке и слизистых оболочках рта и ротоглотки, на лице и руках появлялись макулопапулезные поражения (сыпь), распространяющиеся затем по всему телу и прогрессирующие в пустулы. К 10–13-му дню болезни пустулы достигали максимального размера, после чего они постепенно уплощались, подсыхали и превращались в корочки. К 30–40-му дню болезни корочки отпадали, оставляя красноватые пятна. В дальнейшем на некоторых участках, главным образом на лице, на месте этих пятен образовывались характерные западения кожи – оспенные рубцы (рябое лицо). Таким образом, людей, переболевших оспой, можно было фенотипически легко отличить от неподвергшихся данному заболеванию (Shchelkunov et al., 2005).

Оказалось, что переболевшие оспой люди при последующих эпидемиях данной инфекции были к ней невосприимчивы. Это, по-видимому, натолкнуло много столетий назад врачей в Индии и Китае на разработку процедуры, получившей в дальнейшем название «вариоляция» (*variolation* – от *variola inoculation*). Метод вариоляции состоял в том, что в надрезы кожи вносили (инокулировали) инфекционный материал, полученный после растирания корочек, взятых от больных оспой. Внутривожно зараженные люди, как правило, переносили оспу в более легкой форме по сравнению с естественной инфекцией. На месте инокуляции VARV в кожу по завершению инфекционного процесса формировался характерный рубец. После такой процедуры люди приобретали устойчивость к оспе. Однако от 0.5 до 2 % пациентов погибали от вариоляции, поэтому этот метод защиты от оспы не нашел широкого распространения (Fenner et al., 1988).

В XVIII в. в Англии появились наблюдения о наличии оспоподобного заболевания у крупного рогатого скота и лошадей, которое стали называть оспой коров. Клинически это заболевание характеризовалось кожными высыпаниями на теле животных, чаще всего на вымени и сосках. Кожные элементы претерпевали типичные стадии эволюции (папулы–везикулы–пустулы) с последующим образованием корочек и язв. Эта инфекция легко передавалась людям, контактировавшим с больными животными. В большинстве случаев оспа коров у человека протекала доброкачественно и характеризовалась развитием единичных местных поражений, чаще всего на кистях и предплечьях, в местах микротравм кожного покрова. По завершении инфекции на местах поражений кожи у людей формировались рубцы, напоминающие рубцы, образу-

ющиеся после вариоляции. Более того, люди, переболевшие оспой коров, не заболели во время эпидемий оспы.

Накопив такую информацию, английский медик Эд. Дженнер пришел к заключению, что можно осуществлять защиту людей от оспы, предварительно заразив их оспой коров. С 1796 г. он провел несколько экспериментальных заражений людей в надрезы кожи (скарификацией) инфекционным материалом из пустул от больных оспой коров с последующим через некоторое время заражением их оспой, используя процедуру вариоляции. Во всех случаях была продемонстрирована устойчивость привитых оспой коров пациентов к заражению оспой. Разработанную процедуру защиты от оспы Эд. Дженнер назвал вакцинацией (*vaccine inoculation/vaccination* – от *лат. vacca* – корова) (Fenner et al., 1988; Esparza et al., 2017).

Следует отметить, что царство вирусов было открыто лишь спустя столетие после появления метода вакцинации против оспы. И только недавно стало ясно, что используемые долгие годы для иммунизации разные штаммы вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) наиболее близки по организации генома к вирусу оспы лошадей, а не к вирусу оспы коров (Tulman et al., 2006; Esparza et al., 2017).

В результате реализации Программы глобальной ликвидации оспы под эгидой Всемирной организации здравоохранения при использовании массовой противооспенной вакцинации и строгого эпидемиологического контроля к 1977 г. оспу удалось полностью искоренить (Fenner et al., 1988).

В большинстве случаев для противооспенной вакцинации применяли метод введения VACV скарификацией кожи (с/к). Данная процедура относительно проста в исполнении, но не обеспечивает точное дозирование вакцинного препарата и, как следствие, для надежности иммунизации необходимо применять вирусный препарат высокой концентрации (Fenner et al., 1988; Jacobs et al., 2009; Sanchez-Sampedro et al., 2015).

Современной альтернативой методу с/к может быть процедура внутривожной (в/к) инъекции вакцинного препарата. Этот подход обеспечивает точное дозирование вакцины и более высокую надежность иммунизации, что может позволить снизить дозу вводимой вакцины. А это важно, особенно в случае вакцинации больших групп людей.

Целью настоящей работы было осуществить сравнение эффективности процедур в/к и с/к при противооспенной вакцинации малой дозой VACV на модели мышей линии BALB/c. Для корректного сравнения при обеих процедурах вирус вводили в кожу одного и того же района хвоста мышей. В качестве объектов исследования использовали клоновый вариант штамма Л-ИВП (LIVP) и полученный на его основе рекомбинантный штамм LIVP-GFP (дефектный по вирусной тимидинкиназе), которые можно рассматривать как прототипные противооспенные вакцины второго и четвертого поколений соответственно.

## Материалы и методы

**Вирусы, культура клеток.** Использовали клон 14 штамма Л-ИВП (LIVP) VACV, полученный нами методом предельного разведения и трехкратным пересевом через бляшку под агарозным покрытием (Yakubitskiy et al., 2015), соз-

данный на его основе мутантный LIVP-GFP с инактивацией гена вирусной тимидинкиназы (Petrov et al., 2013), а также вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV) штамм GRI-90 (Shchelkunov et al., 1998). Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток почки африканской зеленой маргьши линии CV-1 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

**Животные.** Исследовали мышей линии BALB/c, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02-06.2022 от 28.06.2022).

**Оценка патогенности штаммов VACV.** В исследованиях по изучению патогенности штаммов VACV LIVP и LIVP-GFP при интраназальном (и/н) заражении использовали 3-недельных мышей линии BALB/c массой 10–12 г (по 10 животных в группе). Мышам после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром вводили в полость носа в объеме 50 мкл вирусосодержащую жидкость в дозе  $10^7$  бляшкообразующих единиц (БОЕ), либо физиологический раствор (ф. р.). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали у них клинические проявления инфекции и гибель.

Использовали балльную оценку выявляемых симптомов заболевания: 0 – признаков заболевания нет, 1 – легкая взъерошенность шерсти, 2 – сильная взъерошенность шерсти, 3 – сильная взъерошенность шерсти, а также сутулая поза или конъюнктивит, 4 – затрудненное дыхание или отсутствие движения, 5 – гибель.

Мышей индивидуально взвешивали каждые два дня. Средние арифметические значения массы тел мышей для каждой группы на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса. Показатель расщепления данных относительно среднего значения представляли в виде стандартного отклонения и также выражали в процентах.

**Иммунизация мышей.** Иммунизацию самок мышей линии BALB/c возраста 6–7 недель (массой 16–19 г) осуществляли методом в/к или с/к, используя VACV LIVP или LIVP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ.

Для в/к инъекции или с/к инокуляции место введения (дорсальная сторона хвоста, около 1 см от основания) предварительно обрабатывали 70 % этиловым спиртом. При в/к инъекции вирусный материал ( $10^4$  БОЕ) или ф. р. (контрольная группа) в объеме 20 мкл вводили, как описано в работе (Shchelkunov et al., 2022). Для иммунизации методом с/к делали 10 надрезов кожи иглой 26G ( $0.45 \times 16$  мм), оставаясь в пределах поверхностного слоя эпидермиса. На поврежденный участок кожи немедленно наносили вирусный материал ( $10^4$  БОЕ) или ф. р. (контрольная группа) в объеме 5 мкл и давали ему впитаться в кожу.

Через 7, 14, 21, 28, 42 и 56-й день после вакцинации (дпв) вирусами LIVP или LIVP-GFP у мышей (по шесть

животных каждой группы) проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса, как описано в (Shchelkunov et al., 2022).

Из индивидуальных образцов крови мышей были получены препараты сывороток путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием. Образцы сывороток крови мышей хранили при температуре  $-20$  °С.

**Иммуноферментный анализ индивидуальных сывороток крови** мышей выполняли, как описано в (Shchelkunov et al., 2020). В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgM и IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95 % вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

**Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей.** На 62-й дпв группы иммунизированных вирусами LIVP или LIVP-GFP и контрольных животных заражали и/н CPXV GRI-90 в дозе 46 ЛД<sub>50</sub> ( $9.4 \times 10^5$  БОЕ/мышь). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали их гибель.

Получали данные для групп из шести животных, в/к или с/к иммунизированных VACV LIVP или LIVP-GFP, а также неиммунизированных групп мышей и неинфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (положительный контроль).

**Статистический анализ данных.** Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 13.0 (StatSoft Inc. 1984–2001). Расчет 50 % летальной дозы (ЛД<sub>50</sub>) производили на основании количества погибших животных по методу Спирмена–Кербера (Sachs, 1972). Значение  $p$  менее 0.05 считали статистически значимым.

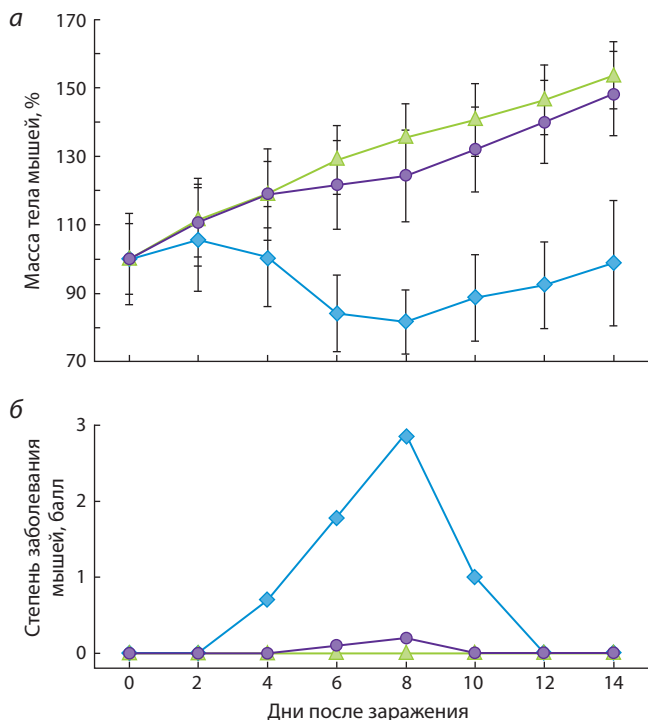
## Результаты

### Сравнение патогенных свойств штаммов LIVP и LIVP-GFP

#### при интраназальном заражении мышей

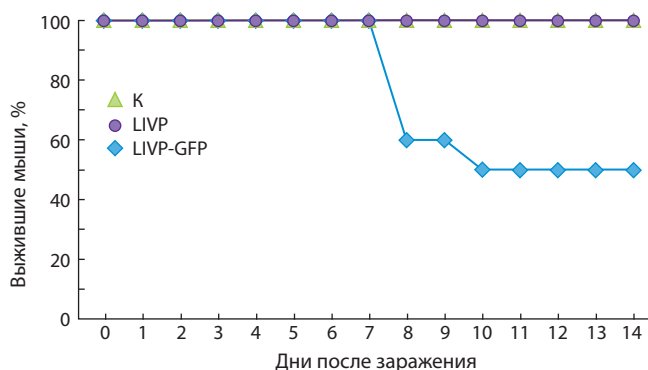
При изучении патогенности штаммов VACV LIVP и LIVP-GFP в настоящей работе использовали 3-недельных мышей линии BALB/c. Осуществляли и/н заражение мышей вирусами в дозе  $10^7$  БОЕ. Для VACV LIVP выраженные клинические проявления инфекции наблюдали начиная с 4-го дня с максимумом на 8-й день, выздоровление наступало после 10-го дня (рис. 1, б). Заболевание сопровождалось существенным снижением массы тела мышей (см. рис. 1, а).

Вирус LIVP-GFP, дефектный по гену тимидинкиназы, в тех же условиях на 6–8-й дни после заражения мышей вызывал минимальные клинические проявления инфекции (см. рис. 1, б) и незначительное снижение массы тела инфицированных животных по сравнению с контрольными (см. рис. 1, а). Интраназальное заражение мышей штаммом LIVP при этом приводило к гибели 50 % животных, а после заражения штаммом LIVP-GFP все животные выжили (рис. 2).



**Рис. 1.** Динамика изменения массы тела мышей (а) и клинических проявлений инфекции (б) после интраназального заражения вирусом LIVP (голубой) или LIVP-GFP (фиолетовый) в дозе  $10^7$  БОЕ.

Приведены средние данные для групп из 10 животных, зараженных соответствующими вирусами, а также контрольной группы (зеленый цвет).



**Рис. 2.** Динамика гибели мышей, интраназально зараженных вирусами LIVP (голубой) или LIVP-GFP (фиолетовый) в дозе  $10^7$  БОЕ. Контрольная группа – неинфицированные животные (зеленый цвет).

Полученные результаты указывают на значительную аттенуацию VACV LIVP при инактивации у него гена тимидинкиназы, которая произошла при получении рекомбинантного штамма LIVP-GFP.

### Сравнение динамик развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию мышей вирусами LIVP и LIVP-GFP

Взрослых мышей линии BALB/c возраста 6–7 недель вакцинировали методом в/к инъекции или с/к инокуляции, используя VACV LIVP или LIVP-GFP в низкой дозе ( $10^4$  БОЕ).

При в/к инъекции вируса LIVP выраженную продукцию VACV-специфичных IgM наблюдали уже на 7-й дпв и максимум их уровня достигал к 21-му дпв, а к 28-му дпв и в последующие дни титр IgM падал до уровня отрицательного контроля. Поэтому на рис. 3 результаты тестирования IgM сывороток мышей представлены только для 7, 14, 21 и 28-го дня после вакцинации. Иммунизация мышей вирусом LIVP методом с/к инокуляции приводила к более поздней и менее выраженной продукции IgM (см. рис. 3, а).

Как при в/к, так и при с/к вакцинации мышей вирусом LIVP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ наблюдали лишь минимальную продукцию IgM без достоверных отличий от уровня этого класса антител в контрольных сыворотках крови неиммунизированных животных (см. рис. 3, б).

VACV-специфичные иммуноглобулины IgG продуцировались в значительно больших титрах по сравнению с IgM (см. рис. 3 и 4). После в/к вакцинации вирусом LIVP существенная продукция IgG выявлялась уже на 7-й дпв и достигала максимума на 21-й дпв, сохраняясь практически на том же уровне до 28-го дня после вакцинации. Затем наблюдалось постепенное снижение уровня VACV-специфичных IgG к 42- и 56-му дпв (рис. 4, а). При с/к инокуляции мышей вирусом LIVP синтез специфичных IgG происходил с запозданием и меньшей интенсивностью по сравнению с в/к иммунизацией (см. рис. 4, а).

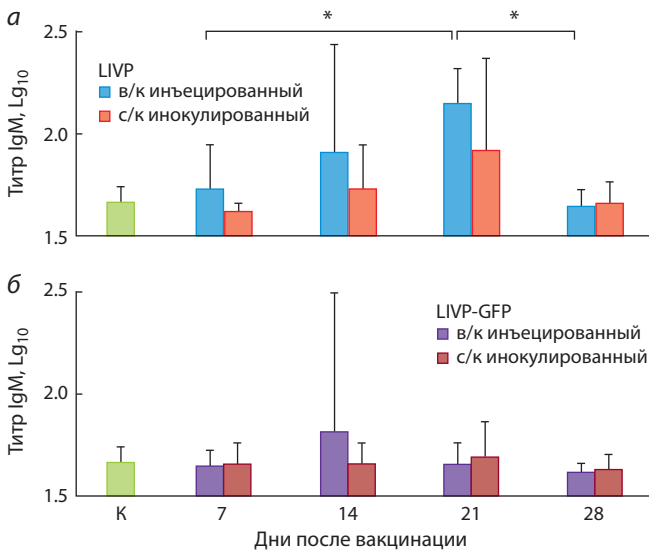
При в/к иммунизации мышей вирусом LIVP-GFP уровень продукции IgG был значительно ниже по сравнению с LIVP вакцинацией, и максимум продукции этих антител приходился на 28-й дпв (см. рис. 4, б). Введение вируса LIVP-GFP методом с/к обуславливало меньшую продукцию анализируемых IgG (см. рис. 4).

### Проверка защиты иммунизированных мышей от летальной ортопоксвирусной инфекции

Для оценки того, как используемые штаммы VACV, а также в/к и с/к способы вакцинации влияют на формирование протективного иммунитета у мышей против повторной ортопоксвирусной инфекции, на 62-й дпв группы иммунизированных вирусами LIVP или LIVP-GFP и контрольных (неиммунизированных) животных и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе 46 ЛД<sub>50</sub>. Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 5, показывают, что полная защита была только в группе мышей, в/к иммунизированных вирусом LIVP. В группе мышей, вакцинированных этим же вирусом, при использовании с/к метода 83 % животных после заражения CPXV-GRI погибли (см. рис. 5, а).

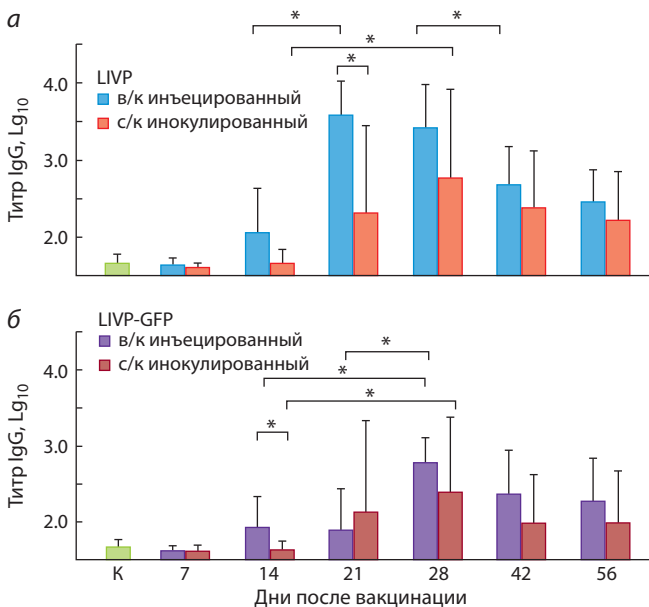
Внутрикожная инъекция вируса LIVP-GFP обеспечила в тех же условиях повторной инфекции CPXV-GRI защиту 80 % мышей, а все животные, с/к инокулированные LIVP-GFP, погибли (см. рис. 5, а). Уровень защиты мышей от летальной инфекции CPXV коррелировал со степенью клинических проявлений этой инфекции (см. рис. 5, б).

Таким образом, при малой дозе VACV ( $10^4$  БОЕ), использованной в данной работе для иммунизации мышей, в/к инъекция демонстрирует явное преимущество перед с/к инокуляцией в формировании протективного иммунитета против гетерологичной ортопоксвирусной инфекции (оспы коров).



**Рис. 3.** Титры VACV-специфических IgM в сыворотках крови мышей, иммунизированных вирусами LIVP (а) или LIVP-GFP (б). К – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор.

\* Статистически достоверные различия с  $p < 0.05$ .



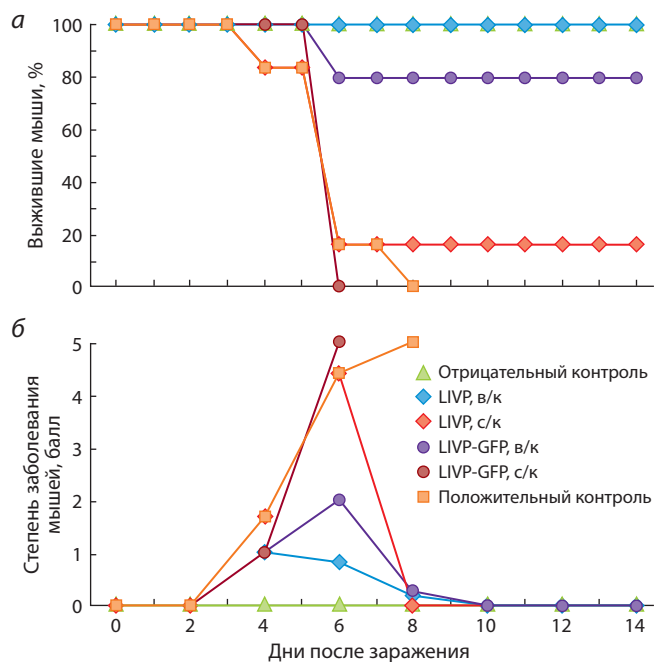
**Рис. 4.** Титры VACV-специфических IgG в сыворотках мышей, иммунизированных вирусами LIVP (а) или LIVP-GFP (б). К – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор.

\* Статистически достоверные различия с  $p < 0.05$ .

## Обсуждение

Масштабная эпидемия оспы обезьян среди людей, распространившаяся в 2022 г. по всем континентам (Nagarajan et al., 2022; Shchelkunova, Shchelkunov, 2023), поставила на повестку дня вопрос о массовой вакцинации против этой инфекции в группах риска. Важной при этом оказалась необходимость выбора типа вакцины, а также наиболее оптимального способа введения противооспенной вакцины.

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляет собой препарат VACV, полученный размно-



**Рис. 5.** Динамика гибели (а) и клинических проявлений инфекции у мышей (б), иммунизированных вирусами LIVP или LIVP-GFP в дозе  $10^4$  БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе  $46 LD_{50}$  на 62-й день после вакцинации.

Приведены средние данные для групп из шести животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также неиммунизированных групп и неинфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (положительный контроль).

жением вируса на коже телят или других животных. Недавние исследования показали, что такие вакцины состоят из смеси разных вариантов VACV (Osborne et al., 2007; Qin et al., 2011).

В современных условиях вакцинные штаммы VACV, полученные выделением клоновых вариантов из вакцин первого поколения, продуцируют на культурах клеток млекопитающих, и такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения (Sanchez-Sampedro et al., 2015). Использование противооспенных вакцин первого и второго поколений для массовой вакцинации в настоящее время ограничено из-за относительно большого числа возможных тяжелых осложнений (Fenner et al., 1988; Sanchez-Sampedro et al., 2015), что обусловлено возросшим в последние годы количеством людей с иммунодефицитами (включая ВИЧ-инфекцию).

Аттенуированные (со сниженной патогенностью) противооспенные вакцины третьего поколения создают в процессе множественных пассажей определенного штамма VACV в культуре клеток гетерологичного хозяина. При этом возникают варианты VACV со спонтанными делециями и мутациями в вирусном геноме (Jacobs et al., 2009; Olson, Shchelkunov, 2017; Albarnaz et al., 2018).

Новый подход к получению противооспенных вакцин четвертого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных делеций/инсерций, нарушающих выбранные вирусные гены и приводящих к аттенуации VACV (Yakubitskiy et al., 2015; Li et al., 2017; Щелкунов и др., 2022).

В России для противооспенной иммунизации используется Вакцина оспенная живая первого поколения на основе штамма Л-ИВП VACV. Штамм Л-ИВП получен путем накожных пассажей на кроликах и телятах вакцины, приготовленной из штамма Lister и предоставленной институтом Листера (Элстри, Англия). Препарат этой вакцины представляет собой вирус, выращенный на скарифицированной коже телят (Перекрест и др., 2013). Пациентам эту вакцину вводят с/к инокуляцией.

Из штамма Л-ИВП нами был получен и охарактеризован клоновый вариант LIVP (Yakubitskiy et al., 2015), который может рассматриваться как прототип противооспенной вакцины второго поколения. Созданный на его основе рекомбинантный штамм LIVP-GFP, у которого инактивирован ген тимидинкиназы (Petrov et al., 2013), представляет собой прототипный вариант противооспенной вакцины четвертого поколения.

На первом этапе настоящего исследования сравнили свойства патогенности штаммов LIVP и LIVP-GFP. Чувствительность мышей к ортопоксвирусам существенно зависит от их возраста (Shchelkunov et al., 2005), поэтому использовали молодых (возраст 3 недели) мышей линии BALB/c. Животных и/н инфицировали вирусами, поскольку данный способ имитирует естественный путь заражения и обуславливает наибольшую чувствительность мышей к этой инфекции (Hughes et al., 2020; Щелкунов и др., 2021).

Оказалось, что при и/н заражении молодых мышей в дозе  $10^7$  БОЕ штамм LIVP индуцировал развитие клинически выраженной инфекции (см. рис. 1) с гибелью 50 % животных (см. рис. 2). В то же время штамм LIVP-GFP обуславливал у мышей появление лишь слабых признаков заболевания (см. рис. 1) с последующим их полным выздоровлением (см. рис. 2). Таким образом, инактивация гена тимидинкиназы у LIVP-GFP привела к его значительной аттенуации по сравнению с родительским штаммом LIVP, что соответствует результатам, полученным на других штаммах VACV (Taylor et al., 1991; Jacobs et al., 2009).

Ранее в разных работах было показано, что с/к иммунизация вакцинами второго и четвертого поколения на основе VACV обеспечивала полную защиту мышей от повторной летальной ортопоксвирусной инфекции при введении этих вакцин в дозах не менее  $10^5$ – $10^6$  БОЕ (Melamed et al., 2007; Jacobs et al., 2009; Shchelkunov et al., 2022).

В данной работе нами изучена возможность снижения дозы прототипных противооспенных вакцин до  $10^4$  БОЕ при иммунизации мышей с/к инокуляцией или в/к инъекцией. Для корректного сравнения с/к и в/к введение VACV осуществляли в один и тот же район кожи хвоста мышей.

При изучении иммуногенности VACV LIVP и LIVP-GFP использовали взрослых мышей (возраст 6–7 недель) со сформированной иммунной системой. Известно, что наибольший вклад в развитие адаптивного иммунного ответа на VACV вакцинацию имеет антительный ответ (Velyakov et al., 2003; Moss, 2011). Поэтому изучили динамику синтеза VACV-специфичных IgM и IgG после в/к или с/к вакцинации мышей штаммами LIVP или LIVP-GFP. Результаты этих экспериментов показали (см. рис. 3 и 4), что оба штамма VACV обуславливают более выраженную продукцию антител при в/к инъекции по сравнению с с/к

инокуляцией. При этом статистически значимая разница результатов между сравниваемыми группами была выявлена только для значений IgG на 21-й дпв в случае LIVP (см. рис. 4, а), и на 14-й дпв в случае LIVP-GFP (см. рис. 4, б). Для значений IgM статистически значимую разницу результатов не наблюдали (см. рис. 3).

Для проверки уровня протективного иммунитета, развившегося у мышей в ответ на иммунизацию их вирусом LIVP или LIVP-GFP с/к или в/к методами, использовали и/н инфицирование этих животных высоколетальной дозой CPXV. Такой подход считается наиболее адекватным для оценки эффективности VACV вакцинации на модели мышей (Ferrier-Rembert et al., 2007; Melamed et al., 2007). Полученные результаты (см. рис. 5) показали, что в/к инъекция обеспечивает развитие протективного иммунитета у мышей в значительно большей степени, по сравнению с с/к инокуляцией VACV. Только штамм LIVP при в/к иммунизации в низкой дозе обеспечивал полную защиту мышей от летальной инфекции CPXV. Аттенуированный штамм LIVP-GFP в тех же условиях уже не формировал достаточно надежный протективный иммунитет. Инокуляция вакцины в скарифицированную кожу VACV LIVP или LIVP-GFP при выбранной низкой дозе не обеспечивала защиты животных от повторной инфекции CPXV (см. рис. 5).

## Заключение

На основании полученных результатов можно заключить, что в/к инъекция обоих изученных вариантов VACV обеспечивает индукцию существенно большего протективного иммунитета у мышей, по сравнению с с/к инокуляцией этих вирусов в той же дозе. Следует отметить, что в/к иммунизация, кроме более точного дозирования вакцины, по сравнению с с/к процедурой, приводит к гораздо меньшему повреждению кожи и тем самым значительно снижает развитие воспалительной реакции, препятствующей эффективной репликации VACV, и уменьшает вероятность бактериальных инфекций в зоне введения вакцины (Shmeleva et al., 2022). При применении для противооспенной иммунизации аттенуированной вакцины четвертого поколения со сниженной «удельной» иммуногенностью нужно использовать VACV в большей дозе по сравнению с вакциной второго поколения.

## Список литературы / References

- Перекрест В.В., Мовсесянц А.А., Мухачева А.В., Шевцов В.А., Шведов Д.В., Борисевич И.В. Препараты для специфической профилактики натуральной оспы, зарегистрированные в Российской Федерации. *Биопрепараты*. 2013;2:4-13.
- [Perekrest V.V., Movsesyants A.A., Mukhacheva A.V., Shevtsov V.A., Shvedov D.V., Borisevich I.V. Preparations for the specific prophylaxis of smallpox approved in the Russian Federation. *Boipreparaty = Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2013;2:4-13. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах их введения мышам. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):357-364. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375.
- [Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Infektsiya*

- i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021; 11(2):357-364. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Якубитский С.Н., Нестеров А.Е., Колосова И.В., Сергеев А.А., Зайковская А.В., Кабанов А.С., Нечаева Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Куцерубова Н.С., Трегубчак Т.В., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А. Доклинические исследования специфической активности живой культуральной вакцины VACΔ6 против оспы и других ортопоксвирусных инфекций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(6):34-47. DOI 10.31631/2073-346-2022-21-6-34-47.
- [Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Nesterov A.E., Kolosova I.V., Sergeev A.A., Zaykovskaya A.V., Kabanov A.S., Nechaeva E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Kutserubova N.S., Tregubchak T.V., Gavrilo E.V., Maksyutov R.A. Preclinical studies of the specific activity of the live culture vaccine VACΔ6 against smallpox and other orthopoxvirus infections. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(6):34-47. DOI 10.31631/2073-346-2022-21-6-34-47. (in Russian)]
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*. 2018; 10(3):101. DOI 10.3390/v10030101.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared models of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9458-9463. DOI 10.1073/pnas.1233578100.
- Esparza J., Schrick L., Damaso C.R., Nitsche A. Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. *Vaccine*. 2017;35(52):7222-7230. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.11.003.
- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Ferrier-Rembert A., Drillien R., Tournier J.-N., Garin D., Crance J.-M. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine*. 2007;25(25): 4809-4817. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.04.011.
- Harapan H., Ophinni Y., Megawati D., Frediansyah A., Mamada S.S., Salampe M., Bin Emran T., Winardi W., Fathima R., Sirinam S., Sittikul P., Stoian A.M., Nainu F., Sallam M. Monkeypox: A comprehensive review. *Viruses*. 2022;14(10):2155. DOI 10.3390/v14102155.
- Hughes L.J., Townsend M.B., Gallardo-Romero N., Hutson C.L., Patel N., Dotty J.B., Salzer J.S., Damon I.K., Carroll D.S., Satheshkumar P.S., Karem K.L. Magnitude and diversity of immune response to vaccinia virus is dependent on route of administration. *Virology*. 2020;544:55-63. DOI 10.1016/j.viro.2020.02.001.
- Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res*. 2009;84(1):1-13. DOI 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- Li Y., Zhu Y., Chen S., Li W., Yin X., Li S., Xiao P., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Generation of an attenuated Tiantan vaccinia virus strain by deletion of multiple genes. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017;7:462. DOI 10.3389/fcimb.2017.00462.
- Melamed S., Paran N., Katz L., Ben-Nathan D., Israely T., Schneider P., Levin R., Lustig S. Tail scarification with vaccinia virus Lister as a model for evaluation of smallpox vaccine potency in mice. *Vaccine*. 2007;25(45):7743-7753. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.09.023.
- Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev*. 2011;239(1):8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.
- Olson V.A., Shchelkunov S.N. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses*. 2017;9(9):242. DOI 10.3390/v9090242.
- Osborne J.D., da Silva M., Frace A.M., Sammons S.A., Olsen-Rasmussen M., Upton C., Buller R.M., Chen N., Feng Z., Roper R.L., Liu J., Pougatcheva S., Chen W., Wohlhueter R.M., Esposito J.J. Genomic differences of *Vaccinia virus* clones from Dryvax smallpox vaccine: The Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine*. 2007;25(52):8807-8832. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.10.040.
- Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the LIVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Dokl. Biol. Sci*. 2013; 451(1):248-252. DOI 10.1134/S0012496613040133.
- Qin L., Upton C., Hazes B., Evans D.H. Genomic analysis of the *Vaccinia virus* strain variants found in Dryvax vaccine. *J. Virol*. 2011; 85(24):13049-13060. DOI 10.1128/JVI.05779-11.
- Sachs L. Statistische Auswertungsmethoden. Heidelberg (Germany): Springer, 1972.
- Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*. 2015;7(4):1726-1803. DOI 10.3390/v7041726.
- Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryzankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology*. 1998;243(2):432-460. DOI 10.1006/viro.1998.9039.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. Effect of the route of administration of the vaccinia virus strain LIVP to mice on its virulence and immunogenicity. *Viruses*. 2020;12(8):795. DOI 10.3390/v12080795.
- Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Pyankov S.A., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Karpenko L.I., Yakubitskiy S.N. Comparison of the effectiveness of transepidermal and intradermal immunization of mice with the vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2022;14(4):111-118. DOI 10.32607/actanaturae.11857.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. Smallpox, monkeypox and other human orthopoxvirus infections. *Viruses*. 2023;15(1):103. DOI 10.3390/v15010103.
- Shmeleva E.V., Gomez de Agüero M., Wagner J., Enright A.J., Macpherson A.J., Ferguson B.J., Smith G.L. Smallpox vaccination induces a substantial increase in commensal skin bacteria that promote pathology and influence the host response. *PLoS Pathog*. 2022; 18(4):e1009854. DOI 10.1371/journal.ppat.1009854.
- Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk<sup>+</sup> phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol*. 1991;72(Pt. 1):125-130. DOI 10.1099/0022-1317-72-1-125.
- Tulman E.R., Delhon G., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. Genome of horsepox virus. *J. Virol*. 2006;80(18):9244-9258. DOI 10.1128/JVI.00945-06.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2015;7(4):113-121. DOI 10.32607/20758251-2015-7-4-113-121.

#### ORCID ID

S.N. Shchelkunov orcid.org/0000-0002-6255-9745  
A.A. Sergeev orcid.org/0000-0001-8355-5551

S.A. Pyankov orcid.org/0000-0002-6593-6614  
S.N. Yakubitskiy orcid.org/0000-0002-0496-390X

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006-П).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.01.2023. После доработки 27.05.2023. Принята к публикации 29.05.2023.

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» – реестровая запись СМИ  
Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий,  
в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой  
степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Russian Science Citation Index  
на платформе Web of Science, 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 ИЦиГ СО РАН, <https://vavilovj-icg.ru/>  
и платформе Научной электронной библиотеки, [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=32440)  
англоязычная версия – на сайте [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://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](mailto: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.

Фотография на обложке О.В. Андреевкова.

