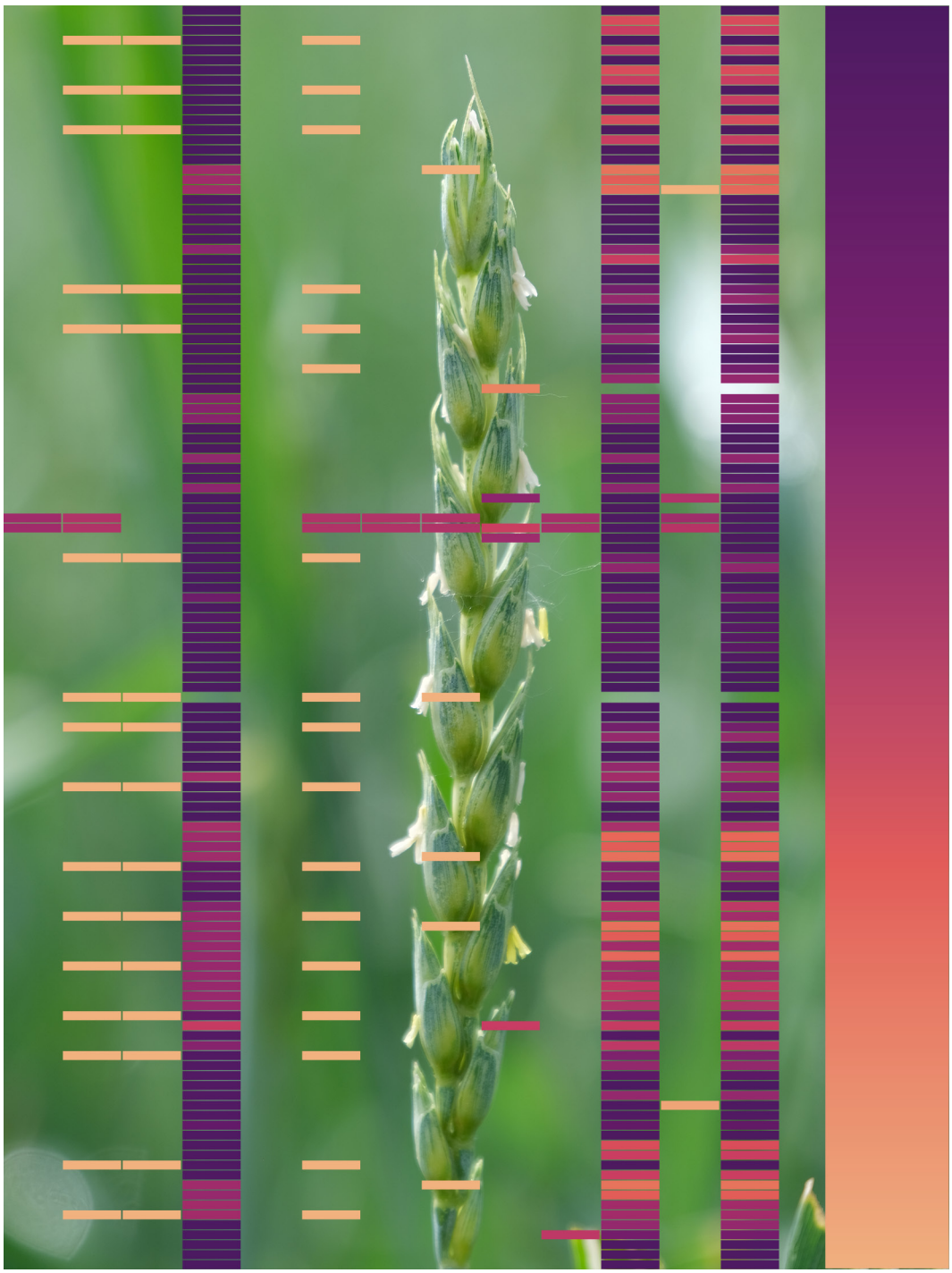
Online ISSN 2500-3259

ВАВИЛОВСКИЙ
ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ
VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2025 • 29 • 8



PlantGen2025

Хромосомная и генетическая инженерия / Устойчивость растений к стрессовым факторам / Молекулярные маркеры в генетике и селекции / Структура и эволюция генома растений / Биоинформатика и системная биология / Компьютерная геномика животных и человека / Проблемы биотехнологии

vavilov.elpub.ru
vavilovj-icg.ru
vavilov_journal@bionet.nsc.ru

2025 • 29 • 8

Online ISSN 2500-3259

Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.
Периодичность 8 выпусков в год
doi 10.18699/vjgb-25-121

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)
И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)
Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)
В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Нидерланды)
О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – д-р биол. наук, доцент (Россия)
Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)
Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)
С.А. Лашин – д-р биол. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
И.Н. Лебедев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
И.В. Максимов – д-р биол. наук (Россия)
Б.А. Малярчук – д-р биол. наук (Россия)
Ю.Г. Матушкин – канд. биол. наук (Россия)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)
Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Салина – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.А. Степанов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)
Е.В. Шахтшнейдер – д-р мед. наук (Россия)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.В. Шеховцов – д-р биол. наук (Россия)
Н.С. Юдин – канд. биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

2025 • 29 • 8

Online ISSN 2500-3259

Online edition

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Founded in 1997
Publication frequency: 8 issues a year
doi 10.18699/vjgb-25-121

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.A. Afonnikov, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), The Netherlands
L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia
N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.E. Gruntenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.K. Khlestkina, Corr. Member of the RAS, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
A.M. Kudryavtsev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.M. Larkin, Cand. Sci. (Biology), Great Britain
S.A. Lashin, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I.N. Lebedev, Corr. Member of the RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
I.V. Maksimov, Dr. Sci. (Biology), Russia
B.A. Malyarchuk, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.G. Matushkin, Cand. Sci. (Biology), Russia
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.Yu. Novikova, Dr. Sci. (Agricul.), Russia
E.K. Potokina, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
E.Y. Rykova, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Salina, Corr. Member of the RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.V. Shakhtshneider, Dr. Sci. (Medicine), Russia
S.V. Shekhovtsov, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Vasiliev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.S. Yudin, Cand. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

СОДЕРЖАНИЕ • 2025 • 29 • 8

Хромосомная и генетическая инженерия

1161 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Исследование потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене α-кафирина *k1C5*. *Л.А. Эльконин, Г.А. Геращенков, Н.В. Борисенко, С.Х. Сарсенова, В.М. Панин*

1169 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* с помощью корневой обработки экзогенной дцРНК. *Т.С. Голубева, В.А. Черенко, Е.А. Филипенко, И.В. Жирнов, А.А. Иванов, А.В. Кочетов*

1176 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Замалчивание гена *TaAOS2* с помощью РНК-интерференции влияет на накопление фитогормонов, рост и продуктивность мягкой пшеницы. *Д.Н. Мирошниченко, А.В. Пиголев, Е.А. Дегтярёв, В.И. Дегтярёва, В.В. Алексеева, А.С. Пушин, С.В. Долгов, Т.В. Савченко (на англ. языке)*

1184 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Изучение влияния интрогрессии хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *Gossypium barbadense* L. при беккроссировании исходными линиями вида *G. hirsutum* L. *М.Ф. Санамьян, Ш.У. Бобохужаев, Ш.С. Абдукаримов, Ж.С. Уралов, А.Б. Рустамов*

Устойчивость растений к стрессовым факторам

1195 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Внутрипопуляционные изменения *Puccinia hordei* под воздействием двухкомпонентных фунгицидов различных химических классов. *М.С. Гвоздева, О.А. Кудинова, В.Д. Руденко, Г.В. Волкова*

1203 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Влияние биопестицида Новохизоль на экспрессию генов защиты при заражении пшеницы стеблевой ржавчиной *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *А.Б. Щербань, А.В. Разуваева, Е.С. Сколотнева, В.В. Фоменко*

1213 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Дифференциальный профиль экспрессии генов транскрипционных факторов подсемейства DREB2 в динамике солевого стресса и послестрессового восстановления растений томата. *М.А. Филюшин, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева*

1221 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
SmartCrop: база знаний молекулярно-генетических механизмов адаптации риса и пшеницы к стрессовым факторам. *П.С. Деменков, Т.В. Иванисенко, М.А. Клещев, Е.А. Антропова, И.В. Яцык, А.Р. Волянская, А.В. Адамовская, А.В. Мальцева, А.С. Вензель, Х. Чао, М. Чен, В.А. Иванисенко*

Молекулярные маркеры в генетике и селекции

1235 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Валидация маркеров, разработанных для выявления локусов устойчивости к *Pyrenophora teres* f. *teres* на хромосомах ячменя 3H, 4H и 6H при полигенном наследовании признака. *О.С. Афанасенко, Н.В. Мироненко, Н.М. Лашина, И.В. Розанова, Е.И. Кырова, Ю.С. Никольская, А.А. Зубкович*

1246 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Выявление нуклеотидного полиморфизма гена *CtE1* и разработка KASP-маркеров для гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *Л. Криолло Дельгадо, Д. Зевуде, Д.С. Каржаев, Д.Е. Полев, Е.К. Потокина (на англ. языке)*

Структура и эволюция генома растений

1255 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Использование линии пшеницы с генетическим материалом дикой полбы для улучшения современных сортов *Triticum aestivum* L. по комплексу хозяйственно полезных признаков. *О.А. Орловская, К.К. Яцевич, Л.В. Милько, Н.М. Казнина, Н.И. Дубовец, А.В. Кильчевский*

1267 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Транспозоны льна: роль в генетическом разнообразии, окультуривании и детерминации хозяйственно ценных признаков. *М.А. Дук, В.А. Станин, А.А. Канапин, А.А. Самсонова, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова*

1277 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Влияние аллельных вариантов гена *Vrn-A1* на длину вегетационного периода у *Triticum dicoccoides*. *Г.Ю. Чепурнов, Ч. Чэнь, А.Г. Блинов, В.М. Ефимов, Н.П. Гончаров*

Биоинформатика и системная биология

1288 ОБЗОР
Фреймовые математические модели – инструмент исследования молекулярно-генетических систем.
Ф.В. Казанцев, С.А. Лашин, Ю.Г. Матушкин (на англ. языке)

1295 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Компьютерное предсказание сети взаимодействий длинных некодирующих РНК и микроРНК кукурузы на основе транскриптома мутантной линии *fuzzy tassel*. *Ц. Янь, А.Ю. Пронозин, Д.А. Афонников*

1304 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Исследование инсектицидного и фунгицидного потенциала бактерий эндофитов пшеницы, сои и рапса методами биоинформатического анализа. *Т.Н. Лахова, А.И. Клименко, Г.В. Васильев, Е.Ю. Гырнец, А.М. Асатурова, С.А. Лашин*

Компьютерная геномика животных и человека

1318 ОБЗОР
Поиск генов домашнего хозяйства для анализа изменения экспрессии отдельных генов у *Macaca mulatta*.
М.В. Шульская, А.Х. Алиева, И.Р. Кумаков, М.И. Шадрина, П.А. Сломинский

1325 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Гены, представляющие стресс-зависимую компоненту при развитии артериальной гипертонии. *Д.Ю. Ощепков, Ю.В. Маковка, И.В. Чадаева, А.Г. Богомолов, Л.А. Федосеева, А.А. Серяпина, М.П. Пономаренко, А.Л. Маркель, О.Е. Редина*

Проблемы биотехнологии

1338 ОБЗОР
Решения проблем фолдинга белков для повышения эффективности дрожжевых биопродуцентов.
Н.В. Дорогова, С.А. Федорова (на англ. языке)

1348 ОБЗОР
Целлюлаза: основные свойства, природные источники и применение в промышленности. *А.В. Задорожный, Н.М. Слынько, С.В. Банникова, Н.В. Богачева, В.Н. Шляхтун, А.Р. Васильева, Е.Ю. Букатич, В.С. Ушаков, Ю.Е. Уварова, А.В. Коржук, А.А. Шипова, Д.В. Бочков, Е.Ю. Павлова, Д.О. Чесноков, С.Е. Пельтек*

1361 ОБЗОР
Селекция на отсутствие проантоцианидинов в зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.): молекулярно-генетический и технологический аспекты.
К.А. Молобекова, И.В. Тоцкий, Н.В. Трубачеева, О.Ю. Шоева

1369 Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2025 г.

© Сибирское отделение Российской академии наук, 2025
© Институт цитологии и генетики СО РАН, 2025
Вавиловский журнал генетики и селекции, 2025

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII • VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2025 • 29 • 8

Chromosome and gene engineering

1161 ORIGINAL ARTICLE
Study of the progeny of sorghum mutants obtained using the CRISPR/Cas9 genetic construct directed at inducing mutations in the α-kafirin *k1C5* gene. *L.A. Elkonin, G.A. Gerashchenkov, N.V. Borisenko, S.Kh. Sarsenova, V.M. Panin*

1169 ORIGINAL ARTICLE
Silencing of the *Nicotiana benthamiana* phytoendesaturase gene by root treatment of exogenous dsRNA. *T.S. Golubeva, V.A. Cherenko, E.A. Filipenko, I.V. Zhirnov, A.A. Ivanov, A.V. Kochetov*

1176 ORIGINAL ARTICLE
Effect of RNAi-mediated silencing of the *TaAOS2* gene on phytohormone accumulation, growth and productivity in bread wheat. *D.N. Miroshnichenko, A.V. Pigolev, E.A. Degtyaryov, V.I. Degtyaryova, V.V. Alekseeva, A.S. Pushin, S.V. Dolgov, T.V. Savchenko*

1184 ORIGINAL ARTICLE
Study of the influence of introgression from chromosome 2 of the A_t subgenome of cotton *Gossypium barbadense* L. during backcrossing with the original lines of *G. hirsutum* L. *M.F. Sanamyan, Sh.U. Bobokhujayev, Sh.S. Abdukarimov, J.S. Uralov, A.B. Rustamov*

Stress resistance in plants

1195 ORIGINAL ARTICLE
Intrapopulation changes in *Puccinia hordei* induced by two-component fungicides from different chemical classes. *M.S. Gvozdeva, O.A. Kudinova, V.D. Rudenko, G.V. Volkova*

1203 ORIGINAL ARTICLE
Effect of the biopesticide Novochizol on the expression of defense genes during wheat infection with stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *A.B. Shcherban, A.V. Razuvaeva, E.S. Skolotneva, V.V. Fomenko*

1213 ORIGINAL ARTICLE
Differential expression profile of DREB2 subfamily transcription factor genes in the dynamics of salt stress and post-stress recovery in tomato plants. *M.A. Filyushin, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva*

1221 ORIGINAL ARTICLE
SmartCrop: knowledge base of molecular genetic mechanisms of rice and wheat adaptation to stress factors. *P.S. Demenkov, T.V. Ivanisenko, M.A. Kleshchev, E.A. Antropova, I.V. Yatsyk, A.R. Volyanskaya, A.V. Adamovskaya, A.V. Maltseva, A.S. Venzel, H. Chao, M. Chen, V.A. Ivanisenko*

Molecular markers in genetics and breeding

1235 ORIGINAL ARTICLE
Validation of markers for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* loci on barley chromosomes 3H, 4H, and 6H in the polygenic inheritance of the trait. *O.S. Afanasenko, N.V. Mironenko, N.M. Lashina, I.V. Rozanova, E.I. Kyrova, Yu.S. Nikolskaya, A.A. Zubkovich*

1246 ORIGINAL ARTICLE
Identification of *CtE1* gene nucleotide polymorphisms and development of SNP-based KASP markers in guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *L. Criollo Delgado, D. Zewude, D.S. Karzhaev, D.E. Polev, E.K. Potokina*

Plant genome structure and evolution

1255 ORIGINAL ARTICLE
Using a wheat line with wild emmer genetic material to improve modern *Triticum aestivum* L. varieties by a complex of economically useful traits. *O.A. Orlovskaya, K.K. Yatsevich, L.V. Milko, N.M. Kaznina, N.I. Dubovets, A.V. Kilchevsky*

1267 ORIGINAL ARTICLE
Flax transposons: unraveling their impact on domestication and agronomic trait variation. *M.A. Duk, V.A. Stanin, A.A. Kanapin, A.A. Samsonova, T.A. Rozhmina, M.G. Samsonova*

1277 ORIGINAL ARTICLE
The influence of allelic variants of the *Vrn-A1* gene on the duration of the vegetation period in *Triticum dicoccoides*. *G.Yu. Chepurnov, Z. Chen, A.G. Blinov, V.M. Efimov, N.P. Goncharov*

Bioinformatics and systems biology

1288 REVIEW
Frame-based mathematical models – a tool for the study of molecular genetic systems.
F.V. Kazantsev, S.A. Lashin, Yu.G. Matushkin

1295 ORIGINAL ARTICLE
Computational prediction of the interaction network between long non-coding RNAs and microRNAs in maize based on the transcriptome of the *fuzzy tassel* mutant line.
J. Yan, A.Yu. Pronozin, D.A. Afonnikov

1304 ORIGINAL ARTICLE
Study of insecticidal and fungicidal potential of endophytic bacteria of wheat, soybean and rapeseed by bioinformatic analysis methods. *T.N. Lakhova, A.I. Klimenko, G.V. Vasiliev, E.Yu. Gyrnets, A.M. Asaturova, S.A. Lashin*

Computational genomics of animals and the human

1318 REVIEW
A housekeeping gene search to analyze expression changes of individual genes in *Macaca mulatta*. *M.V. Shulskaya, A.Kh. Alieva, I.R. Kumakov, M.I. Shadrina, P.A. Slominsky*

1325 ORIGINAL ARTICLE
Genes representing the stress-dependent component in arterial hypertension development. *D.Yu. Oshchepkov, Yu.V. Makovka, I.V. Chadaeva, A.G. Bogomolov, L.A. Fedoseeva, A.A. Seryapina, M.P. Ponomarenko, A.L. Markel, O.E. Redina*

Issues in biotechnology

1338 REVIEW
Overcoming the problem of heterologous proteins folding to improve the efficiency of yeast bioproducers.
N.V. Dorogova, S.A. Fedorova

1348 REVIEW
Cellulases: key properties, natural sources, and industrial applications.
A.V. Zadorozhny, N.M. Slynko, S.V. Bannikova, N.V. Bogacheva, V.N. Shlyakhtun, A.R. Vasilieva, E.Yu. Bukatich, V.S. Ushakov, Yu.E. Uvarova, A.V. Korzhuk, A.A. Shipova, D.V. Bochkov, E.Y. Pavlova, D.O. Chesnokov, S.E. Peltek

1361 REVIEW
Breeding for the absence of proanthocyanidins in grain of barley (*Hordeum vulgare* L.): molecular genetic and technological aspects.
C.A. Molobekova, I.V. Totsky, N.V. Trubacheeva, O.Yu. Shoeva

1369 Alphabetical author index for the list of papers published in the journal in 2025

© Siberian Branch RAS, 2025
© Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 2025

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1161-1168

doi 10.18699/vjgb-25-122

Исследование потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене α-кафирина *k1C5*

Л.А. Эльконин [1], Г.А. Геращенков [2], Н.В. Борисенко [1], С.Х. Сарсенова [1], В.М. Панин [1]

[1] Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия
[2] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

lelkonin@gmail.com

Аннотация. Сайт-направленный мутагенез посредством генетических конструкций, несущих систему CRISPR/Cas, считается эффективной технологией, активно применяемой для решения самых разных задач генетики и селекции у многих возделываемых культур. Зерновое сорго – уникальная по своей засухоустойчивости и жаростойкости злаковая культура, служащая источником кормов и пищевого зерна в аридных регионах земного шара, приобретающая все большее значение в условиях глобального потепления климата. Одной из основных задач селекции сорго является улучшение сравнительно низкой питательной ценности зерна, обусловленной в том числе устойчивостью его запасных белков – кафиринов – к протеолитическому расщеплению. Нами ранее путем использования технологии CRISPR/Cas у зернового сорго сорта Аванс были получены мутанты с улучшенной перевариваемостью кафиринов в системе *in vitro*. При этом в качестве мишени был выбран один из членов генного семейства, кодирующего 22 кДа α-кафирин, а именно ген *k1C5*. Цель данного исследования – изучение потомства полученных нами ранее растений, несущих мутации в гене *k1C5*, отличающихся улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, а именно: анализ наследования высокой перевариваемости, проявления основных селекционно ценных признаков, а также выявление структуры нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α-кафирина у ряда растений из поколения T_0 и их потомства T_1. Обнаружено, что у четырех из шести изученных растений T_0, а также у их потомства присутствует одна и та же мутация: замена T→C в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, кодирующей сигнальный полипептид, которая привела к замене кодирующего триплета CTC→CCC (Leu→Pro). Эта мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3′ от последовательности PAM. Высказывается предположение, что данная мутация могла возникнуть в результате ошибок нуклеазы Cas9, обусловленных наличием нескольких последовательностей PAM, расположенных близко друг к другу. Установлено, что потомство двух из трех изученных мутантов (семьи T_2 и T_3), выращенное в условиях опытного поля, отличалось от исходного сорта сниженной высотой растения (на 12.4–15.5 %). Длина цветоножки, масса 1000 зерен и масса зерна с метелки не отличались от исходного сорта, за исключением потомства мутанта 2C-1.2.5b, у которого урожай зерна с метелки был снижен. В отличие от исходного сорта, у растений из поколений T_2 и T_3 присутствовали зерновки с модифицированным типом эндосперма (полностью мучнистым, либо с вкраплениями стекловидного эндосперма, либо с тонким стекловидным слоем). Уровень перевариваемости белков зерна в потомстве мутантов 2C-2.1.1 № 13 и 2C-1.2.5a № 14 варьировал от 77 до 84 %, значимо превышая показатель исходного сорта (63.4 ± 2.3 %, $p < 0.05$). Уровень перевариваемости белков из зерновок с модифицированным эндоспермом был выше, чем у зерновок с обычным стекловидным эндоспермом (84–93 %, $p < 0.05$). Обсуждаются причины варьирования текстуры эндосперма у потомства полученных мутантов и ее связь с высокой перевариваемостью кафиринов.

Ключевые слова: *Sorghum bicolor*; CRISPR/Cas; альфа-кафирин; перевариваемость *in vitro*; эндосперм

Для цитирования: Эльконин Л.А., Геращенков Г.А., Борисенко Н.В., Сарсенова С.Х., Панин В.М. Исследование потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене α-кафирина *k1C5*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1161-1168. doi 10.18699/vjgb-25-122

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 24-16-00063.

Study of the progeny of sorghum mutants obtained using the CRISPR/Cas9 genetic construct directed at inducing mutations in the α-kafirin *k1C5* gene

L.A. Elkonin [1], G.A. Gerashchenkov [2], N.V. Borisenko [1], S.Kh. Sarsenova [1], V.M. Panin [1]

[1] Federal Centre of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia
[2] Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

lelkonin@gmail.com

© Эльконин Л.А., Геращенков Г.А., Борисенко Н.В., Сарсенова С.Х., Панин В.М., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. Site-directed mutagenesis using genetic constructs carrying the CRISPR/Cas system is an effective technology that is actively used to solve a variety of problems in plant genetics and breeding. One of these problems is to improve the nutritional value of grain sorghum, a high-yielding heat- and drought-tolerant cereal crop that is becoming increasingly important in the conditions of climate aridization. The main reason for the relatively low nutritional value of sorghum grain is the resistance of its storage proteins, kafirins, to proteolytic digestion. We have previously obtained mutants with improved kafirin *in vitro* digestibility using the CRISPR/Cas technology in grain sorghum variety Avance. The nucleotide sequence of one of the genes (*k1C5*) of the gene family encoding the signal polypeptide of 22 kDa α-kafirin was used as a target. The aim of this study was to investigate the manifestation of the main agronomically-important traits in the progeny of these mutants and inheritance of high *in vitro* protein digestibility, and also sequencing nucleotide sequences encoding the 22 kDa α-kafirin signal polypeptide in a number of plants from the T_0 generation and their T_1 progeny. It was revealed that four of the six studied T_0 plants, as well as their progeny, had the same mutation: a T→C substitution in the 23rd position of the nucleotide sequence of the *k1C5* gene encoding the signal polypeptide, which led to a substitution of the coding triplet CTC→CCC (Leu→Pro). This mutation is located off-target, 3′ from the PAM sequence. It is suggested that this mutation may have arisen as a result of Cas9 nuclease errors caused by the presence of multiple PAM sequences located close to each other. It was found that the progeny of two of the three studied mutants (T_2 and T_3 families), grown in the experimental field conditions, differed from the original variety by a reduced plant height (by 12.4–15.5 %). The peduncle length, 1,000-grain mass, and grain mass per panicle did not differ from the original variety, with the exception of the progeny of the 2C-1.2.5b mutant, which had a reduced grain yield per panicle. Unlike the original variety, plants from the T_2 and T_3 generations had kernels with a modified type of endosperm (completely floury, or floury with inclusions of vitreous endosperm, or with a thin vitreous layer). The level of grain protein digestibility in the progeny of mutants 2C-2.1.1 #13 and 2C-1.2.5a #14 varied from 77 to 84 %, significantly exceeding the original variety (63.4 ± 2.3 %, $p < 0.05$). The level of protein digestibility from kernels with modified endosperm was higher than that of kernels with normal vitreous endosperm (84–93 %, $p < 0.05$). The reasons for the variation in endosperm texture in the progeny of the mutants and its relationship with the high digestibility of kafirins are discussed.

Key words: *Sorghum bicolor*; CRISPR/Cas; alfa-kafirins; *in vitro* protein digestibility; endosperm

For citation: Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A., Borisenko N.V., Sarsenova S.Kh., Panin V.M. Study of the progeny of sorghum mutants obtained using the CRISPR/Cas9 genetic construct directed at inducing mutations in the α-kafirin *k1C5* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1161-1168. doi 10.18699/vjgb-25-122

Введение

Внесение изменений в нуклеотидные последовательности генов посредством технологии геномного редактирования CRISPR/Cas – эффективный инструмент генетики и селекции растений (Zhu et al., 2020; Gao, 2021; Saini et al., 2023). За последние годы эта технология стала интенсивно использоваться у многих видов возделываемых растений, включая сорго – уникальную по своей засухоустойчивости и жаростойкости злаковую культуру, служащую источником кормов и пищевого зерна в аридных регионах земного шара. Хотя сорго считается трудно трансформируемым видом злаков, к настоящему времени появилось немало работ по редактированию его генома с помощью технологии CRISPR/Cas, обобщенных в ряде обзоров (Balakrishna et al., 2020; Parikh et al., 2021; Wong A.C.S. et al., 2022).

Одним из наиболее актуальных направлений селекции сорго является улучшение перевариваемости запасных белков зерна. Зерно сорго содержит значительное количество белка (в среднем 10–12 %, а в некоторых линиях до 16–18 %), представленного разными классами кафиринов (α, β, γ, δ), относящихся к спирторастворимым белкам – проламинам, которые составляют до 70–80 % от общего содержания белка, и некафириновых белков (альбуминов, глобулинов, глютелинов), состав которых слабо изучен (Bean et al., 2018). Разные классы кафиринов различаются по молекулярной массе, аминокислотному составу и кодируются разными генами. Важная особенность кафиринов – устойчивость к протеолитическому расщеплению, в результате чего уровень перевариваемости белков зерна в системе *in vitro* у подавляющего большинства сортов и гибридов не превышает 40–60 % (Wong J.H. et al., 2010; Elkonin et al., 2013; Duressa et al., 2018). Такая устойчивость кафиринов к протеолитическому расщеплению снижает не только их усвояемость животными и человеком, но и перевариваемость крахмала, содержание которого в зерне составляет в среднем 70–72 %, поскольку непереваренные кафирины препятствуют полному амилолитическому расщеплению крахмальных гранул (Zhang, Hamaker, 1998; Ezeogu et al., 2005; Wong J.H. et al., 2009).

Устойчивость кафиринов к расщеплению протеазами имеет многофакторную природу (Belton et al., 2006; Duressa et al., 2018). К числу таких факторов относятся: химическая структура кафиринов, которые богаты серосодержащими аминокислотами (особенно γ- и β-кафирины), способными к формированию внутри- и межмолекулярных сшивок и препятствующими, как считается, протеолитическому расщеплению кафиринов; взаимодействие кафиринов с полифенолами, ингибирующими активность протеаз. Важным фактором является пространственная организация разных кафиринов в белковых тельцах клеток эндосперма. На ранних стадиях развития эндосперма происходит синтез γ- и β-кафиринов, которые депонируются в белковых тельцах, развивающихся в эндоплазматическом ретикулюме. Альфа-кафирин, синтезирующийся на более поздних этапах эндоспермогенеза, располагается внутри белковых телец, отодвигая γ-кафирин к периферии, который образует «кожух», трудноперевариваемый протеазами (De Mesa-Stonestreet et al., 2010; Duressa et al., 2018).

В результате исследования мутантов с нарушенным синтезом кафиринов, полученных с помощью РНК-интерференции (Elkonin et al., 2021), было установлено, что частичное блокирование синтеза кафиринов значительно улучшает перевариваемость белков зерна и способствует синтезу других белков, с более высокой питательной цен-

ностью. В этой связи направленная индукция мутаций в генах, кодирующих синтез кафиринов, может способствовать получению новых линий сорго с улучшенной перевариваемостью белков зерна, которые, в отличие от линий, несущих генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга, будут лишены трансгенов.

За последние годы опубликовано несколько работ, в которых сообщалось об успешном редактировании генов α-, β- и γ-кафиринов (Li A. et al., 2018; Massel et al., 2022, 2023; Elkonin et al., 2023; Li X. et al., 2024). В большинстве этих работ в качестве мишеней были использованы нуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальные полипептиды, ответственные за депонирование α- и γ-кафиринов в белковых тельцах клеток эндосперма (Li A. et al., 2018; Elkonin et al., 2023; Li X. et al., 2024). Эти мутанты имели улучшенную перевариваемость белков зерна, в отличие от мутантов с мутациями в структуре гена β-кафирина (Massel et al., 2023).

Целью настоящего исследования было изучение потомства полученных нами ранее растений, несущих мутации в гене *k1C5*, отличающихся улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, а именно: анализ наследования высокой перевариваемости, проявления основных селекционно ценных признаков, а также выявление структуры нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α-кафирина.

Материалы и методы

Материал и условия выращивания. В работе исследовали потомство растений T_1 с высокой перевариваемостью белков эндосперма из потомства мутантов T_0 2C-2.1.1: № 11 (86.6 % перевариваемости), № 13 (86.7 %); T_0 2C-1.2.5a: № 11 (92.4 %), № 14 (77.3 %); T_0 2C-1.2.5b: № 14 (91.8 %). Эти мутанты были получены в экспериментах по геномному редактированию у зернового сорго сорта Аванс с использованием созданного нами ранее бинарного вектора p2C, содержащего ген эндонуклеазы *Cas9* и гидРНК, направленную на индукцию мутаций в нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α-кафирина (Elkonin et al., 2023). Отобранные растения T_1 с высокой перевариваемостью не содержали генетической конструкции CRISPR/Cas (Elkonin et al., 2023). Исследуемые потомства (поколения T_2, T_3) выращивали на опытном участке Селекционного комплекса Федерального аграрного научного центра Юго-Востока (г. Саратов) в 4-метровых рядах с междурядьями 70 см, с густотой стояния 6 растений на 1 м. Метелки всех растений тщательно изолировали пергаментными изоляторами до начала цветения. Анализировали следующие признаки: высоту растения, длину цветоножки, массу 1000 зерен, урожай зерна с метелки, тип эндосперма, перевариваемость белков зерна в системе *in vitro*. В каждой семье определяли среднее значение признака для 10–20 растений.

Перевариваемость белков зерна в системе *in vitro*. Для изучения перевариваемости белков зерна использовали метод обработки пепсином цельносмолотой муки (Aboubacar et al., 2001; Wong J.H. et al., 2009). При этом 60 мг навеску муки инкубировали в 1 мл 0.15 % раствора пепсина (Sigma-Aldrich, P7000; 250 ед./мг) в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 2.0) при 37 °C на шейкере (70 об/мин).

Для количественной оценки перевариваемости применяли метод, основанный на сканировании электрофоретических спектров белков, полученных в SDS-PAGE (Aboubacar et al., 2001; Nunes et al., 2004; Wong J.H. et al., 2009; Elkonin et al., 2013). Для этой цели образцы муки после переваривания пепсином, а также контрольные образцы, инкубировавшиеся в калий-фосфатном буфере без добавления пепсина, центрифугировали при 13 000 об/мин. Осадок инкубировали в экстракционном буфере (0.0125M $Na_2B_4O_7$, pH 10.0) в редуцирующих условиях (1 % SDS, 2 % 2-меркаптоэтанол) при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего кипятили (100 °C) в течение 5 мин. Образцы центрифугировали при 13 000 об/мин и разделяли с помощью SDS-PAGE в 12.5 % (w/v) полиакриламидном геле в соответствии с модифицированным методом Лэммли (Laemmli, 1970). В каждую дорожку вносили по 15 мкл экстракта. Разделение контролировали с использованием маркеров молекулярной массы белка, 10–200 кДа (Servicebio, G2058, Ухань, Хубэй, Китай). Гели окрашивали кумасси R-250. После электрофореза гели сканировали с помощью системы ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США), а количество белка оценивали с помощью программного обеспечения Image Lab 6.1 (Bio-Rad). Показатели перевариваемости рассчитывали как процентное отношение объема белка в переваренном образце к объему белка в контрольном образце. В качестве стандарта высокой перевариваемости *in vitro* использовали ранее полученный мутант Аванс-1/18 с генетической конструкцией для РНК-сайленсинга гена *gKAF1* (Elkonin et al., 2021). Эксперименты были выполнены в двух повторениях.

Текстуру эндосперма определяли на поперечных сколах зрелых зерновок, которые делали с помощью острого скальпеля. Выделяли следующие типы эндосперма: обычный с толстым стекловидным слоем и модифицированный, к которому относили мучнистый, мучнистый с вкраплениями стекловидного эндосперма и мучнистый с тонким ободком стекловидного слоя. С каждого растения анализировали по 40 зерновок.

Секвенирование нуклеотидной последовательности гена *k1C5*. Для выявления мутаций ПЦР-ампликоны гена *k1C5* (праймеры F: 5′-TTGCCAGGGCTAGTTGACTG-3′ и R: 5′-AGGCTTTGATCCACATGAGCA-3′) клонировали в вектор pAL2-T («Евроген», Россия). Секвенирование по Сэнгеру было проведено ООО «Синтол» на генетическом анализаторе ABI 3130 (секвенирующий праймер: 5′-TTG CCAGGGCTAGTTGACTG-3′). Мутации в секвенированных ампликонах выявляли с помощью компьютерных программ Chromas (https://www.technelysium.com.au) и SnapGene Viewer 5.2.4 (https://www.snapgene.com).

Методы биологической статистики. Для оценки различий исследуемых образцов по перевариваемости белков в системе *in vitro* проводили дисперсионный анализ с использованием пакета программ АГРОС, версия 2.09 (С.П. Мартынов, ИОГен РАН), и теста множественных сравнений Дункана. Различия по проявлению морфометрических признаков между семьями мутантов и исходным сортом оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α-кафирина

Секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α-кафирина одного из членов генного семейства *k1C* (*k1C5*), у двух растений из потомства мутанта T_0 2C-2.1.1, № 2 и 11 (поколение T_1), отличающихся улучшенной перевариваемостью белков эндосперма (86 и 87 % соответственно), показало, что они имеют одну и ту же мутацию: замену 23-го нуклеотида, считая от 5′-конца нуклеотидной последовательности сигнального полипептида (в F-цепи: T→C, в R-цепи: A→G) (рис. 1, *б*, *в*). Секвенирование аналогичной последовательности у исходного мутанта выявило наличие такой же мутации и у родительского растения T_0 (см. рис. 1, *а*). Согласно *in silico* анализу, эта мутация ведет

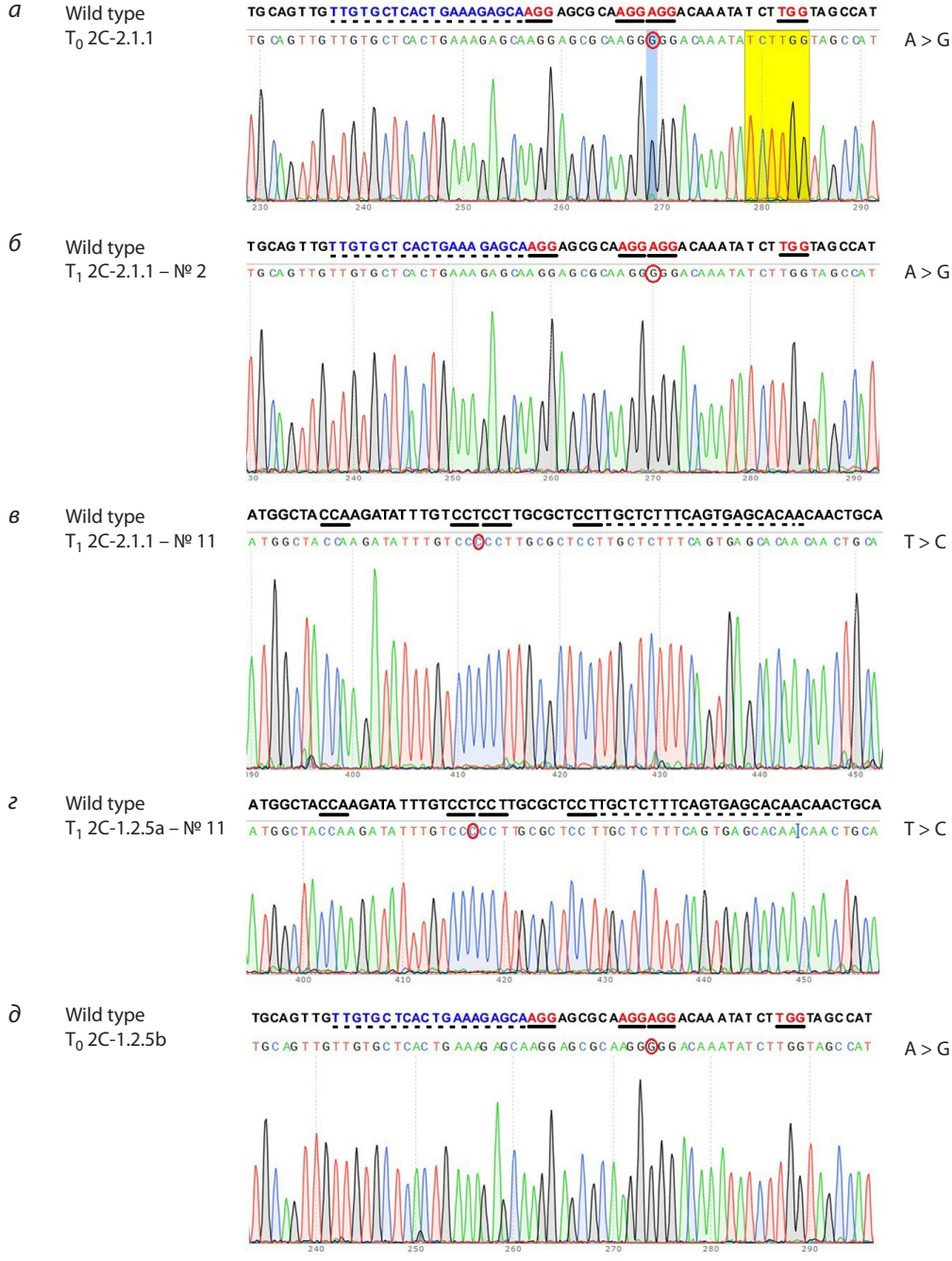


Рис. 1. Результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей, кодирующих сигнальные полипептиды 22 кДа α-кафирина, у растений T_0 2C-2.1.1 (*а*) и его потомства T_1 2C-2.1.1 № 2 (*б*) и T_1 2c-2.1.1 № 11 (*в*), T_1 2C-1.2.5a № 11 (*г*), T_0 2C-1.2.5b (*д*).

а, *б*, *д* – R-цепь; *в*, *г* – F-цепь. Последовательности PAM подчеркнуты сплошной линией; последовательность мишени – штриховой. Нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный полипептид 22 кДа α-кафирина, взята с сайта https://phytozome.jgi.doe.gov: Sobic.005G193100, Chr05: 67654898–67655764.

к замене кодирующего триплета CTC→CCC, что должно привести к мутации восьмой аминокислоты сигнального полипептида α-кафирина, а именно замещению лейцина, алифатической неполярной гидрофобной аминокислоты, на пролин – гетероциклическую, менее гидрофобную аминокислоту, вызывающую изгиб α-спирали белка. Такая замена могла изменить структурные и функциональные свойства полипептида и, как следствие, характер депонирования α-кафирина в белковых тельцах и тем самым повлиять на их перевариваемость.

Секвенирование аналогичного ампликона у одного из растений T_1 из потомства другого мутанта T_0 2C-1.2.5a – № 11, отличающегося улучшенной перевариваемостью белков (92 %), также показало наличие мутации T→C в том же сайте нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид (см. рис. 1, *г*). Эта же мутация была выявлена нами в результате секвенирования ДНК другого растения T_0 2C-1.2.5b (см. рис. 1, *д*), регенерированного из того же каллуса, что и 2C-1.2.5a. Ранее эта же мутация была обнаружена нами у растения T_0 2C-1.2.9, тогда как у двух других растений T_0 (1C-2.1.1 и 2C-1.2.4) мутация отсутствовала (Elkonin et al., 2023).

Таким образом, у четырех из шести изученных растений T_0 присутствует одна и та же мутация: замена T→C в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, и эта мутация наследуется в поколении T_1.

Проявление селекционно ценных признаков

Анализ проявления основных селекционно ценных признаков у потомства мутантов с улучшенной перевариваемостью белков эндосперма, полученных нами ранее (Elkonin et al., 2023), показал, что в поколении T_2 у двух из них, 2C-1.2.5a и 2C-1.2.5b (семьи 203/23 и 200/23), высота растения была значимо снижена по сравнению с исходным сортом Аванс – на 12.4–15.5 % соответственно (табл. 1). Сниженная высота растений у мутанта 2C-1.2.5a наследовалась и в поколении T_3 (на 5.5 %, семья 208/23). Длина цветоножки (выдвинутость подметельчатого междоузлия) не различалась у потомства мутантов и исходного сорта Аванс. Масса 1000 зерен и масса зерна с метелки у всех семей также не отличались от исходного сорта, за исключением потомства мутанта 2C-2.1.1 (семья T_2 195/23), выделявшегося более крупными и тяжелыми зерновками, и потомства мутанта 2C-1.2.5b (семья T_2 200/23), у которого была снижена масса зерна с метелки. У растений всех изученных семей большинство зерновок имели эндосперм обычного стекловидного типа, характерного для исходного сорта Аванс. Однако почти во всех семьях присутствовали растения, у которых наблюдались зерновки с мучнистым эндоспермом либо с размытым или тонким стекловидным слоем (рис. 2), т. е. с типами эндосперма, характерными для мутантов с нарушенным синтезом кафиринов (Elkonin et al., 2021). Доля таких зерновок у

Таблица 1. Проявление селекционно ценных признаков в потомстве мутантов сорго, полученных с помощью генетической конструкции CRISPR/Cas, направленной на индукцию мутаций в гене 22 кДа α-кафирина (*k1C5*)

Мутант T_0	Потомство					
	Поколение, семья	Высота, см	Длина цветоножки, см	Тип эндосперма[1]	M_{1000}, г	Масса зерна с метелки, г
Аванс	191/23	133.1 ± 2.0	13.2 ± 1.4	Стекловидный (100 %)	32.8 ± 1.4	32.6 ± 3.1
2C-2.1.1	T_2: 195/23	132.7 ± 3.0	14.1 ± 1.2	Стекловидный; модифицированный (до 4 %)	37.4 ± 0.6*	31.3 ± 2.7
	T_3: 197/23	126.5 ± 2.9	13.9 ± 1.0	Стекловидный; модифицированный (до 24–43 %)	34.6 ± 1.5	27.3 ± 3.2
2C-1.2.5a	T_2: 203/23	116.6 ± 1.2**	15.4 ± 0.6	Стекловидный; модифицированный (до 6–10 %)	31.3 ± 1.3	27.0 ± 2.1
	T_3: 208/23	125.8 ± 2.3*	14.3 ± 0.7	Стекловидный; модифицированный (до 19–71 %)	34.9 ± 1.7	27.7 ± 2.9
2C-1.2.5b	T_2: 200/23	112.5 ± 4.6**	12.8 ± 1.0	Стекловидный; модифицированный (до 5–9 %)	30.9 ± 1.4	26.6 ± 1.3*

*, ** Отличается от исходного сорта Аванс при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно. [1] Представлена доля зерновок со стекловидным или модифицированным типом эндосперма (мучнистым или с размытым или тонким стекловидным слоем) у разных растений из семьи.

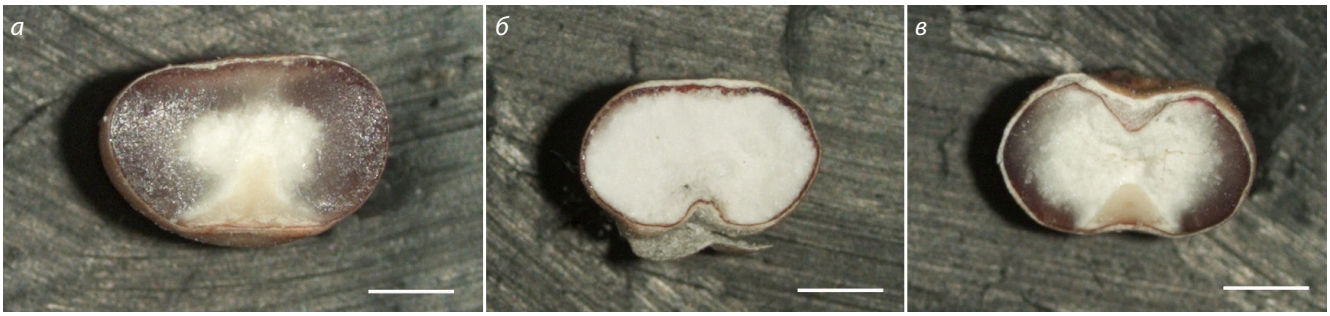


Рис. 2. Поперечные срезы зерновок мутанта 2C-1.2.5a (растения из семьи 208/13):

а – обычный стекловидный эндосперм; *б* – мучнистый эндосперм; *в* – эндосперм с размытым стекловидным слоем. Шкала 1 мм.

некоторых растений из семей 197/23 (поколение T_3 мутанта 2C-2.1.1) и 208/23 (T_3 мутанта 2C-1.2.5a) достигала 35–40 % (см. табл. 1). Нередко такие зерновки имели меньший размер по сравнению с зерновками с обычным стекловидным эндоспермом.

Анализ перевариваемости белков зерна у потомства мутантов 2C-2.1.1 № 13 и 2C-1.2.5a № 14 (оба из T_1) показал, что повышенные значения этого признака, по сравнению с исходным сортом Аванс, проявлялись у растений из поколений T_2 и T_3 (рис. 3). Так, в потомстве мутанта 2C-2.1.1 № 13 (табл. 2, семьи T_2 195/23 и T_3 197/23), а также мутанта 2C-1.2.5a № 14 (семья T_3 208/23) уровень перевариваемости достигал 77–84 %, превышая показатель исходного сорта на 10–20 % ($p < 0.05$). При этом значимо более высокий уровень перевариваемости наблюдался у зерновок с обычным стекловидным типом эндосперма, характерным для исходного сорта. В то же время уровень перевариваемости белков из зерновок с мучнистым или размытым стекловидным эндоспермом был значительно выше, чем у зерновок с обычным стекловидным эндоспермом, достигая 84–93 % у отдельных растений T_3 и значительно превышая уровень перевариваемости исходного сорта ($p < 0.05$), у которого такие зерновки отсутствовали.

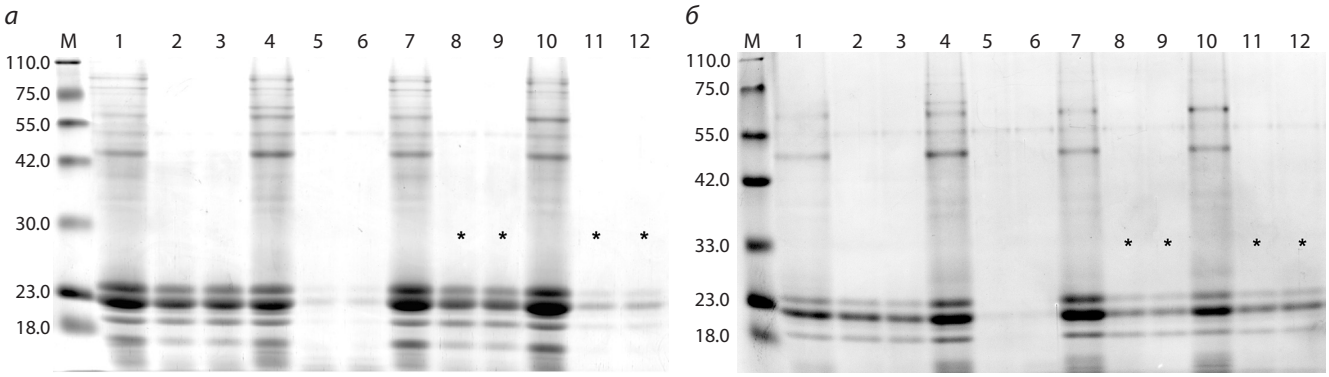


Рис. 3. Электрофоретические спектры белков муки из зерновок растений сорго из разных поколений мутанта 2C-2.1.1, полученного путем сайт-направленного мутагенеза гена *k1C5*.

а – растение № 197-9/23 из поколения T_3 (дорожки 7–12) (эксперимент 03.09-2, см. табл. S1 Приложения[1]); *б* – растение № 195-3/23 из поколения T_2 (дорожки 7–12) (эксперимент 13.08-1, см. табл. S1). На обеих пластинах: 1–3 – исходный сорт Аванс; 4–6 – мутант с РНК-сайленсингом гена *gKAF1* (Elkonin et al., 2021) (стандарт высокого уровня перевариваемости белков *in vitro*); 7–9 – зерновки с обычным стекловидным эндоспермом; 10–12 – зерновки с мучнистым эндоспермом; 1, 4, 7, 10 – контрольные образцы (без обработки пепсином); 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12 – образцы после обработки пепсином (по две повторности для каждого образца); M – маркеры молекулярной массы (Servicebio, G2058). Спектры образцов, отличающиеся значимо более высокой перевариваемостью по сравнению с сортом Аванс (см. табл. 2, табл. S1), отмечены звездочками.

Таблица 2. Перевариваемость в системе *in vitro* белков муки из зерновок с различными типами эндосперма у некоторых растений из потомства мутантов сорго, полученных с помощью направленного мутагенеза гена *k1C5*

Мутант	Растение, поколение	Перевариваемость белков (%) у зерновок с разным типом эндосперма	
		Обычный стекловидный	Мучнистый или размытый стекловидный
Аванс		63.4 ± 2.3	–
2C-1.2.5a, T_1 № 14, отбор в T_2 растения, выросшего из зерновки с размытым стекловидным эндоспермом	208-2/23, T_3	72.8*	79.5*
	208-11/23, T_3	84.3*	84.1*
	208-6/23, T_3	71.7 ns	84.8*
2C-1.2.5a, T_1 № 11	203-4/23, T_2	65.2 ns	–
2C-2.1.1, T_1 № 13	195-3/23, T_2	73.9*	76.1*
	195-4/23, T_2	71.3*	79.7*
	195-8/23, T_2	62.3 ns	73.9*
2C-2.1.1, T_1 № 13, отбор в T_2 растения, выросшего из зерновки с размытым стекловидным эндоспермом	197-9/23, T_3	68.6*	92.9*
	197-6/23, T_3	64.7 ns	81.0*
	197-11/23, T_3	77.1*	78.3*

Примечание. * Отличается от исходного сорта Аванс при $p < 0.05$ в соответствии с F-критерием (см. табл. S1); ns – нет значимых отличий от сорта Аванс при анализе соответствующего SDS-PAGE.

[1] Табл. S1 Приложения см. по адресу: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx44.pdf

Обсуждение

Технология CRISPR/Cas считается одним из наиболее эффективных инструментов для индукции мутаций в строго определенных локусах генома растений. Однако в некоторых случаях в точности редактирования нуклеотидных последовательностей генов при использовании системы CRISPR/Cas9 могут наблюдаться сбои (Sturme et al., 2022; Guo et al., 2023; Movahedi et al., 2023).

В наших экспериментах у четырех из шести изученных растений T_0 присутствует одна и та же мутация: замена T→C в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*. Мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3′ от последовательности PAM (protospacer-adjacent motif), и, соответственно, является нецелевой. Тщательный анализ нуклеотидной последовательности данной области гена *k1C5* показал наличие нескольких сайтов PAM, расположенных близко друг к другу: два 5′-AGG и один 5′-TGG (см. рис. 1). Не исключено, что из-за такой близости нуклеаза Cas9 могла допускать ошибки и вносить разрывы между двумя сайтами PAM: AGG ↓ AGG. Следовательно, одной из причин возникновения нецелевых мутаций, как показывают наши данные, может быть значительное число близко расположенных PAM-сайтов. Подобные примеры нецелевой активности Cas9, при которой мутация возникает в целевом гене, но вне выбранной мишени, были обнаружены ранее при редактировании гена *Phytoene desaturase* (*PDS*) у двух сортов маниока (*Manihot esculenta* Crantz) (Odipio et al., 2017). Примечательно, что в другой работе на сорго по редактированию нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид гена γ-кафирина, с помощью генетической конструкции CRISPR/Cas9 мутации возникали не в каноническом сайте, между 3-м и 4-м нуклеотидами в направлении 5′ от PAM, а после 15-го нуклеотида мишени и за ее пределами в направлении 5′ от PAM-сайта, но внутри целевого гена (Li X. et al., 2024). Эти факты ставят вопрос о точности геномного редактирования при использовании нуклеазы Cas9 у сорго.

Другим важным моментом, заслуживающим обсуждения, является снижение уровня перевариваемости кафиринов у потомства полученных нами мутантов. Ранее мы обнаружили значительное повышение уровня перевариваемости белков зерна у ряда мутантов в поколении T_1: до 80–87 % у мутанта 2C-2.1.1, до 86 и 92 % у мутантов 2C-1.2.5b и 2C-1.2.5a соответственно (Elkonin et al., 2023). В поколении T_3 уровень перевариваемости снизился до 68–74 % у мутанта 2C-2.1.1 и 72–84 % у мутанта 2C-1.2.5a, значимо превосходя, однако, аналогичный показатель у исходного сорта Аванс (см. табл. 2, табл. S1). У растений из потомства мутанта 2C-1.2.5b значимые отличия от сорта Аванс отсутствовали.

Возможной причиной такого снижения перевариваемости могут быть разные условия выращивания растений: поколение T_1 выращивали в климатической камере в условиях регулярного полива и повышенной влажности воздуха, тогда как растения T_3 – на делянке опытного поля. Известно, что в условиях стресса засухи перевариваемость белков зерна сорго значительно снижается (Impa et al., 2019). Кроме того, нельзя исключать возможное компенсаторное повышение экспрессии других генов, контролирующих синтез кафиринов, которое приводило к восстановлению их содержания и снижению уровня перевариваемости белков зерна. Такое компенсаторное повышение содержания γ-кафирина было обнаружено ранее у мутантов сорго с нарушенным синтезом β-кафирина; оно восстанавливало общий баланс кафиринов в зерне и не приводило к улучшению показателя перевариваемости (Massel et al., 2023).

Особый интерес вызывает варьирование текстуры эндосперма у мутантов из разных поколений. У растений T_0 наблюдалось формирование зерновок с нарушенным развитием стекловидного эндосперма (Gerashchenkov et al., 2021). Такие зерновки характерны для мутантов сорго с частично подавленным синтезом кафиринов и высокой перевариваемостью белков (Duressa et al., 2018; Elkonin et al., 2021). В T_1 у растений формировались зерновки с нормально развитым стекловидным эндоспермом и высокой перевариваемостью белков, что представляло собой необычное явление, учитывая тесную корреляцию у сорго высокой перевариваемости и мучнистого эндосперма (Duressa et al., 2018). В поколениях T_2 и T_3 у растений из ряда семей вновь наблюдались зерновки с модифицированным типом эндосперма (мучнистым или с тонким стекловидным слоем по периферии зерновок), отличавшиеся значительно более высоким уровнем перевариваемости (см. табл. 2). В результате отбора таких зерновок нами были получены семьи T_3 208/23 и 197/23, растения которых содержали зерновки с нормальным стекловидным эндоспермом с более высокой, нежели у исходного сорта, уровнем перевариваемости белков. Такие вариации текстуры эндосперма, возможно, являются следствием влияния условий внешней среды на экспрессию индуцированной мутации, либо на модификацию типа эндосперма влияет другая мутация, которую мы пока не выявили. Более определенное заключение можно будет сделать в дальнейшем в результате дополнительных исследований.

Заключение

В результате исследования потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене *k1C5*, кодирующем синтез α-кафирина, нами выявлены две семьи T_3 – 208/23 и 197/23, растения которых содержали зерновки с нормальным стекловидным эндоспермом и с более высоким, нежели у исходного сорта, уровнем перевариваемости белков зерна (до 72–84 % в сравнении с 62–64 % у исходного сорта Аванс). Растения из этих семей не имеют значимых отличий по проявлению селекционно ценных признаков от исходного сорта, за исключением сниженной высоты (на 5–15 %), и не содержат генетической конструкции CRISPR/Cas. У четырех из шести изученных растений T_0 присутствует одна и та же мутация: замена T→C в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, и эта мутация наследуется в поколении T_1. Данная мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3′ от последовательности PAM, и может быть обусловлена неце-

левой активностью нуклеазы Cas9, при которой мутация возникает в целевом гене, но вне выбранной мишени вследствие наличия нескольких сайтов PAM, расположенных близко друг к другу.

Список литературы / References

Aboubacar A., Axtell J.D., Huang C.P., Hamaker B.R. A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines. *Cereal Chem*. 2001;78:160-165. doi 10.1094/CCHEM.2001.78.2.160

Balakrishna D., Singode A., Narasimham D., Venkatesh Bhat B. Current status and future prospects of genetic transformation and gene editing in sorghum. In: Tonapi V.A., Talwar H.S., Are A.K. (Eds) Sorghum in the 21st Century: Food – Fodder – Feed – Fuel for a Rapidly Changing World. Singapore: Springer, 2020;511-535. doi 10.1007/978-981-15-8249-3_21

Bean S.R., Ioerger B.P., Wilson J.D., Tilley M., Rhodes D., Herald T.J. Structure and chemistry of sorghum grain. In: Rooney W. (Ed.) Achieving Sustainable Cultivation of Sorghum. Vol. 2. 2018. doi 10.19103/as.2017.0015.21

Belton P.S., Delgadillo I., Halford N.G., Shewry P.R. Kafirin structure and functionality. *J Cereal Sci*. 2006;44:272-286. doi 10.1016/j.jcs.2006.05.004

De Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J Food Sci.* 2010;75:90-104. doi 10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x

Duressa D., Weerasoriya D., Bean S.R., Tilley M., Tesso T. Genetic basis of protein digestibility in grain sorghum. *Crop Sci*. 2018;58(6):2183-2199. doi 10.2135/cropsci2018.01.0038

Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Fadeeva I.Yu., Bychkova V.V., Kozhemyakin V.V. In vitro protein digestibility in grain sorghum: effect of genotype and interaction with starch digestibility. *Euphytica*. 2013;193:327-337. doi 10.1007/s10681-013-0920-4

Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh. RNAi-mutants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench with improved digestibility of seed storage proteins. In: Jimenez-Lopez J.C. (Ed.) Grain and Seed Proteins Functionality. London: Intech Open Ltd, 2021. doi 10.5772/intechopen.96204

Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A., Borisenko N.V., Sarsenova S.Kh., Panin V.M. Development of sorghum mutants with improved *in vitro* protein digestibility by CRISPR/Cas9 editing of kafirin genes. *The Crop J*. 2023;11:1411-1418. doi 10.1016/j.cj.2023.02.005

Ezeogu L.I., Duodu K.G., Taylor J.R.N. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the in vitro starch digestibility of sorghum and maize flours. *J Cereal Sci*. 2005;42:33-44. doi 10.1016/j.jcs.2005.02.002

Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*. 2021;184:1621-1635. doi 10.1016/j.cell.2021.01.005

Gerashchenkov G.A., Elkonin L.A., Gerashchenkov K.G., Rozhnova N.A., Hiekel S., Kumlehn J., Chemeris A.V. Binary vector construction for site-directed mutagenesis of kafirin genes in sorghum. *Amer J Plant Sci*. 2021;12:1276-1287. doi 10.4236/ajps.2021.128089

Guo C., Ma X., Gao F., Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1143157. doi 10.3389/fbioe.2023.1143157

Impa S.M., Perumal R., Bean S.R., Sunoj V.S.J., Jagadish S.V.K. Water deficit and heat stress induced alterations in grain physicochemical characteristics and micronutrient composition in field grown grain sorghum. *J Cereal Sci.* 2019;86:124-131. doi 10.1016/j.jcs.2019.01.013

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S., Zhang C., Angelovici R., Clemente T.E., Holding D.R. Editing of an alpha-kafirin gene family increases, digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiol*. 2018;177:1425-1438. doi 10.1104/pp.18.00200

Li X., Liu W., Wang G., Sai-Ming Sun S., Yuan L., Wang J. Improving digestibility of sorghum proteins by CRISPR/Cas9-based genome editing. *Food Energy Secur*. 2024;13:e506. doi 10.1002/fes3.506

Massel K., Lam Y., Hintzsche J., Lester N., Botella J.R., Godwin I.D. Endogenous U6 promoters improve CRISPR/Cas9 editing efficiencies in *Sorghum bicolor* and show potential for applications in other cereals. *Plant Cell Rep*. 2022;41:489-492. doi 10.1007/s00299-021-02816-z

Massel K., Hintzsche J., Restall J. CRISPR-knockout of β-kafirin in sorghum does not recapitulate the grain quality of natural mutants. *Planta*. 2023;257:8. doi 10.1007/s00425-022-04038-3

Movahedi A., Aghaei-Dargiri S., Li H., Zhuge Q., Sun W. CRISPR variants for gene editing in plants: biosafety risks and future directions. *Int J Mol Sci.* 2023;24:16241. doi 10.3390/ijms242216241

Nunes A., Correia I., Barros A., Delgadillo I. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *J Agric Food Chem*. 2004;52:2052-2058. doi 10.1021/jf0348830

Odipio J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D.A., Bart R., Taylor N.J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of *Phytoene desaturase* in Cassava. *Front Plant Sci*. 2017;8:1780. doi 10.3389/fpls.2017.01780

Parikh A., Brant E.J., Baloglu M.C. CRISPR/Cas-mediated genome editing in sorghum – recent progress, challenges and prospects. *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* 2021;57:720-730. doi 10.1007/s11627-021-10215-y

Saini H., Thakur R., Gill R., Tyagi K., Goswami M. CRISPR/Cas9-gene editing approaches in plant breeding. *GM Crops & Food.* 2023;14:1-17. doi 10.1080/21645698.2023.2256930

Sturme M.H.J., van der Berg J.P., Bouwman L.M.S., De Schrijver A., de Maagd R.A., Kleter G.A., Battaglia-de Wilde E. Occurrence and nature of off-target modifications by CRISPR-Cas genome editing in plants. *ACS Agric Sci Technol*. 2022;2:192-201. doi 10.1021/acsagscitech.1c00270

Wong A.C.S., Lam Y., Hintzsche J., Restall J., Godwin I.D. Genome editing towards sorghum improvement. In: Zhao K., Mishra R., Joshi R.K. (Eds) Genome Editing Technologies for Crop Improvement. Singapore: Springer Nature, 2022;295-321. doi 10.1007/978-981-19-0600-8_14

Wong J.H., Lau T., Cai N., Singh J., Pedersen J.F., Vensel W.H., Hurkman W.J., Wilson J.D., Lemaux P.G., Buchanan B.B. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J Cereal Sci*. 2009;49:73-82. doi 10.1016/j.jcs.2008.07.013

Wong J.H., Marx D.B., Jeff D., Wilson J.D., Buchanan B.B., Lemaux P.G., Pedersen J.F. Principal component analysis and biochemical characterization of protein and starch reveal primary targets for improving sorghum grain. *Plant Science.* 2010;179:598-611. doi 10.1016/j.plantsci.2010.08.020

Zhang G., Hamaker B.R. Low α-amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal Chem*. 1998;75:710-713. doi 10.1094/CCHEM.1998.75.5.710

Zhu H., Li C., Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21:661-677. doi 10.1038/s41580-020-00288-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 04.12.2024. После доработки 15.07.2025. Принята к публикации 28.07.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1169-1175

doi 10.18699/vjgb-25-123

Сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* с помощью корневой обработки экзогенной дцРНК

Т.С. Голубева[1, 2], В.А. Черенко[1], Е.А. Филипенко[1], И.В. Жирнов[1], А.А. Иванов[1, 3], А.В. Кочетов[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
[3] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
frolova@bionet.nsc.ru

Аннотация. РНК-интерференция – мощный инструмент для генного сайленсинга, благодаря чему используется при разработке новых подходов с большим потенциалом для защиты растений от вирусов, насекомых и других патогенов. Как правило, в таких системах геном растений подвергается модификациям с целью синтеза двуцепочечных РНК (дцРНК), необходимых для РНК-интерференции и последующего сайленсинга непосредственно в растительных клетках. Однако с учетом законодательства Российской Федерации такой подход не может использоваться на сельскохозяйственных растениях, что делает невозможным его применение при условии синтеза дцРНК самим растением. Применение экзогенно синтезированной дцРНК может стать перспективным способом защиты растений, так как позволяет избежать создания генетически модифицированных организмов и внедрить полученную разработку в сельском хозяйстве. Также экзогенные дцРНК имеют преимущество по сравнению с химикатами (фунгицидами, инсектицидами и т. д.), используемыми для защиты растений, так как дцРНК действуют посредством своей специфической нуклеотидной последовательности, что делает описанный подход крайне избирательным к патогену и безопасным для других организмов. В совокупности вышеперечисленные факторы делают методы РНК-интерференции весьма перспективными для применения в сельском хозяйстве с целью защиты растений, поэтому встает вопрос о крупномасштабном синтезе экзогенных молекул дцРНК, специфичных к определенному патогену, и выборе оптимального способа их доставки для достижения защитного эффекта. Целью настоящей работы является сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама (*Nicotiana benthamiana*) с применением экзогенно синтезированной дцРНК. Ген фитоендесатуразы – очень удобная модель в экспериментах по регуляции генной активности, так как его сайленсинг сопровождается ярким фенотипическим проявлением в виде побеления листьев. Синтез дцРНК осуществляли *in vivo* в клетках *Escherichia coli*; в качестве способа доставки выбрана корневая обработка через полив растения – максимально простые и доступные манипуляции. Предполагается, что предложенный подход может быть масштабирован и адаптирован для защиты растений в сельском хозяйстве с помощью методов, в основе которых лежит РНК-интерференция.

Ключевые слова: РНК-интерференция; генный сайленсинг; фитоендесатураза; экзогенная дцРНК; *Nicotiana benthamiana*; корневая обработка

Для цитирования: Голубева Т.С., Черенко В.А., Филипенко Е.А., Жирнов И.В., Иванов А.А., Кочетов А.В. Сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* с помощью корневой обработки экзогенной дцРНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1169-1175. doi 10.18699/vjgb-25-123

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FWNR-2022-0017).

Silencing of the *Nicotiana benthamiana* phytoendesaturase gene by root treatment of exogenous dsRNA

T.S. Golubeva[1, 2], V.A. Cherenko[1], E.A. Filipenko[1], I.V. Zhirnov[1], A.A. Ivanov[1, 3], A.V. Kochetov[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
frolova@bionet.nsc.ru

Abstract. RNA interference (RNAi) is a powerful tool for gene silencing. It has recently been used to design promising plant protection strategies against pests such as viruses, insects, etc. This generally requires modifying the plant genome to achieve *in planta* synthesis of the double-stranded RNA (dsRNA), which guides the cellular RNA interference machinery to silence the genes of interest. However, given Russian legislation, the approach in which

© Голубева Т.С., Черенко В.А., Филипенко Е.А., Жирнов И.В., Иванов А.А., Кочетов А.В., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

dsRNA is synthesized by the plant itself remains unavailable for crop protection. The use of exogenously produced dsRNA appears to be a promising alternative, allowing researchers to avoid genetic modification of plants, making it possible to implement potential results in agriculture. Furthermore, exogenous dsRNAs are superior to chemical pesticides (fungicides, insecticides, etc.), which are widely used to control various plant diseases. The dsRNA acts through sequence-specific nucleic acid interactions, making it extremely selective and unlikely to harm off-target organisms. Thus, it seems promising to utilize RNAi technology for agricultural plant protection. In this case, questions arise regarding how to produce the required amounts of pathogen-specific exogenous dsRNA, and which delivery method will be optimal for providing sufficient protection. This work aims to utilize exogenous dsRNA to silence the *Nicotiana benthamiana* phytoene desaturase gene. Phytoene desaturase is a convenient model gene in gene silencing experiments, as its knockdown results in a distinct phenotypic manifestation, namely, leaf bleaching. The dsRNA synthesis for this work was performed *in vivo* in *Escherichia coli* cells, and the chosen delivery method was root treatment through watering, both techniques being as simple and accessible as possible. It is surmised that the proposed approach could be adapted for broader use of RNAi technologies in agricultural crop protection.

Key words: RNA interference; gene silencing; phytoene desaturase; exogenous dsRNA; *Nicotiana benthamiana*; root treatment

For citation: Golubeva T.S., Cherenko V.A., Filipenko E.A., Zhirnov I.V., Ivanov A.A., Kochetov A.V. Silencing of the *Nicotiana benthamiana* phytoendesaturase gene by root treatment of exogenous dsRNA. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1169-1175. doi 10.18699/vjgb-25-123

Введение

Для защиты растений от патогенов и вредителей в сельском хозяйстве в больших количествах используются разнообразные химические пестициды. Такое интенсивное применение химикатов создает потенциальные риски для здоровья человека, полезных микроорганизмов и в целом для окружающей среды (Niehl et al., 2018). В связи с этим существует потребность в новых альтернативных методах борьбы с заболеваниями растений. Многообещающий новый подход с большим потенциалом для защиты растений от различных патогенов включает использование двуцепочечной РНК (дцРНК).

Применение дцРНК может иметь многочисленные преимущества по сравнению с использованием химических соединений. В отличие от химических соединений, которые редко обладают избирательным воздействием на конкретный организм или процесс, дцРНК действуют посредством своей специфической нуклеотидной последовательности. Таким образом, будучи сконструированными для воздействия на конкретную генную мишень патогена с гомологичной последовательностью, дцРНК и ее производные, малые интерферирующие РНК (миРНК), будут действовать только против предполагаемого патогена. Важно отметить, что, в отличие от химических пестицидов, агенты дцРНК являются биосовместимыми и биоразлагаемыми соединениями. Таким образом, использование дцРНК – значительно более гибкий и экологичный подход.

Однако широкое применение обработки дцРНК в сельском хозяйстве затруднено отсутствием эффективных и экономичных методов синтеза больших количеств этих дцРНК: основным подходом для получения дцРНК до сих пор был физический отжиг двух ферментативно синтезированных одноцепочечных РНК (оцРНК) *in vitro* (Laurila et al., 2002). Также на эффективность экзогенно-применяемой дцРНК в растениях может влиять несколько факторов: концентрация/доза и длина/размер дцРНК, способ применения, метод доставки, специфическая для органов растений активность и стабильность в неблагоприятных условиях окружающей среды. Эти факторы в конечном счете определяют скорость поглощения экзогенных дцРНК растительными клетками для запуска РНК-интерференции. С учетом всех перечисленных факторов существует необходимость разработки эффективного метода для крупномасштабного синтеза молекул дцРНК и выбора оптимального способа их доставки (Carthew, Sontheimer, 2009).

В настоящей статье мы предлагаем способ регуляции активности гена фитоендесатуразы табака *Nicotiana benthamiana* с помощью дцРНК, синтезированной в клетках *Escherichia coli*: корневая обработка растений грубым лизатом бактерий, содержащим целевую дцРНК, приводит к фотообесцвечиванию листьев растений через механизм РНК-интерференции.

Ген фитоендесатуразы кодирует ключевой фермент синтеза каротиноидов и часто используется в качестве модели при разработке новых подходов для регуляции активности генов, так как его сайленсинг имеет фенотипическое проявление в виде фотообесцвечивания листьев. Корневая обработка (полив) грубым лизатом позволяет масштабировать процесс обработки растений дцРНК и снизить время и ресурсы на доставку до минимума. Предполагается, что разработанный подход на модели гена фитоендесатуразы может быть применен для защиты сельскохозяйственных растений через регуляцию активности генов посредством РНК-интерференции.

Материалы и методы

Характеристика бактериального штамма. Использован штамм *E. coli* HT115 (DE3) [F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lacUV5 promoter – T7 polymerase) (IPTG-inducible T7 polymerase) (RNAse III minus)], являющийся дефицитным по РНКазе III, что делает его использование возможным для наработки дцРНК. Культивирование штамма проводили на стандартной жидкой LB среде или LB агаре с тетрациклином (12.5 мкг/мл).

Характеристика плазмиды L4440. Синтез дцРНК осуществлялся с помощью плазмиды L4440 (Plasmid #1654, Addgene, США). Особенность этой плазмиды – наличие двух сильных T7-промоторов в противоположных направлениях, благодаря чему она используется для наработки дцРНК фрагментов. Плазмида содержит ген устойчивости к ампициллину.

Подбор праймеров проводили с помощью ресурса Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi) по матрице мРНК гена фитоендесатуразы *N. benthamiana.* Выбранные варианты праймеров были проверены на наличие шпилек, само- и гетеродимеров с применением инструмента OligoAnalyzer (https://eu.idtdna.com/calc/analyzer). В результате были синтезированы праймеры: прямой 5′-GGCACTCAACTTTATAAACC-3′ и обратный 5′-CTTCAGTTTTCTGTCAAACCATATATG GAC-3′ («Синтол», Россия).

Получение кДНК. Выделение мРНК осуществляли с применением набора RNeasy Plant (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Полученный образец РНК анализировали на РНК-анализаторе Bioanalyzer Instrument 2100 (ЦКП «Геномика» СО РАН). Обратную транскрипцию выполняли с помощью набора BiolabMix R01-250 (Биолабмикс, Россия), для наработки фрагментов использовали набор HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс), амплификацию проводили в приборе Bio-Rad IQ (Bio-Rad, США).

Клонирование фрагмента гена *pds* выполняли в два этапа. Сначала продукт амплификации, фрагмент гена *pds*, был клонирован в промежуточный Т-вектор pCR2.1 (Invitrogen, США). Колонии бактерий, содержащие фрагмент гена, сначала отбирали методом бело-голубой селекции. Окончательный отбор клонов осуществляли по наличию полного фрагмента гена в спектрах рестрикции после обработки эндонуклеазой *Eco*RI.

Клонирование в конечный вектор L4440 выполняли лигазно-рестриктазным методом с использованием эндонуклеаз рестрикции *Pst*I и *Nco*I. Для этого соответствующие сайты рестрикции были введены в состав фрагмента гена *pds* при его амплификации (эти же сайты имеются в структуре вектора L4440). Отбор рекомбинантных клонов *E. coli* проводили на селективной среде, содержащей ампициллин. Для проверки наличия фрагмента гена *pds* в составе вектора L4440 выполняли ПЦР с использованием специфичных для гена *pds* праймеров. Окончательное наличие фрагмента гена *pds* и его нуклеотидную последовательность подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Трансформация штамма *E. coli* HT115 (DE3) плазмидой L4440. Компетентные клетки были приготовлены согласно протоколу (Nishimura et al., 1990). Для трансформации аликвоту бактериальной суспензии объемом 0.1 мл смешивали с 5 мкл буфера ТЕ, содержащего 100 пг плазмиды L4440, и инкубировали на льду 30 мин. Далее суспензию клеток выдерживали в термостате при 42 °С в течение 60 с, затем снова помещали в лед на 2 мин и разбавляли в 10 раз предварительно разогретой до 37 °С средой LB. Суспензию инкубировали при 37 °С в течение 1 ч для формирования устойчивости к ампициллину. Затем 100 мкл суспензии втирали в LB агар с ампициллином (50 мкг/мл), чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч.

Наличие встроенного фрагмента гена *pds* проверяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) выбранных колоний, а также секвенированием по Сэнгеру (ЦКП «Геномика» СО РАН).

Положительный контроль с помощью вирус-индуцированного генного сайленсинга (VIGS). VIGS был использован в качестве положительного контроля. Семена *N. benthamiana* сначала проращивали, затем проростки сажали в пластиковые горшки (диаметр 10 см), содержащие смесь универсального почвогрунта (TerraVita, Россия), перлита и вермикулита (соотношение по объему 8:1:1), и культивировали в ростовой камере при непрерывном освещении и температуре 24 °С.

Векторы для VIGS pTRV1 (pYL192) и pTRV2 (pYL279), полученные из Центра биологических ресурсов арабидопсиса (ABRC, США), описаны ранее (Liu et al., 2002; Burch-Smith et al., 2006). Тотальную РНК выделяли из тканей листьев *Nicotiana tabacum* cv. SR1 (последовательность гена фитоендесатуразы у этого вида совпадает с таковой для *N. benthamiana*) с помощью реагента Trizol (Invitrogen) и синтезировали кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученную кДНК использовали для амплификации фрагмента гена *NtPDS* (номер доступа в GenBank AJ616742.1) методом ПЦР с применением высокоэффективной полимеразы Phusion (New England Biolabs, США) в соответствии с инструкцией производителя. Выбранные варианты праймеров были проверены на наличие шпилек, само- и гетеродимеров с помощью инструмента OligoAnalyzer. В результате были синтезированы праймеры: прямой 5′-CACCGGCACTCAACTTTATAAACC-3′ и обратный 5′-CTTCAGTTTTCTGTCAAACCATATATG GAC-3′ («Синтол», Россия).

Полученный в результате ПЦР фрагмент длиной 413 п. н. был клонирован в вектор pENTR/D-TOPO (Invitrogen) и проверен секвенированием, а затем рекомбинирован в вектор pTRV2 путем проведения реакции LR-рекомбинации с помощью системы Gateway (Invitrogen). Полученный вектор pTRV2::NtPDS трансформировали тепловым шоком в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 и использовали в экспериментах VIGS.

Штамм *A. tumefaciens* GV2260, несущий векторы pTRV1, pTRV2 и pTRV2::NtPDS, был отдельно инокулирован в жидкую среду LB, содержащую канамицин (100 мкг/мл) и рифампицин (25 мкг/мл). Культуры инкубировали в течение ночи при встряхивании при 28 °С. Клетки отбирали из ночных культур, повторно суспендировали в индукционном буфере (10 мМ MES; 10 мМ $MgCl_2$; 250 мкМ ацетосирингона, доведенного до pH 5.5 с помощью 1 М KOH), и инкубировали в течение 6 ч при комнатной температуре в шейкере. После инкубации клетки собирали из индуцированных культур и повторно суспендировали в буфере для инфильтрации (10 мМ MES, отрегулированный до pH 5.5 с помощью 1 М KOH) с разведением до OD_{600} = 1.0.

Для инфильтрации листьев табака суспензию *A. tumefaciens* GV2260, содержащую pTRV1 и pTRV2 или pTRV2::NtPDS, смешивали в соотношении 1:1 по объему и инфильтровывали в нижние листья 21-дневных растений *N. benthamiana* с помощью 1 мл шприца без иглы (Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002). Инфильтрированные растения выдерживали при постоянном освещении в течение 12 ч при температуре 20 °С для эффективной инсерции Т-ДНК *Agrobacterium* (Brigneti et al., 2004).

Корневая обработка *N. benthamiana* грубым лизатом *E. coli* HT115 (DE3), содержащим dsRNA фитоендесатуразы. В качестве источника экзогенной дцРНК могут быть использованы грубые лизаты бактериальных суспензий после индукции синтеза дцРНК. Корневые обработки также применяются для доставки целевых молекул для посттрансляционного генного сайленсинга у растений (Jiang et al., 2014; Li et al., 2015; Dubrovina, Kiselev, 2019).

Для корневой обработки были приготовлены грубые лизаты штамма *E. coli* HT115, трансформированного плазмидой L4440 со встроенным фрагментом гена фитоендесатуразы. В качестве контроля были взяты лизаты бактерий без плазмиды, со встройкой нативной плазмиды L4440, буфер и вода.

Приготовление грубого лизата осуществляли согласно протоколу (Gan et al., 2010). Ночную культуру бактерий выращивали в течение 16 ч со встряхиванием при 37 °C на стандартном LB бульоне (с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл для штаммов, содержащих плазмиду L4440). Затем бактериальную суспензию разводили до OD_{595} = 0.5. Далее синтез дцРНК индуцировали добавлением IPTG в конечной концентрации 0.6 мМ, и бактерии инкубировали при 37 °C в течение 4 ч. Спустя отведенное время суспензию центрифугировали для получения осадка (1500 g, 15 мин, 4 °C), который затем ресуспендировали в ледяном буфере (50 мМ Tris·HCl, 10 мМ EDTA, pH 7.5) объемом 1/50 от исходного. Далее пробирки помещали в лед и обрабатывали ультразвуком (20 кГц,15 мин). Полученный лизат центрифугировали (9000 об/мин, 20 мин, 4 °C); супернатант был использован для обработки растений (по 2 мл на одно растение).

Для каждого типа корневой обработки (вода, буфер tris-EDTA, *E. coli* HT115 без плазмиды, *E. coli* HT115 с плазмидой L4440, *E. coli* HT115 с плазмидой L4440 со встроенным фрагментом гена фитоендесатуразы) использовано по 4 растения. Растения выращивали в стерильной смеси универсального почвогрунта (TerraVita), перлита и вермикулита (соотношение по объему 8:1:1). Обработку растений проводили 3 раза в неделю (понедельник, среда, пятница), длительность эксперимента – 4 недели. Корневую обработку проводили через полив растений супернатантом, ресуспендированным в 2 мл буфера tris-EDTA.

Экстракция дцРНК. 1 мл бактериальной суспензии центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и удаляли супернатант. Осадок растворяли в 200 мкл смеси 1 М CH_3COONH_4 и 10 мМ изоамиловом спирте и экстрагировали эквивалентным объемом смеси изопропанола, фенола и изоамилового спирта в соотношении 25:24:1). Инкубировали 15 мин при 65 °C и центрифугировали 15 мин 10000 об/мин. Отбирали супернатант и добавляли эквивалентный объем изопропанола. Инкубировали 12 ч при –20 °C. После инкубации центрифугировали 30 мин при 12000 об/мин. Осторожно убирали жидкость. Осадок промывали 2 раза 70 % этанолом и ресуспендировали в 10 мкл воды без РНКаз; добавляли ДНКазный буфер. Инкубировали 30 мин, затем добавляли 20 мкл РНКазы А и 20 мкл ДНКазы. Инкубировали 1 ч при 37 °C. Экстрагировали 100 мкл смеси изопропанола, фенола и изоамилового спирта в соотношении 25:24:1. Интенсивно перемешивали и центрифугировали 12000 об/мин 15 мин. Супернатант удаляли, осадок промывали 200 мкл 70 % этанола, высушивали при комнатной температуре и растворяли в 1-кратном буфере ТЕ. Наличие и целостность дцРНК проверили с помощью электрофоретического анализа в 1 % агарозном геле.

Результаты

Получение экзогенной дцРНК с использованием штамма *E. coli* HT115, трансформированного плазмидой L4440

Экзогенный синтез дцРНК в работе выполнен *in vivo* с помощью штамма *E. coli* HT115 (DE3). Штамм является дефицитным по РНКазе III, что позволяет ему накапливать фрагменты дцРНК. Для его трансформации взят вектор L4440, специально разработанный для синтеза дцРНК: наличие двух сильных Т7-промоторов в противоположных направлениях приводит к синтезу самокомплементарных последовательностей РНК.

Фрагмент гена фитоендесатуразы табака длиной 404 п. н. был клонирован в вектор L4440 по липким концам с использованием эндонуклеаз рестрикции *Pst*I и *Nco*I, наличие требуемого фрагмента в векторе подтверждено секвенированием. Карта полученной плазмиды представлена на рис. 1.

Наличие целевых фрагментов нужной длины подтверждено электрофоретическим анализом (рис. 2).

Получение грубого лизата бактерий, содержащего фрагменты дцРНК для сайленсинга фитоендесатуразы *N. benthamiana*

Для наработки целевых фрагментов дцРНК для сайленсинга генов фитоендесатуразы использован штамм *E. coli* HT115 (DE3), трансформированной вектором PDS_benthamiana_L4440. Индукцию синтеза дцРНК осуществляли с помощью IPTG. Далее из бактериальной суспензии был получен грубый лизат (Gan et al., 2010), содержащий дцРНК. Для обработки растений *N. benthamiana* были заготовлены аликвоты грубого лизата по 2 мл.

Корневая обработка *N. benthamiana* грубым бактериальным лизатом, содержащим дцРНК для сайленсинга гена фитоендесатуразы *pds*

В данном исследовании впервые выполнена корневая обработка табака грубым лизатом бактерий, содержащим экзогенную дцРНК. В качестве модельного растения для проведения эксперимента использован табак Бентхама (*N. benthamiana*). Опытные растения поливали грубым лизатом *E. coli* HT115 (DE3) с плазмидой PDS_benthamiana_L4440. По истечению 4 недель корневой обработки листья *N. benthamiana*, политые лизатом бактерий со вставкой фрагмента гена фитоендесатуразы, демонстрировали фенотипы фотообесцвечивания молодых листьев, характерные для сайленсинга гена фитоендесатуразы (рис. 3). Листья растений *N. benthamiana* из отрицательного контроля не изменяли фенотип на протяжении всего времени обработки.

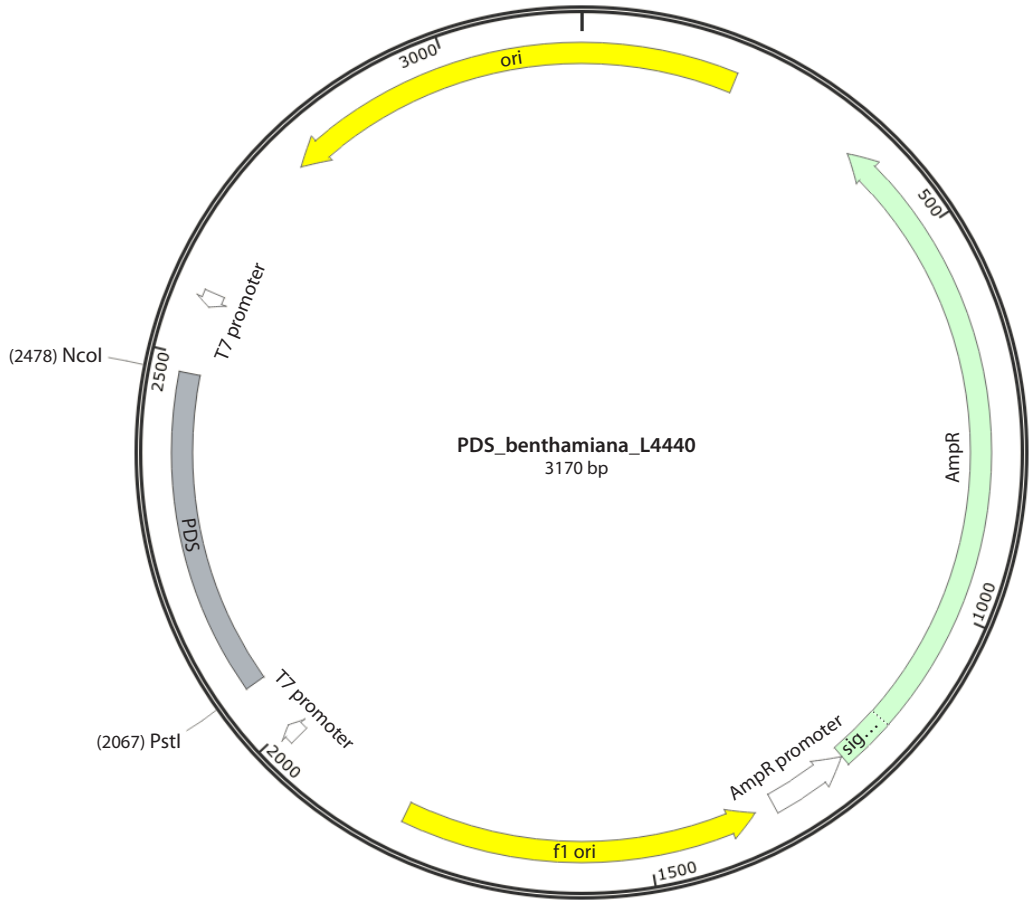


Рис. 1. Карта вектора L4440, содержащего фрагмент гена фитоендесатуразы (*pds*) *N. benthamiana* (PDS_benthamiana_L4440).

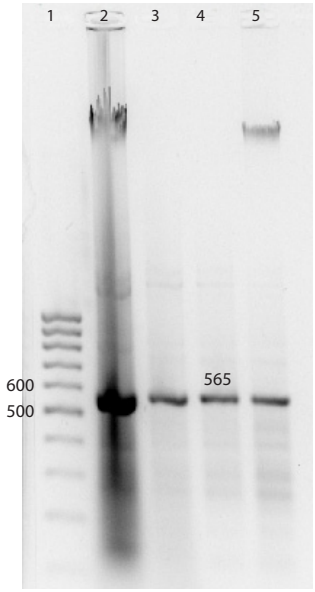


Рис. 2. Электрофоретический анализ фрагментов дцРНК, синтезированных в *E. coli* HT115 (DE3), трансформированной вектором PDS_benthamiana_L4440.

1 – ДНК-маркер 100 п.н.; 2 – суммарная фракция нуклеиновых кислот; 3 – суммарная фракция нуклеиновых кислот, обработанная ДНКазой; 4 – суммарная фракция нуклеиновых кислот, обработанная РНКазой А и ДНКазой; 5 – суммарная фракция нуклеиновых кислот, обработанная РНКазой А.

Обсуждение

В настоящее время многочисленные исследования показывают возможность выключения или снижения экспрессии определенных генов для регуляции устойчивости, ростовых процессов и других свойств растений с помощью индукции РНК-интерференции (Kamthan et al., 2015; Tiwari et al., 2017). Однако применение этого подхода, как правило, включает этап получения трансгенного растения либо применение конструкций на основе ослабленных вирусов растений.

Проблема доставки РНК без использования векторных систем и модификации генома встала особенно остро после запрета использования ГМО в России и странах Европы. В последнее время в научной литературе стали появляться данные о том, что экзогенно примененные дцРНК (например, путем опрыскивания, опрыскивания под высоким давлением, использования материалов для адгезии РНК или с помощью белков-переносчиков) способны проникать в сосудистую систему растения и непосредственно в клетки растения; после чего они индуцируют процесс РНК-интерференции, тем самым повышая устойчивость растений к грибной и вирусной инфекции (Numata et al., 2014; Koch et al., 2016; Mitter et al., 2017; Wang et al., 2018). Имеются единичные работы по доставке дцРНК с целью регуляции работы генов с помощью полива. Например, таким способом доставки удалось повы-

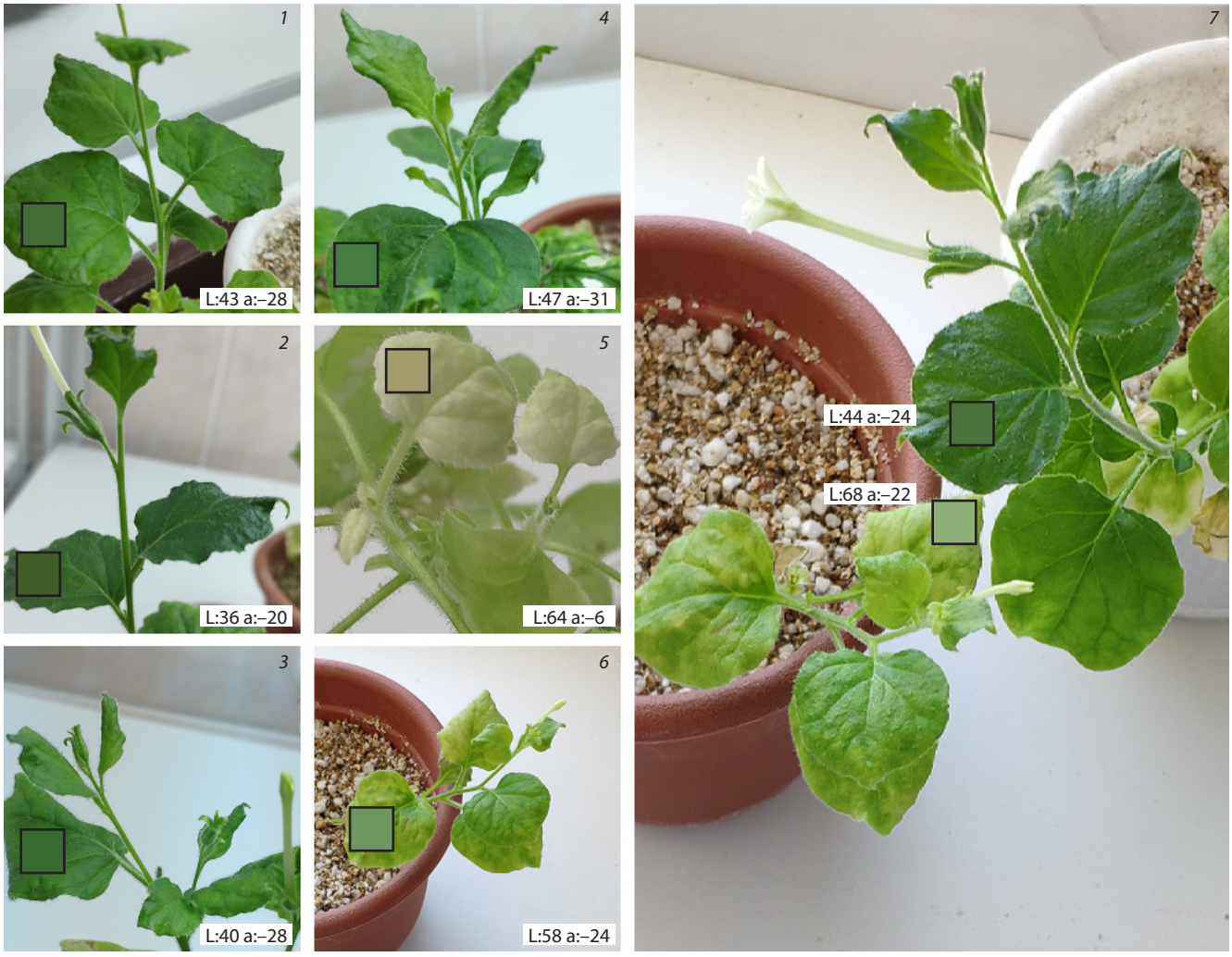


Рис. 3. Побеление листьев *N. benthamiana* после индуцированного сайленсинга фитоендесатуразы с помощью экзогенной дцРНК.

1 – вода; *2* – Tris-EDTA; *3* – грубый лизат *E. coli* HT115 без плазмиды; *4* – грубый лизат *E. coli* HT115 с нативной плазмидой L4440; *5* – VIGS; *6* – грубый лизат *E. coli* HT115 с плазмидой L4440, содержащей фрагмент гена фитоендесатуразы; *7* – сравнение отрицательного контроля с экспериментальным растением при сайленсинге фитоендесатуразы. Контроли в эксперименте: обработки *1–4* служат отрицательными контролями; *5* – положительный контроль. Характеристики фотообесцвечивания листьев: L – светлота цвета в относительных единицах (чем выше значение, тем светлее оттенок, от 0 до 100); a – зелено-красный канал в относительных единицах (чем меньше значение, тем зеленее оттенок, от –127 до 0).

сить устойчивость кукурузы к вирусу мозаики сахарного тростника (SCMV) (Gan et al., 2010).

По аналогии нами получен грубый лизат, содержащий дцРНК фрагмента гена фитоендесатуразы *N. benthamiana*, и проведена корневая обработка табака в течение 4 недель, в результате чего все экспериментальные растения проявили фенотип фотообесцвечивания молодых листьев, характерный для сайленсинга фитоендесатуразы. Степень выраженности побеления сопоставима с положительным контролем VIGS. Таким образом, предлагаемый нами подход позволяет регулировать активность генов растений, не прибегая к созданию ГМО и используя только экологичные методы, что может быть очень перспективным для внедрения в сельское хозяйство с целью повышения стрессоустойчивости культурных растений.

В основе нашей работы лежит исследование F. Tenllado с коллегами (2003), которым удалось защитить табак Бентхама *N. benthamiana* от вируса мягкой крапчатости перца (PMMoV) с помощью распыления на надземную часть растений грубого лизата бактерий *E. coli* HT115, содержащего дцРНК. Эти ученые отмечают, что такой способ получения целевых молекул дцРНК достаточно прост и выгоден экономически по сравнению с синтезом дцРНК *in vitro*. Также они показали, что применение грубого лизата может быть более выгодно с экономической точки зрения, нежели использование очищенного препарата, при этом существенных потерь в эффективности не наблюдалось.

Так как защита растений с применением методов РНК-интерференции может быть альтернативой созданию ГМО, запрещенных законодательно в Российской Федерации для выращивания в сельскохозяйственных целях, мы решили развить идею F. Tenllado с коллегами (2003) и предложить еще более простой способ доставки дцРНК через корневую обработку – полив растения грубым лизатом. Нами показано, что внесение экзогенно синтезированной дцРНК таким способом достаточно эффективно может влиять на фенотип растений, что подтверждает

попадание внесенной дцРНК в растения через корни и ее транспорт в надземную часть растения, где через механизм РНК-интерференции происходит регуляция активности целевого гена – фитоендесатуразы.

Заключение

В последнее время активно развиваются методы на основе РНК-интерференции для защиты растений, особенно с применением экзогенно синтезированных дцРНК, так как они позволяют избежать создания ГМО, законодательно запрещенных для применения в сельском хозяйстве ряда стран, в том числе России. Однако применение экзогенных молекул дцРНК обладает рядом сложностей. Например, способ получения дцРНК должен легко масштабироваться и быть экономически выгодным, а доставка полученных молекул – максимально простой и при этом эффективной. В своей работе для синтеза дцРНК мы разработали систему из штамма *E. coli* HT115, трансформированного плазмидой L4440 с фрагментом гена фитоендесатуразы табака Бентхама (*N. benthamiana*), а для доставки полученных молекул использовали корневую обработку – полив растений грубым лизатом. В результате нам удалось добиться сайленсинга гена фитоендесатуразы, что подтверждает возможность регуляции работы генов растений без создания ГМО. Предлагаемый нами подход также может быть масштабирован и перспективен для применения в сельском хозяйстве с целью защиты растений от патогенов.

Список литературы / References

Brigneti G., Martín-Hernández A.M., Jin H., Chen J., Baulcombe D.C., Baker B., Jones J.D.G. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 2004;39(2):264-272. doi 10.1111/J.1365-313X.2004.02122.x

Burch-Smith T.M., Schiff M., Liu Y., Dinesh-Kumar S.P. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2006;142(1):21-27. doi 10.1104/pp.106.084624

Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-655. doi 10.1016/j.cell.2009.01.035

Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2282. doi 10.3390/ijms20092282

Gan D., Zhang J., Jiang H., Jiang T., Zhu S., Cheng B. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Rep*. 2010;29(11):1261-1268. doi 10.1007/s00299-010-0911-z

Jiang L., Ding L., He B., Shen J., Xu Z., Yin M., Zhang X. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA. *Nanoscale*. 2014;6(17):9965-9969. doi 10.1039/c4nr03481c

Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci.* 2015;6(APR). doi 10.3389/FPLS.2015.00208/PDF

Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdellatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog.* 2016;12(10):e1005901. doi 10.1371/journal.ppat.1005901

Laurila M.R.L., Makeyev E.V., Bamford D.H. Bacteriophage φ6 RNA-dependent RNA polymerase. Molecular details of initiating nucleic acid synthesis without primer. *J Biol Chem.* 2002;277(19):17117-17124. doi 10.1074/jbc.M111220200

Li H., Guan R., Guo H., Miao X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ.* 2015;38(11):2277-2285. doi 10.1111/pce.12546

Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 2002;30(4):415-429. doi 10.1046/J.1365-313x.2002.01297.x

Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants*. 2017;3:16207. doi 10.1038/nplants.2016.207

Niehl A., Soininen M., Poranen M.M., Heinlein M. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. *Plant Biotechnol J.* 2018;16(9):1679-1687. doi 10.1111/pbi.12904

Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(20):6169. doi 10.1093/nar/18.20.6169

Numata K., Ohtani M., Yoshizumi T., Demura T., Kodama Y. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. *Plant Biotechnol J.* 2014;12(8):1027-1034. doi 10.1111/pbi.12208

Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., Baulcombe D.C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 2001;25(2):237-245. doi 10.1046/J.0960-7412.2000.00942.x

Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruíz J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol*. 2003;3:3. doi 10.1186/1472-6750-3-3

Tiwari I.M., Jesuraj A., Kamboj R., Devanna B.N., Botella J.R., Sharma T.R. Host Delivered RNAi, an efficient approach to increase rice resistance to sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14. doi 10.1038/S41598-017-07749

Wang J., Gu L., Knipple D.C. Evaluation of some potential target genes and methods for RNAi-mediated pest control of the corn earworm *Helicoverpa zea*. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;149:67-72. doi 10.1016/j.pestbp.2018.05.012

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.06.2025. После доработки 19.09.2025. Принята к публикации 23.09.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1176-1183

doi 10.18699/vjgb-25-124

Effect of RNAi-mediated silencing of the *TaAOS2* gene on phytohormone accumulation, growth and productivity in bread wheat

D.N. Miroshnichenko[1, 2] ✉, A.V. Pigolev[1], E.A. Degtyaryov[1], V.I. Degtyaryova[1, 2, 3], V.V. Alekseeva[2], A.S. Pushin[2], S.V. Dolgov[2], T.V. Savchenko[1]

[1] Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia
[2] Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia
[3] Pushchino Branch of Russian Biotechnological University, Pushchino, Russia
✉ miroshnichenko@bibch.ru

Abstract. Reverse genetics methods are actively used in plant biology to study the functions of specific genes responsible for the adaptation of plants to various environmental stresses. The present study describes the production and primary characterization of transgenic bread wheat with silenced expression of allen oxide synthase (AOS). AOS is a key enzyme involved in the initial step of biosynthesis of stress-related phytohormones known as jasmonates. To induce silencing of *AOS* in wheat, we designed the RNA interference (RNAi) vector containing an inverted repeat region of the *TaAOS2* gene cloned from genome DNA of cv. Chinese Spring. With the help of biolistic-mediated transformation, a number of transgenic Chinese Spring plants have been produced. Real-Time PCR analysis confirmed the suppression of target gene expression, since transgenic dsRNAi lines accumulated only 21–44 % mRNA of *TaAOS2* after leaf wounding compared to the wound-induced level in non-transgenic control. Gas chromatography–mass spectrometry revealed that the silencing of *TaAOS2* substantially reduced the accumulation of jasmonic acid (JA) and jasmonoyl-isoleucine conjugate (JA-Ile), while the production of other phytohormones, such as abscisic acid and salicylic acid, was not affected. *TaAOS2*-silenced lines were characterized by shorter leaves at the juvenile stage, demonstrated a tendency towards reduced plant height and decreased grain weight, while the average flowering time and plant fertility (number of seeds per spike) were not affected. The obtained transgenic lines in combination with *AOS*-overexpressing lines can be used for further detailed analysis of the adaptive responses controlled by the jasmonate hormonal system.

Key words: allene oxide synthase; jasmonates; *Triticum aestivum* L.; RNA interference; wounding

For citation: Miroshnichenko D.N., Pigolev A.V., Degtyaryov E.A., Degtyaryova V.I., Alekseeva V.V., Pushin A.S., Dolgov S.V., Savchenko T.V. Effect of RNAi-mediated silencing of the *TaAOS2* gene on phytohormone accumulation, growth and productivity in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8): 1176-1183. doi 10.18699/vjgb-25-124

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation, grant No. 22-16-00047-P.

Замалчивание гена *TaAOS2* с помощью РНК-интерференции влияет на накопление фитогормонов, рост и продуктивность мягкой пшеницы

Д.Н. Мирошниченко[1, 2] ✉, А.В. Пиголев[1], Е.А. Дегтярёв[1], В.И. Дегтярёва[1, 2, 3], В.В. Алексеева[2], А.С. Пушин[2], С.В. Долгов[2], Т.В. Савченко[1]

[1] Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Московская область, Россия
[2] Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, Московская область, Россия
[3] Пущинский филиал Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ), Пущино, Московская область, Россия
✉ miroshnichenko@bibch.ru

Аннотация. Методы обратной генетики активно используются в биологии растений для изучения функций генов, ответственных за адаптацию растений к различным стрессовым факторам окружающей среды. Данная работа посвящена получению и первичному анализу трансгенных растений мягкой пшеницы с подавленной экспрессией одного из генов алленоксидсинтазы (AOS). AOS является ключевым ферментом, участвующим в начальном этапе биосинтеза стрессовых фитогормонов, известных как жасмонаты. Для подавления экспрессии гена *AOS* в пшенице создан вектор для РНК-интерференционного замалчивания, содержащий инвертированную область *TaAOS2* из генома яровой мягкой пшеницы сорта Chinese Spring. Путем биобаллистической генетической трансформации получен ряд трансгенных растений Chinese Spring,

© Miroshnichenko D.N., Pigolev A.V., Degtyaryov E.A., Degtyaryova V.I., Alekseeva V.V., Pushin A.S., Dolgov S.V., Savchenko T.V., 2025
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

в которых подавление экспрессии целевого гена подтверждено с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, а изменение уровней накопления отдельных жасмонатов выявлено методом газохроматомасс-спектрометрии. В стрессовых условиях (механическое поранение листовой пластинки молодых растений) трансгенные dsRNAi линии накапливали лишь 21–44 % мРНК *TaAOS2* по сравнению с нетрансгенным пораненным контролем пшеницы. Подавление экспрессии гена *TaAOS2* существенно снизило накопление жасмоновой кислоты и конъюгата жасмоноил-изолейцина, в то время как уровень содержания в листьях других фитогормонов, таких как абсцизовая кислота и салициловая кислота, не изменился. Трансгенные линии пшеницы с подавленной экспрессией гена *TaAOS2* демонстрировали уменьшение длины листьев на ранних стадиях развития растений; также для них была характерна тенденция к сокращению высоты растений и снижению массы зерна. При этом замалчивание не привело к изменению сроков цветения и не повлияло на фертильность растений, так как среднее количество семян в колосе не изменилось. Полученные трансгенные линии пшеницы в сочетании с линиями, сверхэкспрессирующими *AOS*, служат хорошим инструментом для дальнейшего детального анализа адаптивных реакций растений, контролируемых жасмонатным сигналингом.
Ключевые слова: алленоксидсинтаза; жасмонаты; *Triticum aestivum* L.; РНК интерференция; поранение

Introduction

Allen oxide synthase (AOS) is one of the key enzymes in the biosynthesis pathway of jasmonic acid (JA) and its derivatives, lipid-derived plant phytohormones collectively called jasmonates. Jasmonates have various biological functions, including the regulation of developmental and aging processes, activation of the defence system under abiotic stresses, and triggering the immune response upon attacks by fungal pathogens and herbivores. In brief, the role of AOS in the JA biosynthesis pathway is the production of a short-lived intermediate that is converted to various non-volatile oxylipins in plant cells. AOS is a cytochrome P450 enzyme that is localized in chloroplasts and acts as a hydroperoxide dehydratase, converting fatty acid hydroperoxides into allene oxides. Allene oxide synthase is generally divided into three categories depending on the specific catalytic substrate: 13-AOS with activity to 13-hydroperoxy-9,11,15-octadecatrienoic acid (13-HPOT), 9-AOS with activity to 9-hydroperoxy-9,11,15-octadecatrienoic acid (9-HPOT), and 9/13-AOS with a mixed activity to both 9-HPOT and 13-HPOT (Jiang et al., 2009). Allene oxide formed by 13-AOS is rapidly cyclized with the help of allene oxide cyclase to a more stable product, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), the biologically active precursor of JA.

Due to the involvement of AOS-derived oxylipins in signalling and coordination of diverse adaptive responses, AOS encoding genes have been the focus of researchers' attention for more than 30 years. To date, *AOS* genes have been identified in different dicot and monocot species; the number of *AOS* genes varies from a single copy in Arabidopsis (Laudert et al., 1996) to a family of 36 genes in the genome of sugarcane (*Saccharum officinarum*) (Sun et al., 2023). The *AOS* gene family is relatively conserved in structure, but expression pattern analysis demonstrated that different homologues were involved in various, sometimes distinct, defensive responses across different plant species. In Arabidopsis, the model species for the study of the functioning of the jasmonate system for the last decades, the expression of *AOS* is upregulated by a virulent fungal pathogen, mechanical stress, and the application of jasmonates and salicylic acid (SA) (Laudert, Weiler, 1998). The expression of two *AOS* genes of rice (*OsAOS1* and *OsAOS2*) is activated by mechanical wounding, blast fungus infection, herbivore infestation, and JA treatment (Zeng et al., 2021). In sugarcane, accumulation of *ShAOS1* transcripts was reported to increase due to treatments with methyl jasmonate, SA, and abscisic acid (ABA) (Sun et al., 2023).

At present, many *AOS* genes identified in plant species have been found to play an important role in mediating resistance to fungal pathogens and insects. The functional deficit of mRNA of AOS leads to a decrease in resistance to necrotrophic fungi in Arabidopsis (Chehab et al., 2011), potato (Pajerowska-Mukhtar et al., 2008), onion (Kim et al., 2025), and wheat (Fan et al., 2019). In line with this, the complementation of an Arabidopsis *aos* knockout mutant with overexpressed gingko *HvnAOS1* and *HvnAOS2* genes and potato *StAOS2* alleles allowed restoring the resistance to *Erwinia carotovora* and *Botrytis cinerea* (Pajerowska-Mukhtar et al., 2008; An et al., 2024). Constitutive expression of the *ShAOS1* gene, isolated from sugarcane, enhanced the resistance of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants to *Fusarium solani* (Sun et al., 2023). Similarly, transgenic lines of tobacco overexpressing the onion *AOS* gene (*AcAOS*) demonstrated higher resistance to *Botrytis squamosa* (Kim et al., 2025). In rice, silencing of the *OsAOS1* or *OsAOS2* genes negatively affected resistance to the chewing herbivore striped stem borer (*Chilo suppressalis*), resulting in enhanced resistance to the piercing-sucking herbivore brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) (Zeng et al., 2021). An Arabidopsis mutant lacking functional AOS demonstrated increased resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* (Naor et al., 2018).

Changes in the functional activity of *AOS* genes can have pleiotropic effects on various plant characteristics. Transgenic guayule (*Parthenium argentatum*) with RNAi-mediated silencing of *AOS* showed higher rubber content and biomass (Placido et al., 2019), while the disruption of AOS activity in Arabidopsis caused male sterility (Park et al., 2002). Transgenic tobacco overexpressing the wheat *AOS* gene displayed improved tolerance to excessive zinc stress (Liu et al., 2014). Transgenic emmer wheat plants constitutively expressing the Arabidopsis *AtAOS* gene showed increased tolerance to osmotic stress (Pigolev et al., 2023), whereas overexpression of the native *TaAOS2* gene had a generally negative effect on plant growth and productivity in both emmer and bread wheat (Miroshnichenko et al., 2024a).

In bread wheat (*Triticum aestivum* L.), the most important cereal crop in temperate climate countries, the *AOS* family is represented by 12 genes. According to a recent genome-wide analysis, the AOS family consists of four groups of three homoeologous genes located in each sub-genome (A, B, and D) on chromosomes 2, 5, and 6 (Heckmann et al., 2024). The functioning of the twelve *AOS*-encoded proteins significantly

distinguishes the jasmonate system of wheat from that of the model species, Arabidopsis, operated by a single *AOS* gene. Our data indicate that under non-stress conditions, the total content of jasmonates (12-OPDA, JA, and JA-Ile) in wheat leaves is much lower compared to Arabidopsis (Laudert et al., 1996). Upon mechanical injury of leaves, the level of jasmonates increases in emmer and bread wheat up to 1.5–13 times (Miroshnichenko et al., 2024a, b), whereas in *A. thaliana*, the content of jasmonates increases tens of times (Kimberlin et al., 2022). In addition, it was reported that the expression of *AOS* in the leaves of bread wheat could also be induced in response to salts and various pathogenic fungi (Liu et al., 2014; Heckmann et al., 2024). Constitutive overexpression of *TaAOS2* resulted in pleiotropic effects in bread wheat, including reduced length of the first four leaves, shortened plant height, and reduced number of seeds collected per spike (Miroshnichenko et al., 2024a). A transgenic seedling of tetraploid emmer wheat overexpressing the *AtAOS* gene from Arabidopsis showed an increased length of roots and coleoptiles under osmotic stress (Pigolev et al., 2023).

The published data indicate that the knowledge of the functioning of the AOS branch of oxylipin biosynthesis discovered in various species cannot be directly applied to other species. This suggests that the modification of mRNA levels of *AOS*-encoding genes using reverse genetic techniques (overexpression, RNA interference/silencing, or genome editing) may help to uncover their functional role in specific plant species. To gain new insights into the functions of the *AOS*-encoding gene family in wheat, the present study aimed to study jasmonate signalling in the case of reduced expression of the *TaAOS2* gene, including the modification of hormonal status of transgenic lines and influence of *AOS* silencing on growth characteristics.

Materials and methods

Construction of the RNAi expression cassette. The expression cassette pBAR-GFP-AOSi was constructed using two identical fragments of the *TaAOS2* gene (TraesCS4A02G061800.1) of 333 bp, which were cloned in opposite orientation to each other and separated by a spacer representing the *GUS* gene. To avoid non-selective silencing of other genes belonging to the cytochrome P450 family proteins, especially CYP74 enzymes (AOS, hydroperoxide lyase (HPL), and divinyl ether synthase (DES)), we used the fragment outside of the C-domain encoding heme-binding site. The selected harpin arm sequence also did not contain DNA regions, including sequences identical to the *HPL* and *DES* genes longer than 12–20 nucleotides. The fragment corresponded to the central part of the protein sequence (from L93 to W203) and demonstrated high nucleotide homology between all *AOS* genes.

The RNAi construct containing the sequence 3′-TaAOS-5′-GUS-5′-TaAOS-3′ was cloned in two steps. The first RNAi fragment was obtained by PCR from a plasmid containing the full-length *AOS2* (TraesCS4A02G061800.1) using primers: 5′-rnaI-short-NotI-GATCGCGGCCGCCAGCT GCTCTTCTCCCTCCTCG and 3′-rnaI-EcoRV-GATCGA TATCCACTTGGCGGCCTTGGTG. This fragment (335 bp) was then cloned into the Gateway pENTR1A dual plasmids at the NotI and EcoRV sites. The second element of the construct, containing *GUS* and the second RNAi sequence, was obtained by PCR on overlapping DNA templates. The *GUS* gene sequence was amplified using a pair of primers 5′RNAi-GATGACGGTATCGATAAGCTTGATATCT ACCCGCTT and 3′GUS-(KpnI)-GATCGGTACCATTC GATCGAGTGAAGATCCCTTTCTTG. The second RNAi fragment was amplified with the 5′RNAI-(DraI)-GATCTT TAAATATCCACTTGGCGGCCTTGGTG and 3′RNAi-GATATCAAGCTTATCGATACCGTCATCCTCTTCA CAGGCACCTACATGC primers. After amplification, the two resulting fragments of 933 bp (containing the *GUS* gene sequence) and 335 bp (containing the RNAi arm sequence) were combined by PCR with common primers (containing restriction sites for DraI and KpnI). After that, the combined GUS-RNAi sequence was cloned into the pENTR1A plasmid, containing the first RNAi fragment, at the restriction sites DraI and KpnI. The resulting construct of inverted *TaAOS2* repeats was placed under the control of a strong ubiquitin promoter from maize (*ZmUbi1*) and an octopine synthase transcription terminator by transfer into the vector pANIC5D (ampR, kanR, bar, pporRFP) using the LR clonase enzyme for Gateway cloning. The completed RNAi cassette (ocsT)-pANIC5D::PZmUbi1-RNAi(3′-TaAOS-5′-GUS-5′-TaAOS-3′)-Tocs was cut out from pANIC5D at the SacI–SnaBI sites and finally inserted at the SmaI restriction site into the pBAR-GFP vector for cereal genetic transformation.

Generation of transgenic plants. Transgenic plants of spring bread wheat cv. Chinese Spring were generated using the biolistic-mediated genetic transformation approach as described previously (Miroshnichenko et al., 2024a). After rounds of *in vitro* selection, the herbicide-resistant rooted plantlets were transferred to the greenhouse, and the resulting mature plants were then analysed by PCR for the introduction of the hairpin construct. Transgenic status of T0 plants was confirmed by the amplification of GFP-specific fragment of 606 bp using primers sGFPFor (5′-GCGACGTAAACGGC CACAAG) and sGFPRev (5′-CCAGCAGGACCATcTGTG ATCG) as described previously (Pigolev et al., 2018). To verify the presence of left and right arms of the RNAi construct, primers TaAOSRi-1 (5′-ATGAACTCGAAGGAGGT GAAGTCGTTG-3′) and panicGUS-1 (5′-CTCTTCAGCG TAAGGGTAATGCGAGGTA-3′) generating a 500 bp product were designed. The integration of the right hairpin arm was confirmed by amplification of a 466 bp fragment using the TaAOSRi-1 (5′-ATGAACTCGAAGGAGGTGAAGTC GTTG-3′) and panicGUS-2 (5′-CTGCACTCAATGTACA CCGACATGTG-3′) primers. T1 seed progeny resulting from self-pollinated primary T0 plants were screened for GFP fluorescence of pollen to identify homozygous transgenic T1 sub-lines stably inheriting the foreign insertion, as previously described (Pigolev et al., 2018). Sets of T3–T4 seeds of four discovered homozygous sub-lines were used for further analysis.

***TaAOS2* expression analysis.** Extraction of total RNA from wheat leaf tissue, subsequent cDNA synthesis, and quantitative real-time RT-PCR analysis were performed as described previously (Pigolev et al., 2023). To detect changes in the expression levels of the *TaAOS2* gene, the forward primer TaAOSshbF (5′-GGCCGGAGAGAAGTTCCAC-3′) and the reverse primer TaAOSshbR (5′-CTTCTCCAGCGCCTC

TATCG-3′) were used. Transcript levels were quantified with QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Cycler (Thermo Fisher Scientific) using *TaWIN1* as a reference gene.

JA, JA-Ile, SA and ABA analysis. Intact and mechanically damaged leaves of non-transgenic plants and mechanically damaged leaves of four transgenic lines were used for phytohormone analysis. To induce abiotic stress, blades of fully opened 3rd leaves were wounded with forceps as described earlier (Pigolev et al., 2023). 30 min after mechanical injury, the leaves were collected and frozen in liquid nitrogen. The intact leaves were sampled in parallel with wounded tissues. For phytohormone analysis, the leaf tissues were ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Extraction of hormones was performed according to the previously described procedure (Degtyaryov et al., 2023). Dihydrojasmonic acid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and deuterated salicylic acid (Cayman Chemical, USA) were used as internal standards. Extracted samples were treated with trimethylsilyldiazomethane to produce methyl ester derivatives, which were analyzed on a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer detector Chromatec-Crystal 5000 (Chromatec, Yoshkar-Ola, Russia) operating in electron ionization mode. One-microliter samples were injected by autosampler in splitless mode at 250 °C, and separated on a CR-5MS column (length 30 m, inner diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μm) with helium being used as a carrier gas (constant flow 0.7 ml/min). Oven temperature programming was as follows: hold at 40 °C for 1 min after injection, ramp at 15 °C/min to 150 °C, then increase at 10 °C/min to 250 °C, hold for 10 min. Mass spectral analysis was done in selective ion monitoring mode (SIM). The fragment ions of esterified forms of phytohormones monitored were as follows: jasmonic acid (JA) 224, jasmonoil-isoleucine conjugate (JA-Ile) 146, dihydro-JA 83, salicylic acid (SA) 152, abscisic acid (ABA) 190, and deuterated SA derivative SA-d4 156. The Chromatec Analytic 3 program was used for the data analysis.

Plant growth and productivity analysis. For the analysis, two homozygous transgenic lines were cultivated together with non-transgenic control in a greenhouse. Two plants were grown in one-liter pot using a 16 h day/8 h night regime. Light intensity was up to 200 μmol·m^{-2}s^{-1}. The day temperature was 25 ± 2 °C; at night, the temperature was 20 ± 2 °C. A minimum of 15 pots per line were cultivated. The growth parameters analyzed were as follows: the length of the 1st, 2nd, 3rd, and 4th leaves (twenty leaves were measured), the height of plants (15 pots were analyzed), and the date of the anthesis (30 plants were analyzed). The average number of seeds per spike and the weight of 1,000 seeds were recorded at the end of cultivation. Statistically significant differences between control and transgenic lines were confirmed by Student's *t*-test.

Results

Generation of transgenic wheat lines with silenced *TaAOS2* expression

To produce transgenic plants, 630 morphogenic calli of wheat cv. Chinese Spring were transformed using a particle inflow gun with the pBAR-GFP-AOSi plasmid, carrying the hairpin loop sequence for silencing the *TaAOS2* gene (Fig. 1*a*). As a result of the transformation, 43 putative transgenic plantlets were regenerated using a dual selection approach (*GFP*+*BAR*) and adapted to *ex vitro* greenhouse conditions. The efficiency of transgenic plant production was 5.6 %, as PCR analysis detected amplification of a fragment of the *GFP* reporter gene in the DNA extracts of 34 primary independent wheat plants (Fig. 1*b*). The insertion of the complete RNAi sequence (3→5′-TaAOS-GUS-5′→3′-TaAOS) was confirmed for 33 independent T0 plants by amplification of both the left and the right arm fragments using specific primers (Fig. 1*c*, *d*). In order to get a homozygous transgenic population, T1 progenies from T0 plants were analysed for segregation of the introduced construct by detection of *GFP* expression in pollen plants and in T2 embryos. T1 progenies of several transgenic lines showed the segregation for *GFP* expression that fit the Mendelian 3:1 ratio for a single dominant locus. T3 seeds from homozygous T2 individuals of primary transgenic plants CSi3, CSi7, CSi9, and CSi19 were used for further analysis.

To identify RNAi-mediated silencing, we used wounded leaves of transgenic lines CSi3, CSi7, CSi9, and CSi19 and compared the *TaAOS2* expression in these samples with intact and damaged leaves of non-transgenic plants. Quantitative real-time PCR showed that mechanical damage to non-transgenic leaves increased the level of *TaAOS2* mRNA accumulation by about 40 times from 1.6 to 67.0 (Fig. 1*e*). In wounded transgenic lines, *TaAOS2* expression was 2.3–4.7 times lower compared to the damaged leaves of non-transgenic control, whereas the difference with intact non-transgenic control was not statistically confirmed.

Effect of *TaAOS2* silencing on the accumulation of JA, JA-Ile, ABA, and SA in leaves of transgenic wheat plants

The basal levels of jasmonic acid (JA) and jasmonoyl-isoleucine conjugate (JA-Ile) in the intact leaves of Chinese Spring were barely detectable by (GC)–MS chromatography and fluctuated around 10 pmol/g f.w. (Fig. 2). When the leaves of non-transgenic plants were subjected to mechanical wounding, the level of JA and JA-Ile accumulation increased to 64.4 and 40.3 pmol/g f.w., correspondingly. Endogenous concentrations of jasmonates in injured leaves of transgenic plants differed among the four analyzed transgenic lines and did not correlate with the level of *TaAOS2* expression. Two RNAi lines, CSi3 and SCi7, contained only half of the amount of JA-Ile compared to non-transgenic Chinese Spring plants subjected to wounding. Two other transgenic lines, CSi9 and SCi19, showed no difference in JA-Ile content. Measurement of the JA level revealed a similar pattern: JA production in wounded leaves of transgenic lines CSi9 and SCi19 (67.8–68.8 pmol/g f.w.) did not differ from the non-transgenic wounded plants; JA content in transgenic lines CSi3 and SCi7 decreased to 43–44 pmol/g f.w. ($p < 0.05$).

After wound treatment of non-transgenic wheat plants, a significant increase in production of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) was observed (Fig. 2): the level of SA increased around 2.5 times from 362.7 to 914.2 pmol/g f.w., wounding stimulated a 4-fold increase of ABA accumulation in leaves (2.9 vs. 12.6 pmol/g f.w.). Levels of both phytohormones (SA and ABA) were not significantly different in wounded transgenic lines and non-transgenic control.

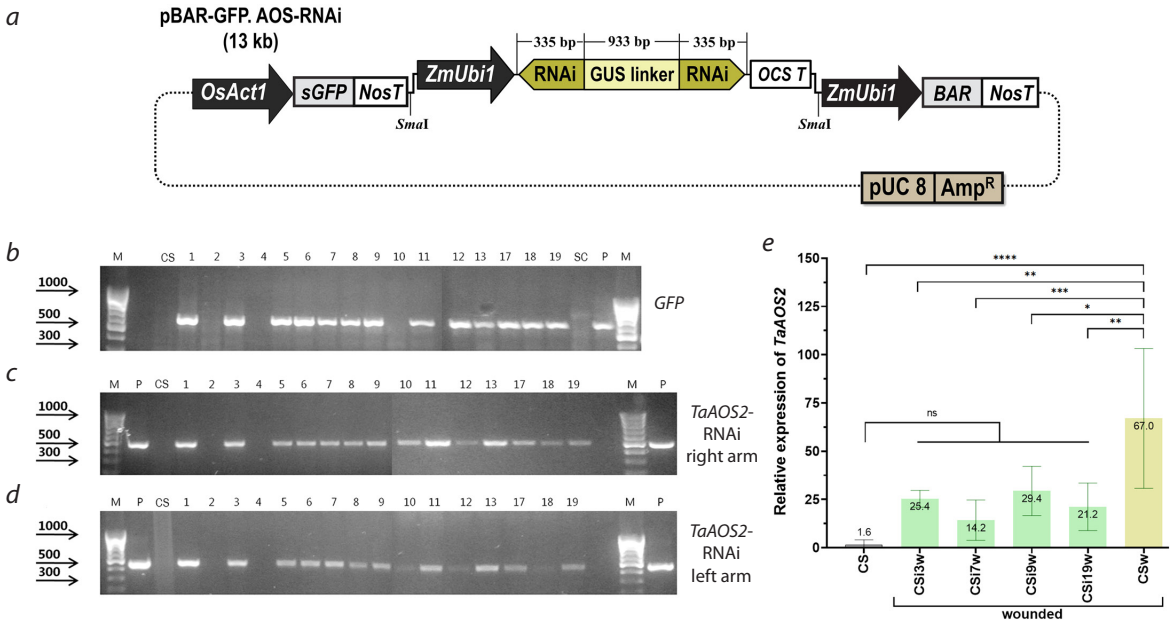


Fig. 1. Generation, selection, and analysis of transgenic wheat plants expressing a construct for silencing of the *TaAOS2* gene.

a, Schematic diagram of the pBAR-GFP-AOSi vector used for the transformation of bread wheat cv. Chinese Spring designed for the induction of RNAi-mediated silencing of the *TaAOS2* gene. *b–d*, Example of PCR analysis of primary putative transgenic plants for the insertion of the heterologous sequences. *b*, Amplification of the *GFP* gene fragment; *c*, *d*, amplification of the right (*c*) and left (*d*) arms of the hairpin sequence for *TaAOS2* silencing; lane M, DNA ladder as a molecular weight marker; lane P, DNA of pBAR-GFP-AOSi; lane CS, non-transgenic wheat plant Chinese Spring; lanes labelled 1–19 represent putative transgenic wheat plants established in the greenhouse. *e*, Relative expression of the *TaAOS2* gene in intact and wounded leaves of non-transgenic plants and wounded transgenic plants. Stars above the graphs indicate statistically significant differences according to Student's *t*-test: * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.005$, **** $p \le 0.001$, ns, non-significant.

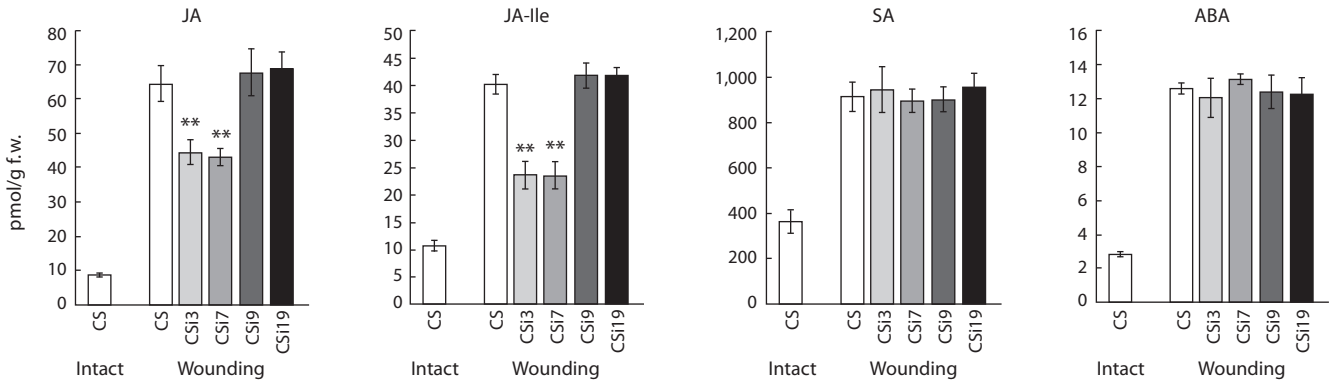


Fig. 2. The content of jasmonic acid (JA), jasmonoyl-isoleucine conjugate (JA-Ile), salicylic acid (SA), and abscisic acid (ABA) in intact and wounded leaf tissues of non-transgenic wheat (Chinese Spring, CS) and wounded transgenic lines with silencing of *TaAOS2* (CSi3, CSi7, CSi9, and CSi19).

Stars indicate a statistically significant difference from the wounded non-transgenic Chinese Spring leaves at $p \le 0.01$, as assessed using Student's *t*-test.

Analysis of plant growth and productivity of RNAi transgenic lines with modified content of jasmonates

In this experiment, two transgenic RNAi lines, CSi3 and SCi7, which showed suppression of *TaAOS2* gene activity resulting in altered JA and JA-Ile content, were compared with the non-transgenic parent variety Chinese Spring. The measurement of the length of four first fully developed leaves of greenhouse-grown plants revealed a decrease in leaf length in both RNAi transgenic lines (Fig. 3). In *AOS* silencing line CSi7, the changes were more pronounced, as the average lengths of the 1st, 2nd, 3rd, and 4th leaves were 2.2 cm ($p < 0.01$), 3.1 cm ($p < 0.005$), 4.8 cm ($p < 0.001$), and 5.8 cm ($p < 0.001$) shorter, correspondingly, compared to the non-transgenic parent plants. The leaves of the transgenic CSi3 line were shorter by 2.5–10 %, and significant leaf length changes were confirmed by Student's *t*-test for 1st, 3rd, and 4th leaves (at $p < 0.05$ to $p < 0.001$).

In addition to a reduction in length of leaves, the transgenic CSi7 line also showed significant changes in plant development. On average, CSi7 plants were 9.9 cm shorter than non-transgenic control, while the transgenic CSi3 line showed almost the same plant height as non-transgenic Chinese Spring plants (Fig. 4*b*).

The average time of the first spike appearance and anthesis was similar in transgenic and non-transgenic plants. A minor change in the average date of flowering observed in RNAi

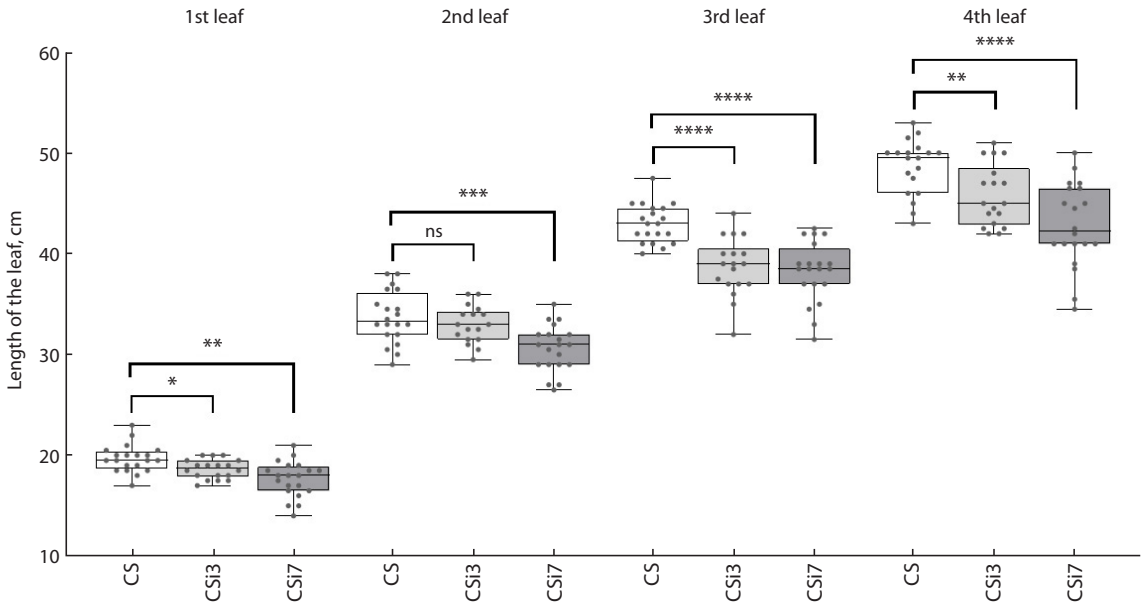


Fig. 3. Analysis of leaf length of non-transgenic bread wheat Chinese Spring and transgenic lines with silencing of *TaAOS2* (CSi3 and CSi7).

Values represent the lengths of 1st, 2nd, 3rd, and 4th leaves measured in 18–20 plants; the line represents the median value, the box margins are SD of the mean, and the bar margins reflect the distribution of values from min to max. Stars indicate statistically significant differences calculated according to Student's *t*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$, ns, non-significant.

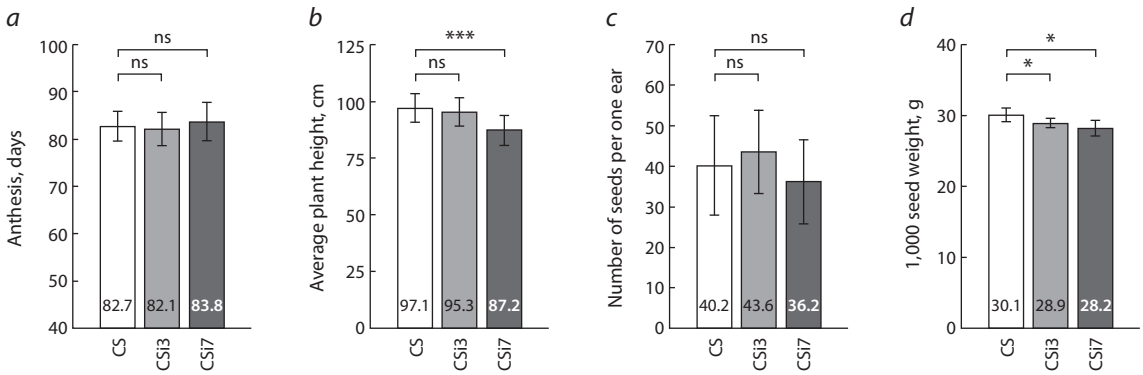


Fig. 4. Analysis of plant growth and productivity of RNAi transgenic wheat lines with modified content of jasmonates.

a, Anthesis date of the first ear; *b*, average plant height; *c*, mean number of seeds per ear; *d*, weight of 1,000 seeds. Stars indicate statistically significant differences of transgenic RNAi lines with silencing of *TaAOS2* (CSi3 and CSi7) from non-transgenic Chinese Spring (SC) plants calculated according to Student's *t*-test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, ns, non-significant.

line CSi7 (84 days vs. 83 days in CS) was not proved to be statistically significant (Fig. 4*a*).

Analysis of productivity revealed a variation in the number of seeds collected from one ear of RNAi lines. Compared to control plants (40.2 seeds/ear), the average number of seeds collected from CSi3 plants was slightly higher (43.6 seeds/ear), while in CSi7 plants, it was slightly reduced (36.2 seeds/ear). Statistical analysis, however, did not confirm the differences between the non-transgenic control and RNAi transgenic lines to be significant (Fig. 4*c*).

The measurement of grain weight revealed a decrease in the average weight of 1,000 seeds by 4–7 % ($p < 0.01$) in both transgenic RNAi lines (Fig. 4*d*). The mean values for 1,000 grain weight were reduced from 30.1 g in non-transgenic control plants to 28.9 and 28.2 g in the SCi3 and CSi7 lines, correspondingly.

Discussion

Jasmonates are known as stress-related plant phytohormones, the activity of which is stimulated by various external stressors. Last decade, to study the functioning of jasmonates in plants, reverse genetics methods have been actively used to regulate the expression of specific genes of the jasmonates biosynthesis pathway. In our previous experiments, the functions of *AOS* genes in two wheat species were studied using the overexpression strategy (Pigolev et al., 2023; Miroshnichenko et al., 2024a). The present study focused on the generation and initial characterization of transgenic bread wheat plants in which the endogenous *AOS* gene activity was suppressed by RNA interference.

Previously, producing transgenic lines overexpressing the *AOS* gene was challenging due to the low output of transgenic plants in both emmer and bread wheat (Miroshnichenko et al.,

2024a). It was observed that independently of the *AOS* gene variant used for the design of the overexpression cassette (*TaAOS2* from bread wheat or *AtAOS* from Arabidopsis), morphogenic tissues were characterized by rapid aging and massive necrosis after the biolistic delivery. This resulted in an extremely low rate of transgenic plants production, amounting to 0.3–1.0 % for bread wheat (cv. Saratovskaya 60) and 0.5–1.7 % for emmer (cv. Runo), which was 5–10 times less in comparison with genetic transformation by an empty vector (Miroshnichenko et al., 2024a). In the present study, the down-regulation of *AOS* had no negative effect on the morphogenetic development of wheat tissue culture, and the production of transgenic wheat plants by introducing an RNA interference cassette was not associated with any difficulties. Transgenic plantlets were readily produced from GFP-positive wheat tissues of cv. Chinese Spring achieving the final genetic transformation efficiency of 5.2 % for the hairpin insertions. The resulting transformation rate is significantly higher compared to our previous experiments involving the other pGFP-BAR-based vector (Miroshnichenko et al., 2022), and it is equal to or even higher than the transformation efficiency in other publications, describing biolistic-mediated transformation of Chinese Spring cultivar (Takumi, Shimada, 1997; Harvey et al., 1999).

Overexpression and silencing of *AOS* by the genetic transformation of wheat are supposed to have opposite effects on the capacity of cells to accumulate jasmonates. As it is shown in the present study, the level of *TaAOS2* activity in transgenic wheat tissues expressing the RNAi construct remains low under the induced stress (wounding) and results in weaker accumulation of JA and JA-Ile content (Fig. 2). We suppose that wheat explants transiently expressing the RNAi construct also accumulate less jasmonates when subjected to chemical stress during the selection of transgenic plants on herbicide-containing medium. Considering the previously reported increase of the jasmonate content in transgenic wheat tissues under stress conditions due to the strong constitutive activity of *AOS*, especially in case of *TaAOS2* overproduction (Miroshnichenko et al., 2024a), these findings, taken together, allow suggesting that high *TaAOS2* expression and increased JA content are negative regulators of morphogenesis and somatic embryogenesis in wheat tissue culture, as it was demonstrated for other species (Kamińska, 2021).

The data obtained in the present study suggest that the abiotic stress (wounding) applied to wheat plants of bread wheat cv. Chinese Spring promotes the expression of the *TaAOS2* gene and causes higher production and accumulation of various phytohormones, including JA, JA-Ile, SA, and ABA. The result supports previous studies, where the same stimulus induced a similar response in plants of another bread wheat cultivar, Saratovskaya 60, as well as in tetraploid emmer wheat cv. Runo (Pigolev et al., 2023; Miroshnichenko et al., 2024a, b). The obtained data are consistent with data obtained for other plant species: the wound response in wheat is similar to that in rice (Zeng et al., 2021), but significantly weaker than in Arabidopsis (Kimberlin et al., 2022) and potato (Pajerowska-Mukhtar et al., 2008). Previously, transgenic guayule lines showed increased SA content due to silencing of the *AOS* gene (Placido et al., 2019); in contrast to guayule RNAi lines, there was no alteration in SA content in *AOS*-silenced wheat lines. Such results support the idea that the effect of modified AOS activity is highly dependent on the plant species and functional specialization of *AOS* genes. In line with this, in guayule, which is a dicotyledonous plant species, the silencing of *AOS* was easily detectable in intact plants. In another dicot species, potato, downregulation of *StAOS1* was also not detected in undamaged leaves due to extremely low mRNA levels, while the silencing of the *StAOS2* gene was easily detected as intact dsRNAi transgenic lines accumulated no more than 10 % of the *StAOS2* transcript compared to control plants (Pajerowska-Mukhtar et al., 2008).

Due to the limited number of publications on silencing of *AOS* genes in cereal species (Naor et al., 2018; Fan et al., 2019), information on plant growth and productivity is lacking. In the present study, the *AOS*-silenced wheat lines showed a tendency to grow shorter leaves at the juvenile stage and demonstrated a decrease in final plant height. Surprisingly, a similar trend was observed in both transgenic emmer and bread wheat overexpressing *TaAOS2*. However, despite the growth modification, wheat lines with the knockdown of *TaAOS2* expression showed no change in the mean flowering date. This result is contrasting to a previous study demonstrating that *AOS*-silenced guayule plants showed higher biomass accumulation, enhanced stem branching, increased photosynthetic rate, and increased rubber content (Placido et al., 2019). This increase was associated with elevated rubber transferase enzyme activity, increased SA content, and decreased ABA levels (Placido et al., 2019). In contrast to RNAi lines of guayule, *AOS*-silenced wheat lines showed no significant changes in endogenous SA and ABA accumulation, while similarly to guayule, JA and JA-Ile contents were also reduced, explaining the markedly different effects between the two species. The observed differences can be associated with the presence of a larger number of *AOS* genes in hexaploid wheat, which can perform compensatory functions during *TaAOS2* silencing or with other differences in the complex regulatory system responsible for maintaining the intracellular level of jasmonates and/or jasmonate signaling. This question certainly requires further study.

The downregulation of *AOS* activity did not affect the fertility of transgenic wheat plants. For comparison, the complete disruption of *AOS* function in the aos mutant of Arabidopsis was reported to induce male sterility and failure of seed formation (Park et al., 2002). In the present study, wheat RNAi lines showed normal seed set, probably because there was no complete silencing of *TaAOS2*. This observation is consistent with the previous publications on RNAi-mediated silencing of *AOS* genes in wheat, rice, and guayule, where transgenic homozygous progenies were successfully generated by self-pollination of primary plants (Naor et al., 2018; Fan et al., 2019; Placido et al., 2019). The productivity analysis performed in the present study revealed that the grain weight of RNAi lines tended to decrease, while the mean number of seeds per one ear was not changed. Conversely, when we previously overexpressed the *TaAOS2* gene in bread wheat cv. Saratovskaya 60, this caused a decrease in the seed number per ear (Miroshnichenko et al., 2024a).

Conclusion

Based on these experimental results, we can assume that the downregulation of *TaAOS2* had no clear beneficial effect on the growth and productivity of bread wheat. However, these

results were obtained on plants grown without any temporal or prolonged biotic or abiotic stresses. Given that the functional activity of AOS in wheat is highly dependent on external stimuli, our further research will focus on the analysis of RNAi lines subjected to pathogen attacks and temperature stress. This will help to expand the understanding of the functional effects of *AOS* suppression in wheat and may provide more information on the possibility of precise genetic regulation of the jasmonate biosynthetic pathway to achieve better growth and productivity under various stress conditions.

References

An L., Wang Z., Cui Y., Yao Y., Bai Y., Liu Y., Li X., Yao X., Wu K. Bioinformatics, expression analysis, and functional verification of allene oxide synthase gene *HvnAOS1* and *HvnAOS2* in qingke. *Open Life Sci.* 2024;19(1):20220855. doi 10.1515/biol-2022-0855

Chehab E.W., Kim S., Savchenko T., Kliebenstein D., Dehesh K., Braam J. Intronic T-DNA insertion renders Arabidopsis *opr3* a conditional jasmonic acid-producing mutant. *Plant Physiol.* 2011; 156(2):770-778. doi 10.1104/pp.111.174169

Degtyaryov E., Pigolev A., Miroshnichenko D., Frolov A., Basnet A.T., Gorbach D., Leonova T., Pushin A.S., Alekseeva V., Dolgov S., Savchenko T. *12-Oxophytodienoate* reductase overexpression compromises tolerance to *Botrytis cinerea* in hexaploid and tetraploid wheat. *Plants* (*Basel*). 2023;12(10):2050. doi 10.3390/plants12102050

Fan Y.-H., Hou B.-Q., Su P.-S., Wu H.-Y., Wang G.-P., Kong L.-R., Ma X., Wang H.-W. Application of virus-induced gene silencing for identification of FHB resistant genes. *J Integr Agric.* 2019;18(10): 2183-2192. doi 10.1016/S2095-3119(18)62118-5

Harvey A., Moisan L., Lindup S., Lonsdale D. Wheat regenerated from scutellum callus as a source of material for transformation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1999;57:153-156. doi 10.1023/A:1006344615666

Heckmann A., Perochon A., Doohan F.M. Genome-wide analysis of salicylic acid and jasmonic acid signalling marker gene families in wheat. *Plant Biol.* 2024;26(5):691-704. doi 10.1111/plb.13659

Jiang K., Pi Y., Huang Z., Hou R., Zhang Z., Lin J., Sun X., Tang K. Molecular cloning and mRNA expression profiling of the first specific jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase from *Hyoscyamus niger*. *Russ J Genet*. 2009;45:430-439. doi 10.1134/S1022795409040073

Kamińska M. Role and activity of jasmonates in plants under in vitro conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2021;146:425-447. doi 10.1007/s11240-021-02091-6

Kim S.-J., Park Y.-D., Lee J.-W. Validation of the role of *Allium cepa allene oxide synthase* (*AcAOS*) in resistance to *Botrytis squamosa*. *Hortic Environ Biotechnol.* 2025;66:951-965. doi 10.1007/s13580-025-00706-x

Kimberlin A.N., Holtsclaw R.E., Zhang T., Mulaudzi T., Koo A.J. On the initiation of jasmonate biosynthesis in wounded leaves. *Plant Physiol.* 2022;189(4):1925-1942. doi 10.1093/plphys/kiac163

Laudert D., Pfannschmidt U., Lottspeich F., Holländer-Czytko H., Weiler E.W. Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol.* 1996;31:323-335. doi 10.1007/BF00021793

Laudert D., Weiler E.W. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 1998;15(5): 675-684. doi 10.1046/j.1365-313x.1998.00245.x

Liu H.-H., Wang Y.-G., Wang S.-P., Li H.-J., Xin Q.-G. Improved zinc tolerance of tobacco by transgenic expression of an allene oxide synthase gene from hexaploid wheat. *Acta Physiol Plant.* 2014;36(9): 2433-2440. doi 10.1007/s11738-014-1616-7

Miroshnichenko D., Timerbaev V., Klementyeva A., Pushin A., Sidorova T., Litvinov D., Nazarova L., Shulga O., Divashuk M., Karlov G., Salina E., Dolgov S. CRISPR/Cas9-induced modification of the conservative promoter region of *VRN-A1* alters the heading time of hexaploid bread wheat. *Front Plant Sci.* 2022;13:1048695. doi 10.3389/fpls.2022.1048695

Miroshnichenko D.N., Pigolev A.V., Pushin A.S., Alekseeva V.V., Degtyaryova V.I., Degtyaryov E.A., Pronina I.V., Frolov A., Dolgov S.V., Savchenko T.V. Genetic transformation of *Triticum dicoccum* and *Triticum aestivum* with genes of jasmonate biosynthesis pathway affects growth and productivity characteristics. *Plants* (*Basel*). 2024a;13(19):192781. doi 10.3390/plants13192781

Miroshnichenko D.N., Pigolev A.V., Tikhonov K.G., Degtyaryov E.A., Leshchenko E.F., Alekseeva V.V., Pushin A.S., Dolgov S.V., Basnet A., Gorbach D.P., Leonova T.S., Frolov A.A., Savchenko T.V. Characteristics of the stress-tolerant transgenic wheat line overexpressing the *AtOPR3* gene encoding the jasmonate biosynthesis enzyme 12-oxophytodienoate reductase. *Russ J Plant Physiol.* 2024b;71(54):1446. doi 10.1134/S1021443724604658

Naor N., Gurung F.B., Ozalvo R., Bucki P., Sanadhya P., Miyara S.B. Tight regulation of allene oxide synthase (AOS) and allene oxide cyclase-3 (AOC3) promote *Arabidopsis* susceptibility to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur J Plant Pathol.* 2018; 150:149-165. doi 10.1007/s10658-017-1261-2

Pajerowska-Mukhtar K.M., Mukhtar M.S., Guex N., Halim V.A., Rosahl S., Somssich I.E., Gebhardt C. Natural variation of potato *allene oxide synthase* 2 causes differential levels of jasmonates and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Planta.* 2008;228(2):293-306. doi 10.1007/s00425-008-0737-x

Park J.-H., Halitschke R., Kim H.B., Baldwin I.T., Feldmann K.A., Feyereisen R. A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 2002;31(1):1-12. doi 10.1046/j.1365-313X.2002.01328.x

Pigolev A.V., Miroshnichenko D.N., Pushin A.S., Terentyev V.V., Boutanayev A.M., Dolgov S.V., Savchenko T.V. Overexpression of Arabidopsis *OPR3* in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) alters plant development and freezing tolerance. *Int J Mol Sci.* 2018;19: 123989. doi 10.3390/ijms19123989

Pigolev A.V., Miroshnichenko D.N., Dolgov S.V., Alekseeva V.V., Pushin A.S., Degtyaryova V.I., Klementyeva A., Gorbach D., Leonova T., Basnet A., Frolov A.A., Savchenko T.V. Endogenously produced jasmonates affect leaf growth and improve osmotic stress tolerance in emmer wheat. *Biomolecules.* 2023;13(12):121775. doi 10.3390/biom13121775

Placido D.F., Dong N., Dong C., Cruz V.M.V., Dierig D.A., Cahoon R.E., Kang B.-G., Huynh T., Whalen M., Ponciano G., McMahan C. Downregulation of a CYP74 rubber particle protein increases natural rubber production in *Parthenium argentatum*. *Front Plant Sci*. 2019;10:760. doi 10.3389/fpls.2019.00760

Sun T., Chen Y., Feng A., Zou W., Wang D., Lin P., Chen Y., You C., Que Y., Su Y. The allene oxide synthase gene family in sugarcane and its involvement in disease resistance. *Ind Crops Prod.* 2023; 192:116136. doi 10.1016/j.indcrop.2022.116136

Takumi S., Shimada T. Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues. *Genes Genet Syst.* 1997;72(2):63-69. doi 10.1266/ggs.72.63

Zeng J., Zhang T., Huangfu J., Li R., Lou Y. Both allene oxide synthases genes are involved in the biosynthesis of herbivore-induced jasmonic acid and herbivore resistance in rice. *Plants* (*Basel*). 2021; 10(3):30442. doi 10.3390/plants10030442

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

Received September 11, 2025. Revised October 10, 2025. Accepted November 5, 2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1184-1194

doi 10.18699/vjgb-25-125

Изучение влияния интрогрессии хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *Gossypium barbadense* L. при беккроссировании исходными линиями вида *G. hirsutum* L.

М.Ф. Санамьян [1] ✉, Ш.У. Бобохужаев [1, 3], Ш.С. Абдукаримов [1, 2], Ж.С. Уралов [1], А.Б. Рустамов [1]

[1] Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан
[2] Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Кибрайский район, Ташкентская область, Узбекистан
[3] Чирчикский государственный педагогический университет, Чирчик, Ташкентская область, Узбекистан
✉ sanam_marina@rambler.ru

Аннотация. Создание хромосомно-замещенных линий, содержащих одну пару хромосом родственного вида, является одним из способов интрогрессии чужеродного генетического материала. Известно, что частота встречаемости замещений по разным хромосомам генома различается по причине избирательности процесса трансмиссии чужеродных хромосом через гаметы гибридов. Использование моносомных линий с идентифицированными унивалентными хромосомами и молекулярно-генетических SSR-маркеров на стадии проростков позволило осуществить быстрый скрининг идентичности чужеродной хромосомы у беккроссных гибридов, что значительно ускорило и облегчило процесс беккроссирования при создании новых хромосомно-замещенных линий хлопчатника. В ходе изучения процесса передачи хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника *Gossypium barbadense* L. при беккроссировании четырех исходных моносомных линий вида *G. hirsutum* L. моносомными беккроссными гибридами с замещением хромосомы 2 A_t-субгенома были выявлены: снижение скрещиваемости, завязываемости и всхожести гибридных семян; отличия в частоте и характере передачи хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника *G. barbadense*; регулярность поведения хромосом в мейозе и высокий мейотический индекс; значительное снижение фертильности пыльцы у беккроссных моносомных гибридов BC_1F_1; специфические морфобиологические особенности моносомных беккроссных растений в виде задержки развития вегетативных и генеративных органов, низкорослости и сниженной облиственности, а также слабой бутонизации и цветения в течение первого года вегетации. По-видимому, такие специфические изменения происходили вследствие реорганизации гибридного генома и интрогрессии чужеродного хроматина. Кроме того, была продемонстрирована эффективность использования молекулярно-генетических микросателлитных (SSR) маркеров для контролирования процессов беккроссирования и элиминации генетического материала донорной линии Pima 3-79 вида *G. barbadense* с целью отбора генотипов с чужеродным замещением хромосом.
Ключевые слова: хлопчатник; *G. hirsutum*; *G. barbadense*; моносомные линии; хромосомно-замещенные гибриды; беккроссирование; SSR-маркеры

Для цитирования: Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Абдукаримов Ш.С., Уралов Ж.С., Рустамов А.Б. Изучение влияния интрогрессии хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *Gossypium barbadense* L. при беккроссировании исходными линиями вида *G. hirsutum* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025; 29(8):1184-1194. doi 10.18699/vjgb-25-125

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан в рамках проекта Ф-ОТ-2021-155.

Study of the influence of introgression from chromosome 2 of the A_t subgenome of cotton *Gossypium barbadense* L. during backcrossing with the original lines of *G. hirsutum* L.

M.F. Sanamyan [1] ✉, Sh.U. Bobokhujayev [1, 3], Sh.S. Abdukarimov [1, 2], J.S. Uralov [1], A.B. Rustamov [1]

[1] National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan
[2] Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Kibrai district, Tashkent region, Uzbekistan
[3] Chirchik State Pedagogical University, Chirchik, Tashkent region, Uzbekistan
✉ sanam_marina@rambler.ru

Abstract. The creation of chromosome substitution lines containing one pair of chromosomes from a related species is one method for introgression of alien genetic material. The frequency of substitutions in different chromosomes of the genome varies due to the selective transmission of alien chromosomes through the gametes of hybrids. The

© Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Абдукаримов Ш.С., Уралов Ж.С., Рустамов А.Б., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

use of monosomic lines with identified univalent chromosomes and molecular genetic SSR markers at the seedling stage allowed rapid screening of the identity of the alien chromosome in backcross hybrids, significantly accelerating and facilitating the backcrossing process for the creation of new chromosome substitution cotton lines. As a result of studying the process of transmission of chromosome 2 of the A_t subgenome of the cotton plant *G. barbadense* L. during backcrossing of four original monosomic lines of *G. hirsutum* L. with monosomic backcross hybrids with substitution of chromosome 2 of the A_t subgenome, the following specific consequences of the introgression of this chromosome were revealed: decreased crossability, setting and germination of hybrid seeds; differences in the frequency and nature of transmission of chromosome 2 of the A_t subgenome of the cotton plant *G. barbadense*; regularity of chromosome behavior in meiosis; a high meiotic index; a significant decrease in pollen fertility in backcross monosomic hybrids BC_1F_1; specific morphobiological characteristics of monosomic backcrossed plants, such as delayed development of vegetative and generative organs; dwarfism; reduced foliage; and poor budding and flowering during the first year of vegetation. All of these factors negatively impact the study and backcrossing of monosomic hybrids and significantly complicate and delay the creation of chromosome-substituted forms concerning chromosome 2 of the A_t subgenome of cotton, *G. barbadense*. These specific changes likely occurred as a result of hybrid genome reorganization and introgression of alien chromatin. Furthermore, the effectiveness of using molecular genetic microsatellite (SSR) markers to monitor backcrossing processes and eliminate genetic material from the Pima 3-79 donor line of *G. barbadense* for the selection of genotypes with alien chromosome substitutions has been demonstrated.

Key words: cotton; *G. hirsutum*; *G. barbadense*; monosomic lines; chromosome-substituted hybrids; backcrossing; SSR markers

For citation: Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U., Abdukarimov Sh.S., Uralov J.S., Rustamov A.B. Study of the influence of introgression from chromosome 2 of the A_t subgenome of cotton *Gossypium barbadense* L. during backcrossing with the original lines of *G. hirsutum* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1184-1194. doi 10.18699/vjgb-25-125

Введение

В настоящее время отсутствие генетического разнообразия у культивируемого хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. ($2n$ = 52, AD_1) тормозит развитие селекционных программ (Wendel, 1989). Одним из способов интродукции чужеродного генетического материала является создание хромосомно-замещенных линий, содержащих одну пару хромосом родственного вида, которая замещает гомеологичную ей пару хромосом вследствие того, что замещение происходит в строгом соответствии с гомеологией хромосом (Щапова, Кравцова, 1990).

Линии с чужеродным замещением хромосом были созданы в США с участием трех тетраплоидных видов хлопчатника: *G. barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem и *G. mustelinum* Miers ex Watt (Saha et al., 2004, 2006, 2013); наибольшее число линий получено с привлечением вида *G. barbadense*. Проведено изучение влияния замещения на ценные признаки качества волокна (Saha et al., 2004, 2010, 2020; Jenkins et al., 2006, 2007). Однако активное использование данных линий другими исследователями указало на отсутствие у некоторых из них интрогрессии целой хромосомы или участка хромосомы (Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2015; Ulloa et al., 2016; Fang et al., 2023), поэтому только 13 CS-B линий (chromosome-substitution) из 20 имели «значительную интрогрессию» от вида *G. barbadense*. Причины отсутствия замещения чужеродных хромосом у линий американской коллекции так и не были выяснены.

Ранее в Национальном университете Узбекистана им. М. Улугбека была создана с помощью различных методов облучения коллекция новых моносомных линий хлопчатника *G. hirsutum*. Унивалентные хромосомы 35 из этих линий с нехватками отдельных хромосом были идентифицированы с использованием транслокационных и молекулярно-генетических SSR-маркеров (Sanamyan et al., 2014, 2022). В результате выяснилось, что четыре моносомные линии имеют нехватки по хромосоме 2, 18 линий – по хромосоме 4, пять линий – по хромосоме 6, одна линия – по хромосоме 7, другая линия – по хромосоме 12 A_t-субгенома хлопчатника. Также по одной моносомной линии приходится на хромосомы 17, 18, 21 и 22 D_t-субгенома хлопчатника и две телоцентрические линии по хромосомам 6 и 11 A_t-субгенома (Санамьян и др., 2016; Sanamyan et al., 2016; Санамьян, Бобохужаев, 2019).

Для создания хромосомно-замещенных линий хлопчатника мы разработали новую схему, основанную на цитогенетических и молекулярно-генетических методах (Sanamyan et al., 2022). Использование моносомных линий с идентифицированными унивалентными хромосомами и молекулярно-генетических SSR-маркеров на стадии проростков позволило осуществить быстрый скрининг идентичности чужеродной хромосомы у беккроссных гибридов, что значительно ускорило и облегчило процесс создания хромосомно-замещенных линий.

Проведение экспериментов с участием большого числа гибридов разных поколений выявило новые эффекты передачи чужеродных хромосом в беккроссных потомствах. Целью нашей работы был анализ особенностей трансмиссии хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника при беккроссировании четырех исходных моносомных линий вида *G. hirsutum* линией-донором Pima 3-79 вида *G. barbadense* в процессе создания линий с чужеродным замещением отдельных хромосом *G. hirsutum*/*G. barbadense*. В ходе работы были изучены скрещиваемость, завязываемость и всхожесть гибридных семян, оценены частота и характер передачи хромосомы 2 A_t-субгенома, изучено поведение хромосом в мейозе и обнаружены специфические морфобиологические особенности беккроссных моносомиков в первый год вегетации.

Материалы и методы

Растительный материал. Цитогенетическая коллекция хлопчатника Национального университета Узбекистана им. М. Улугбека характеризуется присутствием четырех моносомных линий (Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93) с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома тетраплоидного вида хлопчатника *G. hirsutum* ($2n = 52$, AD_1) (Санамьян, Бобохужаев, 2019).

В качестве родителя-донора замещенной хромосомы (CS) от вида *G. barbadense* использовалась линия Pima 3-79, которая была получена на основе удвоенного гаплоида и является генетическим стандартом для этого вида хлопчатника в США (Endrizzi et al., 1985).

Изучались беккроссные гибриды от скрещиваний четырех моносомных линий (Mo11, Mo16, Mo19, Mo93) с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. hirsutum* с ранее полученными моносомными гибридами F_1, у которых моносомия была по тем же хромосомам, что и у исходных моносомиков (Sanamyan et al., 2016). Все растения исходных моносомных линий и беккроссных гибридов круглогодично содержались в пленочной теплице Национального университета Узбекистана.

Цитологические анализы, экстракцию ДНК и генотипирование осуществляли согласно методам, описанным нами ранее (Санамьян и др., 2023). Элиминацию хромосом *G. barbadense* у моносомного гибрида хлопчатника BC_2F_1 определяли по отсутствию амплификации маркера по хромосомам *G. barbadense* (отцовский) и присутствию только аллель-специфичных продуктов ПЦР *G. hirsutum* (материнский).

Результаты

Скрещиваемость, завязываемость и всхожесть гибридных семян BC_1F_1 с участием моносомных линий с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома *G. hirsutum*. Четыре моносомные линии вида *G. hirsutum* с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома *G. hirsutum* скрещивали с гибридами F_1(Mo×Pima 3-79), у которых моносомия была по тем же хромосомам, что и у исходных моносомиков. В результате выявлено, что все четыре варианта BC_1F_1 характеризовались существенным снижением показателя скрещиваемости (от 33.33 до 9.09 %) (Приложение 1)[1] при сравнении с гибридами F_1 (от 68.75 до 50.00 %) (Sanamyan et al., 2022).

Завязываемость гибридных семян у растений BC_1F_1 также уменьшилась (от 52.94±12.11 до 37.31±5.91 %) при сравнении с гибридами F_1 (от 57.69±9.69 до 31.33±±5.09 %). Всхожесть беккроссных семян BC_1F_1 снизилась с 88.89 до 51.61 % (см. Приложение 1) при сравнении с гибридами F_1 (от 100 до 71.43 %).

Идентификация замещения хромосомы 2 A_t-субгенома *G. barbadense* у гибридов BC_1F_1 с использованием хромосом-специфичных молекулярно-генетических маркеров. Для молекулярного анализа беккроссных растений BC_1F_1 использовались принципы делеционного молекулярного анализа (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009). Работа выполнялась согласно ранее предложенной нами схеме получения хромосомно-замещенных линий хлопчатника (Sanamyan et al., 2022), где молекулярно-генетический анализ беккроссных форм проводился у беккроссных проростков хлопчатника на стадии 3–5 настоящих листьев до того, как они были пересажены в грунт теплицы с целью ускоренного выделения моносомиков по хромосомам донорного вида. Среди растений всех вариантов BC_1F_1 были обнаружены такие генотипы, в геноме которых присутствовала чужеродная хромосома 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense*.

Ранее у гибридов BC_1F_1 в варианте скрещивания BC_1F_1(Mo11×F_1(766_3)) в четырех беккроссных семьях (9_n, 10_n, 78_n и 79_n) не было найдено гибридных проростков с присутствием полиморфных аллелей от вида *G. barbadense*, что говорило об отсутствии замещения у этих моносомиков. Позже в схожем варианте опыта в беккроссной семье (494_n) был выявлен один (494_2) моносомный беккроссный проросток, который характеризовался наличием полиморфных аллелей только от *G. barbadense*, тогда как аллели линии Л-458 вида *G. hirsutum* не были обнаружены на основе локализации хромосом-специфичных SSR-маркеров BNL834, BNL1434, BNL1897, BNL3590, BNL3971, BNL3972, CIR381, JESPR179. Поскольку все перечисленные маркеры были ранее локализованы на хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009; Yu et al., 2011; Saha et al., 2015; Wang et al., 2016), полученные данные указали на присутствие замещения по этой хромосоме (Приложения 2, 3, 19).

Ранее в варианте BC_1F_1(Mo16×F_1(98_6)) в двух гибридных беккроссных семьях (922_n и 923_n) уже были обнаружены четыре проростка (922_2, 922_8, 923_7, 923_8) с замещением по хромосоме 2 вида *G. barbadense* (Sanamyan et al., 2022), однако элиминация чужеродной хромосомы в BC_2F_1 потребовала повторного изучения этого варианта, где в двух новых семьях были выявлены три беккроссных проростка (495_5, 497_1 и 497_4), у которых присутствовали аллели только от *G. barbadense*, а аллелей от *G. hirsutum* не было, что указало на локализацию семи хромосом-специфичных SSR-маркеров: BNL834, TMB0471, JESPR101, JESPR179, CIR376, DPL0674, NAU2277, ранее локализованных на хромосоме 2 A_t-субгенома (Gutiérrez et al., 2009; Yu et al., 2011; Saha et al., 2015; Wang et al., 2016) и подтвердивших присутствие замещения этой хромосомы (Приложения 4–6, 19).

SSR-основанный делеционный анализ в комбинациях BC_1F_1(Mo19×F_1(769_4)) и BC_1F_1(Mo93×F_1(516_4)) с предполагаемым замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника позволил обнаружить аллели вида *G. barbadense* у одного беккроссного проростка (8_8) в первом варианте и девяти проростков (7_1, 7_2, 7_3, 88_1, 88_4, 88_7, 89_3, 89_4 и 89_6) во втором, тогда как аллели вида *G. hirsutum* отсутствовали. Поскольку прежде хромосом-специфичные SSR-маркеры BNL3545, BNL3971, JESPR101, JESPR179, CIR376, DPL0674 были локализованы на хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009; Yu et al., 2011; Saha et al., 2015; Wang et al., 2016), полученные данные указали на наличие замещения этой хромосомы у изученных проростков (рис. 1, Приложения 7–9, 19).

[1] Приложения 1–20 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx45.pdf

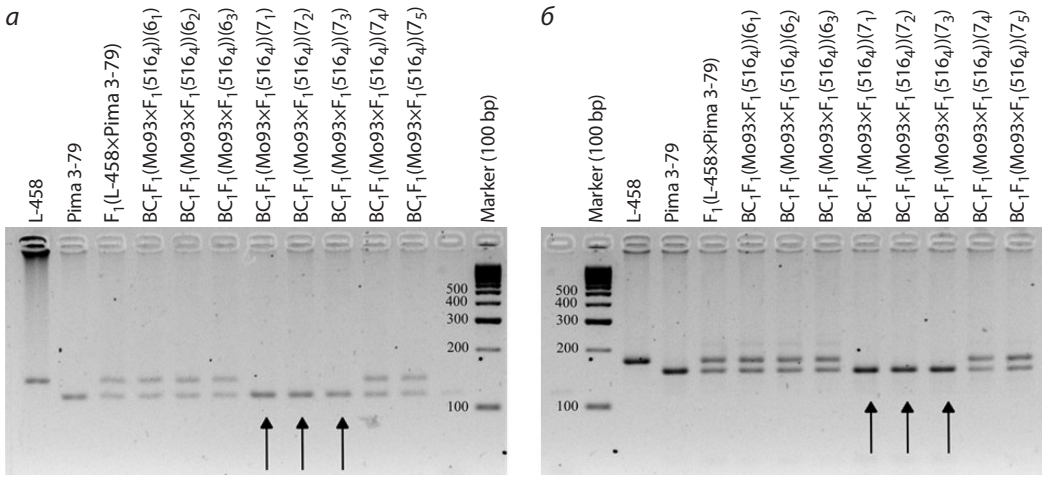


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков $BC_1F_1(Mo93\times F_1(516_4))$ по хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника.

а – маркер BNL3971; *б* – JESPR179.

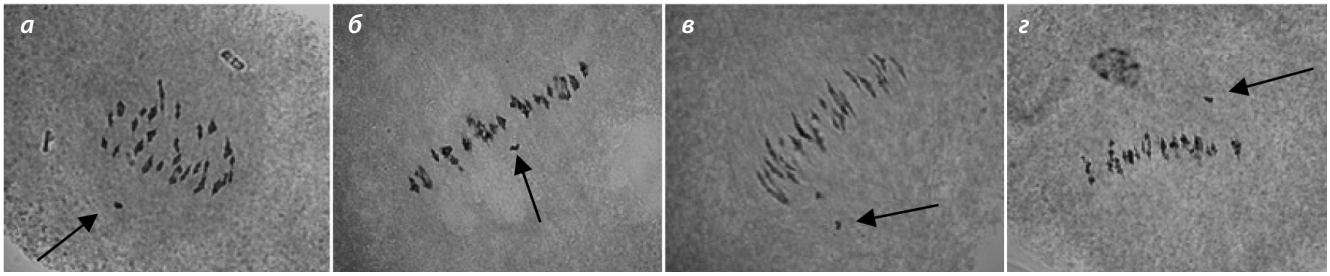


Рис. 2. Конфигурации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений BC_1F_1, полученных от скрещиваний моносомных линий с межвидовыми моносомными гибридами F_1: *а* – $BC_1F_1(Mo11\times F_1(766_3))$ (494_2); *б* – $BC_1F_1(Mo16\times F_1(98_2))$ (497_1); *в* – $BC_1F_1(Mo19\times F_1(769_4))$ (8_8); *г* – $BC_1F_1(Mo93\times F_1(516_4))$ (88_1) с хромосомой 2 A_t-субгенома *G. barbadense*.

Стрелкой показаны унивалеты.

Изучение мейоза у гибридов BC_1F_1 с идентифицированными унивалентами. У 17 моносомных растений в четырех беккроссных вариантах, полученных от скрещиваний моносомных линий вида *G. hirsutum* с межвидовыми моносомными гибридами F_1(Мо×Pima 3-79), была изучена конъюгация хромосом на стадии метафазы I (MI) мейоза. В результате семь моносомиков было найдено среди беккроссных растений в варианте $BC_1F_1(Mo16\times F_1(98_6))$, по одному – в вариантах $BC_1F_1(Mo11\times F_1(766_3))$ и $BC_1F_1(Mo19\times F_1(769_4))$, и восемь – в варианте $BC_1F_1(Mo93\times F_1(516_4))$.

Анализ MI мейоза у моносомиков BC_1F_1, где все беккроссные моносомные растения имели унивалентные хромосомы *G. barbadense*, выявил модальную конъюгацию хромосом с 25 бивалентами и одним унивалентом, характерную для моносомиков тетраплоидного хлопчатника (Приложение 10). Анализ размера унивалентов у моносомиков BC_1F_1 подтвердил крупный размер хромосомы 2 *G. barbadense* во всех четырех вариантах скрещиваний (рис. 2), что свидетельствовало об их принадлежности к A_t-субгеному хлопчатника.

Большинство изученных моносомиков BC_1F_1 характеризовалось высоким мейотическим индексом (до 95.74±0.47) и малым числом тетрад с микроядрами (до 3.86±0.65 %), за исключением двух моносомиков (922_8 и 7_3) со сниженным мейотическим индексом (89.04±0.94 и 88.57±1.13 соответственно) и увеличенным числом тетрад с микроядрами (до 4.75±0.64 и 5.15±0.78 % соответственно) (рис. 3, Приложение 11).

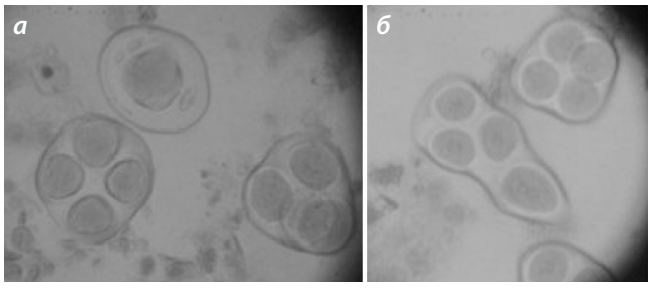


Рис. 3. Спорады у гибридного растения $BC_1F_1(Mo93\times F_1(516_4))$ (88_7): *а* – монада с тремя микроядрами и тетрады; *б* – аномальная тетрада и нормальная тетрада.

Жизнеспособность пыльцы была оценена у моносомиков BC_1F_1 с помощью окраски ацетокармином. Только два моносомика (922_8 и 923_7) продемонстрировали высокую жизнеспособность пыльцы (до 94.21±1.06 %) (рис. 4, Приложение 12). Шесть моносомиков показали небольшую редукцию жизнеспособности пыльцы (от 88.38±1.46 до

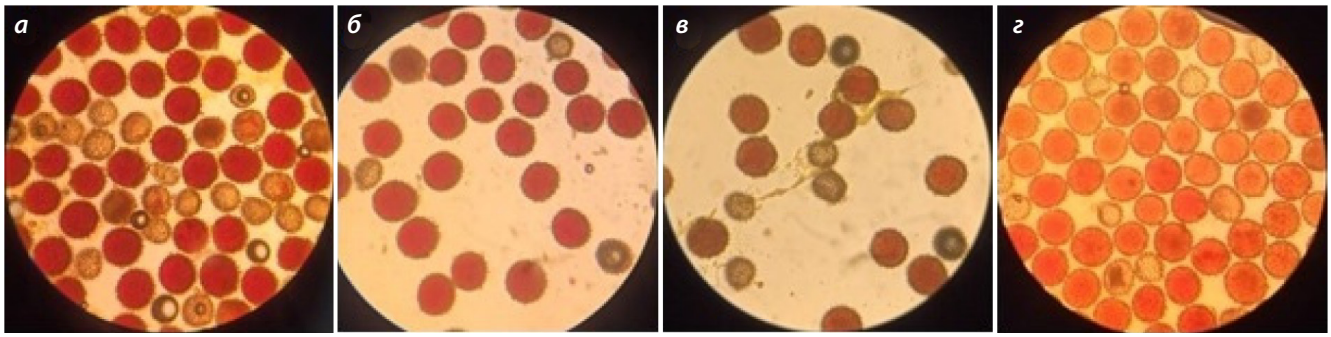


Рис. 4. Стерильная (неокрашенная) и фертильная (окрашенная) пыльца у моносомных гибридов BC_1F_1, полученных от скрещиваний моносомной линии с моносомным гибридом F_1(Mo×Pima 3-79): *а*, *б* (88_4) и *в*, *г* (89_4) в варианте BC_1F_1(Mo93×F_1(516_4)).

81.15±1.52 %), но пять моносомиков (7_2, 88_1, 88_4, 88_7, 89_4) в одном варианте скрещивания BCC_1F_1(Mo93×F_1(516_4)) отличались сильной редукцией жизнеспособности пыльцы (от 62.65±2.15 до 77.47±1.64 %).

Особенности скрещиваемости, завязываемости и всхожести гибридных семян BC_2F_1 с участием моносомных линий с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома *G. hirsutum*. Три моносомные линии с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. hirsutum* цитогенетической коллекции скрещивали с моносомными гибридами BC_1F_1(Mo×F_1(Mo×Pima 3-79)), которые имели замещения хромосомы 2 A_t-субгенома *G. barbadense*. При сравнении с гибридами F_1 и BC_1F_1 установлено сильное снижение скрещиваемости (от 18.18 до 3.47 %) (Приложение 13). Изучение завязываемости гибридных семян у растений BC_2F_1 выявило ее сильное уменьшение (от 47.47±5.02 до 27.69±5.55 %) при сравнении с гибридами F_1 и BC_1F_1. Всхожесть беккроссных семян BC_2F_1 тоже снизилась (от 69.23 до 44.44 %), причем моносомная линия Mo93 выделялась самым сильным снижением завязываемости и всхожести при сравнении с двумя другими моносомными линиями.

Идентификация замещения хромосомы 2 A_t-субгенома *G. barbadense* у гибридов BC_2F_1 и BC_3F_1 с использованием хромосом-специфичных молекулярно-генетических маркеров. Ранее нами было показано, что пять моносомных проростков (21_1, 21_2, 21_4, 21_7 и 22_1) в варианте BC_2F_1(Mo16×BC_1F_1(923_7)) с предполагаемым замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника характеризовались присутствием хромосом-специфичных аллелей только от линии Л-458 вида *G. hirsutum*, в то время как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали, что указывало на элиминацию чужеродной хромосомы (Санамьян и др., 2023).

Согласно результатам нового изучения двух вариантов с участием линии Mo16, но двух разных гибридов BC_1F_1 – BC_2F_1(Mo16×BC_1F_1(922_8)) и BC_2F_1(Mo16×BC_1F_1(923_7)), в первом варианте у трех проростков (817_1, 817_4 и 817_6) наблюдалось присутствие хромосом-специфичных аллелей только от вида *G. barbadense*, тогда как аллели от вида *G. hirsutum* отсутствовали. Во втором варианте четыре проростка (818_2, 818_3, 818_4 и 818_7) характеризовались наличием аллелей только от вида *G. hirsutum*, что говорит об элиминации чужеродной хромосомы. Поскольку прежде хромосом-специфичные SSR-маркеры BNL3971,

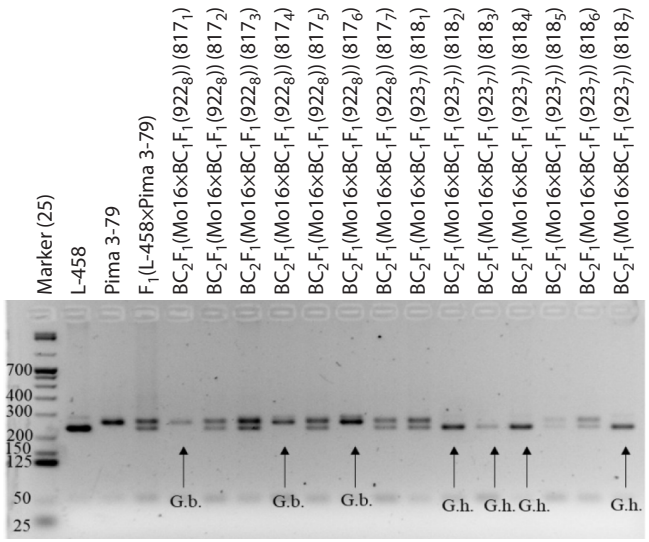


Рис. 5. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков BC_2F_1(Mo16×BC_1F_1(922_8)) по хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника.

Маркер DPL0674.

TMB1194, CIR376, DPL0674 были локализованы на хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2013, 2015; Wang et al., 2016), то полученные данные указали на присутствие замещения хромосомы 2 у первых трех проростков (рис. 5, Приложения 14, 19).

SSR-основанный делеционный анализ в комбинациях BC_2F_1(Mo19×BC_1F_1(8_8)) и BC_2F_1(Mo93×BC_1F_1(88_4)) с предполагаемым замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника позволил обнаружить аллели вида *G. barbadense* только у 10 беккроссных проростков (820_2, 820_3, 820_7, 820_{10}, 820_{14}, 820_{17}, 821_2, 821_3, 821_6, 821_{10}) первого варианта и у одного (515_1) – второго. Аллели вида *G. hirsutum* отсутствовали. Поскольку прежде хромосом-специфичные SSR-маркеры BNL834, BNL1434, BNL1897, BNL3292, BNL3413, BNL3424, BNL3547, BNL3971, BNL3972, JESPR101, JESPR179, JESPR304, TMB0471, TMB1194, CIR376, CIR381, CIR401, DPL0674, NAU2277 были локализованы на хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009; Saha et al., 2013, 2015; Wang et al., 2016; https://www.cottongen.org/

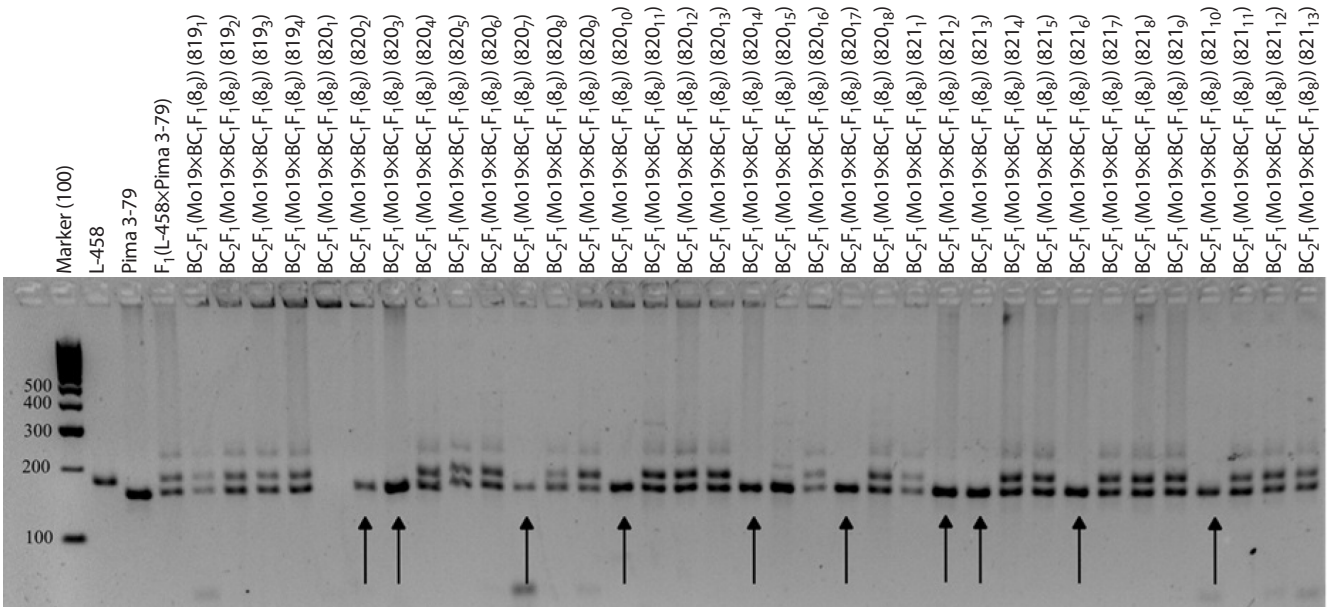


Рис. 6. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков BC_2F_1(Mo19×$BC_1F_1(8_8)$) по хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника.

Маркер JESPR179.

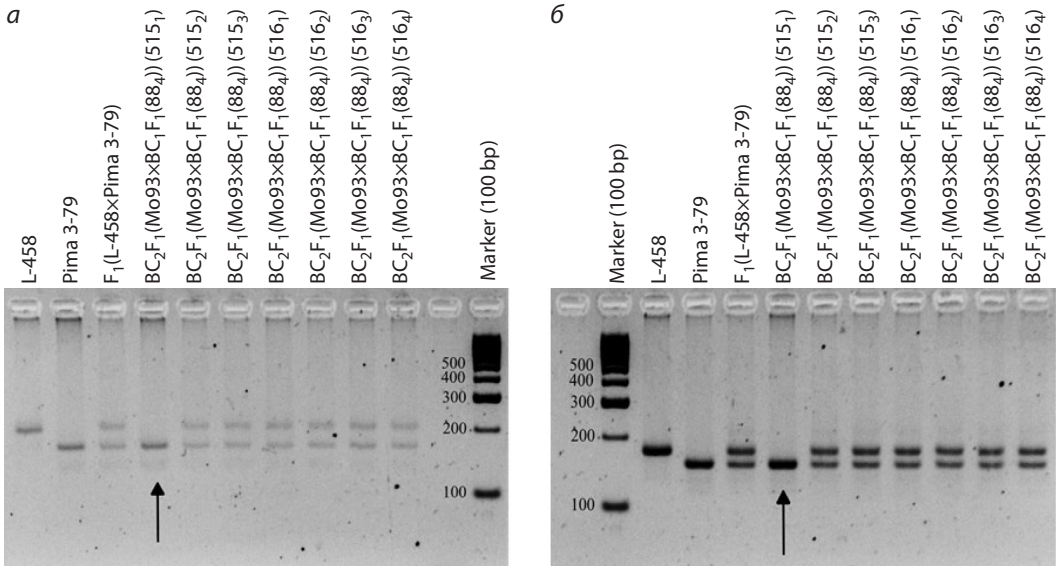


Рис. 7. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков BC_2F_1(Mo93×$BC_1F_1(88_4)$) по хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника.

а – маркер TMB0471; *б* – JESPR179.

data/download/marker_origin), полученные данные указали на наличие замещения этой хромосомы у изученных проростков (рис. 6 и 7, Приложения 15–17, 19).

Используя сходный анализ, в комбинации BC_3F_1(Mo93×$\times BC_2F_1(515_1)$) с предполагаемым замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника были выявлены аллели *G. barbadense* у семи беккроссных проростков (839_1, 839_2, 839_4, 839_9, 839_{10}, 839_{11}, 839_{12}), в то время как аллели вида *G. hirsutum* отсутствовали. Прежде хромосом-специфичные SSR-маркеры DPL0674 и JESPR179 были локализованы на хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009; Yu et al., 2011; Saha et al., 2013, 2015; Wang et al., 2016), поэтому полученные данные указали на наличие замещения этой хромосомы у изученных проростков (рис. 8, Приложения 18, 19).

Изучение мейоза у гибридов BC_2F_1 с идентифицированными унивалентами. Изучение коньюгации хромосом на стадии MI мейоза позволило обнаружить по одному беккроссному моносомику в каждом из трех беккроссных вариантов BC_2F_1 (с участием линий Mo16, Mo19 и Mo93) на момент написания статьи.

Анализ MI мейоза у трех моносомиков BC_2F_1, где один моносомик (21_1) – из одного варианта скрещиваний с унивалентной хромосомой 2 A_t-субгенома хлопчатника

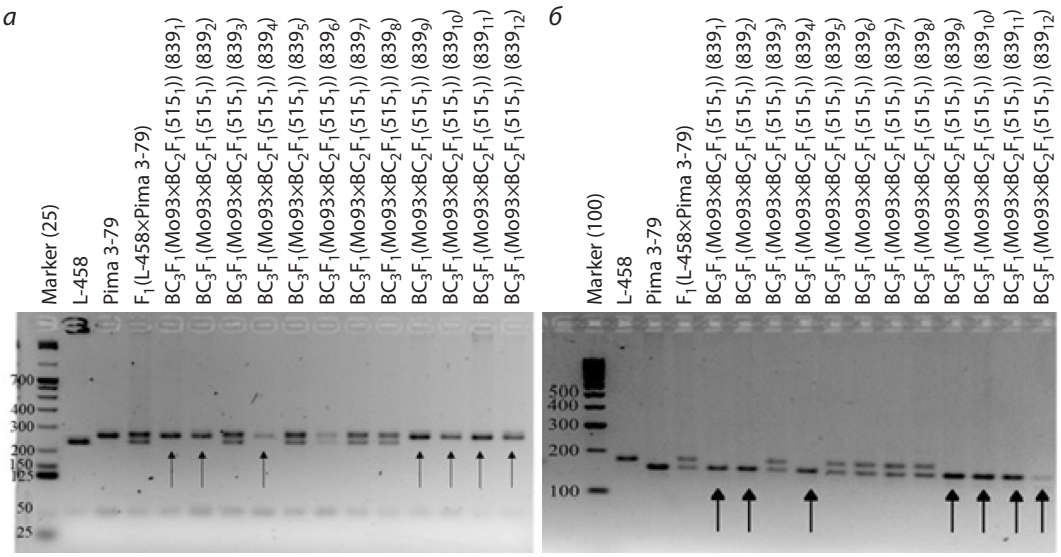


Рис. 8. Электрофореграмма ДНК-ампликонов SSR-маркеров у гибридных проростков BC_3F_1(Mo93×$BC_2F_1(515_1)$) по хромосоме 2 A_t-субгенома хлопчатника.

а – маркер DPL0674; *б* – JESPR179.

G. hirsutum (Санамьян и др., 2023), а два других моносомика (821_{10} и 515_1) – из двух вариантов скрещиваний с унивалентными хромосомами 2 вида *G. barbadense*, выявил модальную конъюгацию хромосом с 25 бивалентами и одним унивалентом, что стало подтверждением их моносомного статуса. Анализы размера унивалентов у моносомиков BC_2F_1 определили большой размер хромосомы 2 *G. hirsutum* и такой же размер у моносомиков BC_2F_1 с хромосомой 2 *G. barbadense*.

Особенности передачи хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника при беккроссировании моносомных линий с нехваткой этой хромосомы моносомными гибридами разных поколений беккроссов. Молекулярно-генетический анализ беккроссных проростков (на стадии 3–5 настоящих листьев), проведенный с помощью хромосом-специфичных молекулярных маркеров (SSR), позволил оценить частоту и характер передачи хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника у гибридных растений BC_1F_1. В результате изучения пяти беккроссных семей BC_1F_1 в варианте BC_1F_1(Mo11×$F_1(766_3)$) был обнаружен только один проросток (494_2) с присутствием замещенной хромосомы, что говорило об очень редкой частоте передачи хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense* (3.13 %) (рис. 9, Приложение 20).

У гибридов BC_1F_1 в комбинации скрещивания BC_1F_1(Mo16×$F_1(98_6)$) было найдено семь проростков с замещением хромосомы 2, которые характеризовались присутствием полиморфных аллелей только от вида *G. barbadense*, что указало на более высокую частоту передачи хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense* (21.21 %) в этом варианте. Однако изучение передачи этой хромосомы у гибридов BC_2F_1 в варианте BC_2F_1(Mo16××$BC_1F_1(923_7)$) выявило присутствие хромосом-специфичных аллелей только от вида *G. hirsutum*, тогда как аллели вида *G. barbadense* отсутствовали, что свидетельствовало об отсутствии замещения хромосомы 2 у пяти изученных гибридов. Повторный анализ гибридов BC_2F_1 в двух вариантах скрещиваний позволил идентифицировать в одном варианте BC_2F_1(Mo16×$BC_1F_1(923_7)$) четыре гибрида с присутствием хромосом-специфичных аллелей только от вида *G. hirsutum*, что привлекло внимание к повторной элиминации этой хромосомы, тогда как в другом варианте (922_8) наблюдалось замещение хромосомы 2 от вида *G. barbadense.* В целом в BC_2F_1 с участием моносомной линии Mo16 частота передачи замещенной хромосомы характеризовалась снижением (до 12.00 %) при сравнении с гибридами BC_1F_1, а также элиминацией у большей части гибридов (36.00 %). Причем элиминация замещенной хромосомы происходила в одном варианте скрещиваний с участием одного и того же гибридного растения BC_1F_1, что позволило предполагать влияние генотипа на характер передачи хромосомы (см. рис. 9, Приложение 20).

Среди гибридов одной семьи в варианте BC_1F_1(Mo19××$F_1(769_4)$) с предполагаемым замещением хромосомы 2 было выявлено единственное гибридное растение (8_8), у которого присутствовал аллель от *G. barbadense*, что указало на передачу замещенной хромосомы 2 с низкой частотой (12.50 %). Однако при изучении передачи этой хромосомы у гибридов BC_2F_1 в варианте BC_2F_1(Mo19××$BC_1F_1(8_8)$) выявлены хромосом-специфичные аллели только от вида *G. barbadense* у десяти гибридов в трех проанализированных семьях, что говорит о более высокой передаче замещенной хромосомы 2 (28.57 %) при сравнении с гибридами BC_1F_1 (см. рис. 9, Приложение 20).

Девять гибридов с замещением хромосомы 2, которые характеризовались присутствием аллелей только от *G. barbadense*, было обнаружено в варианте BC_1F_1(Mo93××$F_1(516_4)$). Это указало на высокую частоту передачи данной хромосомы (42.86 %). Среди гибридов BC_2F_1 в варианте BC_2F_1(Mo93×$BC_1F_1(88_4)$) только у одного гибрида из двух семей выявлено замещение от *G. barbadense*, что подтвердило низкую частоту замещения хромосомы 2 (14.29 %). Однако изучение передачи этой хромосомы у гибридов BC_3F_1 в варианте BC_3F_1(Mo93×$BC_2F_1(515_1)$)

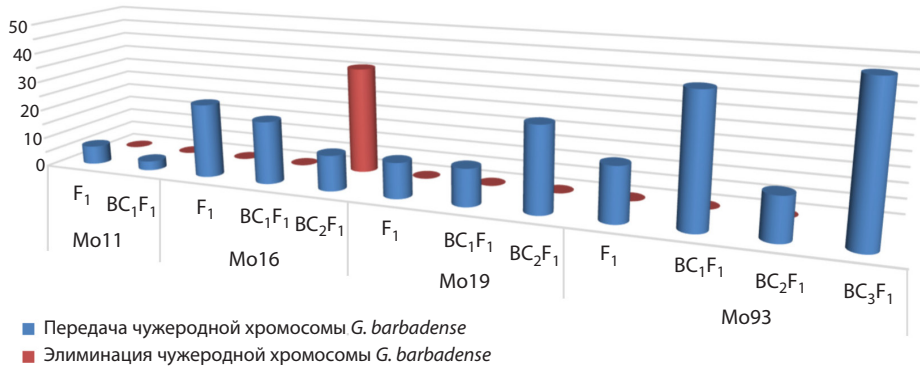


Рис. 9. Частота встречаемости моносомных гибридов с чужеродной хромосомой 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. barbadense*.

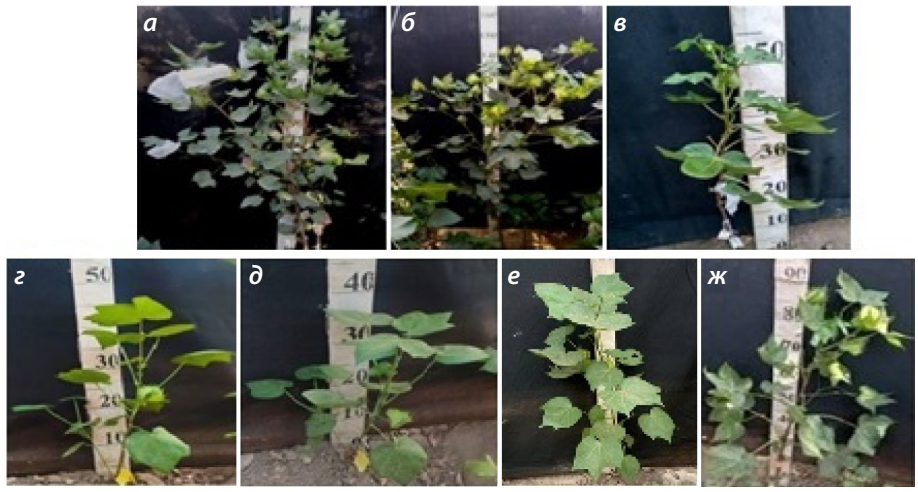


Рис. 10. Растения исходных линий и моносомных гибридов хлопчатника F_1 и BC_2F_1, полученных от скрещиваний рекуррентного родителя с моносомными гибридами.

а – моносомная линия Mo16 по хромосоме 2 A_t-субгенома; *б* – F_1(Mo16×Pima 3-79) (98_2); *в–д* – BC_1F_1(Mo16×$F_1$$98_6$) с замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника *G. barbadense*: *в* – 923_7, *г* – 495_5, *д* – 497_4; *е* – BC_2F_1(Mo16×$BC_1F_1922_8$) (817_4) с замещением хромосомы 2; *ж* – BC_2F_1(Mo16×$BC_1F_1923_7$) (21_1) без замещения хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника *G. barbadense*.

позволило охарактеризовать присутствие хромосом-специфичных аллелей от вида *G. barbadense* у семи гибридов из 12 изученных, т. е. передача хромосомы 2 наблюдалась более чем у половины гибридов (58.33 %) (см. рис. 9, Приложение 20).

Морфобиологический анализ моносомных гибридов BC_1F_1, BC_2F_1 и BC_3F_1, полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника *G. hirsutum* с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома с моносомными гибридами разных поколений беккроссов с замещением хромосомы. Морфобиологический анализ беккроссных моносомных гибридов BC_1F_1 с замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника показал низкий рост (в среднем до 50 см), уменьшение размера трехлопастных листьев, бутонов и цветков, небольшую облиственность, укорочение междоузлий, а также слабые бутонизацию и цветение в течение первого года вегетации (всего 2–3 бутона и цветка на растение) при сравнении с рекуррентным родителем. Особой низкорослостью и снижением темпов роста отличались беккроссные гибриды с участием моносомной линии Mo16 (рис. 10). На второй и третий год вегетации происходило увеличение размера листьев, числа бутонов и количества раскрытых коробочек.

Беккроссные моносомные гибриды BC_2F_1 и BC_3F_1 с замещением хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника характеризовались более высоким ростом (до 80 см), средней облиственностью, более крупными трехдольчатыми листьями, увеличенным числом цветков и шаровидных коробочек среднего размера, при сравнении с моносомными гибридами BC_1F_1 с замещением хромосомы 2.

Обсуждение

Межвидовые скрещивания различных тетраплоидных видов хлопчатника характеризуются высокой скрещиваемостью и фертильностью гибридов первого поколения, однако в более поздних поколениях наблюдается снижение всех этих показателей и массовая стерильность (Мауер, 1954; Абдуллаев, 1974).

При изучении скрещиваемости и завязываемости беккроссных семян, полученных от скрещиваний моносом-

ных линий с нехваткой хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. hirsutum* с межвидовыми моносомными гибридами F_1 и беккроссными моносомными гибридами BC_1F_1, обнаружено существенное снижение скрещиваемости у всех изученных беккроссных гибридов, тогда как завязываемость и всхожесть гибридных семян уменьшились у большинства гибридов. Последнее объяснялось снижением этих показателей у исходных моносомных линий из-за наличия большого количества нуллисомных гамет, а также гемизиготности материнских и отцовских растений, что приводило к присутствию многочисленных неоплодотворенных яйцеклеток в виде улюков и низкой всхожести семян с нуллисомией.

Для идентификации чужеродных интрогрессий применяется молекулярно-генетический метод с использованием микросателлитных маркеров (SSR), которые широко распространены в геномах эукариот и имеют высокий уровень полиморфизма. К настоящему времени у хлопчатника создано несколько коллекций таких маркеров (BNL, JESPR, CIR, DPL, NAU) и построены молекулярно-генетические карты сцепления, благодаря хромосомной специфичности многих SSR-маркеров (Liu et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009; Yu et al., 2011; Saha et al., 2013, 2015; Wang et al., 2016; https://www.cottongen.org/data/download/marker_origin). Наличие или отсутствие продуктов амплификации микросателлитных маркеров после проведения полимеразной цепной реакции позволяет судить о присутствии или отсутствии чужеродной хромосомы в изученном генотипе. Поэтому выполненный нами молекулярно-генетический скрининг беккроссных гибридов на стадии проростков позволил быстро выявить замещения хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. barbadense*.

Показано, что скрининг хромосом-специфичных маркеров на основе ПЦР имеет более высокую производительность и гораздо большую результативность по сравнению с прямым цитологическим наблюдением (Polgári et al., 2019). Особенно в случае невозможности выявления и наблюдения чужеродного генетического материала непосредственно на цитологических препаратах с помощью FISH и GISH гибридизации.

Оригинальность нашего подхода состоит в разработке новой схемы целенаправленного запланированного замещения специфических хромосом с помощью моносомных линий с ранее установленной принадлежностью унивалентных хромосом и молекулярных хромосом-специфических микросателлитных маркеров (SSR) на стадии проростков. В процессе создания новых хромосом-замещенных линий, согласно этой схеме, выяснились существенные отличия между специфическими хромосомами генома хлопчатника по частоте передачи чужеродных хромосом, по их элиминации на разных стадиях беккроссирования, а также по морфобиологическим особенностям беккроссных гибридов. Настоящая статья представляет данные о специфических последствиях передачи генетического материала хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника *G. hirsutum* с участием четырех моносомных линий.

Результаты исследования беккроссных потомств BC_1F_1, BC_2F_1 и BC_3F_1 (в одном варианте скрещиваний) показали, что частота передачи хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. barbadense* зависела как от генотипа моносомной линии, так и от генотипа беккроссного гибрида, использованного в скрещивании. Так, уровень передачи хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. barbadense* в первом беккроссном поколении с участием четырех моносомных линий варьировал в широких пределах (от 3.13 до 42.86 %), тогда как в поколении BC_2F_1, где вовлечено было только три моносомных линии, частота передачи была заметно снижена и варьировала в менее узких пределах (от 12.00 до 28.57 %). Однако в поколении BC_3F_1, включавшем лишь одну моносомную линию (Mo93), наблюдалась самая высокая частота передачи хромосомы 2 (58.33 %) у более половины изученных гибридов. Причем именно эта линия характеризовалась самым высоким средним числом замещений на геном гибрида среди всех четырех линий. Кроме того, была обнаружена элиминация хромосомы 2 A_t-субгенома в варианте $BC_2F_1(Mo16\times BC_1F_1(923_7))$ с участием одного и того же отцовского беккроссного моносомного гибридного растения (923_7) в течение двух экспериментов, что говорит о преимущественной элиминации хромосомы 2 в изученных беккроссных потомствах и о влиянии конкретного отцовского генотипа на этот процесс. Поэтому проведенный анализ особенностей трансмиссии чужеродной хромосомы 2 указал на различия в конкурентоспособности этой хромосомы при передаче потомству в генотипической среде четырех моносомных линий.

Известно, что успех замещения зависит от того, насколько хорошо чужеродная хромосома компенсирует отсутствующую хромосому, поскольку трудно предполагать, чтобы каждая чужеродная хромосома могла бы одинаково компенсировать отсутствие гомеологичных хромосом (Моррис, Сирс, 1970).

Ранее была обнаружена зависимость интрогрессии хромосом ржи от генотипической среды реципиента. Так, в популяции гибридов F_2 между пшенично-ржаной замещенной линией по хромосомам 1R+2R и сортами озимой пшеницы Holme и Kraka наблюдались различия по частотам встречаемости хромосом ржи (Merker, Forsstrom, 2000). Отмечалось, что генотип сорта влиял также на частоты образования телоцентриков по хромосоме ржи и транслокации T2R.2DL (Красилова и др., 2011).

Случаи полной однородительской элиминации хромосом целого генома широко известны (Ishii et al., 2016; Dedukh, Krasikova, 2021). Они являются результатом гибридизации между отдаленно родственными видами и служат элементом защиты целостности генома от «геномного шока» (McClintock, 1984). Пример – предпочтительная элиминация хромосом целого D-генома у гибридов первого поколения при гибридизации пшеницы с рожью (Li et al., 2015).

Примеры частичной элиминации отдельных хромосом не так многочисленны, но известно, что в каждом конкретном случае у межвидовых гибридов действуют разные механизмы элиминации хромосом, в зависимости от участия конкретного вида. Так, оценка большой популяции гибридов пшеницы с ячменем с помощью геномной *in situ* гибридизации (GISH) и SSR-маркеров выявила отсутствие предпочтения элиминации отдельных

хромосом ячменя на фоне пшеницы (Polgári et al., 2019). А изучение процесса трансмиссии хромосомы 5R через гаметы пшенично-ржаных димоносомиков 5R5D обнаружило значительно меньшую конкурентоспособность этой хромосомы в передаче потомству и ее преимущественную элиминацию (Силкова и др., 2011). Установлено, что селективная элиминация хромосом *H. bulbosum* L. связана с утратой одного из видов гистонового белка H3(CENH3) в центромере, приводящей к его неактивности и отсутствию прикрепления хромосом к веретену деления, а также к формированию микроядер и их дегенерации (Sanei et al., 2011). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов центромерного гистона CENH3 у пшенично-ржаных аллополиплоидов разной плоидности позволил определить повышенную экспрессию ржаных вариантов CENH3, что связано с поддержанием жизнеспособного гибридного генома (Evtushenko et al., 2019). На примере мягкой пшеницы показан широкий спектр особенностей интрогрессии чужеродного хроматина, который представляет значительный потенциал для обогащения генофонда (Адонина и др., 2021).

Хотя скрининг присутствия чужеродных хромосом в беккроссных потомствах хлопчатника с помощью молекулярно-генетических маркеров позволил обнаружить специфические последствия интрогрессии хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense* на разных этапах беккроссирования, изучение поведения унивалентных хромосом на стадии MI мейоза показало схожесть конъюгации у беккроссных моносомиков с унивалентной хромосомой 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. hirsutum* и унивалентной хромосомой 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense*.

Рассмотренные нами беккроссные моносомики BC_1F_1 характеризовались общей задержкой развития вегетативных и генеративных органов в виде низкорослости, сниженной облиственности, слабых бутонизации и цветения в течение первого года вегетации. Это затрудняло их исследование и беккроссирование, а также значительно усложняло и замедляло создание хромосом-замещенных форм. Однако в течение второго года вегетации у беккроссных растений наблюдалась нормализация развития вегетативных и генеративных органов.

Схожая карликовость отмечена у моносомной чужеродной дополненной линии хлопчатника *G. hirsutum*/*G. bickii* Proch. с замещением хромосомы 10 Gb (MAAL), созданной с помощью скрещиваний с амфидиплоидом ($2n = 78$, $AADDG_1G_1$) и хромосом-специфичных SSR-маркеров (Tang et al., 2018). Можно предположить, что такие изменения в морфобилогии происходили вследствие реорганизации гибридного генома и интрогрессии чужеродного хроматина.

Заключение

В настоящей работе показаны негативные последствия интрогрессии хромосомы 2 A_t-субгенома хлопчатника вида *G. barbadense* в геном хлопчатника *G. hirsutum* с участием четырех моносомных линий. К таким последствиям относятся: снижение скрещиваемости, завязываемости и всхожести гибридных семян; варьирование уровня передачи чужеродной хромосомы 2 в широких пределах (от 3.13 до 42.86 %) в BC_1F_1, но в менее узких пределах (от 12.00 до 28.57 %) в BC_2F_1; элиминация хромосомы 2 A_t-субгенома вида *G. barbadense* в варианте $BC_2F_1(Mo16\times BC_1F_1(923_7))$ с участием одного и того же отцовского генотипа, что указало на влияние конкретного отцовского генотипа на этот процесс; низкорослость и сниженная облиственность, слабые бутонизация и цветение в первый год вегетации, однако увеличение числа бутонов, цветков и коробочек у моносомных гибридов следующих беккроссных поколений.

Список литературы / References

Абдуллаев А.А. Эволюция и систематика полиплоидных видов хлопчатника. Ташкент, 1974
[Abdullaev A.A. Evolution and Taxonomy of Polyploid Species of Cotton. Tashkent, 1974 (in Russian)]

Адонина И.Г., Тимонова Е.М., Салина Е.А. Интрогрессивная гибридизация мягкой пшеницы: результаты и перспективы. *Генетика*. 2021;57(4):384-402. doi 10.31857/S0016675821030024
[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]

Красилова Н.М., Адонина И.Г., Силкова О.Г., Шумный В.К. Особенности передачи хромосомы ржи 2R при беккроссировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D) различными сортами мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2011;15(3):554-562
[Krasilova N.M., Adonina I.G., Silkova O.G., Shumny V.K. Transmission of rye chromosome 2R in backcrosses of wheat-rye 2R (2D substitution lines to various common wheat varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(3):554-562 (in Russian)]

Мауер Ф.М. Происхождение и систематика хлопчатника. Т. 1. Хлопчатник. Ташкент, 1954
[Mauer F.M. Origin and Taxonomy of Cotton. Vol. 1. Cotton. Tashkent, 1954 (in Russian)]

Моррис Е.Р., Сирс Э.Р. Цитогенетика пшеницы и родственных форм. Пшеница и ее улучшение. М.: Колос, 1970
[Morris E.R., Sears E.R. Cytogenetics of Wheat and Related Forms. Wheat and its Improvement. Moscow: Kolos Publ., 1970 (in Russian)]

Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У. Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):836-845. doi 10.18699/VJ19.557
[Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U. Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019; 23(7):836-845. doi 10.18699/VJ19.557]

Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахмонов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией нехваток отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):643-652. doi 10.18699/VJ16.186
[Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U., Makamov A.X., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Y. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(5):643-652. doi 10.18699/VJ16.186 (in Russian)]

Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Абдукаримов Ш.С., Силкова О.Г. Молекулярно-генетический и цитогенетический анализ интрогрессии хромосом хлопчатника *Gossypium barbadense* L. в геном *G. hirsutum* L. у гибридов BC_2F_1. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):958-970. doi 10.18699/VJGB-23-110

[Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U., Abdukarimov Sh.S., Silkova O.G. Molecular-genetic and cytogenetic analyses of cotton chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into the genome of *G. hirsutum* L. in BC_2F_1 hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023; 27(8):958-970. doi 10.18699/VJGB-23-110]

Силкова О.Г., Леонова И.Н., Красилова Н.М., Дубовец Н.И. Преимущественная элиминация хромосомы ржи 5R в потомстве димоносомиков 5R5D. *Генетика*. 2011;47(8):1064-1072
[Silkova O.G., Leonova I.N., Krasilova N.M., Dubovets N.I. Preferential elimination of chromosome 5R of rye in the progeny of 5R5D dimonosomics. *Russ J Genet*. 2011;47(8):942-950. doi 10.1134/S1022795411080151]

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

Dedukh D., Krasikova A. Delete and survive: strategies of programmed genetic material elimination in eukaryotes. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2021;97(1):195-216. doi 10.1111/brv.12796

Endrizzi J.E., Turcotte E.L., Kohel R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. *Adv Genet.* 1985;23:271-375. doi 10.1016/S0065-2660(08)60515-5

Evtushenko E.V., Lipikhina Y.A., Stepochkin P.I., Verchinin A.V. Cytogenetic and molecular characteristics of rye genome in octoploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack). *Comp Cytogenet*. 2019;13(4): 423-434. doi 10.3897/compcytogen.v13i4.39576

Fang D.D., Thyssen G.N., Wang M., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jones D.C. Genomic confirmation of *Gossypium barbadense* introgression into *G. hirsutum* and a subsequent MAGIC population. *Mol Genet Genomics*. 2023;298(1):143-152. doi 10.1007/s00438-022-01974-3

Gutiérrez O.A., Stelly D.M., Saha S., Jenkins J.N., McCarty J.C., Raska D.A., Scheffler B.E. Integrative placement and orientation of non-redundant SSR loci in cotton linkage groups by deficiency analysis. *Mol Breeding*. 2009;23:693-707. doi 10.1007/s11032-009-9266-y

Ishii T., Karimi-Ashtiyani R., Houben A. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*. 2016;67:421-438. doi 10.1146/annurev-arplant-043014-114714

Jenkins J.N., Wu J., McCarty J.C., Saha S., Gutiérrez O., Hayes R., Stelly D.M. Genetic effects of thirteen *Gossypium barbadense* L. chromosome substitution lines in top crosses with upland cotton cultivars: I. Yield and yield components. *Crop Sci*. 2006;46(3): 1169-1178. doi 10.2135/cropsci2005.08-0269

Jenkins J.N., McCarty J.C., Wu J., Saha S., Gutiérrez O., Hayes R., Stelly D.M. Genetic effects of thirteen *Gossypium barbadense* L. chromosome substitution lines in top crosses with upland cotton cultivars: II. Fiber quality traits. *Crop Sci*. 2007;47(2):561-572. doi 10.2135/cropsci2006.06.0396

Li H., Guo X., Wang Ch., Ji W. Spontaneous and divergent hexaploid triticales derived from common wheat × rye by complete elimination of D-genome chromosomes. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120421. doi 10.1371/journal.pone.0120421

Liu S., Saha S., Stelly D.M., Burr B., Cantrell R.G. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *Hered.* 2000;91(4): 326-332. doi 10.1093/jhered/91.4.326

McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984;226(4676):792-801. doi 10.1126/science.15739260

Merker A., Forsstrom P.O. Isolation of mildew resistant wheat-rye translocations from a double substitution line. *Euphytica*. 2000;115: 167-172. doi 10.1023/A:1004018500970

Polgári D., Mihók E., Sági L. Composition and random elimination of paternal chromosomes in a large population of wheat-barley (*Triticum aestivum* L. × *Hordeum vulgare* L.) hybrids. *Plant Cell Rep*. 2019;38:767-775. doi 10.1007/s00299-019-02405-1

Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jr., Gutiérrez O.A., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. *J Cotton Sci.* 2004;8(3):162-169

Saha S., Raska D.A., Stelly D.M. Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) × Hawaiian cotton (*G. tomentosum* Nutt. ex Seem.) F_1 hybrid hypoaneuploid chromosome substitution series. *J Cotton Sci*. 2006;10(4):263-272

Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Hayes R., Stelly D.M. Genetic dissection of chromosome substitution lines of cotton to discover novel *Gossypium barbadense* L. alleles for improvement of agronomic traits. *Theor Appl Genet*. 2010;120(6):1193-1205. doi 10.1007/s00122-009-1247-3

Saha S., Raska D.A., Stelly D.M., Manchali Sh., Gutiérrez O.A. Hypoaneuploid chromosome substitution F_1 hybrids of *Gossypium hirsutum* L. × *G. mustelinum* Miers ex Watt. *J Cotton Sci*. 2013; 17(2):102-114

Saha S., Stelly D.M., Makamov A.K., Ayubov M.S., Raska D., Gutiérrez O.A., Shivapriya M., Jenkins J.N., Dewayne D., Abdurakhmonov I.Y. Molecular confirmation of *Gossypium hirsutum* chromosome substitution lines. *Euphytica.* 2015;205:459-473. doi 10.1007/s10681-015-1407-2

Saha S., Bellaloui N., Jenkins J.N., McCarty J.C., Stelly D.M. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L., *G. tomentosum* Nutt. ex Seem and *G. mustelinum* Watt into *G. hirsutum* L. on cotton seed protein and oil content. *Euphytica*. 2020;216:118. doi 10.1007/s10681-020-02644-4

Sanamyan M.F., Petlyakova J., Rakhmatullina E.M., Sharipova E. Cytogenetic collection of Uzbekistan. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.) World Cotton Germplasm Resources. InTech, 2014;247-287. doi 10.5772/58589

Sanamyan M.F., Makamov A.K., Bobokhujaev Sh.U., Usmonov D.E., Buriev Z.T., Saha S., Stelly D.M. The utilization of translocation lines and microsatellite markers for the identification of unknown cotton monosomic lines. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.) Cotton Research. InTech, 2016;167-183. doi 10.5772/64558

Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U., Abdukarimov Sh.S., Makamov Kh.A., Silkova O.G. Features of chromosome introgression from *Gossypium barbadense* L. into *G. hirsutum* L. during the development of alien substitution lines. *Plants.* 2022;11(4):542. doi 10.3390/plants11040542

Sanei M., Pickering R., Kumke K., Nasuda S., Houben A. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(33):E498-E505. doi 10.1073/pnas.1103190108

Tang D., Feng S., Li S., Chen Yu., Zhou B. Ten alien chromosome additions of *Gossypium hirsutum–Gossypium bickii* developed by integrative uses of GISH and species-specific SSR markers. *Mol Genet Genomics.* 2018;293(4):1-11. doi 10.1007/s00438-018-1434-5

Ulloa M., Wang C., Saha S., Hutmacher R.B., Stelly D.M., Jenkins J.N., Burke J., Roberts P.A. Analysis of root-knot nematode and fusarium wilt disease resistance in cotton (*Gossypium* spp.) using chromosome substitution lines from two alien species. *Genetica.* 2016;144:167-179. doi 10.1007/s10709-016-9887-0

Wang P.Z., Bian L., Cao C. Mapping of nuclear male-sterile gene ms_{14} using SSR markers in cotton. *Mol Plant Breed*. 2016;7:35. doi 10.5376/mpb.2016.07.0035

Wendel J.F. New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(11):4132-4136. doi 10.1073/pnas.86.11.4132

Yu Yu., Yuan D., Liang Sh., Li X., Wang X., Lin Zh., Zhang X. Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC_1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *BMC Genomics*. 2011;12:15. doi 10.1186/1471-2164-12-15

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 19.08.2025. После доработки 07.11.2025. Принята к публикации 07.11.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1195-1202

doi 10.18699/vjgb-25-126

Внутрипопуляционные изменения *Puccinia hordei* под воздействием двухкомпонентных фунгицидов различных химических классов

М.С. Гвоздева, О.А. Кудинова, В.Д. Руденко, Г.В. Волкова

Федеральный научный центр биологической защиты растений, Краснодар, Россия
alosa@list.ru

Аннотация. Резистентность к фунгицидам является мировой проблемой, обуславливающей снижение их эффективности и срока действия вследствие изменения расового состава и вирулентности популяций фитопатогенов. В настоящее время зарегистрирована резистентность более чем у 230 грибных патогенов растений к 100 действующим веществам. Возбудитель карликовой ржавчины (*Puccinia hordei* Otth.) – один из распространенных и вредоносных в патокомплексе ячменя, в Южном федеральном округе, фиксируется на посевах ежегодно. Исследований по влиянию фунгицидов на характеристики популяции ржавчинных грибов крайне мало, а в отношении *P. hordei* в России не проводилось. Цель данной работы – проанализировать влияние фунгицидов из химических классов триазолов и стробилуринов на внутрипопуляционные изменения *P. hordei* по показателям патогенности (вирулентности и агрессивности) в условиях Северо-Кавказского региона России. Для исследования были выбраны двухкомпонентные фунгициды, разрешенные к применению на территории Российской Федерации: Деларо, КС; Амистар Экстра, СК; Амистар Голд, СК. Обработку растений проводили с использованием нескольких норм применения препаратов: 50, 100, 150 и 200 % (рекомендуемая норма применения принята за 100 %). При обработке растений ячменя озимого фунгицидами с различной нормой применения выявлены внутрипопуляционные изменения в структуре *P. hordei* по вирулентности. Во всех вариантах с увеличением нормы применения фунгицидов происходили снижение частоты изолятов, вирулентных к генам *Rph4*, *Rph5*, *Rph6+2*, *Rph12*, и увеличение частоты изолятов, вирулентных к *Rph14*. Не обнаружено изолятов, вирулентных к *Rph7*, как в исходной популяции, так и в вариантах опыта. Средняя вирулентность популяций гриба, обработанных фунгицидами, во всех вариантах опыта была ниже по сравнению с вирулентностью исходной популяции (без обработки) (48.5 %) и в зависимости от нормы применения варьировала от 33.8 (Амистар Голд, 50 %) до 28. 5 % (Амистар Голд, 200 %). Под действием повышенных норм применения препаратов отмечено увеличение длительности латентного периода развития инфекции – от 168 ч (исходная популяция) до 216 ч (Деларо, Амистар Голд, 200 %). Под действием фунгицидов установлено снижение спорулирующей способности (масса спор с одной пустулы варьировала от 0.013 (исходная популяция) до 0.002 мг (Деларо, Амистар Голд, 200 %) и жизнеспособности *P. hordei* (от 100 % для исходной популяции до 22.5 % при обработке Амистар Голд, 200 %). Таким образом, популяция *P. hordei*, подвергавшаяся обработке фунгицидами, характеризуется внутрипопуляционными изменениями по показателям агрессивности и вирулентности, что может существенно увеличивать потери урожая ячменя вследствие как снижения эффективности химической защиты, так и повышения вредоносности патогена.

Ключевые слова: ячмень; карликовая ржавчина; фунгициды; *Puccinia hordei*; резистентность; патогенность; популяция

Для цитирования: Гвоздева М.С., Кудинова О.А., Руденко В.Д., Волкова Г.В. Внутрипопуляционные изменения *Puccinia hordei* под воздействием двухкомпонентных фунгицидов различных химических классов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1195-1202. doi 10.18699/vjgb-25-126

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда № 23-76-10063, https://rscf.ru/project/23-76-10063/

Intrapopulation changes in *Puccinia hordei* induced by two-component fungicides from different chemical classes

M.S. Gvozdeva, O.A. Kudinova, V.D. Rudenko, G.V. Volkova

Federal Research Center of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia
alosa@list.ru

Abstract. Fungicide resistance is a global problem that reduces the effectiveness and duration of action of these compounds due to changes in the racial composition and virulence of phytopathogen populations. Currently, resistance to 100 active substances has been registered in more than 230 fungal plant pathogens. Leaf rust of barley (*Puccinia hordei* Otth.) is one of the most widespread and harmful pathogens in the barley pathocomplex; it is

© Гвоздева М.С., Кудинова О.А., Руденко В.Д., Волкова Г.В., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

recorded in southern Russia every year. There are very few studies on the effect of fungicides on the characteristics of rust fungi populations, and none have been carried out on *P. hordei* in Russia. This research aimed to analyze the effect of fungicides belonging to the chemical classes of triazoles and strobilurins on intrapopulation changes in *P. hordei* in terms of pathogenicity (virulence and aggressiveness) under the conditions of the North Caucasus region of Russia. Two-component fungicides approved for use in the Russian Federation were selected for the study: Delaro, SC; Amistar Extra, SC; Amistar Gold, SC. Plants were treated using several application rates: 50, 100, 150 and 200 % (the recommended application rate was determined to be 100 %). Treatment of winter barley plants with fungicides with different application rates revealed intrapopulation changes in the virulence structure of *P. hordei*. In all treatment variants, the frequency of isolates virulent to the *Rph4*, *Rph5*, *Rph6+2*, *Rph12* genes decreased with increasing fungicide application rate and the frequency of isolates virulent to *Rph14* increased. No isolates virulent to *Rph7* were found in either the original population or the experimental variants. The average virulence of the fungal populations treated with the fungicides in all experimental variants was lower compared to the original population (no treatment (48.5 %)) and depending on the application rate varied from 33.8 % (Amistar Gold, 50 %) to 28.5 % (Amistar Gold, 200 %). Under the influence of the increased application rates of the fungicides, an increase in the duration of the latent period was observed: from 168 h (original population) to 216 h (Delaro, Amistar Gold, 200 %). A decrease in sporulation ability (spore mass per pustule ranged from 0.013 mg (original population) to 0.002 mg (Delaro, Amistar Gold, 200 %)) and in the viability of *P. hordei* (from 100 % for the original population to 22.5 % in Amistar Gold, 200 % treatment) was found under the action of the fungicides. Thus, a fungicide-treated *P. hordei* population is characterized by intrapopulation changes in aggressiveness and virulence, which can significantly increase barley yield losses due to a decrease in the effectiveness of chemical protection, as well as an increase in the harmfulness of the pathogen.
Key words: barley; leaf rust of barley; fungicides; *Puccinia hordei*; resistance; pathogenicity; population

For citation: Gvozdeva M.S., Kudinova O.A., Rudenko V.D., Volkova G.V. Intrapopulation changes in *Puccinia hordei* induced by two-component fungicides from different chemical classes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1195-1202. doi 10.18699/vjgb-25-126

Введение

Южный федеральный округ лидирует по площади посевов озимых зерновых культур. По данным Федеральной службы государственной статистики (https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/posev-4cx_2024.xlsx), в 2024 г. доля этих культур в посевах составила 51.3 %. Ячмень озимый – перспективная культура, ценная для животноводства, способная давать стабильно высокий урожай даже в экстремально засушливых условиях юга России (Ерешко и др., 2012). В 2024 г. Краснодарский край стал лидером по сбору ячменя – было собрано 1159.5 тыс. т, что составило 7 % от объема по стране (https://graininfo.ru/news/yachmen-ploshchadi-sbory-i-urozhaynost-v-rossii-v-2024-godu/).

Посевы ячменя поражаются разными патогенами, вызывающими недобор урожая и потерю качества зерна (Abbas, 2022). Возбудитель карликовой ржавчины биотрофный базидиомицет *Puccinia hordei* Otth. – один из распространенных и вредоносных в патокомплексе ячменя (Sapkota et al., 2023). В Северо-Кавказском регионе России карликовая ржавчина на посевах ячменя фиксируется ежегодно, а эпифитотии возникают 1–2 раза за 10 лет (Волкова и др., 2018). Обеспечение высоких показателей урожайности культуры невозможно без химической защиты. Помимо высокой пестицидной нагрузки на агробиоценоз, серьезной проблемой является возникновение резистентных к действующим веществам фунгицидов форм патогенов (Shcherbakova, 2019).

Резистентность к фунгицидам стала значительной мировой проблемой, обуславливающей снижение эффективности и срока действия некоторых весьма перспективных фунгицидов (Brent, Hollomon, 2007; Thind, 2021). В настоящее время резистентность зарегистрирована более чем у 230 грибных патогенов растений к 100 действующим веществам на различных культурах и в разных географических регионах (FRAC, 2020). По данным P.E. Russell (2003), ржавчинные грибы относятся к патогенам с низким риском развития резистентности, но их быстрый жизненный цикл, распространение спор воздушно-капельным путем и смешанный способ размножения могут стать причиной внутрипопуляционных изменений (Ji et al., 2023), обусловленных быстрым распространением и накоплением резистентных форм, что приведет к снижению чувствительности к фунгицидам.

Традиционно для контроля ржавчинных болезней пшеницы и ячменя применяют фунгициды из классов триазолов и стробилуринов (Walters et al., 2012). Триазолы относятся к самому обширному классу фунгицидов, имеющих группу ингибиторов демитилирования (demethylation inhibitor group, DMI), подавляющих биосинтез эргостерола, ключевого компонента плазматической мембраны клеток гриба (Lass-Flörl, 2011). По данным FRAC (2020), риск возникновения резистентности к таким фунгицидам средний. При этом в ряде работ отмечены изменения структуры популяции биотрофных патогенов. Так, например, G. Zhan с коллегами (2022), изучая чувствительность к триадемифону у 446 изолятов *Puccinia graminis*, установили, что устойчивые к фунгициду изоляты демонстрировали сильные адаптивные признаки в отношении скорости прорастания урединиоспор, латентного периода, интенсивности спорообразования и скорости распространения поражений.

Стробилурины – не менее обширный класс фунгицидов, которые после обработки растения накапливаются в восковом слое кутикулы листа (Крупенько, 2023). В мировом масштабе стробилурины составляют 20–25 % от общего объема продаж фунгицидов, треть из которых – азоксистробин, самый продаваемый фунгицид в мире (Leadbeater, 2012). Первые устойчивые изоляты к стробилуринам обнаружены в 1998 г. у *Blumeria graminis* [DC.] в Германии через два года после их использования, а в настоящее время резистентность к стробилуринам зарегистрирована как среди биотрофных (Dodhia et al., 2021),

так и среди гемибиотрофных (Ölmez et al., 2023) патогенов по всему миру.

Для карликовой ржавчины ячменя также возможен риск возникновения резистентности к фунгицидам (Walters et al., 2012). Как и все ржавчинные грибы, *P. hordei* является быстро эволюционирующим фитопатогеном (Çelik Oğuz, Karakaya, 2021). Исследований по влиянию фунгицидов на характеристики популяции ржавчинных грибов крайне мало. Впервые в России такие работы проводились в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (ФГБНУ ФНЦБЗР) для патосистемы «пшеница–возбудитель желтой ржавчины» (Волкова, 2007). Было изучено влияние фунгицида на основе триадимефона на вирулентность и агрессивность *P. striiformis*, рассчитана скорость появления резистентных форм патогена, разработана и предложена антирезистентная стратегия применения фунгицидов с этим действующим веществом на посевах пшеницы. Далее исследования были выполнены для возбудителя бурой ржавчины пшеницы (Гвоздева, Волкова, 2022). Установлено, что популяция *P. triticina*, обработанная химическим фунгицидом на основе тебуконазола, характеризуется изменением структуры по агрессивности и вирулентности и снижением чувствительности к токсиканту. В отношении возбудителя карликовой ржавчины ячменя подобных исследований не проводилось как в мире, так и в России. С учетом высокой вирулентности и изменчивости северокавказской популяции патогена (Danilova, Volkova, 2022) и необходимостью выработки антирезистентной стратегии для каждого патогена и ценоза (Corkley et al., 2021) исследования данного вопроса крайне актуальны.

Цель настоящей работы – анализ влияния фунгицидов из химических классов триазолов и стробилуринов на внутрипопуляционные изменения *P. hordei* по показателям патогенности (вирулентность и агрессивность) в условиях Северо-Кавказского региона России.

Материалы и методы

Исследования проводили в лабораторно-тепличном комплексе ФГБНУ ФНЦБЗР на восприимчивом к карликовой ржавчине сорте ячменя озимого Виват. Сорт селекции ФГБНУ «Аграрный научный центр "Донской"» рекомендован для возделывания в Северо-Кавказском регионе России, устойчив к полеганию и заморозкам.

Для получения спорового материала северокавказской популяции возбудителя карликовой ржавчины ячменя (далее – урединиоспоры гриба, или популяция), пораженные болезнью листья были собраны в ходе маршрутного обследования производственных посевов ячменя на территории Краснодарского, Ставропольского краев, Ростовской области и Республики Адыгея. Затем смесь гербарных образцов была привита на восприимчивом к болезни сорте Виват по существующим методикам (Грибные патогены зерновых колосовых культур..., 2024). Собранный в необходимом количестве споровый материал хранили при температуре +4 °С.

Для исследования были выбраны двухкомпонентные фунгициды из групп триазолов и стробилуринов, разрешенные к применению на территории Российской Федерации: Деларо, КС (д. в.: 175 г/л протиоконазола + 150 г/л трифлоксистробина); Амистар Экстра, СК (д. в.: 200 г/л азоксистробина + 80 г/л ципроконазола); Амистар Голд, СК (д. в.: 125 г/л азоксистробина + 125 г/л дифеноконазола).

Инокуляцию растений ячменя озимого споровой суспензией патогена осуществляли в фазу всходов. Зараженные растения выдерживали во влажной камере в течение 18 ч, затем содержали в контролируемых условиях теплицы при температуре +20–22 °С, относительной влажности воздуха 70–80 %, освещенности 10–15 тыс. лк со сменой дня и ночи (16/8 ч) (Грибные патогены…, 2000). При появлении первых признаков болезни проводили опрыскивание с использованием нескольких норм применения препаратов: 50, 100, 150 и 200 % (рекомендуемая норма применения принята за 100 %).

Собранные с растений ячменя, обработанных фунгицидами в различных нормах применения, урединиоспоры гриба *P. hordei* переносили на интактные растения для переразмножения и определения показателей агрессивности (жизнеспособность спор, длительность латентного периода, спорулирующая способность, длительность споруляции). Показатели агрессивности были определены для сборных популяций патогена, полученных, как описано выше.

Жизнеспособность спор карликовой ржавчины проверяли во влажной камере под микроскопом путем подсчета общего количества спор гриба и проросших спор (Санин и др., 1975). Длительность латентного периода считали с момента инокуляции до проявления первых признаков заболевания (Пыжикова, 1972). Спорулирующую способность определяли путем расчета отношения количества пустул к массе собранного биоматериала. Длительность споруляции определяли с начала раскрытия пустул до завершения споруляции (Санин и др., 1975).

Вирулентность популяций *P. hordei*, обработанных фунгицидами в различных нормах применения, определяли по реакции 20 сортов – дифференциаторов и линий ячменя из международного и австралийского наборов, содержащих известные гены устойчивости к патогену: Sudan (*Rph1*), Peruvian (*Rph2*), Estate (*Rph3*), Gold (*Rph4*), Magnif 104 (*Rph5*), Bolivia (*Rph6+2*), Cebada Capa (*Rph7*), Egypt 4 (*Rph8*), Abyssinian (*Rph9*), Triumph (*Rph12*), PI 531849 (*Rph13*), PI 584760 (*Rph14*), Prior (*Rph19*), Ricardo (*Rph21+2*), Fongtein (*Rph25*). Учет типов реакции проводили на 10–12-е сутки после инокуляции по шкале Левина и Черевика в баллах (Волкова и др., 2018). Частоты генов вирулентности рассчитывали вероятностным методом (Wolfe, Schwarzbach, 1975) по отношению числа пустул с типом реакции 3–4 балла на линиях с известными генами устойчивости к числу пустул на универсально восприимчивом сорте Виват. Для равномерного распределения спорового материала на листьях растений ячменя инокуляцию осуществляли в башне осаждения с использованием ликоподия, который смешивали со спорами гриба в соотношении 400:1 (Parlevliet, 1980).

По результатам дифференциации рассчитывали среднюю вирулентность (Михайлова и др., 2003). Различия между исходной популяцией (без обработки) и популяциями, подвергавшимися обработке с различными нормами

применения препаратов, по частотам генов вирулентности определяли по индексу Нея (Nei, 1972). Статистическую достоверность показателей агрессивности оценивали с помощью критерия Фишера ($\alpha = 0.05$) с применением программного обеспечения Statistica 10.0.

В исследованиях использованы материально-техническая база уникальной научной установки (УНУ) «Фитотрон для выделения, идентификации, изучения и поддержания рас, штаммов, фенотипов патогенов» (https://fncbzr.ru/brk-i-unu/unique-installation-2/) и объекты биоресурсной коллекции ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» (https://fncbzr.ru/brk-i-unu/unique-installation-1/).

Результаты

При обработке растений ячменя озимого фунгицидами с различной нормой применения выявлены внутрипопуляционные изменения в структуре *P. hordei* по вирулентности (табл. 1).

В варианте с применением препарата Амистар Голд, СК при повышении нормы до 200 % от рекомендуемой наблюдалось снижение вирулентности патогена на сортах, содержащих гены устойчивости *Rph2*, *Rph6+2*, *Rph9*, *Rph14*. На линии с генами *Rph13* и *Rph25* при обработке растений ячменя препаратами с нормой применения 50 % от рекомендуемой поражения не отмечено. При увеличении нормы до 200 % тип реакции на заражение возрастал до 3 баллов.

Обработка растений ячменя фунгицидом Амистар Экстра, СК оказала влияние на популяцию гриба в сторону увеличения вирулентности к гену *Rph14*, при этом наблюдался гетерогенный тип реакции, на листе присутствовали пустулы разных размеров, участки отмершей и хлоротичной тканей.

В варианте с применением фунгицида Деларо, СК отмечалось уменьшение вирулентности популяции *P. hordei* к гену *Rph14*. Тип реакции снижался от 3 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 0 баллов (норма применения 50 % от рекомендуемой), для исходной популяции этот показатель составил 1 и 2 балла. При использовании рекомендованной нормы применения препарата (100 %) тип реакции сортов, содержащих гены устойчивости *Rph19* и *Rph9*, составил 0;, 1 балл; для исходной популяции этот показатель был равен 3 баллам.

Тип поражения сортов, содержащих гены устойчивости *Rph1*, *Rph3*, *Rph4*, *Rph5*, *Rph7*, *Rph8*, *Rph12*, *Rph21+2*, во всех вариантах с применением фунгицидов, независимо от нормы применения, соответствовал типу исходной популяции (без обработки) и составил 3 балла.

В данной работе изучено влияние фунгицидов на вирулентность популяции возбудителя карликовой ржавчины ячменя (табл. 2).

Во всех вариантах с увеличением нормы применения фунгицидов происходило снижение вирулентности популяции гриба к *Rph4*, *Rph5*, *Rph6+2*, *Rph12* в варианте с применением препаратов Амистар Экстра, СК и Деларо, КС – к *Rph2*, Амистар Голд, СК и Амистар Экстра, СК – к *Rph9*. Применение изученных фунгицидов с нормой 50–150 % от рекомендуемой способствовало увеличению вирулентности популяции к *Rph14*. Под влиянием фунгицидов Амистар Голд, СК и Деларо, КС с нормой применения 150 % от рекомендуемой отмечалось увеличение вирулентности популяции к *Rph19*. Обработка растений препаратами Амистар Экстра, СК и Деларо,

Таблица 1. Тип реакции сортов-дифференциаторов на заражение северокавказской популяцией *P. hordei* под действием фунгицидов с различными нормами применения (тепличный комплекс ФНЦБЗР, 2024 г.)

№ п/п	Сорт	Ген	Амистар Голд, СК				Амистар Экстра, СК				Деларо, КС				Исходная популяция (без обработки)
			Норма применения фунгицида, % от рекомендуемой												
			50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200	
			Тип реакции сортов на заражение, балл												
1	Sudan	*Rph1*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	Peruvian	*Rph2*	3	3	3	0;	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3	Estate	*Rph3*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	Gold	*Rph4*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	Magnif 104	*Rph5*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
6	Bolivia	*Rph6+2*	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
7	Cebada Capa	*Rph7*	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;
8	Egypt 4	*Rph8*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	Abyssinian	*Rph9*	3	3	3	0;	3	3	3	3	3	0; 1	3	3	3
10	Triumph	*Rph12*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
11	PI 531849	*Rph13*	0	0;	0;	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
12	PI 584760	*Rph14*	3	3	3	0;	1, 2, 3	2, 3	1, 2, 3	2, 3	3	3	3	0	1, 2
13	Prior	*Rph19*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0; 1	3	3	3
14	Ricardo	*Rph21+2*	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
15	Fong tein	*Rph25*	0;	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Таблица 2. Вирулентность (%) популяции *P. hordei*, обработанной фунгицидами с различными нормами применения, к линиям-носителям *Rph* генов (тепличный комплекс ФНЦБЗР, 2024 г.)

№ п/п	Сорт	Ген	Исходная популяция (без обработки фунгицидом)	Амистар Голд, СК				Амистар Экстра, СК				Деларо, КС			
				Норма применения фунгицида, % от рекомендуемой											
				50	100	150	200	50	100	150	200	50	100	150	200
1	Sudan	*Rph1*	43	33	22	20	20	76	45	27	34	67	45	39	44
2	Peruvian	*Rph2*	59	62	67	51	0	87	76	49	44	76	76	68	53
3	Estate	*Rph3*	80	46	72	50	49	60	54	53	55	58	44	45	34
4	Gold	*Rph4*	57	22	21	20	20	52	45	38	38	59	45	39	32
5	Magnif 104	*Rph5*	35	27	13	10	10	72	43	45	41	63	43	43	23
6	Bolivia	*Rph6+2*	44	17	11	10	0	61	55	44	43	73	85	70	64
7	Cebada Capa	*Rph7*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Egypt 4	*Rph8*	66	16	15	10	40	42	50	98	93	21	59	67	57
9	Abyssinian	*Rph9*	59	36	34	27	0	28	25	22	20	10	0	10	9
10	Triumph	*Rph12*	42	25	13	10	8	92	24	17	14	30	34	22	10
11	PI 531849	*Rph13*	47	0	0	0	37	10	57	65	59	21	27	20	46
12	PI 584760	*Rph14*	0	27	29	28	0	9	10	4	2	4	40	20	0
13	Prior	*Rph19*	51	46	59	67	64	11	20	20	18	80	0	78	57
14	Ricardo	*Rph21+2*	86	99	79	89	99	44	41	33	34	49	78	63	57
15	Fong tein	*Rph25*	57	41	29	35	21	21	32	28	25	78	62	45	35
Индекс Нея (Nei distance), у. е.			–	0.11	0.10	0.13	0.22	0.28	0.10	0.14	0.14	0.24	0.10	0.14	0.10

КС с увеличением нормы применения до 150 % от рекомендуемой способствовала снижению вирулентности популяции к *Rph1* и увеличению встречаемости изолятов, вирулентных к *Rph8*.

Согласно индексу Нея, максимальные различия по частоте изолятов, вирулентных к линиям с генами *Rph*, получены между исходной популяцией (без обработки) и популяцией, обработанной препаратами Амистар Экстра, СК и Деларо, КС с нормой применения 50 % от рекомендуемой (N = 0.28; N = 0.24 соответственно). При этом в варианте с фунгицидом Амистар Голд, СК максимальные различия получены при использовании нормы применения 200 % от рекомендуемой (N = 0.22).

Средняя вирулентность исходной популяции *P. hordei* (без обработки) составила 48.4 % (рис. 1). Во всех вариантах с увеличением нормы применения фунгицидов отмечалось изменение средней вирулентности.

Обработка растений препаратом Деларо, КС способствовала снижению этого показателя от 45.9 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 34.7 % (норма применения 200 %), Амистар Экстра, СК – от 44.3 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 34.7 % (норма применения 200 %), Амистар Голд, СК – от 33.8 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 28.5 % (норма применения 200 %).

Получены результаты влияния разных норм применения фунгицидов на показатели агрессивности карликовой ржавчины. Установлено увеличение длительности латентного периода болезни под действием высоких норм применения препаратов. Для исходной популяции (без обработки) этот показатель составил 168 ч, что соответствовало значениям, полученным при обработке растений ячменя изученными фунгицидами с пониженной нормой

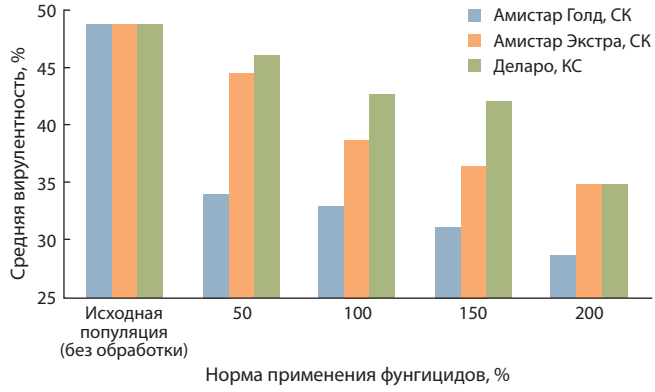


Рис. 1. Средняя вирулентность (%) популяции возбудителя карликовой ржавчины ячменя под воздействием разных норм применения фунгицидов. Лабораторно-тепличный комплекс ФНЦБЗР, 2024 г.

применения (50 % от рекомендуемой). В варианте с использованием фунгицидов Деларо, КС и Амистар Голд, СК в норме применения 200 % от рекомендуемой длительность латентного периода возрастала до 216 ч, Амистар Экстра, СК – до 192 ч.

Установлено снижение спорулирующей способности популяции гриба *P. hordei*, обработанной фунгицидами. В вариантах с использованием препаратов Деларо, КС и Амистар Голд, СК с увеличением нормы применения масса спор с одной пустулы снижалась от 0.007 мг (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 0.002 мг (норма применения 200 %). В варианте, обработанном фунгицидом Амистар Экстра, СК, этот показатель изменялся от 0.006 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 0.005 мг (норма применения 200 %). Для исходной по-

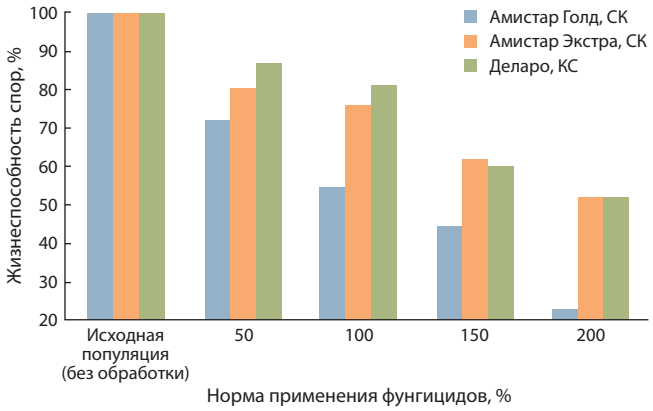


Рис. 2. Влияние разных норм применения фунгицидов на жизнеспособность спор карликовой ржавчины ячменя. Лабораторно-тепличный комплекс ФНЦБЗР, 2024 г.

пуляции (без обработки) спорулирующая способность составила 0.013 мг с одной пустулы.

Под влиянием изученных фунгицидов отмечалось изменение жизнеспособности спор *P. hordei*. Так, для исходной популяции (без обработки) значение этого показателя было принято за 100 % (рис. 2). В варианте, обработанном фунгицидом Деларо, КС, жизнеспособность спор снижалась от 86.7 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 51.7 % (норма применения 200 %), в варианте с препаратом Амистар Экстра, СК – от 80.0 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 51.7 % (норма применения 200 %), Амистар Голд, СК – от 71.7 (норма применения 50 % от рекомендуемой) до 22.5 % (норма применения 200 %).

Обсуждение

Полученные в ходе исследования результаты согласуются с работами других ученых. Так, C. Zhao с коллегами удалось получить два устойчивых к флутоланилу изолята *Rhizoctonia* spp., которые отличались более низкой скоростью роста мицелия и пониженной вирулентностью в отношении проростков сахарной свеклы в сравнении с исходным изолятом (Zhao et al., 2019).

Ингибирующее действие на спорулирующую способность гриба *Phytophthora infestans* отмечено при увеличении нормы применения фунгицидов с действующими веществами дифеноконазол и флудиоксонил (Мыца, 2015).

Под действием водного раствора бензимидазола (40 мг/л) установлено снижение спорулирующей способности и количества пустул возбудителя листовой ржавчины ржи *P. dispers* в сравнении с контролем; также отмечена авирулентность гриба (Тырышкин, 2017).

В работе Г.В. Волковой (2007) доказано, что приобретение резистентности к фунгициду из триазолового класса сопровождалось снижением спорулирующей способности в 4.8 раза, скорости диффузного распространения мицелия патогена в тканях растения-хозяина – в 4 раза. Инкубационный период удлинялся на 3-е суток, период пустулообразования – на 8–12 суток.

Ранее были получены данные по влиянию фунгицида на основе тебуконазола на показатели агрессивности популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы. С увеличением нормы применения препарата снижались: жизнеспособность спор – до 21.5 %, спорулирующая способность – до 0.02 мг спор и длительность споруляции – до 8 суток (норма применения 0.7 л/га). При этом длительность латентного периода увеличивалась до 233 ч (Гвоздева, Волкова, 2022).

Зафиксированы изменения структуры популяции под воздействием фунгицидов триазолового класса. Так, X. Wu с коллегами (2020) описали чувствительность 89 изолятов *P. graminis* к триадемифону, фунгициду из класса триазолов. Установлено, что изоляты, проявляющие устойчивость к триадемифону, могут обладать перекрестной устойчивостью к карбендазиму. Изоляты, устойчивые к фунгицидам азолового класса, зарегистрированы также у *P. striiformis* (Tian et al., 2019), *B. graminis* (Cao et al., 2008). Для популяции *P. triticina* из Бразилии отмечено уменьшение чувствительности к триазолам для пяти наиболее распространенных рас патогена (Ardium et al., 2012). Нами исследовано изменение структуры популяции *P. triticina* под влиянием фунгицида на основе тебуконазола (Гвоздева, Волкова, 2022). Согласно полученным данным, при пониженных нормах применения препарата установлены максимальные из изученных изменения в генетической структуре популяции (по Нею, N). Средняя вирулентность популяции патогена снижалась с увеличением нормы применения препаратов.

Установлено снижение вирулентности популяции гриба к *Rph4*, *Rph5*, *Rph6+2*, *Rph12* под влиянием изученных фунгицидов. Данные гены являются неэффективными для северокавказской популяции на протяжении более 10 лет (Volkova et al., 2019; Danilova, Volkova, 2023). При этом вирулентность к *Rph14* увеличилась по сравнению с исходной популяцией. В 2021 г. частота изолятов гриба к данной линии была низкой (Danilova, Volkova, 2023). Это может указывать на снижение эффективности гена *Rph14* под влиянием фунгицидов.

Развитие резистентности для возбудителей болезней часто напоминает эффект вертикальной устойчивости: в первые годы применения фунгицида наблюдается полное подавление инфекции; со временем отмечаются возникновение отдельных толерантных штаммов и их накопление в популяции; и, наконец, полная потеря эффективности фунгицида (Дьяков, 1998). Одним из факторов снижения чувствительности фитопатогенов к действующим веществам препаратов является изменение их внутрипопуляционной структуры (Тютерев, 2001). Мутации, вызывающие устойчивость изолятов фитопатогенов к фунгицидам, могут приводить к снижению их приспособленности и вирулентности (Hawkins, Fraaije, 2018), но в последующие годы может наблюдаться увеличение агрессивности возбудителя болезни (Дьяков, 1998). В проведенных нами исследованиях для северокавказской популяции возбудителя карликовой ржавчины ячменя под действием двухкомпонентных препаратов из класса триазолов и стробилуринов отмечены изменения внутрипопуляционной структуры по показателям агрессивности и вирулентности, что является обоснованием необходимости перманентного изучения данного вопроса для контроля накопления резистентных форм *P. hordei* в популяции гриба.

Заключение

При сравнительной оценке показателей патогенности под действием фунгицидов из химических классов триазолов и стробилуринов установлено снижение агрессивности и вирулентности северокавказской популяции возбудителя карликовой ржавчины ячменя. Так, во всех вариантах с увеличением нормы применения фунгицидов наблюдалось изменение внутрипопуляционной структуры и средней вирулентности популяций. Во всех вариантах с увеличением нормы применения фунгицидов происходило снижение вирулентности популяции гриба к *Rph4*, *Rph5*, *Rph6+2*, *Rph12*, в варианте с применением препаратов Амистар Экстра, СК и Деларо, КС – *Rph2*, Амистар Голд, СК и Амистар Экстра, СК – *Rph9*.

Применение изученных фунгицидов с нормой 50–150 % от рекомендуемой способствовало увеличению вирулентности популяции к *Rph14*. Линия с геном *Rph7* была без признаков поражения болезнью как в исходной популяции, так и в вариантах опыта. Средняя вирулентность популяций гриба, обработанных фунгицидами, во всех вариантах опыта была ниже по сравнению с исходной популяцией (без обработки (48.5 %)). Существенные изменения по этому показателю установлены в результате действия препарата Амистар Голд, СК, средняя вирулентность снижалась от 33.8 до 28.5 %.

В сравнении с исходной (без обработки) популяцией отмечено увеличение длительности латентного периода болезни под действием высоких норм применения препаратов. В варианте с использованием фунгицидов Деларо, КС и Амистар Голд, СК в норме применения 200 % от рекомендуемой значение этого показателя варьировало от 168 до 216 ч, Амистар Экстра, СК – от 168 до 192 ч.

Установлено снижение спорулирующей способности популяции гриба *P. hordei*, обработанной фунгицидами. В вариантах с использованием препаратов Деларо, КС и Амистар Голд, СК с увеличением нормы применения масса спор с одной пустулы снижалась от 0.013 (исходная популяция (без обработки) до 0.002 мг (норма применения 200 %), в варианте, обработанном фунгицидом Амистар Экстра, СК, – до 0.005 мг (норма применения 200 %). Значительное снижение жизнеспособности спор *P. hordei* в сравнении с исходной популяцией (без обработки) отмечено в результате действия фунгицида Амистар Голд, СК. При норме применения препарата 200 % от рекомендуемой этот показатель снижался от 100 до 22.5 %.

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют выявить изменения структуры популяции по вирулентности и агрессивности популяции *P. hordei* под влиянием изученных фунгицидов, что сделает возможным оперативно скорректировать систему защиты озимого ячменя и в дальнейшем может внести вклад в разработку антирезистентной стратегии борьбы с *P. hordei*.

Список литературы / References

Волкова Г.В. Антирезистентная стратегия применения фунгицидов на основе триадимефона против возбудителя желтой ржавчины пшеницы на Северном Кавказе. *Наука Кубани.* 2007;2:39-43
[Volkova G.V. An antiresistant strategy for the triadimefon-based fungicides application against the leaf-rust pathogen on wheat in North Caucasus. *Nauka Kubani = Science of Kuban*. 2007;2:39-43 (in Russian)]

Волкова Г.В., Кудинова О.А., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф., Данилова А.В., Матвеева И.П. Вирулентность популяций возбудителей ржавчины зерновых колосовых культур. Краснодар, 2018
[Volkova G.V., Kudinova O.A., Gladkova E.V., Vaganova O.F., Danilova A.V., Matveeva I.P. Virulence of Populations of Agents of Grain Ear Crop Rusts. Krasnodar, 2018 (in Russian)]

Гвоздева М.С., Волкова Г.В. Влияние фунгицида Колосаль на структуру популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы по признакам патогенности и чувствительности. *Микология и фитопатология*. 2022;56(1):52-63. doi 10.31857/S0026364822010044
[Gvozdeva M.S., Volkova G.V. Influence of the Kolosal fungicide on the population structure of the wheat leaf rust pathogen by signs of pathogenicity and sensitivity. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2022;56(1):52-63. doi 10.31857/S0026364822010044 (in Russian)]

Грибные патогены зерновых колосовых культур: биология, распространение, вредоносность, методы учета, сбора и хранения биоматериала. Создание искусственных инфекционных фонов: Научно-практические рекомендации. Краснодар: ФГБНУ ФНЦБЗР; ООО «Просвещение-Юг», 2024
[Fungal Pathogens of Grain Ear Crops: Biology, Distribution, Harmfulness, Methods of Detection, Collection and Storage of Biomaterial. Creation of Artificial Infectious Backgrounds: Research and Practice Recommendations. Krasnodar, 2024 (in Russian)]

Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. М., 1998
[Dyakov Y.T. Population Biology of Phytopathogenic Fungi. Moscow, 1998 (in Russian)]

Ерешко А.С., Хронюк В.Б., Репко Н.В. Состояние и перспективы производства ячменя в Российской Федерации. *Вестник аграрной науки Дона*. 2012;3(19):57
[Ereshko A.S., Hronyuk V.B., Repko N.V. State and prospects of barley production in the Russian Federation. *Vestnik Agrarnoj Nauki Dona = Don Agrarian Bulletin.* 2012;3(19):57 (in Russian)]

Крупенько Н.А. Классификация и механизм действия химических фунгицидов, применяемых для защиты зерновых культур от болезней в Беларуси. *Вестник защиты растений*. 2023;106(2):84-92. doi 10.31993/2308-6459-2023-106-2-15690
[Krupen'ko N.A. Classification and mode of action of chemical fungicides applied for cereal crops protection in Belarus. *Vestnik Zashchity Rastenij = Plant Protection News.* 2023;106(2):84-92. doi 10.31993/2308-6459-2023-106-2-15690 (in Russian)]

Михайлова Л.А., Гультяева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования структуры популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. Иммуногенетические методы создания устойчивых к вредным организмам сортов: Методические рекомендации. СПб.: ВИЗР, 2003
[Mihaylova L.A., Gul'tyaeva E.I., Mironenko N.V. Methods of Studying the Population Structure of the Wheat Leaf Rust Pathogen *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. Immunogenetic Methods for Breeding Varieties Resistant to Pests (Methodical Recommendations). St. Petersburg, 2003 (in Russian)]

Мыца Е.Д. Влияние некоторых пестицидов на возбудителей грибных болезней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2015
[Mytsa E.D. Effect of some pesticides on fungal pathogens of potato (*Solanum tuberosum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Cand. Sci. Biol. Dissertation. Moscow, 2015 (in Russian)]

Пыжикова Г.В. Влияние температуры на инфекцию и развитие желтой ржавчины пшеницы. *Микология и фитопатология.* 1972;6(3):51-53
[Pyzhikova G.V. Effect of temperature on infection and severity of leaf rust of wheat. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1972;6(3):51-53 (in Russian)]

Санин С.С., Шинкарев В.П., Кайдаш А.С. Методы определения количества спор, образуемых ржавчинными и другими фитопатогенными грибами. *Микология и фитопатология.* 1975;9(3):443-445

[Sanin S.S., Shinkarev V.P., Kaydash A.S. Methods for determining the number of spores produced by rust and other phytopathogenic fungi. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1975;9(3):443-445 (in Russian)]

Тырышкин Л.Г., Сидоров А.В. Изменение вирулентности и агрессивности возбудителя листовой ржавчины ржи под действием абиотических факторов и возможность его практического применения. *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*. 2017;46:58-63
[Tyryshkin L.G., Sidorov A.V. The Changing virulence and aggressiveness of the pathogen of leaf rust of rye under the influence of abiotic factors and the possibility of its practical application. *Izvestiya Saint-Petersburg State Agrarian University*. 2017;46:58-63 (in Russian)]

Тютерев С.Л. Проблемы устойчивости фитопатогенов к новым фунгицидам. *Вестник защиты растений.* 2001;1:38-53
[Tyuterev S.L. Problems of phytopathogen resistance to new fungicides. *Vestnik Zashchity Rastenij = Plant Protection News.* 2001;1:38-53 (in Russian)]

Abbas H.S. Barley diseases: introduction, etiology, epidemiology, and their management. In: Abd-Elsalam K.A., Mohamed H.I. (Eds) Cereal Diseases: Nanobiotechnological Approaches for Diagnosis and Management. Singapore: Springer, 2022;97-117. doi 10.1007/978-981-19-3120-8_6

Arduim G.D.S., Reis E.M., Barcellos A.L., Turra C. *In vivo* sensitivity reduction of *Puccinia triticina* races, causal agent of wheat leaf rust, to DMI and QoI fungicides. *Summa Phytopathol.* 2012;38(4):306-311. doi 10.1590/S0100-54052012000400006

Bai Q., Liu T., Wan A., Wang M., See D.R., Chen X. Changes of barley stripe rust populations in the United States from 1993 to 2017. *Phytopathology*. 2022;112(11):2391-2402. doi 10.1094/PHYTO-04-22-0135-R

Brent K.J., Hollomon D.W. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it Be Managed? Bristol, UK: Fungicide Resistance Action Committee, 2007

Cao X.R., Zhao W.J., Zhou Y.L. Monitoring of resistance of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* isolates to triadimefon in 2007. *Plant Protection*. 2008;34:74-77

Corkley I., Fraaije B., Hawkins N. Fungicide resistance management: maximizing the effective life of plant protection products. *Plant Pathology*. 2021;71(1):150-169. doi 10.1111/ppa.13467

Çelik Oğuz A., Karakaya A. Genetic diversity of barley foliar fungal pathogens. *Agronomy*. 2021;11(3):434. doi 10.3390/agronomy11030434

Danilova A.V., Volkova G.V. Virulence of barley leaf rust in the South of Russia in 2017–2019. *Span J Agric Res*. 2022;20(1):e10SC01. doi 10.5424/sjar/2022201-18337

Danilova A., Volkova G. Efficiency of *Rph genes* against *Puccinia hordei* in Southern Russia in 2019–2021. *Agronomy*. 2023;13(4):1046. doi 10.3390/agronomy13041046

Dodhia K.N., Cox B.A., Oliver R.P., Lopez-Ruiz F.J. Rapid in situ quantification of the strobilurin resistance mutation G143A in the wheat pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Sci Rep*. 2021;11(1):4526. doi 10.1038/s41598-021-83981-9

FRAC. List of first confirmed cases of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. CropLife International. Brussels, 2020. Available at: https://www.frac.info/media/3oils1zl/list-of-first-confirmed-cases-of-plant-pathogenic-organisms-resistant-to-disease-control-agents_05_2020.pdf

Hawkins N.J., Fraaije B.A. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 2018;56:339-360. doi 10.1146/annurev-phyto-080417-050012

Ji F., Zhou A., Liu B., Liu Y., Feng Y., Wang X., Huang L., Kang Z., Zhan G. Sensitivity of *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* from China to triadimefon and resistance risk assessment. *Plant Dis*. 2023;107(12):3877-3885. doi 10.1094/PDIS-02-23-0277-RE

Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs.* 2011;71(18):2405-2419. doi 10.2165/11596540-000000000-00000

Leadbeater A. Resistance risk to QoI fungicides and anti-resistance strategies. In: Thind T.S. (Ed.) Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management. CABI, 2012;144-154. doi 10.1079/9781845939052.0141

Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*. 1972;106:283-292. doi 10.1086/282771

Ölmez F., Turgay E.B., Mustafa Z., Büyük O., Kaymak S. Screening the *Zymoseptoria tritici* population in Turkey for resistance to azole and strobilurin fungicides. *J Plant Dis Prot*. 2023;130(5):991-998. doi 10.1007/s41348-023-00761-5

Parlevliet J.E. Variation for latent period one of the component of partial resistance in barley to yellow rust by *Puccinia striiformis*. *Cereal Rust Bull.* 1980;8:2-17

Russell P.E. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph No. 3. CropLife International, 2003. Available at: https://www.frac.info/media/cj3hvben/monograph-3.pdf

Sapkota R., Jørgensen L.N., Boeglin L., Nicolaisen M. Fungal communities of spring barley from seedling emergence to harvest during a severe *Puccinia hordei* epidemic. *Microb Ecol*. 2023;85(2):617-627. doi 10.1007/s00248-022-01985-y

Shcherbakova L.A. Fungicide resistance of plant pathogenic fungi and their chemosensitization as a tool to increase anti-disease effects of triazoles and strobilurines. *Agric Biol.* 2019;54(5):875-891. doi 10.15389/agrobiology.2019.5.875eng

Thind T.S. Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective. *Indian Phytopathol*. 2021;74:875-883. doi 10.1007/s42360-021-00411-6

Tian Y., Meng Y., Zhao X., Chen X., Ma H., Xu S., Zhan G. Trade-off between triadimefon sensitivity and pathogenicity in a selfed sexual population of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Front Microbiol.* 2019;10:2729. doi 10.3389/fmicb.2019.02729

Volkova G.V., Danilova A.V., Kudinova O.A. The virulence of the barley leaf rust pathogen in the North Caucasus in 2014-2017. *Agric Biol.* 2019;54(3):589-596. doi 10.15389/agrobiology.2019.3.589eng

Walters D.R., Avrova A., Bingham I.J., Burnett F.J., Fountaine J., Havis N.D., Hoad S.P., Hughes G., Looseley M., Oxley S.J.P., Renwick A., Topp C.F.E., Newton A.C. Control of foliar diseases in barley: towards an integrated approach. *Eur J Plant Pathol.* 2012;133:33-73. doi 10.1007/s10658-012-9948-x

Wolfe M.S., Schwarzbach E. The use of virulence analysis in cereal mildews. *J Phytopathol.* 1975;82(4):297-307. doi 10.1111/j.1439-0434.1975.tb03495.x

Wu X., Bian Q., Lin Q., Sun Q., Ni X., Xu X., Qiu Y., Xuan Y., Cao Y., Li T. Sensitivity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates from China to triadimefon and cross-resistance against diverse fungicides. *Plant Dis.* 2020;104(8):2082-2085. doi 10.1094/PDIS-01-20-0009-RE

Zhan G., Ji F., Zhao J., Liu Y., Zhou A., Xia M., Zhang J., Huang L., Guo J., Kang Z. Sensitivity and resistance risk assessment of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* to triadimefon in China. *Plant Dis*. 2022;106(6):1690-1699. doi 10.1094/PDIS-10-21-2168-RE

Zhao C., Zhang X., Hua H., Han C., Wu X. Sensitivity of *Rhizoctonia* spp. to flutolanil and characterization of the point mutation in succinate dehydrogenase conferring fungicide resistance. *Eur J Plant Pathol*. 2019;155:13-23. doi 10.1007/s10658-019-01739-6

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 31.03.2025. После доработки 14.05.2025. Принята к публикации 15.05.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1203-1212

doi 10.18699/vjgb-25-127

Влияние биопестицида Новохизоль на экспрессию генов защиты при заражении пшеницы стеблевой ржавчиной *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

А.Б. Щербань [1], А.В. Разуваева [1], Е.С. Сколотнева [1], В.В. Фоменко [2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
atos@bionet.nsc.ru

Аннотация. Стеблевая ржавчина, вызываемая грибом *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), является вредоносным заболеванием, поражающим посевы зерновых культур. Традиционный способ борьбы с этим и другими инфекционными болезнями растений – использование химических средств защиты. В качестве их эффективной и безопасной альтернативы все чаще рассматриваются биопестициды, а также индукторы болезнеустойчивости растений, в частности на основе хитозана, производного хитина. Недавно разработана глобулярная форма хитозана – Новохизоль, имеющая ряд преимуществ и показавшая свою эффективность в предварительных полевых и лабораторных экспериментах. Однако в настоящее время отсутствуют работы, посвященные влиянию данного препарата на экспрессию генов защиты. Поэтому целью данной работы стали поиск генов, принимающих участие в реакции растений мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. на заражение стеблевой ржавчиной, и оценка влияния обработки препаратом Новохизоль на их транскрипцию в ходе инфекционного процесса. В качестве модели были задействованы линия пшеницы с геном устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr6* и два отобранных изолята *Pgt* для этой линии: авирулентный (Avr6) и вирулентный (vr6), позволяющие сопоставить эффекты препарата Новохизоль в зависимости от генетической совместимости в патосистеме растение–патоген. Для анализа уровня транскрипции генов защиты использовали листовой материал в различных временных точках, от 3 до 144 ч после инокуляции растений патогеном. Количественный ПЦР-анализ показал повышение уровня транскрипции генов *CERK1*, *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PR6* и *PR9* у растений, обработанных изучаемым биопестицидом и инфицированных различными изолятами *Pgt*, по сравнению с необработанными инфицированными растениями. Полученные данные подтверждают, что одна из оптимальных стратегий повышения устойчивости зерновых культур к грибным патогенам с точки зрения экологической безопасности – сочетание методов селекции по генам специфической устойчивости с применением биологических средств защиты.

Ключевые слова: биопестицид; хитозан; Новохизоль; гены защиты; стеблевая ржавчина; транскрипция; мягкая пшеница

Для цитирования: Щербань А.Б., Разуваева А.В., Сколотнева Е.С., Фоменко В.В. Влияние биопестицида Новохизоль на экспрессию генов защиты при заражении пшеницы стеблевой ржавчиной *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1203-1212. doi 10.18699/vjgb-25-127

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-16-00119.

Благодарности. Выращивание растений с последующей обработкой препаратами и заражением проводилось в Центре коллективного пользования репродукции растений ИЦиГ СО РАН при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Effect of the biopesticide Novochizol on the expression of defense genes during wheat infection with stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

A.B. Shcherban [1], A.V. Razuvaeva [1], E.S. Skolotneva [1], V.V. Fomenko [2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
atos@bionet.nsc.ru

Abstract. Stem rust, caused by the fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), is a harmful disease affecting grain crops. The traditional way to combat this and other infectious plant diseases is to use chemical pesticides. Biopesticides, as well as plant disease resistance inducers – in particular those based on chitosan, a derivative of chitin – are increasingly being considered as an effective and safe alternative. Recently, a globular form of chitosan, Novochizol, has been developed, which has a number of advantages and has shown its effectiveness in preliminary field and laboratory experiments. However, there are no works devoted to the effect of this preparation on the expression of defense genes. Therefore, the aim of this work was to search for genes involved in the response of common wheat (*Triticum aestivum* L.) to stem

© Щербань А.Б., Разуваева А.В., Сколотнева Е.С., Фоменко В.В., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

rust infection and to evaluate the effect of Novochizol treatment on their transcription during the infection process. The wheat line ISr6-Ra with the stem rust resistance gene *Sr6* and two *Pgt* isolates – an avirulent one, Avr6, and a virulent one, vr6 – were used as a model, allowing us to compare the effects of Novochizol depending on the genetic compatibility in the plant–pathogen pathosystem. To analyze the transcription level of defense genes, leaf material was collected at different time points from 3 to 144 h after inoculation of plants with the pathogen. Quantitative PCR analysis showed an increase in the transcription levels of the *CERK1*, *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PR6* and *PR9* genes in plants treated with Novochizol and infected with various *Pgt* isolates compared to untreated infected plants. *Pgt* isolate Avr6 induced the highest expression of some defense genes (primarily *CERK1*), which is consistent with the phytopathology data showing the maximum degree of resistance (IT1) to stem rust in Novochizol-treated plants with a combination of *Sr6–Avr6* genes. The data obtained confirm that one of the optimal strategies for increasing the resistance of grain crops to fungal pathogens is a combination of selection for specific resistance genes with the use of biological control agents.
Key words: biopesticide; chitosan; Novochizol; defense genes; stem rust, transcription; common wheat

For citation: Shcherban A.B., Razuvaeva A.V., Skolotneva E.S., Fomenko V.V. Effect of the biopesticide Novochizol on the expression of defense genes during wheat infection with stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1203-1212. doi 10.18699/vjgb-25-127

Введение

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. является самой востребованной и крупнейшей по посевным площадям зерновой культурой. Одна из основных проблем ее возделывания – это снижение ее урожайности из-за болезней, вызываемых различными патогенами, особенно грибами (Hafeez et al., 2021). Почти 90 % мировых посевных площадей пшеницы подвержено риску поражения хотя бы одним грибным заболеванием (Chai et al., 2022). К числу наиболее опасных относятся листостебельные болезни, которые сокращают ассимиляционную поверхность листьев, разрушают хлорофилл, что приводит к снижению фотосинтеза, преждевременному старению и отмиранию тканей растений. Потери урожая при этом могут составлять от 20 до 70 %. Нередко такие грибные инфекции принимают форму эпифитотий. Так, с начала 2000 г. заболеваемость посевов пшеницы стеблевой ржавчиной на территории Европы резко возросла и продолжает расти (Patpour et al., 2022). В РФ периодически наблюдаются эпифитотии стеблевой и бурой ржавчин, септориоза, мучнистой росы (Санин, 2012).

В ответ на атаки патогенов растения выработали сложную иммунную систему, включающую различные уровни защиты. Восприятие молекулярных паттернов, связанных с патогеном (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), мембранными паттерн-распознающими рецепторами (pattern recognition receptors, PRR) приводит к PAMP-индуцируемому иммунитету (PAMP-triggered immunity, PTI) (Bigeard et al., 2015). В попытке преодолеть этот уровень защиты патоген секретирует специфичные эффекторы авирулентности (продукты генов *Avr*), подавляющие PTI, что способствует дальнейшему развитию заболевания. В связи с этим растения выработали следующий, специфический уровень защиты, основанный на внутриклеточном распознавании эффекторов NOD-подобными рецепторами (NOD-like receptors, NLR), продуктами *R*-генов растений. Этот защитный механизм, запускаемый эффекторами (effector-triggered immunity, ETI), часто приводит к запрограммированной гибели клеток в инфицированной ткани или реакции сверхчувствительности (СВЧ), создающей барьер для распространения патогена (Jones, Dangl, 2006; Bent, Mackey, 2007).

Показано, что PTI и ETI тесно взаимосвязаны и совместно обеспечивают системную устойчивость к заболеванию (Ngou et al., 2021). Эта устойчивость основана на активации ряда сигнальных каскадов, в том числе гормональных, которые контролируются такими гормонами, как салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты, этилен и другие, в зависимости от типа питания патогена: биотрофного, гемибиотрофного или некротрофного (Jones, Dangl, 2006).

Контролируемый салицилатами каскад, характерный для реакции против биотрофных патогенов, включая возбудителя стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), приводит к накоплению активных форм кислорода (АФК) − окислительному взрыву, который провоцирует СВЧ, синтез фенольных веществ и специфических защитных PR (pathogenesis-related) белков (Tada et al., 2008; Ding et al., 2018).

Белки PR – важнейшие факторы в механизмах устойчивости растений. Они участвуют в сигнальных системах, катализируя образование гормонов, укрепляют клеточные стенки растений, способны вызывать повреждение клеточных стенок и цитоплазматических мембран патогенов (Тарчевский, 2002). Белки PR делятся на 17 семейств (PR1−PR17) (Van Loon, Van Strien, 1999; Sels et al., 2008). Многие из них являются гидролазами. Так, белки семейства PR2 – это β-1,3-эндоглюканазы, они накапливаются вокруг места заражения, проявляя фунгицидную активность. Белки семейств PR3, PR4, PR8 и PR11 обладают эндохитиназной активностью и способны разрушать клеточную стенку грибов; их пул увеличивается при заражении. Представители семейств PR7, PR8, PR9 и PR10 проявляют протеиназную, лизоцимную, пероксидазную и рибонуклеазную активности соответственно. Белки семейства PR6 – ингибиторы протеиназ, которые подавляют протеолитические ферменты, выделяемые патогенами для проникновения в ткани растений. Активность других белков PR связана с увеличением проницаемости мембран (семейства PR5, PR12, PR13, PR14), а также с накоплением перекиси водорода (семейства PR15 и PR16); синтез этих белков значительно усиливается при обработке элиситорами (Van Loon, Van Strien, 1999; Scherer et al., 2005; Van Loon et al., 2006).

Одна из общепризнанных долговременных стратегий защиты растений от патогенов основана на генетической защите с использованием *R*-генов − индукторов ETI (см. выше). Каталог генов Международного симпозиума по

генетике пшеницы содержит около 58 генов устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr*), идентифицированных у пшеницы (McIntosh et al., 2011). Большинство из них, например, *Sr25*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr35*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr44*, *Sr45*, обеспечивают специфические механизмы устойчивости, включающие СВЧ и экспрессию белков PR. Однако появление новых рас патогенов и преодоление ими устойчивости у сортов увеличивают потери от болезней. Поэтому дополнительная линия защиты заключается в использовании химических пестицидов. В то же время последние могут оказывать негативное воздействие на здоровье человека, безопасность пищевых продуктов и окружающую среду, а также могут быть токсичными для нецелевых полезных организмов. Это стимулирует поиск безопасных альтернативных средств защиты растений − биопестицидов и индукторов устойчивости (Ali et al., 2023).

Хитин – один из наиболее изученных PAMP, индуцирующих иммунитет растений. Он является основным компонентом клеточных стенок грибов, экзоскелетов членистоногих, в том числе насекомых. Путем гидролиза и деацетилирования хитина получен биопестицид хитозан, действие которого как стимулятора роста и индуктора неспецифической устойчивости к грибным, бактериальным и вирусным заболеваниям подтверждено во многих исследованиях (Maluin, Hussein, 2020; Щербань, 2023). Однако есть ряд недостатков, затрудняющих использование хитозана: нерастворимость в воде при физиологическом pH, низкая стабильность, вариабельность эффектов в зависимости от веса молекул, степени их деацетилирования и состава мономеров (Katiyar et al., 2014; Варламов и др., 2020).

Поскольку в настоящее время отсутствуют стандартные протоколы определения этих параметров, оценки эффектов препаратов хитозана в разных лабораториях зачастую плохо сопоставимы. Недавно учеными из РФ (патент US 20230096466A1; https://www.freepatentsonline.com/y2023/0096466.html) в результате внутримолекулярной сшивки линейных молекул хитозана получена его глобулярная форма − Новохизоль, обладающая рядом преимуществ: повышенной растворимостью в водных растворах, высокой адгезией к растительным тканям, химической стабильностью, способностью образовывать комплексы с другими биологически активными веществами (Fomenko, Loroch, 2021). В результате обработки этим препаратом семян мягкой пшеницы ускорялось их прорастание, а также наблюдалось увеличение массы корней и общей массы растений (Teplyakova et al., 2022).

В полевых условиях предпосевная обработка семян и обработка растений препаратом Новохизоль в комплексе с природными фунгицидами оказали положительное влияние на рост и продуктивные свойства пшеницы, а также повысили ее устойчивость к ряду грибных заболеваний (Орлова и др., 2025). На этом же объекте в лабораторных условиях продемонстрировано ингибирующее действие препарата Новохизоль на развитие стеблевой ржавчины (Shcherban et al., 2024). При этом было показано, что под влиянием обработки данным препаратом в листовой ткани растений после заражения *Pgt* происходит накопление АФК, в частности пероксида водорода (H_2O_2), за счет модуляции активности ферментов антиоксидантной системы. Следует отметить, что в работе (Shcherban et al., 2024) изучалась реакция на заражение сорта со сложным генотипом, инфицированного смешанной популяцией гриба.

Представляет интерес изучение индуцированных Новохизолем механизмов устойчивости к контрастным по вирулентности изолированным расам *Pgt* с использованием линии мягкой пшеницы, несущей соответствующий ген *Sr*. Для этой цели нами была выбрана изогенная по гену *Sr6* линия, на которой были эффективно дифференцированы авирулентные и вирулентные изоляты *Pgt* (Сколотнева и др., 2020).

Целью данной работы являлись оценка уровня восприимчивости растений указанной линии, обработанных препаратом Новохизоль и отдельно инфицированных тем или другим изолятом *Pgt*, а также сравнительный анализ динамики экспрессии генов защиты (*PR*) в листовой ткани растений в течение 144 ч после инокуляции. К настоящему времени накоплены данные о влиянии препаратов хитозана на экспрессию генов *PR* после заражения растений различными патогенными грибами (Manjunatha et al., 2008; Maluin, Hussein, 2020; Щербань, 2023), однако исследование подобного влияния препарата Новохизоль в нашей работе проведено впервые.

Материалы и методы

Растительный материал и возбудитель стеблевой ржавчины. С целью получения семенного материала линию мягкой пшеницы ISr6-Ra, любезно предоставленную проф. Дж. Колмером (г. Сент-Пол, США), выращивали на гидропонике в лаборатории искусственного климата ИЦиГ СО РАН. Для подтверждения наличия у этой линии гена устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr6* растительный материал генотипировали с помощью молекулярного маркера Xcfd43 к указанному гену (Tsilo et al., 2009). В лабораторном эксперименте растения выращивали в сосудах с почвой в условиях, рекомендуемых для работ с ржавчинными грибами международными протоколами (Roelfs et al., 1992). Для обработки Новохизолем использовали 10-дневные проростки, а в качестве контроля − незараженные растения без обработки, которые выращивались параллельно экспериментальным образцам.

Ранее в составе западносибирской популяции *Pgt* были генотипированы расы гриба, содержащие различные комбинации (патотипы) генов *Avr* и *vr* (Сколотнева и др., 2020). В эксперименте была использована система патотипов LKCSF (vr6)/LCCSF (Avr6) с наибольшим выходом урединиоспор. Отобранные изоляты были размножены на восприимчивом сорте мягкой пшеницы Хакасская для получения материала спор в количестве, необходимом для заражения опытной партии растений из расчета 10 мг на 1000 растений. Споровый материал хранился при температуре −70 °C до проведения эксперимента.

Обработка препаратом Новохизоль и заражение *Pgt*. Оценка уровня восприимчивости растений. Препарат Новохизоль со степенью деацетилирования ≥ 90 % и молекулярной массой ~500 кДа предоставлен Novochizol SA (г. Монте, Швейцария). Водные суспензии данного препарата были приготовлены, как описано в (Teplyakova et al., 2022). Для обработки 10-дневных проростков растений была выбрана концентрация 0.125 %, которая,

Последовательности праймеров и ожидаемые размеры продуктов ПЦР

Праймеры	Продукт гена	Последовательность (5′–3′)	Размер ПЦР-продукта (п. о.)	Литературный источник
GAPDHF GAPDHR	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	TTGCTCTGAACGACCATTTC GACACCATCCACATTTATTCTTC	176	Hao et al., 2022
CERK1F CERK1R	Киназа рецептора хитинового элиситора 1	TTACCCCATCGACGCCATTC TCTGCCGGACATGAGGTTCA	190	Lee et al., 2014
PR3F PR3R	Эндохитиназа	AGAGATAAGCAAGGCCACGTC GGTTGCTCACCAGGTCCTTC	116	Desmond et al., 2005
PR4F PR4R	Гевеин-подобный белок	CGAGGATCGTGGACCAGTG GTCGACGAACTGGTAGTTGACG	128	Bertini et al., 2003
PR5F2 PR5R2	Тауматин-подобный белок	GCCGCAAGCCTACCAACA CGCGGTGCGACGTATAGAG	107	Ray et al., 2003
PR6F PR6R	Ингибитор протеиназы	TTCAGGGCTTCAGGCTCAG ATTGACCAAGACACGACGATAG	141	Gao et al., 2013
PR9F PR9R	Пероксидаза	GAGATTCCACAGATGCAAACGAG GGAGGCCCTTGTTTCTGAATG	102	Pritsch et al., 2000

как ранее было показано, эффективна против стеблевой ржавчины (Shcherban et al., 2024). Суспензию препарата Новохизоль наносили на растения с помощью бытового опрыскивателя (15 мл/100 растений) за четыре дня до инокуляции *Pgt*.

Для инокуляции растений урединиоспоры *Pgt* предварительно смешивали с минеральным маслом Novec 7100 (3M Novec™, Сент-Пол, Миннесота, США) в концентрации 25 мг спор на 5 мл масла и наносили на проростки с помощью опрыскивателя. Контрольные растения обрабатывали бидистиллированной водой. Инокулированные растения инкубировали в течение 24 ч во влажной камере, в темноте, при температуре 15–20 °C для обеспечения максимального прорастания спор. Затем растения переносили в камеры для роста и инкубировали в течение 16 ч при освещении фитолампой 10000 лк и при температуре 26–28 °C. Эти условия необходимы для образования аппрессориев, проникновения патогена в устьица и развития инфекционных гиф в межклетниках растения (Roelfs et al., 1992).

Степень восприимчивости растений к стеблевой ржавчине оценивали с учетом качественной (тип реакции) и количественной составляющих этого показателя. Инфекционные типы реакции растений (ИТ) определяли через 12–14 дней после инокуляции с использованием модифицированной шкалы Штэкмана (Roelfs et al., 1992), где ИТ «0», «;», «1» и «2» трактовали как устойчивые (низкая, L), а «3», «3+» и «4» – как восприимчивые (высокая, H).

Экстракция РНК, обратная транскрипция, ОТ-ПЦР и кПЦР. Для сбора проб в различные временные точки после заражения (3, 6, 24, 48, 72, 144 ч) для каждого варианта опыта было высажено по три растения – биологические повторности. Отдельные листья срезали с каждого растения и сразу помещали в жидкий азот. Собранный материал хранили при –80 °C перед выделением РНК. Тотальную РНК выделяли с помощью набора R-Plants-kit («Биолабмикс», Новосибирск, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Геномную ДНК удаляли с помощью термолабильной ДНКазы («Биолабмикс»). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов OT-M-MuLV-RH для синтеза первой цепи кДНК («Биолабмикс») с применением 1 мкг общей РНК и олиго$(dT)_{16}$ в качестве праймера.

Для ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) условия были те же, что и для кПЦР (см. ниже). Продукты ОТ-ПЦР анализировали электрофорезом в 1.5 % агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом.

Для кПЦР использовали набор реагентов BioMaster HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2×) («Биолабмикс») и систему QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Scientific, США). Последовательности геноспецифичных праймеров приведены в таблице. Условия амплификации: 5 мин при 95 °C, затем 40 циклов: 10 с при 95 °C, 20 с при 60 °C (55 °C для гена *GAPDH*) и 10 с при 72 °C. Данные кПЦР собирали во время каждого раунда амплификации. Анализ кривой плавления между 60 и 95 °C применяли ко всем продуктам для определения точности реакции ПЦР.

Измерения экспрессии генов проводили в трех биологических повторах, каждый с тремя техническими повторами. Относительное количество мРНК определяли по формуле Пфаффла (Pfaffl, 2001). Эффективность ПЦР оценивали с использованием программного обеспечения LinReg (Ruijter et al., 2009). Уровни экспрессии мРНК были нормализованы относительно уровня гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Этот ген был выбран в качестве референсного, поскольку не были выявлены различия в содержании его мРНК между инфицированными *Pgt* и контрольными образцами (данные не показаны). Для сравнения уровней экспрессии использовали дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки.

Для оценки с помощью кПЦР уровня транскрипции генов мягкой пшеницы, индуцируемых во время инфекции *Pgt*, нами было отобрано шесть генов, для которых в предварительной ОТ-ПЦР было установлено наличие мономорфного продукта амплификации ожидаемой длины с варьирующей интенсивностью в отдельных временных точках после инокуляции возбудителем (см. таблицу).

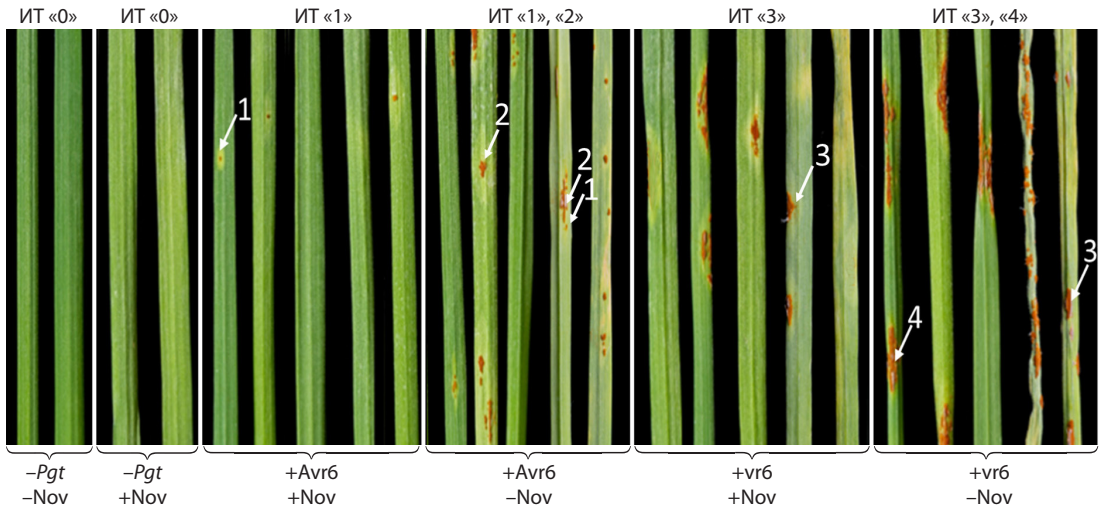


Рис. 1. Влияние препарата Новохизоль на развитие симптомов стеблевой ржавчины на листьях пшеницы линии *T. aestivum* ISr6-Ra.

Avr6 и vr6 – авирулентный и вирулентный изоляты возбудителя стеблевой ржавчины (*Pgt*). Инфекционные типы реакции растений (ИТ) указаны над рисунком. Пустулы, характерные для каждого ИТ, обозначены стрелками. Nov – Новохизоль. Фотофиксация проводилась на 14-е сутки после инокуляции возбудителем. Возраст растений на момент фиксации – 28 суток.

Результаты

Влияние препарата Новохизоль на развитие стеблевой ржавчины

Для изучения влияния обработки препаратом Новохизоль на восприимчивость растений мягкой пшеницы к стеблевой ржавчине и экспрессию генов защиты мы использовали модель, включающую линию *T. aestivum* ISr6-Ra и соответствующие ей Avr6- и vr6-изоляты *Pgt*. Данная модель позволяет изучать различные механизмы устойчивости в зависимости от распознавания лигандов патогена иммунными рецепторами хозяина.

Через 14 дней после инокуляции уровень восприимчивости растений, инфицированных изолятом Avr6, соответствовал устойчивому типу (ИТ = 1–2) (рис. 1). Такой сценарий соответствует случаям взаимодействия генотипов растение/патоген, несущих комплементарные гены устойчивости и авирулентности, т. е. кодирующих иммунный рецептор и его специфический лиганд. Заражение изолятом vr6 привело к реакции восприимчивости (ИТ = 3–4). Проведенная ранее оценка количественной составляющей устойчивости, определяемой по среднему числу пустул на листовую пластинку, показала многократное уменьшение числа пустул у предварительно обработанных препаратом Новохизоль растений, по сравнению с необработанными, в случае того и другого изолята (данные не опубликованы). В результате обработки растения, инфицированные Avr6 и vr6, по количественному показателю оказались сходными (~1.5 пустулы на лист в среднем), однако в целом сохранили специфические для каждого изолята ИТ устойчивости и восприимчивости, определяемые по размеру пустул (см. рис. 1).

Оценка уровня транскрипции генов защиты

Индукция гена *CERK1* в ходе заражения пшеницы *Pgt*. Киназа рецептора элиситора хитина 1 (CERK1) была идентифицирована как PAMP-рецептор хитина, основного структурного компонента клеточных стенок грибов (Gong et al., 2020; Wang L. et al., 2024). После распознавания хитина данный белок-рецептор активирует различные сигнальные пути, связанные с защитой, играя тем самым ключевую роль в иммунитете растений.

У необработанных растений, инфицированных изолятом vr6, через 24 ч после инокуляции (ч/ин) выявлено небольшое увеличение транскрипции этого гена, в то время как в других точках уровень транскрипции не превышал контрольный. В группе необработанных растений, инфицированных изолятом Avr6, увеличения количества транскриптов *CERK1* на протяжении всего эксперимента, по сравнению с контролем, не отмечалось.

Растения, предварительно обработанные препаратом Новохизоль, демонстрировали разную реакцию на заражение *Pgt* в зависимости от типа изолята (рис. 2, *а*). У растений, инфицированных vr6, мы наблюдали увеличение уровня транскриптов *CERK1* через 3 и 48–144 ч/ин относительно необработанных растений, инфицированных тем же изолятом, хотя значимость этого увеличения в отдельных точках была низкой. В то же время у обработанных препаратом растений, инфицированных Avr6, отмечалось достоверное увеличение транскрипции *CERK1* примерно в 2–3 раза относительно необработанных растений в диапазоне 24–72 ч/ин. У неинфицированных растений, обработанных препаратом, уровень транскрипции *CERK1* существенно не превышал таковой у контрольных растений, а иногда даже снижался (см. рис. 2, *а*). Таким образом, хотя индукция *CERK1* под влиянием биопестицида Новохизоль наблюдалась для обоих изолятов, степень этой индукции была выше в случае изолята Avr6.

Индукция генов *PR3* и *PR4*, кодирующих различные хитиназы. Гены *PR3* и *PR4* кодируют белки с хитиназной активностью, расщепляющие хитин патогенных грибов, растительноядных насекомых и нематод (Van Loon et al., 2006). Эти ферменты не имеют эндогенного субстрата и

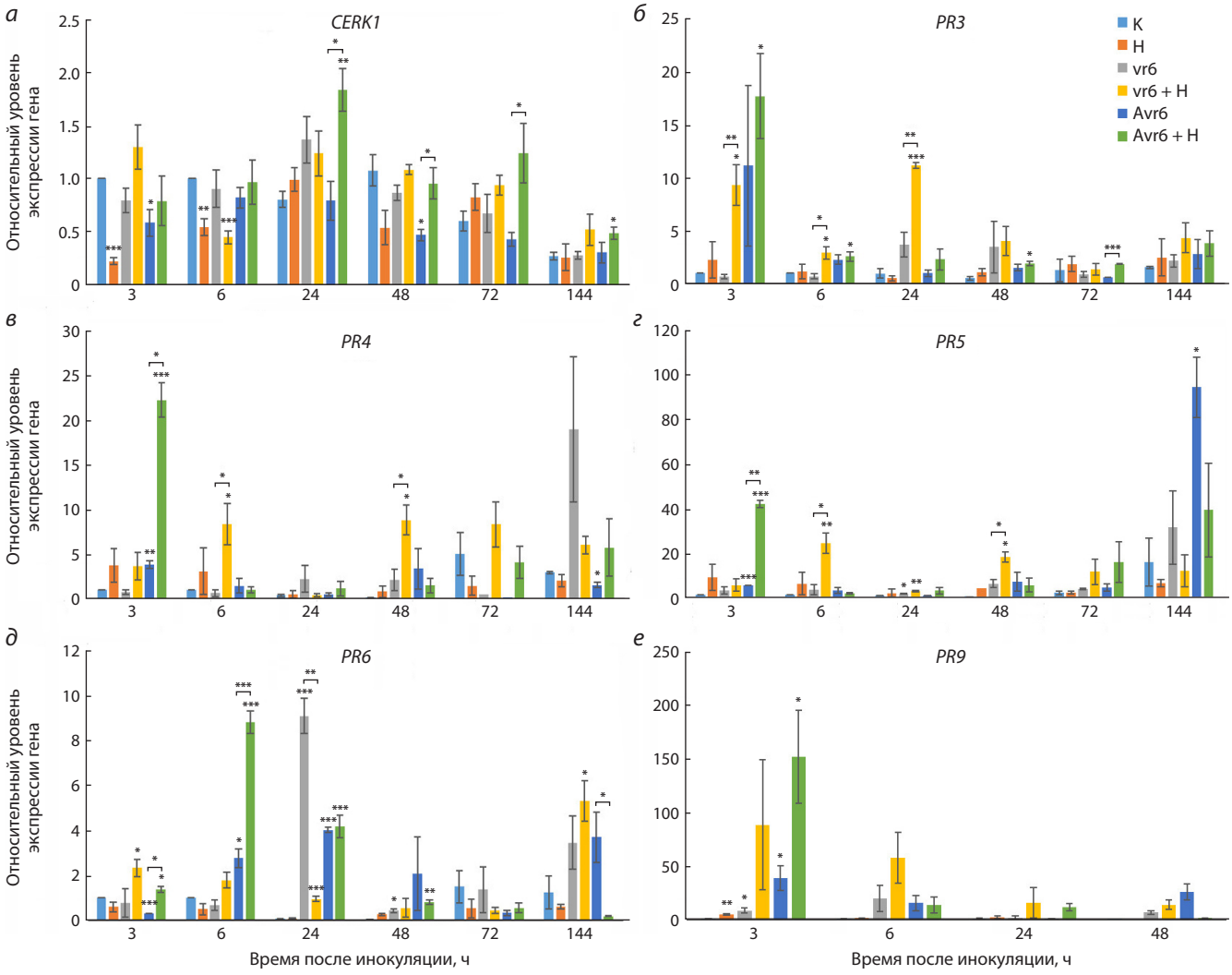


Рис. 2. Динамика транскрипции генов некоторых защитных белков в листьях мягкой пшеницы линии ISr6-Ra после их обработки препаратом 0.125 % Новохизоль и инокуляции vr6- или Avr6-изолятом *Pgt*.

K – контроль; H – обработка препаратом; vr6 – инокуляция изолятом vr6; vr6 + H – обработка препаратом и инокуляция изолятом vr6; Avr6 – инокуляция изолятом Avr6; Avr6 + H – обработка препаратом и инокуляция изолятом Avr6. Столбцы представляют средний уровень транскриптов генов относительно референсного (± стандартная ошибка среднего). Проведены сравнение с контрольными растениями в отдельных временных точках и попарные сравнения vr6/vr6 + H и Avr6/Avr6 + H (выделены скобками); значения *p*: * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$.

играют важную роль в лизисе клеточных стенок многих патогенов.

Транскрипция обоих генов в контрольных растениях и растениях, обработанных препаратом Новохизоль без заражения, была примерно на одном уровне, без каких-либо значительных изменений (см. рис. 2, *б*, *в*). У необработанных растений, инфицированных vr6, отмечено небольшое увеличение уровня транскрипции *PR3* через 24 ч/ин с последующим снижением до исходного уровня на третьи сутки после инокуляции. У необработанных растений, инфицированных Avr6, было повышенное значение среднего уровня транскрипции *PR3* через 3 ч/ин; в других временных точках существенных изменений относительно контроля не было. Что касается *PR4*, то экспрессия этого гена у необработанных растений, инфицированных vr6, показала увеличение среднего уровня через 144 ч/ин, тогда как при заражении Avr6 индукция отмечалась уже через 3 ч/ин.

Обработка препаратом индуцировала более высокие уровни транскрипции генов *PR3* и *PR4* в ответ на заражение *Pgt* по сравнению с необработанными растениями. Так, в случае заражения vr6 обработанных растений мы наблюдали повышенную транскрипцию гена *PR3* через 3–24 ч/ин с максимальным уровнем в 24 ч/ин, тогда как для *PR4* – через 6 и 48–72 ч/ин. Транскрипция обоих генов увеличивалась через 3 ч/ин при заражении растений изолятом Avr6, причем статистически наиболее значимое увеличение, по сравнению с необработанными растениями, обнаружено для гена *PR4* (см. рис. 2, *б*, *в*).

Экспрессия генов *PR5*, *PR6* и *PR9*. В этой работе мы также изучили динамику транскрипции генов *PR5*, *PR6* и *PR9*, которые играют важную роль в защите растений от патогенных организмов. Ген *PR5* кодирует тауматин-подобный белок, обладающий противогрибной активностью, а также является осморегулятором, предохраняющим растения от абиотического стресса (Van Loon et al.,

2006). Продукт гена *PR6* – ингибитор протеиназы, подавляющий протеолитические ферменты патогена. Пероксидаза, кодируемая геном *PR9*, играет важную роль в укреплении клеточной стенки растений и образовании АФК для создания токсичной среды для патогена (Almagro et al., 2009).

Уровни транскрипции генов *PR5*, *PR6* и *PR9* у контрольных, а также неинфицированных растений, обработанных препаратом Новохизоль, не претерпели существенных изменений в ходе эксперимента (см. рис. 2, *г–е*). У необработанных растений, инфицированных тем или иным изолятом *Pgt*, накопление транскриптов *PR5* наблюдалось только на 6-й день заражения патогеном (см. рис. 2, *г*). Под влиянием препарата у растений, инфицированных vr6, отмечено более раннее повышение уровня транскрипции *PR5*, особенно заметное через 6 и 48 ч/ин. У растений, инфицированных Avr6, предобработка препаратом вызвала значительную индукцию транскрипции *PR5* через 3 ч/ин с последующим снижением уровня экспрессии. Следует отметить, что есть признаки сходства динамики транскрипции *PR5* с таковой генов *PR3* и *PR4* (см. выше).

У необработанных растений, инфицированных vr6, транскрипция *PR6* достигала пика в 24 ч/ин, тогда как у необработанных растений, инфицированных Avr6, транскрипция этого гена увеличивалась менее значительно, в 6 и 24 ч/ин (см. рис. 2, *д*). Интересно, что обработка биопестицидом вызвала значительное снижение уровня транскриптов *PR6* у растений, инфицированных vr6, в 24 ч/ин. В случае заражения изолятом Avr6 максимальная экспрессия *PR6* у обработанных растений, значительно превышающая таковую у необработанных, наблюдалась в 6 ч/ин, а затем уровни обеих групп растений становились сходными, за исключением 144 ч/ин.

У растений, инфицированных vr6, без обработки препаратом, уровень транскриптов *PR9* увеличивался в интервале 3−6 ч/ин, а затем снижался (см. рис. 2, *е*). У растений, инфицированных vr6, с обработкой препаратом увеличение транскрипции *PR9* наблюдалось в 3−24 ч/ин с высокой вариабельностью между отдельными растениями. Меньшая степень увеличения экспрессии этого гена была характерна для обработанных растений, инфицированных Avr6, за исключением точки 3 ч/ин, в которой был зарегистрирован самый высокий уровень транскрипции *PR9*. Транскрипты гена *PR9* на временных точках 72 и 144 ч/ин в контрольных и инфицированных образцах не обнаружены.

Обсуждение

Влияние препаратов хитозана на защитные реакции и сигнальные пути, контролирующие иммунитет, подробно изучено на различных растительных объектах, хотя и недостаточно для полного понимания механизмов этого влияния (Щербань, 2023). Однако пока существуют лишь единичные исследования, посвященные анализу эффектов препарата Новохизоль − глобулярного производного хитозана (Teplyakova et al., 2022; Shcherban et al., 2024; Орлова и др., 2025). Наша работа предоставляет новую информацию об индуцированных данным препаратом изменениях в экспрессии генов защиты при заражении пшеницы возбудителем опасного грибного заболевания − стеблевой ржавчины.

В ответ на атаки патогенов растения выработали сложную иммунную систему, включая PRR-опосредованную PTI, представляющую первый уровень защиты растений от инфекций. PRR являются центральными элементами иммунитета растений, запускающими каскад защитных реакций, включая накопление АФК, экспрессию генов *PR* и другие реакции (Jones, Dangl, 2006).

В нашем исследовании проанализировано влияние препарата Новохизоль на экспрессию гена, кодирующего PRR CERK1 в листовой ткани растений пшеницы, инфицированных различными изолятами *Pgt*. Растения, не обработанные препаратом, в ответ на заражение авирулентным и вирулентным изолятами *Pgt* не показали существенных изменений уровня экспрессии этого гена на протяжении всего эксперимента (см. рис. 2, *а*). Также не выявлены достоверные изменения уровня экспрессии у неинфицированных растений, обработанных препаратом.

Ранее была обнаружена активация транскрипции гена *CERK1* в ткани колоса под действием хитина и при инфицировании возбудителем фузариоза *Fusarium graminearum* Schwabe (Wang L. et al., 2024). По всей видимости, возбудители фузариоза и стеблевой ржавчины провоцируют различающиеся реакции защитной системы в разных тканях растения, а хитин − природный элиситор, может провоцировать более интенсивную реакцию, по сравнению с препаратом Новохизоль.

Растения, обработанные препаратом, продемонстрировали более выраженный ответ на заражение *Pgt*, который зависел от типа изолята. Так, при заражении vr6 мы наблюдали небольшое повышение уровня транскрипции *CERK1* через 3 ч/ин и в диапазоне 48−144 ч/ин, тогда как при заражении авирулентным изолятом Avr6 степень индукции *CERK1* была выше, чем в предыдущем случае, и превосходила уровень экспрессии данного гена у необработанных растений в 2−3 раза на промежутке 24−72 ч/ин. Такое повышение уровня экспрессии у растений, инфицированных Avr6, можно объяснить тесной связью между PTI и ETI.

Предыдущие исследования продемонстрировали, что эти уровни защиты, активируемые в растениях внешними и внутриклеточными рецепторами соответственно, взаимно усиливают друг друга (Ngou et al., 2021). С этой точки зрения можно предположить, что наличие внутриклеточного рецептора растения (продукта гена *Sr6*), комплементарного продукту *Avr6* гена *Pgt*, является дополнительным триггером, способным усилить PTI за счет увеличения экспрессии гена *CERK1*. Недавно было показано, что сверхэкспрессия *CERK1* обеспечивает для пшеницы широкий спектр устойчивости к грибным заболеваниям (Wang L. et al., 2024).

Гены, кодирующие белки PR3 и PR4, обладают эндохитиназной активностью, способны разрушать клеточную стенку грибов и активируются при воздействии на растения различных патогенов (Van der Bulcke et al., 1990; Ward et al., 1991; Hammond-Kosack, Gones, 1996; Gao et al., 2013). Согласно полученным в работе данным, при инфицировании vr6 происходило повышение уровня

транскрипции гена *PR3* через 24 ч/ин, тогда как ген *PR4* индуцировался значительно позже, на 6-й день после инокуляции (см. рис. 2, *б*, *в*). При инфицировании Avr6 синхронное повышение экспрессии обоих генов происходило через 3 ч/ин.

Как и в случае с *CERK1*, обработка препаратом вызывала увеличение транскрипции обоих генов хитиназ, по сравнению с необработанными растениями, наиболее выраженное в случае изолята Avr6 в той же точке, что и у необработанных, зараженных Avr6 растений − 3 ч/ин. Таким образом, для генов *PR3* и *PR4* характерно раннее накопление транскриптов при заражении Avr6 изолятом *Pgt*, при этом Новохизоль проявил дополнительное стимулирующее действие на экспрессию данных генов. Показано, что обработка препаратами хитозана вызывает раннее накопление хитиназ, которые неспецифически разрушают хитин клеточных стенок грибов и тем самым повышают устойчивость растений к широкому спектру грибных заболеваний (Manjunatha et al., 2008; Ma et al., 2013; Elsharkawy et al., 2022).

Многочисленные исследования продемонстрировали, что сверхэкспрессия тауматин-подобных белков (TLP), относящихся к семейству PR5, обеспечивает значительную устойчивость растений к различным патогенным грибам (Wang X. et al., 2010; Cui et al., 2021). Нами показано, что, подобно гену *PR4*, накопление транскриптов *PR5* происходило поздно − через 144 ч/ин в необработанных растениях, инфицированных vr6 (см. рис. 2, *г*). Обработка препаратом привела к более раннему накоплению транскриптов *PR5* – через 6 и 48 ч/ин у растений, инфицированных тем же изолятом. Наконец, подобно *PR4*, ген *PR5* проявил значительную индукцию своей экспрессии через 3 ч/ин в обработанных растениях, инфицированных Avr6. Такое сходство в динамике экспрессии *PR4* и *PR5* указывает на общий механизм регуляции этих генов, зависящий от генотипа патогена.

Что касается возможной мишени действия белка PR5, показано, что сверхэкспрессия TLP у винограда *Vitis vinifera* L. приводит к снижению роста гиф патогенного гриба *Plasmopara viticola* (He et al., 2017). Точный механизм действия TLP не установлен, однако сообщалось, что PR5 разрушает β-1,3-глюканы, которые, как и хитин, являются важным структурным компонентом клеточных стенок грибов (Grenier et al., 1999).

Значительная роль продукта гена *PR6* заключается в ингибировании протеиназ патогенов, разрушающих белки растения (Ryan, 2000). Согласно нашим данным, экспрессия этого гена в необработанных растениях продемонстрировала сходную картину с таковой у других генов *PR*, изученных в данной работе: небольшое повышение уровня транскрипции через 24 ч/ин в случае vr6 и в 6, 24 и 144 ч/ин в случае Avr6 (см. рис. 2, *д*). Особенность этого гена – различная реакция на Новохизоль, в зависимости от типа изолята, в точке 24 ч/ин. Для изолята vr6 в этот момент было характерно резкое снижение уровня транскрипции *PR6* в результате обработки, тогда как для Avr6 уровни транскрипции в обработанных и необработанных растениях были примерно одинаковыми. В предыдущие 6 ч/ин мы наблюдали более типичную для Avr6 картину, а именно: существенное увеличение транскрипции *PR6* у обработанных растений по сравнению с необработанными. Можно предположить, что пик функциональной активности *PR6* приходится на период до 24 ч/ин, после чего его роль снижается, что обуславливает изменчивость уровня транскрипции.

Ген *PR9* кодирует пероксидазу, участвующую в детоксикации перекиси водорода и синтезе лигнина. Последнее вещество, накапливаясь в клеточной стенке растения, создает барьер для распространения патогена (Андреева, 1988). У обработанных препаратом растений, инфицированных vr6, мы отметили увеличение транскрипции *PR9* через 3−24 ч/ин (см. рис. 2, *е*). Обработанные растения, инфицированные Avr6, показали повышенный средний уровень транскрипции через 3 ч/ин и отсутствие увеличения в другие временные точки относительно необработанных растений, инфицированных тем же изолятом. Наблюдаемую в случаях обоих изолятов повышенную дисперсию данных можно объяснить неравномерным распределением пустул по отдельным листьям (см. рис. 1), при этом самый высокий уровень активности пероксидазы и, соответственно, транскрипции этого гена можно ожидать в областях формирования морфологических структур гриба (см. ниже).

Тем не менее эти данные коррелируют с недавним биохимическим анализом, который продемонстрировал повышение ферментативной активности пероксидазы в промежутке 6−144 ч/ин у обработанных препаратом Новохизоль инфицированных vr6 растений (данные не опубликованы). Мы предполагаем, что увеличение активности пероксидазы в этой группе растений под влиянием препарата связано с ускорением процесса лигнификации. Предыдущий гистохимический анализ выявил у растений, обработанных препаратом, более раннее и интенсивное, по сравнению с необработанными растениями, накопление фенольных веществ в цитоплазме и лигнина на клеточных стенках в зоне колоний *Pgt* (Щербань и др., 2025).

Таким образом, индукция защитных генов в растениях, обработанных препаратом Новохизоль, практически во всех случаях усиливается после инокуляции патогеном, что согласуется с ранее высказанной гипотезой прайминга − быстрой реакции иммунной системы на последующую атаку патогенов под влиянием элиситоров (Conrath, 2011).

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что биопрепарат Новохизоль повышает количественную составляющую устойчивости изогенной линии ISr6-Ra к стеблевой ржавчине как в случае Avr6-изолята *Pgt*, так и в случае vr6-изолята. Анализ транскрипции генов защиты *CERK1*, *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PR6* показал повышение уровня транскрипции этих генов у растений, обработанных препаратом и инфицированных различными изолятами *Pgt*, по сравнению с необработанными инфицированными растениями. Таким образом, применение биопестицида Новохизоль в сочетании с селекцией на гены устойчивости (пирамидированием) является эффективным способом повышения устойчивости мягкой пшеницы к стеблевой ржавчине.

Список литературы / References

Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988
[Andreeva V.A. The Enzyme Peroxidase: Participation in the Protective Mechanism of Plants. Moscow: Nauka Publ., 1988 (in Russian)]

Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*. 2020; 60:317-368
[Varlamov V.P., Ilyina A.V., Shagdarova B.Ts., Lunkov A.P., Mysyakina I.S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches. *Biochemistry*. 2020;85:154-176. doi 10.1134/s0006297920140084]

Орлова Е.А., Бехтольд Н.П., Щербань А.Б., Фоменко В.В. Влияние новых биологических препаратов на основе новохизоля на состояние посевов мягкой яровой пшеницы. *Зерновое хозяйство России*. 2025;17(2):86-93. doi 10.31367/2079-8725-2025-97-2-86-93
[Orlova E.A., Bekhtold N.P., Shcherban A.B., Fomenko V.V. The effect of new biological products based on Novochizol on the condition of spring common wheat crops. *Zernovoe Hozyajstvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2025;17(2):86-93. doi 10.31367/2079-8725-2025-97-2-86-93 (in Russian)]

Санин С.С. Эпифитотии болезней зерновых культур: теория и практика. М.: НИПКЦ Восход-А, 2012
[Sanin S.S. Epiphytoties in Grain Crops: Theory and Practice. Moscow, 2012 (in Russian)]

Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргунов А.И., Бойко Н.И., Шаманин В.П., Салина Е.А. Расовый состав новосибирской популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici. Микология и фитопатология*. 2020;54(1):49-58. doi 10.31857/S0026364820010092
[Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Morgunov A.I., Boyko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races composition of the Novosibirsk population of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mykologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. doi 10.31857/S0026364820010092 (in Russian)]

Тарчевский И.А. Сигнальные системы растительных клеток. М.: Наука, 2002
[Tarchevskiy I.A. Signaling systems of plant cells. Moscow: Nauka Publ., 2002 (in Russian)]

Щербань А.Б. Хитозан и его производные как перспективные средства защиты растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1010-1021. doi 10.18699/VJGB-23-116
[Shcherban A.B. Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(8):1010-1021. doi 10.18699/VJGB-23-116]

Щербань А.Б., Плотникова Л.Я., Кнауб В.В., Сколотнева Е.С., Фоменко В.В. Цитофизиологические проявления защитных реакций пшеницы от стеблевой ржавчины, индуцируемые биофунгицидом Новохизолем. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2025;29(4):539-548. doi 10.18699/vjgb-25-57
[Shcherban A.B., Plotnikova L.Ya., Knaub V.V., Skolotneva E.S., Fomenko V.V. Cyto-physiological manifestations of protective reactions of wheat against stem rust, induced by the biofungicide Novochizol. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(4):539-548. doi 10.18699/vjgb-25-57]

Ali S., Ahmad N., Dar M.A., Manan S., Rani A., Alghanem S.M.S., Khan K.A., Sethupathy S., Elboughdiri N., Mostafa Y.S., Alamri S.A., Hashem M., Shahid M., Zhu D. Nano-agrochemicals as substitutes for pesticides: prospects and risks. *Plants* (*Basel*). 2023; 13(1):109. doi 10.3390/plants13010109

Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreño M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot*. 2009;60(2):377-390. doi 10.1093/jxb/ern277

Bent A.F., Mackey D. Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*. 2007;45:399-436. doi 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427

Bertini L., Leonardi L., Caporale C., Tucci M., Cascone N., Di Berardino I., Buonocore V., Caruso C. Pathogen-responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. *Plant Sci*. 2003;164(6):1067-1078. doi 10.1016/S0168-9452(03)00112-2

Bigeard J., Colcombet J., Hirt H. Signaling mechanisms in pattern triggered immunity (PTI). *Mol Plant.* 2015;8(4):521-539. doi 10.1016/j.molp.2014.12.022

Chai Y., Senay S., Horvath D., Pardey P. Multi-peril pathogen risks to global wheat production: a probabilistic loss and investment assessment. *Front Plant Sci*. 2022;13:1034600. doi 10.3389/fpls.2022.1034600

Conrath U. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci*. 2011;16(10):524-531. doi 10.1016/j.tplants.2011.06.004

Cui Z., Liang F., Zhang J., Wang F., Liu D., Wang H. Transgenic expression of *TaTLP1*, a thaumatin-like protein gene, reduces susceptibility to common root rot and leaf rust in wheat. *Crop J*. 2021;9(5): 1214-1218. doi 10.1016/j.cj.2021.03.021

Desmond O.J., Edgar C.I., Manners J.M., Maclean D.J., Schenk P.M., Kazan K. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2005;67(3-5):171-179. doi 10.1016/j.pmpp.2005.12.007

Ding Y., Sun T., Ao K., Peng Y., Zhang Y., Li X., Zhang Y. Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*. 2018;173(6):1454-1467.e15. doi 10.1016/j.cell.2018.03.044

Elsharkawy M.M., Omara R.I., Mostafa Y.S., Alamri S.A., Hashem M., Alrumman S.A., Ahmad A.A. Mechanism of wheat leaf rust control using chitosan nanoparticles and salicylic acid. *J Fungi* (*Basel*). 2022;8(3):304. doi 10.3390/jof8030304

Fomenko V., Loroch V. Novochizol: a new type of cross-linked chitosan particles for formulation and parsimonious delivery of copper compounds. In: 6th European Copper Conference in Plant Protection, Berlin, Germany, 17–18 November 2021. Berlin: IFOAM Organics Europe, 2021. Available online: https://www.boelw.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/Veranstaltungen/Kupfertagung_2021/copper_novochizol.pdf

Gao C., Kou X., Li H., Zhang J., Saad A., Liao Y. Inverse effects of *Arabidopsis NPR1* gene on fusarium seedling blight and fusarium head blight in transgenic wheat. *Plant Pathol*. 2013;62(2):383-392. doi 10.1111/J.1365-3059.2012.02656.x

Gong B.Q., Wang F.Z., Li J.F. Hide-and-seek: chitin-triggered plant immunity and fungal counterstrategies. *Trends Plant Sci*. 2020;25(8): 805-816. doi 10.1016/j.tplants.2020.03.006

Grenier J., Potvin C., Trudel J., Asselin A. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β-1,3-glucans. *Plant J*. 1999;19(4):473-480. doi 10.1046/j.1365-313x.1999.00551.x

Hafeez A.N., Arora S., Ghosh S., Gilbert D., Bowden R.L., Wulff B.B.H. Creation and judicious application of a wheat resistance gene atlas. *Mol Plant.* 2021;14(7):1053-1070. doi 10.1016/j.molp.2021.05.014

Hammond-Kosack K.E., Gones J.D.G. Resistance gene dependent plant defence responses. *Plant Cell.* 1996;8(10):1773-1791. doi 10.1105/tpc.8.10.1773

Hao G., Tiley H., McCormick S. Chitin triggers tissue-specific immunity in wheat associated with Fusarium head blight. *Front Plant Sci*. 2022;13:832502. doi 10.3389/fpls.2022.832502

He R., Wu J., Zhang Y., Agüero C.B., Li X., Liu S., Wang C., Walker M.A., Lu J. Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma*. 2017;254:1579-1589. doi 10.1007/s00709-016-1047-y

Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature*. 2006; 444(7117):323-329. doi 10.1038/nature05286

Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.N. A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Adv Plants Agric Res*. 2014;1(1):23-30. doi 10.15406/apar.2014.01.00006

Lee W.S., Rudd J.J., Hammond-Kosack K.E., Kanyuka K. *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(3):236-243. doi 10.1094/ MPMI-07-13-0201-R

Ma Z., Yang L., Yan H., Kennedy J.F., Meng X. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydr Polym*. 2013;94(1):272-277. doi 10.1016/j.carbpol.2013.01.012

Maluin F.N., Hussein M.Z. Chitosan-based agronanochemicals as a sustainable alternative in crop protection. *Molecules*. 2020;25(7): 1611. doi 10.3390/molecules25071611

Manjunatha G., Roopa K.S., Prashanth G.N., Shetty H.S. Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defence-related enzyme activation. *Pest Manag Sci*. 2008;64(12):1250-1257. doi 10.1002/ps.1626

McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2011 supplement. IWGS, 2011. Available online: http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2011.pdf

Ngou B.P.M., Ahn H.K., Ding P., Jones J.D. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*. 2021;592(7852):110-115. doi 10.1038/s41586-021-03315-7

Patpour M., Hovmøller M.S., Rodriguez-Algaba J., Randazzo B., Villegas D., Shamanin V.P., Berlin A., … Meyer K.J.G., Valade R., Thach T., Hansen J.G., Justesen A.F. Wheat stem rust back in Europe: diversity, prevalence and impact on host resistance. *Front Plant Sci.* 2022;13:882440. doi 10.3389/fpls.2022.882440

Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45. doi 10.1093/nar/29.9.e45

Pritsch C., Muehlbauer G.J., Bushnell W.R., Somers D.A., Vance C.P. Fungal development and induction of defence response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2000;13(2):159-169. doi 10.1094/MPMI.2000.13.2.159

Ray S., Anderson J.M., Urmeev F.I., Goodwin S.B. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol*. 2003;53(5):701-714. doi 10.1023/B:PLAN.0000019120.74610.52

Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico: CIMMYT, 1992

Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M.H., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J.B., Moorman A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):e45. doi 10.1093/nar/gkp045

Ryan C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):112-121. doi 10.1016/s0167-4838(99)00269-1

Scherer N.M., Thompson C.E., Freitas L.B., Bonatto S.L. Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins. *Genet Mol Biol*. 2005;28(4):645-653. doi 10.1590/S1415-47572005000500001

Sels J., Mathys J., De Coninck B.M., Cammue B.P., De Bolle M.F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*. 2008;46(11):941-950. doi 10.1016/j.plaphy.2008.06.011

Shcherban A.B., Skolotneva E.S., Fedyaeva A.V., Boyko N.I., Fomenko V.V. Effect of biopesticide Novochizol on development of stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in wheat, *T. aestivum* L. *Plants*. 2024;13(23):3455. doi 10.3390/plants13233455

Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*. 2008;321(5891):952-956. doi 10.1126/science.1156970

Teplyakova O.I., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F., Vlasenko N.G. Novochizol™ seed treatment: effects on germination, growth and development in soft spring wheat. *Nat Prod Chem Res*. 2022; 10(5):1-4. doi 10.35248/naturalproducts.10.5.1-04

Tsilo T.J., Chao S., Jin Y., Anderson J.A. Identification and validation of SSR markers linked to the stem rust resistance gene *Sr6* on the short arm of chromosome 2D in wheat. *Theor Appl Genet.* 2009; 118(3):515-524. doi 10.1007/s00122-008-0917-x

Van der Bulcke C., Bauw G., De Rucke R., Castresana C. The role of vacuolar and secreted pathogenesis-related B (1-3)-gluconases and chitinases in the defense response of plants. *Bull Soc Bot Fr*. 1990;137(3-4):51-63. doi 10.1080/01811789.1990.10827029

Van Loon L.C., Van Strien E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1999;55(2):85-97. doi 10.1006/pmpp.1999.0213

Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*. 2006;44:135-162. doi 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425

Wang L., He Y., Guo G., Xia X., Dong Y., Zhang Y., Wang Y., Fan X., Wu L., Zhou X., Zhang Z., Li G. Overexpression of plant chitin receptors in wheat confers broad-spectrum resistance to fungal diseases. *Plant J.* 2024;120(3):1047-1063. doi 10.1111/tpj.17035

Wang X., Tang C., Deng L., Cai G., Liu X., Liu B., Han Q., Buchenauer H., Wei G., Han D., Huang L., Kang Z. Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiol Plant*. 2010;139(1):27-38. doi 10.1111/j.1399-3054.2009.01338.x

Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-Goy P., Metraux J.P., Ryalset J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 1991;3(10):1085-1094. doi 10.1105/tpc.3.10.1085

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 05.06.2025. После доработки 17.07.2025. Принята к публикации 30.07.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1213-1220

doi 10.18699/vjgb-25-128

Дифференциальный профиль экспрессии генов транскрипционных факторов подсемейства DREB2 в динамике солевого стресса и послестрессового восстановления растений томата

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

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
michel7753@mail.ru

Аннотация. В ответ на стрессовое воздействие в геноме растения происходят эпигенетические модификации, вместе формирующие стрессовую память, которая может наследоваться и повышает эффективность защитной реакции растения на повторные стрессовые события. Гены, чья экспрессия становится мишенью эпигенетических модификаций, служат биомаркерами стрессовой памяти. Их характерными признаками считаются профиль экспрессии, различающийся между ответами на первичное и повторное стрессовые события, а также длительное удерживание изменений после отмены стресса. Томат (*Solanum lycopersicum* L.) – важная овощная культура, урожайность которой снижается при засолении почв. К генам, индуцируемым солевым стрессом, относятся гены транскрипционных факторов подсемейства DREB2 (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2). В настоящей работе проведена оценка генов *SlDREB2* томата как возможных генов-маркеров памяти о солевом стрессе. Для этого в листьях растений двух сортов, Гном и Отрадный, с разной степенью солеустойчивости была определена экспрессия генов *SlDREB16*, *20*, *22*, *24*, *43*, *44* и *46* в ответ на 24-ч воздействие NaCl и в динамике продолжительного (14 дней) послестрессового периода восстановления. Выявлены значительные генотип-специфичные колебания уровней транскриптов генов как в контроле, так и в подвергнутых стрессу растениях. Показано, что в процессе длительной фазы памяти экспрессия генов возвращается к контрольным показателям либо временно (*SlDREB24*, *44* и *46* у среднеустойчивого сорта Гном через 7 дней; через 14 дней экспрессия снова меняется), либо медленно (*SlDREB16* и *43* у высокоустойчивого сорта Отрадный через 14 дней восстановления). Было определено, что только два гена, *SlDREB22* и *46*, имеют сходный между сортами паттерн колебаний экспрессии в динамике стресса и восстановления, а ген *SlDREB20* не экспрессируется ни в контроле, ни в опыте. Полученные данные позволили предположить, что гены подсемейства *SlDREB2*, кроме *SlDREB20*, участвуют в ответе *S. lycopersicum* на солевой стресс генотип-специфичным образом и могут служить маркерами стрессовой памяти, сцепленными с эпигенетической регуляцией адаптации томата к солевому стрессу. Гены *SlDREB16*, *28*, *43* и *44* могут вносить вклад в определение различий в механизме регуляции ответа растений на солевой стресс между солеустойчивыми генотипами *S. lycopersicum*. Полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований роли генов *SlDREB2* в эпигенетической регуляции адаптации растений томата к солевому стрессу, что может быть использовано в селекции солеустойчивых сортов.

Ключевые слова: томат; *Solanum lycopersicum* L.; солевой стресс; стрессовая память; фаза памяти; транскрипционные факторы SlDREB2; экспрессия генов; гены-кандидаты стрессовой памяти

Для цитирования: Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Дифференциальный профиль экспрессии генов транскрипционных факторов подсемейства DREB2 в динамике солевого стресса и послестрессового восстановления растений томата. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1213-1220. doi 10.18699/vjgb-25-128

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РНФ № 24-16-00043 (анализ экспрессии генов) и Министерства науки и высшего образования РФ (подготовка растений).

Differential expression profile of DREB2 subfamily transcription factor genes in the dynamics of salt stress and post-stress recovery in tomato plants

M.A. Filyushin, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
michel7753@mail.ru

Abstract. In response to stress, epigenetic modifications occur in the plant genome, which together form a stress memory that can be inherited and increases the efficiency of the plant's defense response to repeated stress events. Genes whose expression becomes the target of epigenetic modifications serve as biomarkers of stress memory. Their characteristic features are considered to be an expression profile that differs between responses to primary and repeated stress events,

© Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

as well as long-term retention of changes after the stress is canceled. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important vegetable crop whose yield decreases with soil salinity. Genes induced by salt stress include genes encoding transcription factors of the DREB2 (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2) subfamily. In this work, we evaluated the *SlDREB2* genes of tomato as possible marker genes of salt stress memory. The expression of the genes *SlDREB16*, *20*, *22*, *24*, *43*, *44* and *46* was determined in the leaves of two plant varieties (Gnom, Otradnyi) with different degrees of salt tolerance in response to 24 h of NaCl exposure and in the dynamics of a long-term (14 days) post-stress recovery period. Significant genotype-specific fluctuations in the levels of gene transcripts were revealed both in the control and in the stressed plants. It was shown that during the long-term memory phase, gene expression returns to the control values either temporarily (*SlDREB24*, *44* and *46* in the moderately resistant Gnom variety after 7 days; after 14 days, the expression changed again) or slowly (*SlDREB16* and *43* in the highly resistant Otradnyi variety after 14 days of recovery). Only two genes (*SlDREB22* and *46*) showed a similar between varieties pattern of expression fluctuations in the dynamics of stress and recovery, and the *SlDREB20* gene was not expressed in either the control or the experiment. The data obtained suggest that the *SlDREB2* subfamily genes (except *SlDREB20*) are involved in the response of *S. lycopersicum* to salt stress in a genotype-specific manner and can serve as markers of stress memory linked to the epigenetic regulation of tomato adaptation to salt stress. The *SlDREB16*, *28*, *43* and *44* genes may contribute to the determination of differences in the mechanism of regulation of plant response to salt stress between salt-tolerant genotypes of *S. lycopersicum*. The obtained results can form the basis for further studies of the role of *SlDREB2* genes in the epigenetic regulation of tomato plant adaptation to salt stress, which can be used in breeding salt-tolerant varieties.

Key words: tomato; *Solanum lycopersicum* L.; salt stress; stress memory; memory phase; SlDREB2 transcription factors; gene expression; potential stress memory genes

For citation: Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential expression profile of DREB2 subfamily transcription factor genes in the dynamics of salt stress and post-stress recovery in tomato plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1213-1220. doi 10.18699/vjgb-25-128

Введение

Фенотип растения формируется при совместном действии генотипа и эпигенома, где последний определяет пластичность фенотипа в зависимости от условий окружающей среды, в том числе в ответ на воздействие различных стрессовых факторов, часто носящее возвратный характер (Villagómez-Aranda et al., 2022). Первичное, на протяжении жизненного цикла, переживание растением стресса (прайминг) индуцирует изменения в эпигеноме: метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов, активность некодирующих РНК и другие, которые позволяют более эффективно реагировать на повторный стресс (стимул) (Villagómez-Aranda et al., 2022).

Набор возникших при прайминге эпигенетических меток назван стрессовой памятью растения, которая может сохраняться в течение жизненного цикла организма и наследоваться (Villagómez-Aranda et al., 2022; Zuo et al., 2023). Таким образом, стрессовая память растения – запечатленный в эпигеноме первичный опыт эффективного регулирования стрессового ответа, который при повторном стрессовом событии способен быстро запустить необходимые для защиты транскриптомные и метаболомные изменения (Villagómez-Aranda et al., 2022; Zuo et al., 2023).

Биомаркерами стрессовой памяти принято считать отдельные гены (метаболиты), чья экспрессия (метаболизм) после прайминга стала мишенью эпигенетических модификаций (Aina et al., 2024). Таких маркеров может быть немало. К примеру, стрессовую память о засухе у модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. связывают более чем с 2000 генами (Ding et al., 2013), сравнение списка которых с аналогичным набором у *Zea mays* L. сократило перечень до 556 генов как возможных межвидовых маркеров памяти о засухе (Ding et al., 2014; Virlouvet et al., 2018; Jacques et al., 2021). При отборе кандидатов в маркеры памяти руководствуются тем, что уровень и/или направление изменения экспрессии генов (содержания метаболитов) различается между ответами на прайминг и стимул, тогда как гены (метаболиты), не связанные с памятью, одинаково реагируют на прайминг и стимул (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021). Еще один важный критерий: в период между повторами стресса (восстановление, или фаза памяти) экспрессия генов-маркеров (содержание метаболитов-маркеров) длительно поддерживается на измененном уровне, в то время как экспрессия генов (содержание метаболитов), не связанных с памятью, быстро возвращается к контрольным значениям (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021).

Как пример использования критериев можно привести метаболомный анализ реакции галофита *Limonium angustebracteatum* на повторы засухи и солевого стресса, который выявил в качестве потенциальных маркеров стрессовой памяти различные органические осмолиты и антиоксидантные соединения, включая флавоноиды (Calone et al., 2023). Транскриптомные исследования картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в условиях возврата засухи определили потенциальные гены памяти, в том числе гены, вовлеченные в фотосинтез, углеводный обмен, метаболизм флавоноидов и т. д. (Chen et al., 2019).

С учетом наблюдаемых ассоциаций различных значимых процессов со стрессовой памятью растений изучение стрессового влияния на экспрессию генов конкретных метаболических или сигнальных путей может способствовать конкретизации генов-маркеров. К примеру, анализ динамики экспрессии семейства генов халконсинтаз *AsCHS* (флавоноидный путь) у чеснока (*Allium sativum* L.) при воздействии абиотических факторов выделил только один из восьми генов как возможный биомаркер (Anisimova et al., 2025). Другой пример: отслеживание изменений экспрессии различных *PR*-генов в зубках чеснока в ответ на прайминг элиситором (хитозан) и биотический стимул (заражение *Fusarium proliferatum*) помогло определить гены-кандидаты для дальнейшей верификации в качестве

маркеров памяти устойчивости *A. sativum* к фузариозу (Filyushin et al., 2022).

Отобранные маркеры стрессовой памяти – как гены, так и метаболиты – могут быть использованы для выявления у сельскохозяйственных растений доноров искомого признака условной (эпигенетической) устойчивости к целевым типам стрессоров (Aina et al., 2024). В генной инженерии растений изменение экспрессии генов-маркеров может способствовать получению стрессоустойчивых генотипов. К примеру, сверхэкспрессия отдельных генов семейства *WRKY* повышает резистентность растений томата (*Solanum lycopersicum* L.) к фитопатогенам (Bai et al., 2018), а генов *DREB1A* и *OsPIL1* – устойчивость *A. thaliana* к засухе (Kudo et al., 2017).

Томат (*S. lycopersicum* L.) – важная овощная культура, преимущественно выращиваемая в защищенном грунте, вследствие чего одним из главных факторов снижения ее урожайности считается засоленность почв (Guo et al., 2022). Известны как эпигенетические метки, связанные с формированием памяти о солевом стрессе в растении (Gallusci et al., 2023), так и механизмы солеустойчивости томата (Guo et al., 2022). Среди генов, экспрессия которых индуцируется солевым стрессом, присутствуют гены, кодирующие транскрипционные факторы (ТФ) семейства DREB (суперсемейство APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF)), в частности подсемейства DREB2 (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2) (Bai et al., 2018; Guo et al., 2022). Геном томата содержит семь генов *SlDREB2* (Maqsood et al., 2022).

Целью нашей работы стала оценка генов *SlDREB2* как возможных генов-маркеров памяти о солевом стрессе путем профилирования экспрессии генов в растениях двух сортов *S. lycopersicum* в ответ на стимул NaCl и в динамике длительного восстановления после отмены стресса (фаза памяти).

Материалы и методы

Для исследования использовали растения двух солеустойчивых сортов томата (*S. lycopersicum*): высокоустойчивого сорта Отрадный и среднеустойчивого сорта Гном селекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО, Московская область). Семена высевали в грунт и растения выращивали до стадии формирования 6–8 листьев (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 23/21 °C).

Полученные растения подвергали воздействию солевого стресса. Для этого растения (опыт и контроль) помещали из почвы в воду, отряхнув и промыв предварительно корни, и спустя 1 ч переносили в жидкую питательную среду MS, содержащую (опыт) и не содержащую (контроль) 100 мМ NaCl. Спустя 24 ч опытные образцы возвращали в среду MS без NaCl и выдерживали две недели параллельно с контролем. Листовые пробы: все листья с одного растения; два биологических повтора – отбирали в следующих временных точках: S24 (опыт, 24 ч стрессового воздействия) и 24K (контроль); R7 и R7K (одна неделя послестрессового периода); R14 и R14K (две недели восстановления) (рис. 1, *а*).

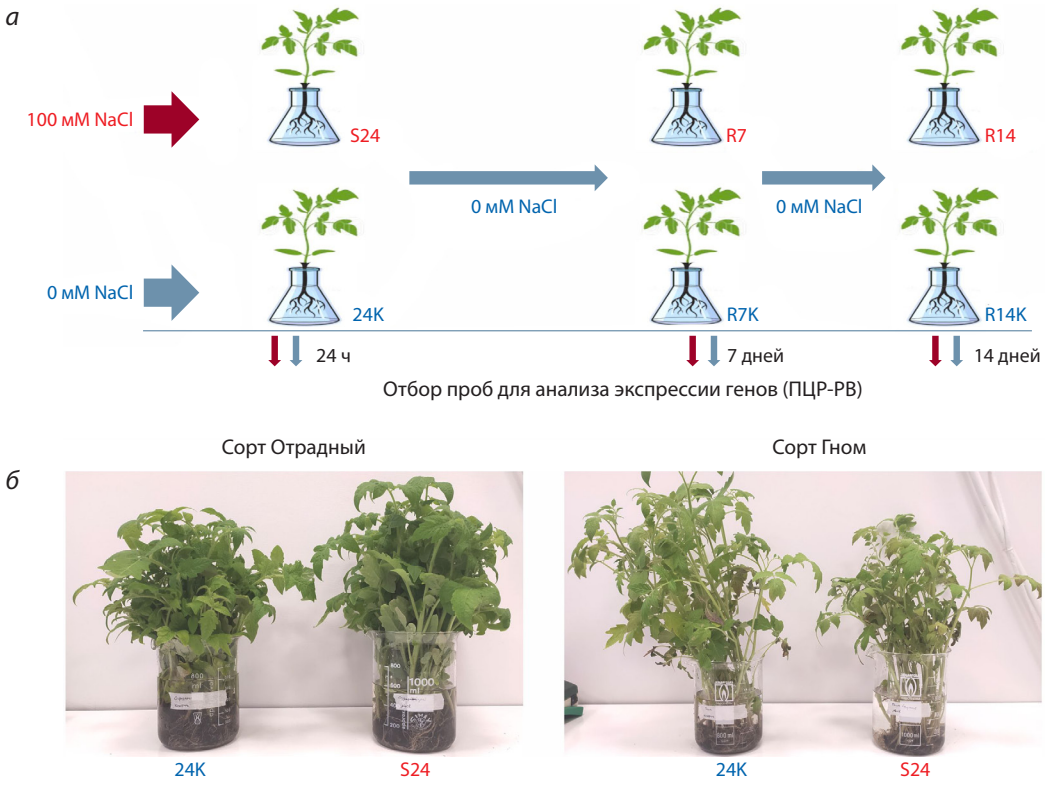


Рис. 1. Схема эксперимента:

а – солевой стресс 24 ч, 100 мМ NaCl (S24) и 0 мМ NaCl (24K), и послестрессовое восстановление, 7 (R7K, R7) и 14 (R14K, R14) дней; *б* – внешний вид опытных (S24) и контрольных (24K) образцов сортов томата Отрадный и Гном после 24 ч стресса.

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР-РВ

Ген[1]	Номер ID гена[1]	Последовательности (5′→3′) прямого и обратного праймеров
SlDREB16	Solyc04g050750	TGAGAGGTAAAGGTGGACCAG CTCTGGCTGCTTCCACTGAA
SlDREB20	Solyc04g080910 (LOC101246344)	GGTAAATGGGTAGCCGAGATC AGTTTGGCTTCGGCACCATAG
SlDREB22	Solyc05g052410 (LOC101261712)	GATACATTGGAAGGTCTGCAGC CATCCAACTCATCCAAGCAGAAG
SlDREB24	Solyc06g050520	GGTATCAGATTCGCAATGTCAGG GAATGCAAGGTCATCCGAACTG
SlDREB43	Solyc10g076370 (LOC101245410)	GGTACTTACTCGACTGCTGGT CAATCGACGATTGACCACTCG
SlDREB44	Solyc10g076380 (LOC101268444)	TCGCCTGCTTGTTCCTGGAA CGCACCAACATCTTCATTCACG
SlDREB46	Solyc10g080310 (LOC101268444)	CAATGTAGCCGTTCGTGGTG TGACTCTGTGAAACTACTGATGC
Expressed	(LOC101263039)	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG TGGGTGTGCCTTTCTGAATG
actin-7	(LOC101262163)	CATTGTGCTCAGTGGTGGTTC TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG

[1] Нумерация и Solyc_ID генов приведены в соответствии с работой (Maqsood et al., 2022); в скобках дан соответствующий NCBI_ID генов (при наличии гомологов).

Собранные пробы растирали в жидком азоте и использовали для анализа экспрессии генов ТФ подсемейства SlDREB2 с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Из 0.2–0.5 г измельченной ткани выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase-free DNase set; QIAGEN, Германия) и использовали для синтеза кДНК (GoScript Reverse Transcription System; Promega, США). Определяли концентрацию препарата (Qubit® Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, США; Qubit RNA HS Assay Kit, Invitrogen, США) и 3 нг кДНК использовали для ПЦР-РВ с ген-специфичными праймерами (табл. 1). Праймеры разрабатывали на основе доступных данных генома и транскриптома *S. lycopersicum* (https://www.solgenomics.net/; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Реакцию проводили с набором «2.5× Реакционная смесь для проведения ПЦР−РВ в присутствии SYBR Green I и ROX» (ООО «Синтол», Россия) на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Программа ПЦР-РВ: 5 мин при 95 °C, 40 циклов (15 с при 95 °C; 40 с при 60 °C). Экспрессию генов *SlDREB2* нормализовали на референсные гены *Expressed* и *actin-7* (Efremov et al., 2020). Анализ проводили в двух биологических и трех аналитических повторах. Полученные данные статистически обрабатывали и визуализировали с помощью GraphPad Prism v. 9.5.1 (Two-Way ANOVA: multiple comparisons corrected with Bonferroni test; GraphPad Software Inc., США; https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/). Для построения тепловой карты и линейных диаграмм по экспрессионным данным использовали программу Excel.

Результаты

В нашей работе охарактеризовано воздействие солевого стресса и длительного послестрессового восстановления на экспрессию генов *SlDREB2* в листьях растений томата высоко (сорт Отрадный) и средне (сорт Гном) устойчивых к засолению образцов. Спустя 24 ч воздействия NaCl, а также 7 и 14 дней послестрессового периода растения обоих сортов визуально не отличались от контрольных, не подвергшихся стрессу образцов (см. рис. 1, *б*).

Листья растений (контроль и опыт) в точках S24/24K, R7/R7K и R14/R14K были собраны и использованы для анализа экспрессии генов *SlDREB2*, гомологи которых у других видов растений известны своим участием в ответе на осмотические стрессы (Akbudak et al., 2018; Guo et al., 2022; Filyushin et al., 2023; Sun et al., 2025). Гены для анализа были определены на основании опубликованной характеристики генов семейства *DREB S. lycopersicum*, в котором подсемейство *SlDREB2* представлено семью безынтронными генами *SlDREB16*, *20*, *22*, *24*, *43*, *44* и *46* (Maqsood et al., 2022). Проведенный анализ ПЦР-РВ показал, что ген *SlDREB20* не экспрессируется в листьях ни в опыте, ни в контроле, тогда как профиль экспрессии остальных шести генов носит генотип-зависимый характер (рис. 2).

Сорта различались по экспрессии генов в контроле как уровнем в исходной точке 24K (*SlDREB16*, *24*, *43* и *44*), так и тенденцией колебаний на протяжении периода измерений (*SlDREB16*, *44* и *46*). Только ген *SlDREB22* показал сходный профиль экспрессии в контроле между сортами (см. рис. 2). На основе экспрессионных данных построена тепловая карта (рис. 3), из которой очевидно, что в случае высокоустойчивого сорта Отрадный только три гена, *SlDREB22*, *24* и *44*, сохранили контрольные показатели экспрессии после 24 ч стресса. Однако уровень их транскриптов повысился спустя одну (в ~1.7, 8.2 и 2.4 раза) и две (в ~5.7, 3.4 и 1.4 раза) недели периода восстановления. Экспрессия оставшихся трех генов снизилась (*SlDREB16* и *46*) или повысилась (*SlDREB43*) после 24 ч стресса и значительно выросла в точке R7. Спустя две недели восстановления только два гена (*SlDREB16* и *43*) экспрессировались сходно с контролем (см. рис. 3).

В листьях среднеустойчивого сорта Гном после 24 ч стресса экспрессия генов повысилась (*SlDREB43* и *44*), понизилась (*SlDREB22* и *46*) или не изменилась (*SlDREB16* и *24*). Спустя неделю восстановления (R7) изменения экспрессии наблюдали у трех генов (*SlDREB16*, *22* и *43*), тогда как спустя две недели (R14) все шесть генов экспрессировались отлично от контроля (см. рис. 3).

Таким образом, спустя длительный срок после отмены стресса возвращение экспрессии к контрольному уровню наблюдалось только для генов *SlDREB24*, *44* и *46* у сорта Гном (R7), которые в точке R14 снова показали измененные (*vs* контроль) значения экспрессии, а также для генов *SlDREB16* и *43* у сорта Отрадный в точке R14 (см. рис. 3).

Для более наглядного межсортового сравнения профилей экспрессии генов *SlDREB2* были построены линейные диаграммы по экспрессионным данным, выраженным как соотношение уровней экспрессии генов между опытом и контролем (рис. 4). Из графиков видно, что два гена, *SlDREB22* и *46*, имеют сходный паттерн ответа на соле-

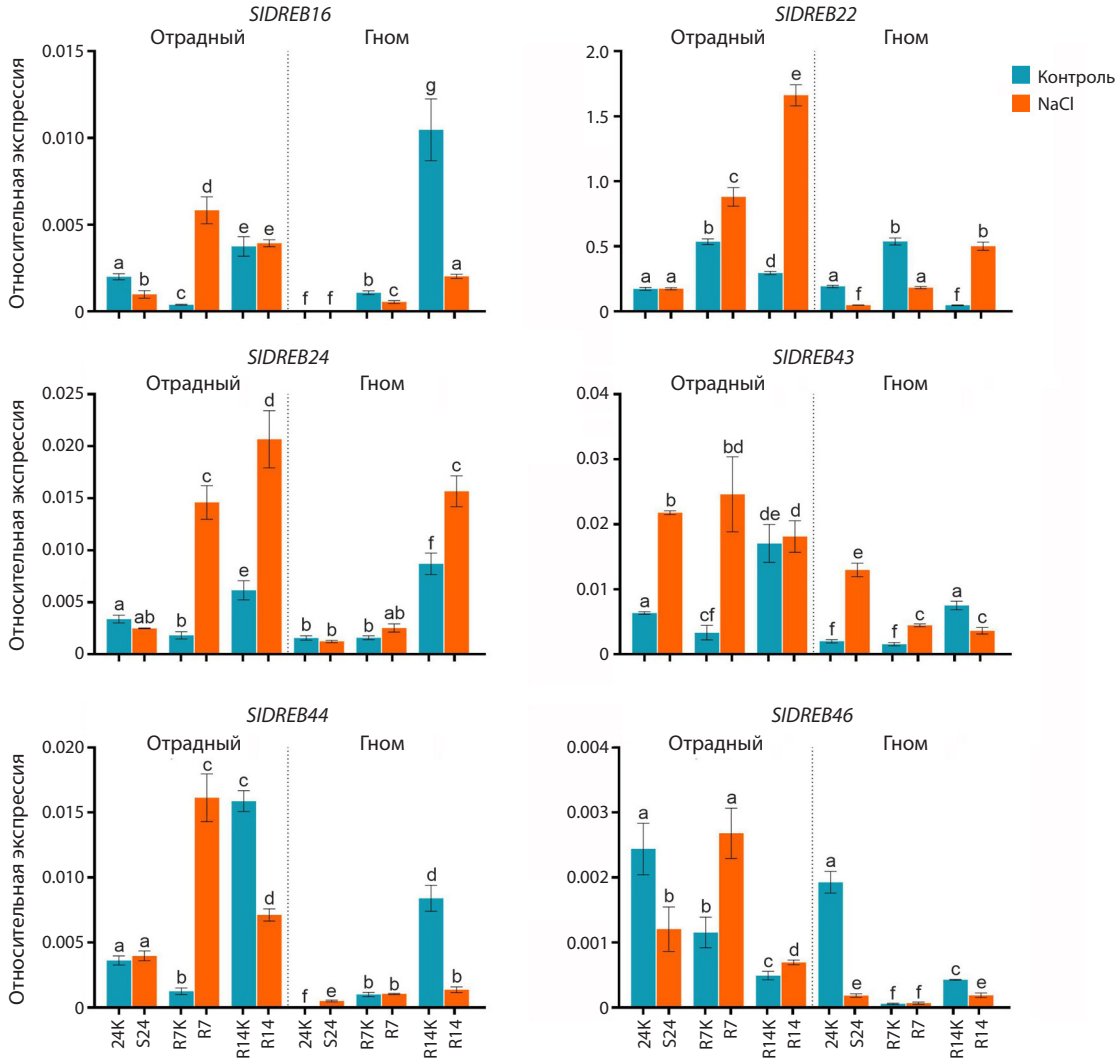


Рис. 2. Профили экспрессии генов *SlDREB2* в листьях растений томата сортов Отрадный и Гном в ответ на солевой стресс в течение 24 ч (24K и S24) и в динамике послестрессового восстановления спустя 7 (R7K и R7) и 14 (R14K и R14) дней. [a–g] Значимые различия между уровнями экспрессии внутри сорта ($p < 0.05$).

вой стресс и фазу памяти между сортами. Другие четыре гена, *SlDREB16*, *28*, *43* и *44*, показывают различающуюся между сортами модель реакции на стресс и длительное восстановление (см. рис. 4).

Для предварительной оценки возможности зависимости экспрессии генов *SlDREB16*, *20*, *22*, *24*, *43*, *44* и *46* от вариабельности их регуляторных областей у сортов томата был проведен анализ *in silico* промоторов (1000 пн) этих генов у 10 образцов томата; последовательности взяты из базы данных NCBI. Было показано, что у *SlDREB16*, *22*, *24*, *43* и *44* промоторы высококонсервативны (0–2 полиморфизма (SNP) на 1000 пн), а промоторы генов *SlDREB20* и *46* содержат индели/SNP (5/58 и 5/13 соответственно).

0.49*	15.35*	1.07	1.00	0.51*	0.20*	*SlDREB16*
1.01	1.65*	5.65*	0.25*	0.34*	10.66*	*SlDREB22*
0.74	8.22*	3.41*	0.80	1.60	1.82*	*SlDREB24*
3.43*	7.88*	1.08	6.54*	2.90*	0.48*	*SlDREB43*
1.10	13.27*	0.45*	25.42*	1.07	0.16*	*SlDREB44*
0.50*	2.39*	1.43*	0.10*	1.22	0.44*	*SlDREB46*
24 ч NaCl	7 д Восст.	14 д Восст.	24 ч NaCl	7 д Восст.	14 д Восст.	
Отрадный			Гном			

Рис. 3. Тепловая карта экспрессии генов *SlDREB2* в листьях растений томата сортов Отрадный и Гном в ответ на солевой стресс в течение 24 ч и в динамике послестрессового восстановления спустя 7 и 14 дней. Числовые данные представлены соотношением значений по опытным образцам с контролем, принятым за единицу. * Значимые различия уровня экспрессии между опытом и контролем ($p < 0.05$).

Обсуждение

В настоящей работе проведена оценка генов подсемейства *SlDREB2* томата как возможных генов-маркеров памяти о солевом стрессе путем профилирования экспрессии генов в растениях двух сортов *S. lycopersicum* в ответ на прайминг NaCl и в динамике длительного восстановления после отмены стресса (фаза памяти). Использованные сорта различались степенью устойчивости к солевому стрессу (средняя у сорта Гном и высокая у сорта Отрадный). Устойчивость сортов может регулироваться как на уровне генетических вариаций, управляющих экспрессией генов в ответ на солевой стресс, так и на уровне

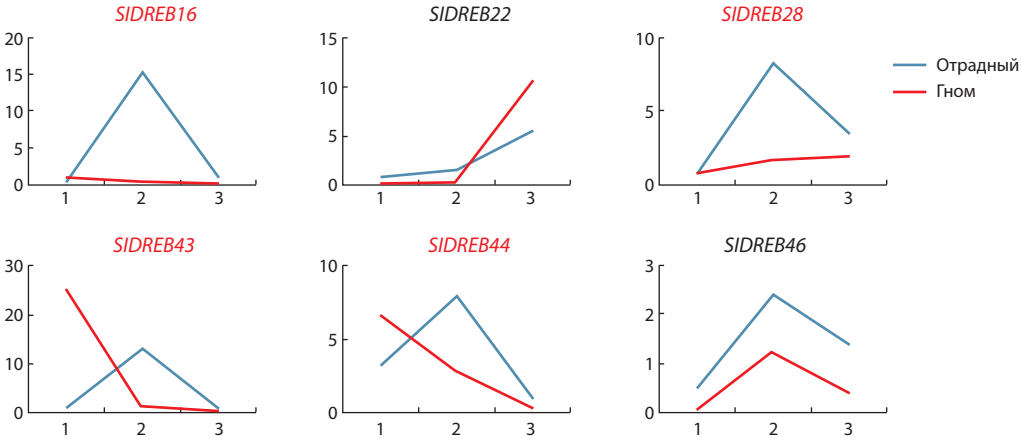


Рис. 4. Профили экспрессии генов *SlDREB2* в листьях растений томата сортов Отрадный и Гном в ответ на солевой стресс в течение 24 ч и в динамике послестрессового восстановления спустя 7 и 14 дней, представленные в виде линейных графиков. Красным выделены названия генов, профиль экспрессии которых имеет значительные межсортовые различия по направлению колебаний.

условно наследуемых эпигенетических модификаций, некогда полученных как результат солевого прайминга и поддерживаемых стрессовой памятью.

В первом случае генетические вариации могут быть представлены какими-либо генами и локусами, ассоциированными с признаком солеустойчивости (Ismail, Horie, 2017). От различий в генах/локусах может зависеть степень адаптивности, как это продемонстрировано на примере генотипов томата, несущих мутантные локусы *TSS1* и *TSS2*, которые обеспечивают контрастную чувствительность к общему осмотическому стрессу и разные механизмы солеустойчивости (Borsani et al., 2001). При варианте генетического регулирования устойчивости к NaCl наш эксперимент можно считать первичным стрессом для растений. Во втором случае с учетом предполагаемого наличия памяти о солевом стрессе проводимое нами воздействие будет играть роль стимула для проявления памяти. Третий возможный вариант включает генетическую регуляцию солеустойчивости у одного сорта и эпигенетическую у другого.

Различные транскриптомные исследования воздействия NaCl на растение предполагают, что ключевые гены памяти о солевом стрессе представлены генами ТФ различных семейств (Zhu et al., 2023), включая семейство DREB (Hassan et al., 2022). Важность последних подчеркивается дифференциальной экспрессией генов *DREB* в ответ на засоление у растений пшеницы *Triticum aestivum* L. (Hassan et al., 2022), перца *Capsicum annuum* L. (Sun et al., 2025), чеснока *A. sativum* (Filyushin et al., 2023) и других видов.

Выбор нами для анализа генов подсемейства DREB2 обусловлен тем, что из двух наиболее крупных DREB-подсемейств DREB1/CBF-белки наиболее важны в регуляции холодостойкости (Shi et al., 2018), тогда как в ответе на осмотические стрессы в основном участвуют DREB2-ТФ (Akbudak et al., 2018; Baillo et al., 2019). В геноме томата подсемейство *DREB2* состоит из семи генов *SlDREB16*, *20*, *22*, *24*, *43*, *44* и *46* (Maqsood et al., 2022) (см. табл. 1).

В ходе эксперимента для растений томата двух сортов была проведена симуляция солевого стресса с последующей его отменой и длительной (14 дней) фазой памяти (см. рис. 1). Проведенное затем профилирование экспрессии генов в динамике опыта (S24/24K–R7/R7K–R14/R14K) выявило значительные генотип-специфичные колебания уровней транскриптов как в контроле, так и в подвергнутых стрессу растениях (см. рис. 2), что подчеркивает различия между сортами в механизме регуляции солеустойчивости.

Было определено, что в процессе длительного восстановления после отмены стресса значения экспрессии генов возвращаются к контрольным показателям или временно (*SlDREB24*, *44* и *46* у сорта Гном в точке R7; в точке R14 снова меняются), или крайне медленно (*SlDREB16* и *43* у сорта Отрадный в точке R14) (см. рис. 3). Такая реакция генов в случае обоих сортов соответствует признаку генов-маркеров стрессовой памяти, экспрессия которых в фазу восстановления длительно поддерживается на измененном уровне, в то время как экспрессия генов, не связанных с памятью, быстро возвращается к контрольным значениям (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021). Это предполагает, что шесть генов, *SlDREB16*, *22*, *24*, *43*, *44* и *46*, могут функционировать как гены-маркеры памяти о солевом стрессе в растениях томата.

Было показано, что только два гена, *SlDREB22* и *46*, имеют сходный между сортами паттерн колебаний экспрессии в период измерений (S24/24K–R7/R7K–R14/R14K) (см. рис. 4). Это допускает для остальных четырех генов, *SlDREB16*, *28*, *43* и *44*, роль в определении различий в механизме регуляции ответа растений на солевой стресс между солеустойчивыми генотипами *S. lycopersicum*.

В целом проведенная оценка профиля экспрессии генов подсемейства *SlDREB2* в листьях растений двух солеустойчивых сортов томата в ответ на воздействие NaCl и при длительной фазе памяти позволила предположить, что гены *SlDREB2*, за исключением *SlDREB20*, участвуют в ответе *S. lycopersicum* на избыток соли генотип-специфичным образом. Потенциально эти гены могут служить маркерами стрессовой памяти, сцепленными с эпигенетической регуляцией адаптации к солевому стрессу.

Таблица 2. Список предположительных генов-мишеней ТФ семейства DREB *A. thaliana*

Ген	NCBI_ID (*A. thaliana*/ *S. lycopersicum*)	Белок	Участие в стрессовых ответах, согласно NCBI
COR15A	At2g42540	Cold-inducible protein	Холод, повышенная температура, засоление, засуха
FL05-21-F13 (*LEA14*)	At1g16850	Late embryogenesis abundant protein	Засоление
RD29A	At5g52310	Drought-responsive protein, low-temperature-responsive protein 78 (LTI78) / desiccation-responsive protein 29A	Холод, засоление, засуха
RD17 (*COR47*)	At1g20440	Dehydrin, COR47 cold-regulated 47	Холод, повышенная температура, осмотический стресс, засуха
AtGOLS3	At1g09350	Glycosyl transferase family 8, GolS3 galactinol synthase 3	Холод
FL05-20-N18 (*COR15B*)	At2g42530	COR15B cold regulated 15b	Холод
KIN1	At5g15960	Cold-inducible protein	Холод, осмотический стресс, засуха
FL06-16-B22 (*COR413-PM1*)	At2g15970	Cold-acclimation protein, COR413-PM1 cold regulated 413 plasma membrane 1	Холод, засуха
KIN2 (*COR6.6*)	At5g15970	KIN2 stress-responsive protein (KIN2) / stress-induced protein (KIN2) / cold-responsive protein (COR6.6) / cold-regulated protein (COR6.6)	Холод, осмотический стресс, засуха
ERD10	At1g20450	ERD10 Dehydrin family protein	Холод, засуха

Также возможна зависимость реакции генов *SlDREB2* на солевой стресс от генетических вариаций у образцов *S. lycopersicum* в промоторных областях как самих генов подсемейства *SlDREB2*, так и у возможных мишеней ТФ SlDREB2.

Обнаруженная нами (с помощью анализа *in silico* промоторов анализируемых генов на примере 10 сортов/образцов томата) инвариабельность регуляторных последовательностей генов *SlDREB16*, *22*, *24*, *43* и *44* допускает, что консервативность промоторов может распространяться и на сорта, использованные в нашей работе. Это предполагает отсутствие зависимости реакции *SlDREB16*, *22*, *24*, *43* и *44* на солевой стресс от межсортовых вариаций их регуляторных последовательностей. Ген *SlDREB20*, промотор которого между образцами наиболее вариабелен (58 SNP), в листьях не экспрессируется, поэтому вопрос о рассматриваемой зависимости в работе не ставится. В то же время уровень экспрессии *SlDREB46* может регулироваться полиморфизмами (13 SNP), что требует дополнительных исследований промотора *SlDREB46* у образцов томата, использованных в работе, с поиском корреляций между экспрессией и найденными SNP.

Уровень экспрессии некоторых генов подсемейства *DREB2* положительно связывают с устойчивостью растений к различным абиотическим стрессам, что показано на примере растений *A. thaliana* со сверхэкспрессией гена *OsDREB2B* риса (*Oryza sativa* L.) и повышенной устойчивостью к засухе и жаре (Matsukura et al., 2010). Предполагается, что в ответ на абиотический стресс изменяется экспрессия ТФ подсемейства DREB1/2, которые, в свою очередь, регулируют транскрипцию генов-мишеней, принимающих участие в защите растения. На сегодняшний день имеются данные о 10 возможных генах-мишенях ТФ DREB1/2 (*A. thaliana*), содержащих в промоторах цис-регуляторные элементы DRE/DRE-related, и шесть из 10 генов могут участвовать в ответе растения на солевой стресс (табл. 2) (Dubouzet et al., 2003; Matsukura et al., 2010).

Заключение

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования структуры и экспрессии генов *SlDREB2* и их возможных мишеней с использованием многократных повторений стрессовых событий, перемежающихся фазами памяти разной длительности, в сопровождении анализа экспрессии генов, предположительно не сцепленных с памятью о стрессе. Результаты таких исследований можно будет использовать в селекции солеустойчивых сортов томата.

Список литературы / References

Aina O., Bakare O.O., Fadaka A.O., Keyster M., Klein A. Plant biomarkers as early detection tools in stress management in food crops: A review. *Planta*. 2024;259(3):60. doi 10.1007/s00425-024-04333-1

Akbudak M.A., Filiz E., Kontbay K. *DREB2* (dehydration-responsive element-binding protein 2) type transcription factor in sorghum (*Sorghum bicolor*): genome-wide identification, characterization and expression profiles under cadmium and salt stresses. *3 Biotech*. 2018;8(10):426. doi 10.1007/s13205-018-1454-1

Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A. Identification of chalcone synthase genes from garlic (*Allium sativum* L.) and their expression levels in response to stress factors. *Acta Nat.* 2025;17(2):4-14. doi 10.32607/actanaturae.27639

Bai Y., Sunarti S., Kissoudis C., Visser R.G.F., van der Linden C.G. The role of tomato *WRKY* genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses. *Front Plant Sci.* 2018;9:801. doi 10.3389/fpls.2018.00801

Baillo E.H., Kimotho R.N., Zhang Z., Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes* (*Basel*). 2019;10(10):771. doi 10.3390/genes10100771

Bäurle I., Trindade I. Chromatin regulation of somatic abiotic stress memory. *J Exp Bot*. 2020;71(17):5269-5279. doi 10.1093/jxb/eraa098

Borsani O., Cuartero J., Fernández J.A., Valpuesta V., Botella M.A. Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *Plant Cell*. 2001;13(4):873-887. doi 10.1105/tpc.13.4.873

Calone R., Mircea D.M., González-Orenga S., Boscaiu M., Zuzunaga-Rosas J., Barbanti L., Vicente O. Effect of recurrent salt and drought stress treatments on the endangered halophyte *Limonium angustebracteatum* Erben. *Plants* (*Basel*). 2023;12(1):191. doi 10.3390/plants12010191

Chen Y., Li C., Yi J., Yang Y., Lei C., Gong M. Transcriptome response to drought, rehydration and re-dehydration in potato. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):159. doi 10.3390/ijms21010159

Ding Y., Liu N., Virlouvet L., Riethoven J.J., Fromm M., Avramova Z. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 2013;13:229. doi 10.1186/1471-2229-13-229

Ding Y., Virlouvet L., Liu N., Riethoven J.J., Fromm M., Avramova Z. Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 2014;14:141. doi 10.1186/1471-2229-14-141

Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 2003;33(4):751-763. doi 10.1046/j.1365-313x.2003.01661.x

Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section Lycopersicon). *Plants* (*Basel*). 2020;9(9):1169 doi 10.3390/plants9091169

Filyushin M.A., Shagdarova B.T., Shchennikova A.V., Il'ina A.V., Kochieva E.Z., Varlamov V.P. Pretreatment with chitosan prevents *Fusarium* infection and induces the expression of chitinases and β-1,3-glucanases in garlic (*Allium sativum* L.). *Horticulturae.* 2022;8(5):383. doi 10.3390/horticulturae8050383

Filyushin M.A., Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. *DREB1* and *DREB2* genes in garlic (*Allium sativum* L.): Genome-wide identification, characterization, and stress response. *Plants* (*Basel*). 2023;12(13):2538. doi 10.3390/plants12132538

Friedrich T., Faivre L., Bäurle I., Schubert D. Chromatin-based mechanisms of temperature memory in plants. *Plant Cell Environ.* 2019;42(3):762-770. doi 10.1111/pce.13373

Gallusci P., Agius D.R., Moschou P.N., Dobránszki J., Kaiserli E., Martinelli F. Deep inside the epigenetic memories of stressed plants. *Trends Plant Sci.* 2023;28(2):142-153. doi 10.1016/j.tplants.2022.09.004

Guo M., Wang X.S., Guo H.D., Bai S.Y., Khan A., Wang X.M., Gao Y.M., Li J.S. Tomato salt tolerance mechanisms and their potential applications for fighting salinity: A review. *Front Plant Sci.* 2022;13:949541. doi 10.3389/fpls.2022.949541

Hassan S., Berk K., Aronsson H. Evolution and identification of DREB transcription factors in the wheat genome: modeling, docking and simulation of DREB proteins associated with salt stress. *J Biomol Struct Dyn.* 2022;40(16):7191-7204. doi 10.1080/07391102.2021.1894980

Ismail A.M., Horie T. Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance. *Annu Rev Plant Biol.* 2017;68:405-434. doi 10.1146/annurev-arplant-042916-040936

Jacques C., Salon C., Barnard R.L., Vernoud V., Prudent M. Drought stress memory at the plant cycle level: A review. *Plants* (*Basel*). 2021;10(9):1873. doi 10.3390/plants10091873

Kudo M., Kidokoro S., Yoshida T., Mizoi J., Todaka D., Fernie A.R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. *Plant Biotechnol J.* 2017;15(4):458-471. doi 10.1111/pbi.12644

Maqsood H., Munir F., Amir R., Gul A. Genome-wide identification, comprehensive characterization of transcription factors, cis-regulatory elements, protein homology, and protein interaction network of *DREB* gene family in *Solanum lycopersicum*. *Front Plant Sci*. 2022;13:1031679. doi 10.3389/fpls.2022.1031679

Matsukura S., Mizoi J., Yoshida T., Todaka D., Ito Y., Maruyama K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics.* 2010;283(2):185-196. doi 10.1007/s00438-009-0506-y

Shi Y., Ding Y., Yang S. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation. *Trends Plant Sci.* 2018;23(7):623-637. doi 10.1016/j.tplants.2018.04.002

Sun N., Sun X., Zhou J., Zhou X., Gao Z., Zhu X., Xu X., Liu Y., Li D., Zhan R., Wang L., Zhang H. Genome-wide characterization of pepper DREB family members and biological function of *CaDREB32* in response to salt and osmotic stresses. *Plant Physiol Biochem*. 2025;222:109736. doi 10.1016/j.plaphy.2025.109736

Villagómez-Aranda A.L., Feregrino-Pérez A.A., García-Ortega L.F., González-Chavira M.M., Torres-Pacheco I., Guevara-González R.G. Activating stress memory: eustressors as potential tools for plant breeding. *Plant Cell Rep*. 2022;41(7):1481-1498. doi 10.1007/s00299-022-02858-x

Virlouvet L., Avenson T.J., Du Q., Zhang C., Liu N., Fromm M., Avramova Z., Russo S.E. Dehydration stress memory: gene networks linked to physiological responses during repeated stresses of *Zea mays*. *Front Plant Sci.* 2018;9:1058. doi 10.3389/fpls.2018.01058

Zhu Z., Dai Y., Yu G., Zhang X., Chen Q., Kou X., Mehareb E.M., Raza G., Zhang B., Wang B., Wang K., Han J. Dynamic physiological and transcriptomic changes reveal memory effects of salt stress in maize. *BMC Genomics*. 2023;24(1):726. doi 10.1186/s12864-023-09845-w

Zuo D.D., Ahammed G.J., Guo D.L. Plant transcriptional memory and associated mechanism of abiotic stress tolerance. *Plant Physiol Biochem*. 2023;201:107917. doi 10.1016/j.plaphy.2023.107917

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.07.2025. После доработки 19.09.2025. Принята к публикации 19.09.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1221-1234

doi 10.18699/vjgb-25-129

SmartCrop: база знаний молекулярно-генетических механизмов адаптации риса и пшеницы к стрессовым факторам

П.С. Деменков [1], Т.В. Иванисенко [1], М.А. Клещев [1], Е.А. Антропова [1], И.В. Яцык [1], А.Р. Волянская [1], А.В. Адамовская [1], А.В. Мальцева [1], А.С. Вензель [1], Х. Чао [2], М. Чен [2], В.А. Иванисенко [1] ✉

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Факультет биоинформатики, Колледж естественных наук, Чжэцзянский университет, Ханчжоу, Китай
✉ salix@bionet.nsc.ru

Аннотация. Изучение молекулярно-генетических механизмов реакций растений на специфические условия роста и стрессовые факторы – одно из приоритетных направлений исследований, нацеленных на создание новых сортов сельскохозяйственных культур, в частности риса и пшеницы. К числу таких факторов относятся абиотические стрессы (высокие или низкие температуры, засуха, засоление, загрязнение почвы металлами), биотические стрессы (патогены, вредители), а также реакции растений на регуляторные факторы (удобрения, гормоны, элиситоры и другие соединения). Современные исследования в области генетики растений основаны на понимании того, что формирование любых фенотипических характеристик (молекулярно-генетических, биохимических, физиологических, морфологических и др.) контролируется генными сетями – группами согласованно функционирующих генов, взаимодействующих через свои продукты (РНК, белки и метаболиты). Ранее с целью реконструкции генных сетей, значимых для биологии и биомедицины, нами была разработана интеллектуальная компьютерная система ANDSystem, предназначенная для автоматизированного извлечения знаний из текстов научных публикаций и баз данных. В настоящей работе, используя адаптированную версию ANDSystem для растений, мы создали базу знаний SmartCrop для решения задач, связанных с изучением молекулярно-генетических механизмов взаимодействий «генотип–фенотип–среда» для сельскохозяйственно ценных культур риса и пшеницы. SmartCrop предназначена для помощи исследователям в решении таких задач, как интерпретация результатов омиксных экспериментов на растениях: установление связей между наборами генов и биологическими процессами, фенотипическими признаками и др.; реконструкция генных сетей, описывающих отношения между молекулярно-генетическими объектами и понятиями в селекции, феномике, семеноводстве, фитопатологии; выявление регуляторных и сигнальных путей, ответных реакций растений на специфические условия роста и биотические и абиотические стрессы; прогнозирование генов-кандидатов для генотипирования; поиск маркеров для маркер-опосредованной селекции; выявление потенциальных мишеней (генов и белков) для субстанций, влияющих на растения (контролирующих процессы прорастания семян, вегетативного роста, эффективного поглощения питательных веществ и улучшения устойчивости к стрессовым факторам).

Ключевые слова: база знаний SmartCrop; ANDSystem; извлечение знаний из текстов; искусственный интеллект; молекулярно-генетические механизмы; рис; пшеница; ассоциативные генные сети; абиотические стрессы; биотические стрессы; взаимодействия генотип–фенотип–среда; омиксные технологии; длинные некодирующие РНК; маркер-опосредованная селекция; адаптация растений; стрессоустойчивость

Для цитирования: Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Клещев М.А., Антропова Е.А., Яцык И.В., Волянская А.Р., Адамовская А.В., Мальцева А.В., Вензель А.С., Чао Х., Чен М., Иванисенко В.А. SmartCrop: база знаний молекулярно-генетических механизмов адаптации риса и пшеницы к стрессовым факторам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1221-1234. doi 10.18699/vjgb-25-129

Финансирование. Работа ПСД, ТВИ, МАК, ЕАА, ИВЯ, АРВ, АВА, АВМ, АСВ и ВАИ поддержана российско-китайским грантом Российского научного фонда № 23-44-00030. Работа МЧ (MCh) и ХЧ (HCh) поддержана Национальным фондом естественных наук Китая (№ 32261133526).

SmartCrop: knowledge base of molecular genetic mechanisms of rice and wheat adaptation to stress factors

P.S. Demenkov [1], T.V. Ivanisenko [1], M.A. Kleshchev [1], E.A. Antropova [1], I.V. Yatsyk [1], A.R. Volyanskaya [1], A.V. Adamovskaya [1], A.V. Maltseva [1], A.S. Venzel [1], H. Chao [2], M. Chen, V.A. Ivanisenko [1] ✉

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Department of Bioinformatics, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, China
✉ salix@bionet.nsc.ru

© Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Клещев М.А., Антропова Е.А., Яцык И.В., Волянская А.Р., Адамовская А.В., Мальцева А.В., Вензель А.С., Чао Х., Чен М., Иванисенко В.А., 2025

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. The study of molecular genetic mechanisms of plant responses to specific growth conditions and stress factors is a central focus of scientific research aimed at developing new valuable crop varieties, particularly rice and wheat. These factors include abiotic stresses (high or low temperatures, drought, salinity, soil metal contamination), biotic stresses (pathogens, pests), as well as plant responses to regulatory factors (fertilizers, hormones, elicitors, and other compounds). Modern research in plant genetics is based on the understanding that the formation of any phenotypic characteristics (molecular genetic, biochemical, physiological, morphological, etc.) is controlled by gene networks – groups of coordinately functioning genes interacting through their products (RNA, proteins, and metabolites). Previously, we developed the ANDSystem intelligent technology designed to extract knowledge from scientific publication texts for the reconstruction of gene networks in biology and biomedicine. In this work, using an adapted version of ANDSystem for plants, we created the SmartCrop knowledge base designed to address challenges related to studying molecular genetic mechanisms of genotype-phenotype-environment interactions for agriculturally valuable rice and wheat crops. SmartCrop is designed to assist researchers in solving tasks such as interpreting omics technology results (establishing connections between gene sets and biological processes, phenotypic traits, etc.); reconstructing gene networks describing relationships between molecular genetic objects and concepts in breeding, phenomics, seed production, phytopathology, diagnostics, protective agents, etc.; identifying regulatory and signaling pathways of plant responses to specific growth conditions and biotic and abiotic stresses; predicting candidate genes for genotyping; searching for markers for marker-assisted selection; and identifying potential targets for substances (including external factors) affecting plants to ensure timely and uniform germination, better vegetative growth, efficient nutrient uptake, and improved stress resistance.

Key words: SmartCrop knowledge base; ANDSystem; text mining; artificial intelligent; molecular genetic mechanisms; rice; wheat; associative gene networks; abiotic stress; biotic stress; genotype–phenotype–environment interactions; omics technologies; long non-coding RNAs; marker-assisted selection; plant adaptation; stress resistance

For citation: Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kleshchev M.A., Antropova E.A., Yatsyk I.V., Volyanskaya A.R., Adamovskaya A.V., Maltseva A.V., Venzel A.S., Chao H., Chen M., Ivanisenko V.A. SmartCrop: knowledge base of molecular genetic mechanisms of rice and wheat adaptation to stress factors. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1221-1234. doi 10.18699/vjgb-25-129

Введение

Рис (*Oryza sativa* L.) и пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшие сельскохозяйственные культуры, обеспечивающие продовольственную безопасность значительной части мирового населения. Обе культуры известны своей высокой питательной, технической и кормовой ценностью (Shewry, Hey, 2015). В современных условиях производство этих культур сталкивается с серьезными вызовами. Экстремальные погодные явления, неблагоприятные климатические изменения, болезни растений и вредители приводят к значительным потерям урожая (Lesk et al., 2016). Преодоление указанных трудностей невозможно без изучения молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам, что требует анализа комплексных систем, включающих сложные сигнальные, регуляторные, транспортные и метаболические пути (Mittler, 2006; Nykiel et al., 2023).

Эффективным инструментом для изучения таких механизмов являются генные сети, контролирующие молекулярно-генетические процессы, определяющие формирование фенотипических признаков и функционирование биологических процессов, в том числе ответные реакции растений на стресс.

Современная концепция генных сетей охватывает не только молекулярные компоненты (РНК, гены, белки и метаболиты), но и широкий спектр сущностей различной природы, включая заболевания, биологические процессы и факторы окружающей среды. Такой тип генных сетей получил название ассоциативных генных сетей (Ivanisenko V. et al., 2015). По своей структуре они представляют собой граф знаний, интегрирующий информацию о взаимодействиях между разнородными объектами, участвующими в функционировании молекулярно-генетических систем или влияющими на них. В агробиологии и растениеводстве анализ генных сетей успешно применяется для исследования таких экономически ценных признаков, как устойчивость к болезням и вредителям, толерантность к абиотическим факторам и урожайность (Virlouvet et al., 2018; Chen et al., 2020).

Реконструкция генных сетей растений представляет собой сложную задачу, требующую обработки огромных массивов данных и интеграции разрозненной информации из научных публикаций, включая данные о регуляторных, транспортных и каталитических процессах, а также о связях между генетическими особенностями, фенотипическими проявлениями и факторами окружающей среды. Для извлечения таких знаний используют методы автоматического анализа текстов (text-mining), основанные как на классических компьютерных подходах (на основе словарей, синтактико-лингвистических правил и шаблонов, статистически значимой совстречаемости и т. д.), так и на методах машинного обучения (Ivanisenko T. et al., 2014; Shrestha et al., 2024; Zhang et al., 2024).

В свою очередь, алгоритмы машинного обучения, применяемые для построения и анализа генных сетей, можно разделить на следующие направления: методы обучения с учителем, методы обучения без учителя, обучение с частичным контролем, а также гибридные подходы. Методы обучения с учителем используют предварительно размеченные данные для построения предсказательных моделей, например, для идентификации ключевых регуляторов или предсказания функциональных взаимодействий между генами растений (Ni et al., 2016). Обучение без учителя позволяет выявлять скрытые паттерны в больших объемах информации, что важно, например, при

кластеризации генов по схожести их экспрессии или выявлении модулей генных сетей. Методы обучения с частичным привлечением учителя комбинируют преимущества обоих подходов, используя как размеченные, так и неразмеченные данные, что особенно актуально в условиях ограниченного количества хорошо аннотированных данных (Yan, Wang, 2022). Гибридные подходы объединяют различные методы машинного обучения, а также традиционные подходы биоинформатики, что позволяет эффективно бороться с недостатками этих методов, когда они используются по отдельности (Guindani et al., 2024; Ivanisenko T. et al., 2024). Так, интеграция методов распознавания в текстах поименованных сущностей по словарю с методами машинного обучения способствует их более точной идентификации (Do et al., 2018; Ivanisenko T. et al., 2020).

В последние годы глубокое машинное обучение достигло значительных успехов благодаря внедрению архитектуры трансформера и механизмов внимания, что обеспечило качественный прогресс в обработке естественного языка и анализе биологических последовательностей (Vaswani et al., 2017). Существенное развитие получил и анализ генных сетей с применением графовых нейросетей, среди которых архитектура GraphSAGE (Hamilton et al., 2017) позволяет эффективно обучать модели на больших гетерогенных графах за счет агрегации признаков соседних узлов. Перспективным направлением является также использование больших языковых моделей, таких как Gemma-2-9b-it (Gemma Team, Google DeepMind, 2024), обеспечивающих высокое качество семантического анализа научных текстов и валидации извлеченных взаимодействий.

Для реконструкции и анализа генных сетей растений разработан ряд специализированных ресурсов. К ним относятся: PlantRegMap (Tian et al., 2020), предназначенный для анализа регуляторных взаимодействий транскрипционных факторов; STRING (Szklarczyk et al., 2021), позволяющий исследовать белок-белковые взаимодействия; платформа KEGG PLANT (Kanehisa, 2013), объединяющая информацию о метаболических путях различных видов растений; ресурс Plant Reactome (Naithani et al., 2020), содержащий детальные данные о сигнальных и метаболических путях модельных растительных организмов. Для визуализации и анализа генных сетей широко применяется программа Cytoscape (Otasek et al., 2019), имеющая обширный набор плагинов для работы с биологическими данными. База данных ncPlantDB предоставляет комплексную информацию для анализа регуляторных сетей, включая данные о тканеспецифичной экспрессии некодирующих РНК на уровне отдельных клеток и их взаимодействиях (Cheng et al., 2024; Liu et al., 2025). Интеграция подобных омиксных ресурсов формирует эффективную платформу для реконструкции генных сетей сельскохозяйственных культур (Chao et al., 2023).

Ранее нами разработана когнитивная программно-информационная система ANDSystem (Ivanisenko V. et al., 2015, 2019; Ivanisenko T. et al., 2020, 2022), предназначенная для полного цикла инженерии знаний в медико-биологической области. База знаний системы содержит свыше 50 миллионов взаимодействий для различных организмов.

В области биологии растений с помощью ANDSystem была создана база знаний по генетике картофеля SOLANUM TUBEROSUM (Сайк и др., 2017; Иванисенко и др., 2018; Деменков и др., 2019), проведены реконструкция и анализ регуляторной генной сети, контролирующей функции клеточной стенки в листьях *Arabidopsis thaliana* L. при водном дефиците (Volyanskaya et al., 2023), а также разработан метод приоритизации биологических процессов на основе реконструкции и анализа ассоциативных генных сетей (Деменков и др., 2021).

Применение системы автоматизированной реконструкции ассоциативных генных сетей ANDSystem для анализа микроРНК-регуляции адаптации мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к условиям водного дефицита позволило предложить новые кандидатные микроРНК (MIR7757, MIR9653a, MIR9670, MIR9672b), представляющие интерес для дальнейших экспериментальных исследований механизмов адаптации растений к недостаточному увлажнению (Клещев и др., 2024).

В другой работе (Антропова и др., 2024) с использованием ANDSystem была реконструирована молекулярно-генетическая сеть ответа риса (*Oryza sativa*) на поражение *Rhizoctonia solani* в условиях избытка азота, что позволило выявить три потенциальных механизма, объясняющих снижение устойчивости растения к патогену. Идентифицированы ключевые регуляторные пути: OsGSK2-опосредованный каскад, сигнальный путь OsMYB44–OsWRKY6–OsPR1, а также путь, включающий SOG1, Rad51 и гены PR1/PR2. Кроме того, выделены перспективные для селекции маркеры – 7 генов, регулирующих широкий спектр стрессовых ответов, и 11 генов-модуляторов иммунной системы. Дополнительный анализ некодирующих РНК (Антропова и др., 2024) позволил выявить 30 микроРНК, мишенями которых являются гены, входящие в реконструированную генную сеть. Для двух из них (Osa-miR396 и Osa-miR7695) обнаружено около 7400 уникальных длинных некодирующих РНК с различными индексами коэкспрессии, что может указывать на сложную архитектуру посттранскрипционной регуляции в условиях азотного стресса.

Целью настоящей работы была адаптация системы ANDSystem для создания базы знаний SmartCrop, интегрирующей данные о молекулярно-генетических механизмах и ассоциативных генных сетях стрессового ответа риса и пшеницы на основе интеллектуального анализа научных публикаций и фактографических баз данных. Работа включала создание предметной онтологии и оптимизацию интеллектуальных методов извлечения знаний из научных текстов с использованием семантико-лингвистических шаблонов и предобученных больших языковых моделей. Разработанная онтология SmartCrop представлена набором взаимосвязанных словарей, описывающих: молекулярно-генетические объекты (гены, белки, метаболиты, микроРНК), биологические процессы, фенотипические признаки и болезни, патогены, генетические биомаркеры, маркеры устойчивости к средствам защиты растений, молекулярные мишени химических средств защиты, биотические и абиотические факторы, средства защиты растений, а также сорта с их экономически ценными и потребительскими свойствами.

В результате автоматизированного анализа научных публикаций сформирована база знаний SmartCrop, интегрирующая более 10 миллионов взаимодействий между описанными в онтологии сущностями.

Материалы и методы

Информационные ресурсы. Для создания базы знаний SmartCrop мы использовали программно-информационную платформу ANDSystem (Ivanisenko V. et al., 2015, 2019; Ivanisenko T. et al., 2020, 2022) и ее информационные и биоинформатические технологии.

Настройка методов ANDSystem на предметную область осуществлялась с использованием онтологии, включающей специализированные словари объектов и описание типов их взаимодействий. Основу генетической и геномной информации при составлении словарей составили: база данных NCBI Gene (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), специализированная база данных по рису Oryzabase (https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase), база данных микроРНК miRBase (https://www.mirbase.org), база данных по коэкспрессии длинных некодирующих РНК ncPlantDB (https://bis.zju.edu.cn/ncPlantDB/), база данных однонуклеотидных полиморфизмов dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) и база данных по злаковым культурам GrainGenes (https://wheat.pw.usda.gov/GG3).

Для стандартизации терминологии использовались онтологии: Gene Ontology (http://geneontology.org), Crop Ontology для пшеницы и риса (https://cropontology.org), а также коллекция генетических ресурсов ВИР (https://www.vir.nw.ru).

Химические соединения и метаболиты были аннотированы с помощью базы данных ChEBI (https://www.ebi.ac.uk/chebi). Информация об устойчивости к гербицидам была получена из International Herbicide-Resistant Weed Database (http://www.weedscience.org), а данные о пестицидах – из EU Pesticide Database (https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en).

Для извлечения знаний из текстов применялись семантико-лингвистические шаблоны ANDSystem, а также вновь созданные шаблоны, учитывающие специфику предметной области. Дополнительно для извлечения знаний использовались методы искусственного интеллекта, включая графовые нейросети GraphSAGE (Hamilton et al., 2017) и большую языковую модель Gemma-2-9b-it (Gemma Team, Google DeepMind, 2024).

Оценка точности. Для оценки качества разметки имен объектов в тексте применялась F1-мера, представляющая собой гармоническое среднее между точностью (Precision) и полнотой (Recall):

$$F1 = 2 \cdot (Precision \times Recall)/(Precision + Recall),$$

$$Precision = TP/(TP + FP),$$

$$Recall = TP/(TP + FN),$$

где TP – истинно положительные, FP – ложноположительные, FN – ложноотрицательные результаты.

Результаты

Схематическое представление основных блоков программно-информационной системы SmartCrop показано на рис. 1.

Модуль предметно-ориентированной онтологии SmartCrop

Создание онтологии предметной области было ключевым этапом разработки SmartCrop. Предметно-ориентированная онтология формирует концептуальную модель проблемной области и включает словари объектов и типы их взаимодействий. На основе этих словарей из текстов и

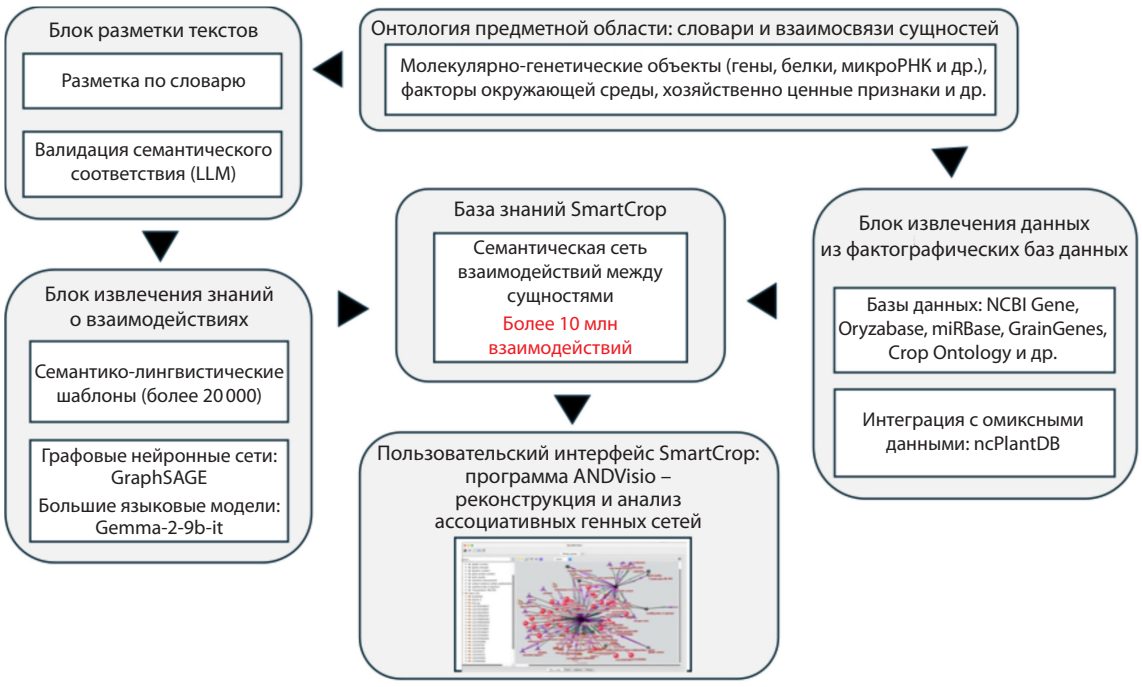


Рис. 1. Схематическое представление архитектуры программно-информационной системы SmartCrop.

фактографических баз данных извлекается информация о взаимодействиях между конкретными объектами. Текущая версия онтологии SmartCrop содержит 15 словарей различных объектов (табл. 1), составленных путем извлечения названий сущностей из специализированных баз данных и существующих онтологий.

Типы взаимодействий. В системе SmartCrop определены 16 типов отношений между объектами онтологии. Все взаимодействия в системе характеризуются определенной направленностью и подразделяются на несколько основных групп. К физическим взаимодействиям относятся процессы образования как кратковременных молекулярных комплексов, так и устойчивых соединений между белками и метаболитами.

Химические взаимодействия включают каталитические реакции типа субстрат–фермент–продукт, процессы протеолитического расщепления белков, а также различные посттрансляционные модификации белков, такие как фосфорилирование и гликозилирование.

Особую группу составляют регуляторные взаимодействия, охватывающие регуляцию экспрессии генов транскрипционными факторами, модуляцию активности и функций белков, контроль транспорта белков и метаболитов, а также регуляцию стабильности и деградации белков. Важной особенностью является то, что регуляторные взаимодействия определяют также взаимосвязи между молекулярно-генетическими объектами, биологическими процессами и фенотипическими признаками. При этом каждое регуляторное событие может характеризоваться эффектом усиления или ослабления соответствующего процесса.

Отдельно выделяются экспрессия и коэкспрессия генов. Продукты экспрессии – белки и некодирующие РНК. Коэкспрессия – одновременная экспрессия генов, обусловленная общими регуляторными механизмами при изменении клеточных условий. Дополнительно система учитывает ассоциативные связи, включающие неклассифицированные взаимодействия между различными объектами онтологии.

Таблица 1. Словари, представленные в онтологии SmartCrop

Словарь	Количество объектов
Гены/белки риса (*O. sativa*)	45198
Гены/белки пшеницы (*T. aestivum*)	155761
МикроРНК риса (*O. sativa*)	604
МикроРНК пшеницы (*T. aestivum*)	122
Генетические биомаркеры (*T. aestivum*)	862
Полиморфизмы QTL (*O. sativa*)	1987
Полиморфизмы QTL (*T. aestivum*)	1266
Сорта риса (*O. sativa*)	14377
Сорта пшеницы (*T. aestivum*)	25501
Метаболиты	74838
Биологические процессы	122477
Хозяйственно ценные признаки	234
Фенотипические признаки	2386
Болезни, патогены и вредители	1065
Маркеры устойчивости к СЗР	861
Биотические факторы	710
Абиотические факторы	496
Средства защиты растений, гербициды (СЗР)	1336
Молекулярные мишени для химических СЗР	14
Длинные некодирующие РНК	6546

Блок разметки текстов на основе объектов онтологии

Распознавание молекулярно-генетических объектов в научных текстах представляет собой сложную задачу, обусловленную спецификой их наименований. Наш опыт работы с ANDSystem показывает, что значительная часть ошибок при автоматической реконструкции ассоциативных генных сетей связана с неточной идентификацией поименованных сущностей (Ivanisenko T. et al., 2022). Причинами таких ошибок являются использование авторами аббревиатур, семантическая многозначность терминов, а также разнообразные лингвистические особенности научных текстов. В публикациях нередко модифицируются стандартные наименования объектов, изменяются пунктуация и порядок слов, варьируются грамматические формы, применяются сокращения либо допускаются технические опечатки (Pearson, 2001; Krallinger et al., 2015; Islamaj et al., 2021).

Для повышения точности распознавания нами разработан процесс, включающий два этапа: 1) первичное сопоставление названий со словарем онтологии; 2) вторичная верификация соответствия каждого размеченного имени объекта его типу на основе контекстуального анализа документа с помощью нейронных сетей.

Процесс верификации реализован следующим образом: языковая модель преобразует контекст (около 400 слов), который содержит анализируемый объект, замещенный специальным тэгом-маской, в векторное представление. Используя это представление, нейронная сеть выполняет двоичную классификацию, определяя, соответствует ли контекстуальное окружение термина его типичному употреблению.

Для объектов из онтологии ANDSystem (гены, белки, метаболиты и др.) точность классификации приведена в ранее опубликованной статье (Ivanisenko T. et al., 2022). Для новых словарей SmartCrop была проведена ручная экспертная оценка качества разметки (табл. 2) по результатам анализа 1000 случайно отобранных документов из баз PubMed и PubMed Central.

Результаты оценки показали высокую точность разметки для большинства словарей, за исключением наименований сортов риса и пшеницы. Идентификация сортовых названий растений является известной комплексной задачей, обусловленной рядом факторов, включая значительное пересечение терминов с общеупотребительной лексикой и антропонимами, а также отсутствие унифицированного стандарта в номенклатуре новых сортов (Do et al., 2018; D'Souza, 2024).

Таблица 2. Оценка точности разметки имен объектов по новым словарям

Словарь	F1-мера
Сорта (*O. sativa*)	0.103 (0.88)*
Сорта (*T. aestivum*)	0.274 (0.919)*
Хозяйственно ценные признаки	0.789
Абиотические факторы	0.748
Биотические факторы	0.927
Болезни, патогены и вредители	0.881

* В скобках указана точность после фильтрации типа распознанных имен с использованием нейронной сети.

Для решения данной проблемы было проведено обучение специализированной языковой модели, ориентированной на задачу контекстной классификации терминов. Обучение выполнялось в соответствии с методологией, ранее описанной в нашей работе по повышению точности идентификации восьми типов молекулярно-генетических сущностей, включая белки, гены, метаболиты и клеточные компоненты (Ivanisenko T. et al., 2022). Интеграция разработанной модели позволила существенно повысить точность распознавания наименований сортов (F1-мера) – до 0.88 у риса и 0.919 у пшеницы.

Блок извлечения знаний

Блок извлечения знаний из текстов научных публикаций реализует три основных этапа: 1) первичное извлечение знаний с использованием семантико-лингвистических шаблонов; 2) реконструкцию первичной семантической сети; 3) ее расширение с применением графовых нейросетей и больших языковых моделей. Дополнительно для расширения семантической сети используется блок извлечения данных из фактографических баз, содержащих структурированную информацию, что позволяет получать дополнительные сведения о взаимодействиях между объектами.

Семантико-лингвистические шаблоны представляют собой структурированные записи, содержащие метаданные о типах объектов и характере их взаимодействий. Они включают два основных компонента: 1) синтаксические связи, описывающие порядок расположения объектов и ключевых слов в предложении через регулярные выражения, и 2) семантические связи, определяющие тип взаимодействия между объектами. Регулярные выражения применяются для поиска соответствий в расположении имен объектов в размеченных предложениях текста. При обнаружении соответствия конкретные имена объектов из текста сопоставляются с идентификаторами шаблона.

Для каждого типа взаимодействий разработаны специализированные группы шаблонов с уникальными синтаксическими правилами. База знаний содержит более 18000 шаблонов ANDSystem для типов взаимодействий, отраженных как в онтологии ANDSystem, так и в SmartCrop, а также более 3000 шаблонов, специально разработанных для онтологий риса и пшеницы. Эффективность метода извлечения взаимодействий на основе шаблонов была подтверждена в ходе разработки системы ANDSystem (Ivanisenko V. et al., 2015).

Применение графовых нейросетей и больших языковых моделей. На втором этапе на основе знаний, извлеченных с помощью шаблонов, строился первичный граф знаний (семантическая сеть), который использовался для обучения графовой нейросети. После обучения выполнялось предсказание отсутствующих ребер в графе знаний. На третьем этапе большие языковые модели применялись для валидации этих предсказаний на основе анализа текстов научных публикаций, содержащих в разметке объекты с предполагаемым взаимодействием (Ivanisenko T. et al., 2024).

Интеграция с омиксными данными

Некодирующие РНК (нкРНК) – обширный и функционально разнообразный класс РНК-молекул, не транслирующихся в белки, но выполняющих ключевые регуляторные функции в клетке. Особый интерес представляют днРНК, поскольку они участвуют в регуляции экспрессии генов на различных уровнях – от модификации стабильности и трансляции мРНК до включения в сложные сигнальные каскады (Statello et al., 2021; Supriya et al., 2024).

Известным специализированным ресурсом по коэкспрессии нкРНК у растений, в том числе днРНК риса, является база данных ncPlantDB (https://bis.zju.edu.cn/ncPlantDB/). Она содержит сведения о тканеспецифичной экспрессии нкРНК на уровне отдельных клеток и об их предполагаемых взаимодействиях, полученные с помощью современных методов одноклеточного транскриптомного анализа (Cheng et al., 2024; Liu et al., 2025). Интеграция SmartCrop с базой ncPlantDB позволила использовать данные о коэкспрессии нкРНК, а также их связи с микроРНК для обогащения реконструируемых генных сетей.

Модуль анализа и визуализации генных сетей

В качестве пользовательского графического интерфейса SmartCrop, предназначенного для реконструкции и анализа генных сетей на основе информации из базы знаний SmartCrop, используется программа ANDVisio (рис. 2).

Программа ANDVisio (Demenkov et al., 2012) изначально была разработана как компонент системы ANDSystem и впоследствии адаптирована для интеграции со SmartCrop. Она предоставляет исследователям широкий набор инструментов для структурного и функционального анализа генных сетей, в том числе:

- многовариантные алгоритмы раскладки графа;
- систему многопараметрической фильтрации;
- механизмы поиска путей и циклов;
- инструменты расчета показателей центральности узлов;
- средства оценки обогащения биологических процессов генами сети;
- дополнительные методы сетевого анализа.

База знаний SmartCrop

База знаний системы реализована в виде семантической сети (графа знаний), интегрирующей данные, извлеченные как из научных публикаций, так и из фактографиче-

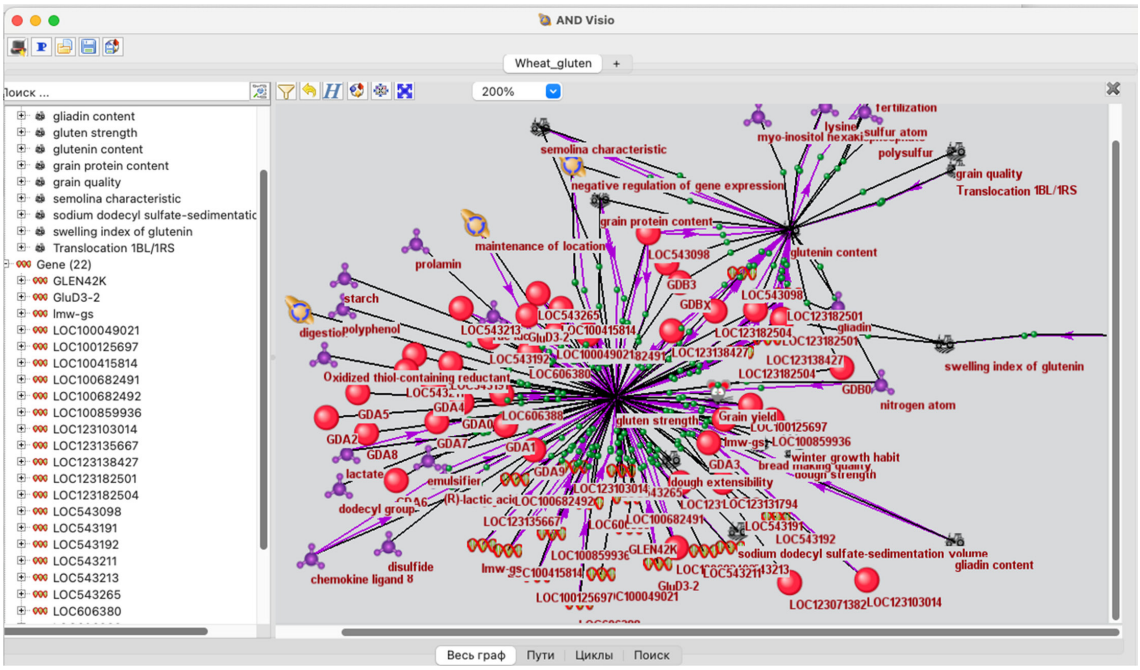


Рис. 2. Образ экрана с изображением интерфейса программы ANDVisio.

ских баз данных. В структуре графа узлы соответствуют объектам предметной онтологии, а ребра отражают различные типы взаимодействий между ними.

Наполнение базы знаний осуществлялось посредством систематического анализа научной литературы, включая рефераты из PubMed и полнотекстовые статьи из открытого ресурса PubMed Central. Проанализированные публикации охватили период с 1970 по 2024 г., при этом основным критерием отбора было наличие упоминаний пшеницы или риса. Детальная статистика по количеству зафиксированных взаимодействий в базе знаний SmartCrop приведена в табл. 3.

Таблица 3. Статистика базы знаний SmartCrop по взаимодействиям между объектами для пшеницы и риса

Тип взаимодействия	Количество взаимодействий	
	Рис (*Oryza sativa*)	Пшеница (*Triticum aestivum*)
Ассоциация	189650	207415
Регуляция экспрессии	22472	26474
Регуляция активности	3991	23411
Регуляция деградации	1442	4415
Регуляция транспорта	830	1320
нкРНК/миРНК регуляция	2125036	5814
Регуляция процессов	23274	23766
Каталитические реакции	2267	5798
Экспрессия	86353	311964
Физическое взаимодействие	8551	11810
Маркер (marker)	435	226

Обсуждение

Для демонстрации возможностей SmartCrop рассмотрим два сценария ее применения: анализ экспериментальных омиксных данных и планирование экспериментов.

Анализ экспериментальных омиксных данных

В качестве примера интерпретации омиксных данных проведена функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) мягкой пшеницы при солевом стрессе. Для анализа был использован набор из 5829 ДЭГ, выделенных из базы NCBI GEO (GSE225565, Alyahya, Taybi, 2023) для тканей корня мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Saudi) в ответ на засоление.

Результаты анализа перепредставленности объектов SmartCrop (биологические процессы, фенотипические признаки, хозяйственно ценные признаки, патогены) для этого набора ДЭГ и их белковых продуктов приведены в табл. S1 Приложения[1]. Всего была выявлена достоверная (p-value < 0.05, с поправкой Бонферрони) перепредставленность 217 терминов, описывающих биологические процессы (тип объекта Pathway), 50 фенотипических признаков (Phenotype), 9 хозяйственно ценных признаков (Agrophenotype) и 38 видов патогенных организмов. Примеры объектов, входящих в число статистически наиболее значимых характеристик, приведены в табл. 4.

Анализ перепредставленных биологических процессов показал, что исследуемый набор ДЭГ связан как с ответом на солевой стресс, так и с реакцией на водный дефицит. Это отражает адаптационные механизмы растений к состоянию так называемой физиологической

[1] Табл. S1 Приложения см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx46.xls

Таблица 4. Характеристики мягкой пшеницы, статистически значимо связанные с набором ДЭГ и их белковых продуктов при солевом стрессе, выявленные с помощью системы SmartCrop

Объект (термин)	Число связанных генов и белков	*p*-value	Объект (термин)	Число связанных генов и белков	*p*-value
Биологические процессы			Хозяйственно ценные признаки		
Response to water deprivation	37	2.73E–66	Seed longevity	2	3.96E–08
Cell death	31	1.12E–54	Grain thickness	2	1.77E–07
Cold acclimation	23	4.52E–41	Grain length	7	1.62E–20
Hyperosmotic salinity response	23	2.67E–38	Grain protein content	7	1.42E–17
Seed germination	20	7.21E–34	Fiber quality	2	1.23E–06
Фенотипические признаки			Патогены		
Stomatal closure rate	2	8.84E–47	*Fusarium* sp.	22	2.22E–59
Cell membrane stability	2	1.45E–31	*Fusarium culmorum*	10	1.23E–27
Grain moisture content	2	5.46E–31	*Fusarium oxysporum*	10	2.39E–26
Seed length	2	2.32E–30	*Botrytis cinerea*	10	8.63E–26
Na^+ uptake	2	1.98E–29	*Fusarium pseudograminearum*	10	2.45E–25

сухости, возникающей при невозможности эффективного поглощения воды из-за высокого осмотического давления окружающей среды. К числу таких адаптаций относится закрытие устьиц, обеспечиваемое быстрым повышением уровня абсцизовой кислоты (Verma et al., 2016; Zhao et al., 2021). Соответственно, среди достоверно перепредставленных объектов оказались как фенотипический признак «скорость закрытия устьиц» (stomatal closure rate, см. табл. 4), так и сигнальные пути, связанные с абсцизовой кислотой (см. табл. S1), что подтверждает их важную роль в ответе на засоление.

Следует отметить, что важным преимуществом базы знаний SmartCrop по сравнению с широко используемыми ресурсами для функциональной аннотации генов (DAVID, Gene Ontology, ShinyGO и др.) является возможность анализа связей генов и белков не только с биологическими процессами, молекулярными функциями, клеточными компонентами и путями KEGG, но и с широким спектром абиотических и биотических факторов среды, фенотипических признаков, хозяйственно значимых свойств и патогенов. Такая интеграция позволяет оценивать перепредставленность различных типов объектов для исследуемого набора генов, существенно расширяя возможности функциональной аннотации и обеспечивая выявление генов с плейотропными эффектами. Последнее особенно важно для маркер-ориентированной селекции, поскольку отбор по одному целевому фенотипическому признаку или генетическому маркеру может затрагивать сразу несколько других, нецелевых признаков.

В частности, результаты функциональной аннотации ДЭГ мягкой пшеницы при солевом стрессе показали их ассоциацию не только с биологическими процессами, такими как ответ на засоление и водный дефицит, и процессами, контролирующими прорастание семян, но и с хозяйственно ценными признаками, отражающими качество зерна (см. табл. 4). Например, аквапорины, кодируемые генами *LOC543267*, *LOC100037645*, *LOC123093445* и др., обеспечивают селективный транспорт молекул воды, участвуют в поддержании ионного состава клеток и регулировании водно-солевого баланса при повышенном засолении (Ayadi et al., 2019), а также способствуют перемещению воды и растворенных веществ внутри семян, что играет ключевую роль в процессе их прорастания (Hoai et al., 2020).

Функциональность SmartCrop не ограничивается анализом перепредставленности. Система также позволяет реконструировать ассоциативные сети белков и генов, значимо связанных с перепредставленными объектами, и проводить поиск их регуляторов, что обеспечивает более глубокое понимание молекулярных механизмов этих связей и выявление их специфики в определенных условиях эксперимента.

В качестве примера была реконструирована генная сеть регуляции устойчивости растений к гиперосмотическому стрессу (GO:0042538 hyperosmotic salinity response) (рис. 3). Согласно данным SmartCrop, в формировании реакции пшеницы на гиперосмотический стресс участвуют 95 генов и 119 белков, включая аквапорины и натрий-водородные транспортеры (sodium/hydrogen exchangers), которые играют ключевую роль в регуляции внутриклеточного pH, водного баланса и гомеостаза ионов натрия (Gupta et al., 2021). Избыточные ионы натрия, поступающие из окружающей среды, удаляются из цитоплазмы в апопласт и вакуоли в обмен на ионы водорода с помощью трансмембранных Na^+/H^+ транспортеров (Zhao et al., 2021).

В сеть также входят пероксидазы и каталазы, участвующие в антиоксидантной защите при абиотическом стрессе, транскрипционные факторы семейств MYB и WRKY, дегидрины (LOC123125487, LOC100141381 и др.), белки холодового шока (LOC123080042, LOC543252, LOC542792) и белки DELLA, которые, подавляя сигнальный путь гиббереллина и взаимодействуя с сигнальными путями жасмоновой кислоты, повышают толерантность растений к абиотическому стрессу, включая засоление

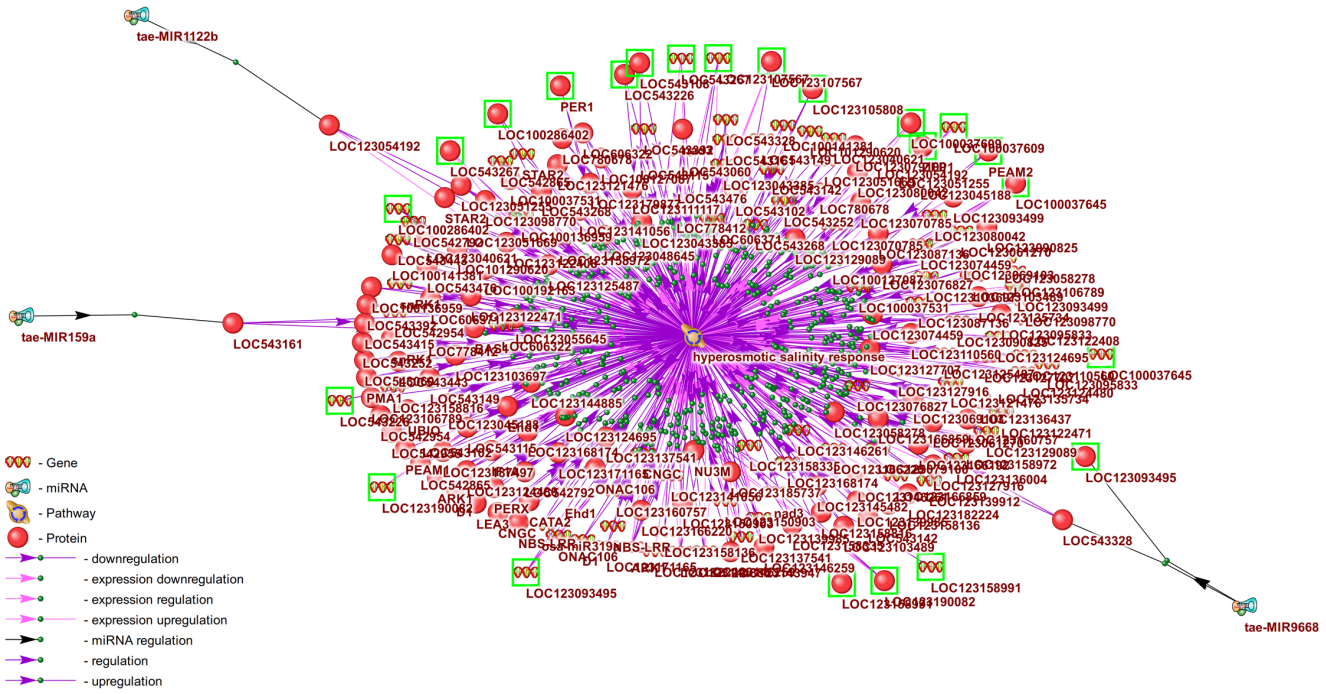


Рис. 3. Гены, белки и микроРНК, участвующие в регуляции ответа мягкой пшеницы на гиперосмотический стресс.

Зеленой рамкой отмечены гены, дифференциально экспрессирующиеся в корнях мягкой пшеницы в ответ на засоление почвы, а также их белковые продукты.

(Colebrook et al., 2014). Дополнительно в сети представлены кальций-зависимые протеинкиназы – ключевые элементы кальциевых сигнальных каскадов, активируемых при абиотическом стрессе.

Кроме того, по данным SmartCrop, в регуляцию ответа на гиперосмотический стресс вовлечены микроРНК *tae-MIR159a*, регулирующая экспрессию транскрипционного фактора TaMyb3 (LOC543161), и *tae-MIR1122b* и *tae-MIR9668*, мишенями которых являются аквапорины LOC123054192 и LOC123093495 соответственно.

Из общего списка генов, участвующих в регуляции реакции на гиперосмотический стресс, лишь девять демонстрировали дифференциальную экспрессию в тканях корня мягкой пшеницы при экспериментальном солевом стрессе в исследовании (Alyahya, Taybi, 2023). В этот перечень входят гены, кодирующие аквапорины, пероксидазы, каталазы, а также серин/треонин-протеинкиназу CTR1 (LOC100286402). Таким образом, в условиях эксперимента, описанного в статье (Alyahya, Taybi, 2023), преимущественно активировались сигнальные пути, связанные с антиоксидантной защитой.

Ассоциативная сеть, реконструированная в SmartCrop, включает эти девять ДЭГ и их белковые продукты, регуляторные белки, а также две микроРНК – *tae-MIR159a*, регулирующую экспрессию транскрипционного фактора TaMyb3 (LOC543161), и *tae-MIR9668,* мишенью которой является аквапорин LOC123093495. Данная сеть представлена на рис. 4.

Интересно отметить, что транскрипционный фактор TaMyb3 (LOC543161), являющийся мишенью микроРНК *tae-MIR159a*, в свою очередь выступает негативным регулятором экспрессии ряда генов, кодирующих пероксидазы. Подавление экспрессии этих ферментов приводит к повышенному накоплению перекиси водорода в тканях и, как следствие, к снижению устойчивости растений к засолению (Wei et al., 2021). В данном случае реализуется «кассетно-каскадный» принцип регуляции с участием микроРНК, при котором микроРНК контролирует экспрессию своей мишени – транскрипционного фактора, регулирующего целый набор генов, вовлеченных в реакцию на абиотический стресс (Клещев и др., 2024).

Транскрипционные факторы семейства MYB хорошо известны как участники регуляции ответов на различные абиотические стрессы, включая засоление (Kong et al., 2021; Wang S. et al., 2021). В частности, они участвуют в регуляции биосинтеза флавоноидов-метаболитов, необходимых для защиты клеток от оксидативного стресса (Wang X. et al., 2021).

Применение SmartCrop для решения задач планирования экспериментов

В качестве второго примера применения системы SmartCrop был проведен поиск перспективных генов и фенотипических маркеров для последующей маркер-ориентированной селекции и геномного редактирования, направленных на повышение устойчивости риса (*Oryza sativa* L.) к засолению почвы.

Согласно данным базы знаний SmartCrop, маркерами устойчивости к засолению могут служить такие признаки, как содержание хлорофилла, форма семян, содержание метаболитов 3′-метоксиапигенина и 5,7,4′-тригидрокси-3′-метоксифлавона. Устойчивость риса к засолению регулируется 30 генами и соответствующими 30 белковыми продуктами (рис. 5). Помимо генов, в регуляцию вовле-

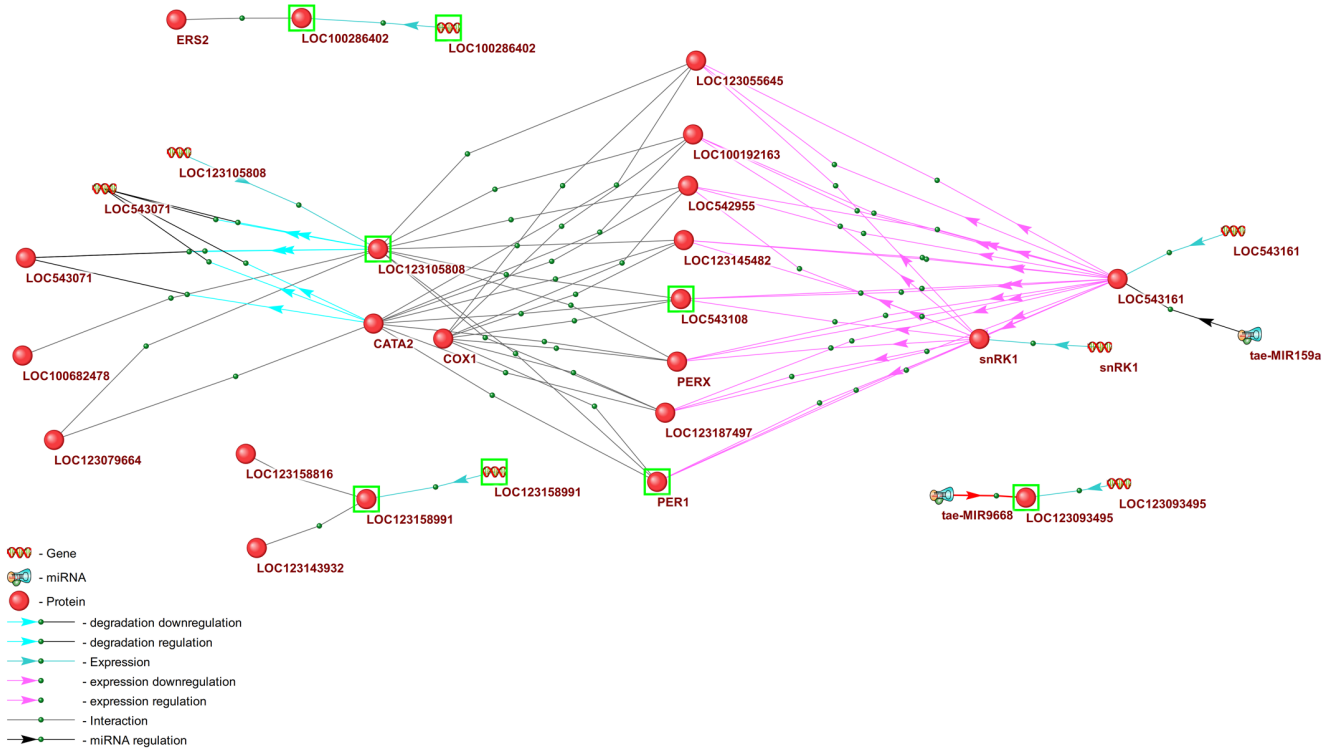


Рис. 4. Генная сеть регуляции ответа мягкой пшеницы на солевой стресс.

Зеленой рамкой отмечены гены, дифференциально экспрессирующиеся в корнях мягкой пшеницы в ответ на засоление почвы, а также их белковые продукты.

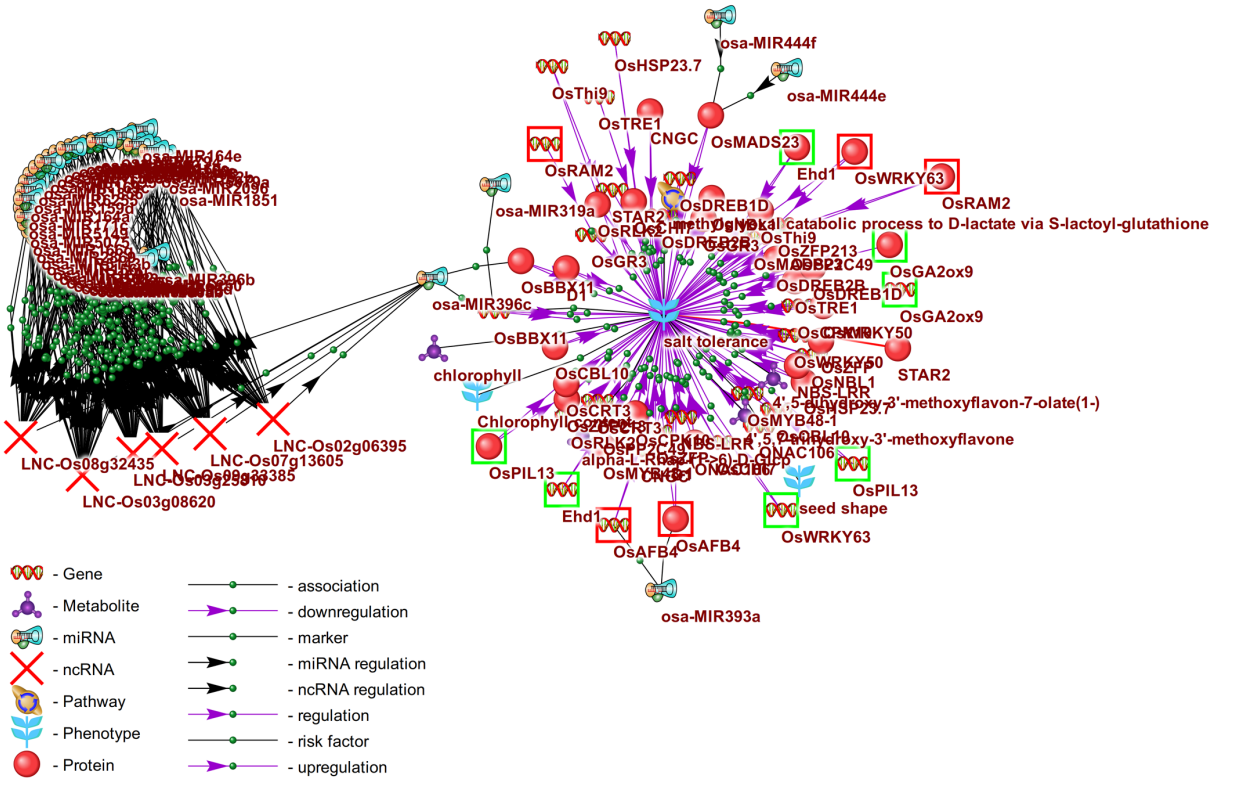


Рис. 5. Ассоциативная генная сеть, показывающая участие генов, белков, микроРНК и длинных некодирующих РНК в регуляции устойчивости риса (*Oryza sativa* L.) к засолению и их потенциальную роль в качестве фенотипических маркеров.

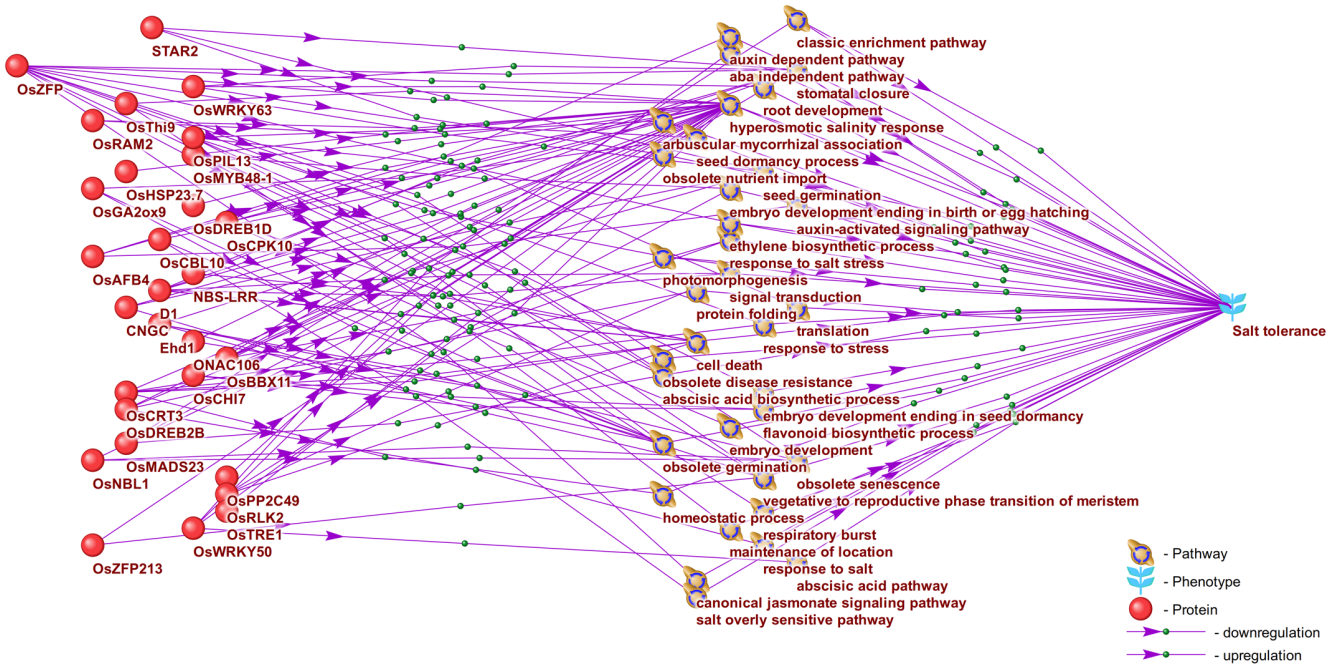


Рис. 6. Регуляторные связи генов, связанных с устойчивостью риса к засолению, с биологическими путями, вовлеченными в регуляцию данного признака.

чены микроРНК *osa-MIR444f* и *osa-MIR444e*, мишенью которых является транскрипционный фактор OsMADS23, а также *osa-MIR444e* (мишень – ауксиновый рецептор OsABF4). Транскрипционный фактор OsBBX11, известный регулятор устойчивости к засолению (Lei et al., 2023), является мишенью для микроРНК *osa-MIR319a* и *osa-MIR396c*.

Длинные некодирующие РНК (lncRNA, днРНК) – это молекулы длиной более 200 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов на транскрипционном, посттранскрипционном и эпигенетическом уровнях, тем самым модулируя ответ растений на различные абиотические и биотические факторы, включая засоление (Sun X. et al., 2018). LncRNA могут взаимодействовать с ДНК (хроматином, промоторами и энхансерами), белками, мРНК и микроРНК. Один из важных механизмов функционирования длинных некодирующих РНК – ингибирование микроРНК, что делает lncRNA ключевыми регуляторами их активности (Saha et al., 2025).

По данным SmartCrop, микроРНК *osa-MIR396c* взаимодействует с 508 длинными некодирующими РНК, из которых шесть (*LNC-Os02g06395*, *LNC-Os03g08620*, *LNC-Os03g25810*, *LNC-Os07g13605*, *LNC-Os08g32435*, *LNC-Os09g33385*) коэкспрессируются не только с *osa-MIR396c*, но и с 42 другими микроРНК риса (см. рис. 5). Это указывает на их потенциальную роль как ключевых участников регуляции устойчивости риса к абиотическим стрессам, включая засоление.

Из 30 генов, регулирующих устойчивость к засолению, шесть (*OsPIL13*, *OsNBL1*, *OsABF4*, *OsCPK10*, *OsCRT3*, *OsBBX11*) контролируют содержание хлорофилла. Остальные 24 гена ранее не связывались с известными маркерами устойчивости риса к засолению и, таким образом, представляют собой перспективные кандидаты для поиска новых генетических маркеров данного признака.

Следует особо отметить, что приоритизация генов для маркер-ориентированной селекции и геномного редактирования требует учета специфичности их регуляторного действия, поскольку отбор по одному целевому признаку может оказывать влияние на другие хозяйственно ценные характеристики. Анализ показал, что гены и белки, регулирующие устойчивость к засолению, ассоциированы с 67 другими фенотипическими признаками, включая биомассу, площадь листьев, морфологию зерна и др., что отражает эффект плейотропии.

Три гена – *OsPIL13*, *Ehd1* и *OsGA2Ox3* – являются позитивными регуляторами устойчивости к засолению и таких хозяйственно значимых признаков, как качество зерна, период покоя семян и длина зерна. Это делает их перспективными кандидатами для селекции и геномного редактирования, поскольку воздействие на них может одновременно повышать солеустойчивость и улучшать качество зерна. В то же время гены *OsWRKY63*, *OsRAM2* и *OsABF4* повышают устойчивость риса к засолению, но при этом связаны с негативной регуляцией периода покоя семян, содержания белка в зерне и устойчивости растений к *Fusarium graminearum* и *F. pseudograminearum*, что необходимо учитывать при селекции.

Согласно данным SmartCrop, 21 ген участвует только в регуляции устойчивости к засолению и не связан с регуляцией хозяйственно ценных признаков или устойчивости к патогенам, что делает их подходящими для целенаправленной селекции на повышение солеустойчивости.

Другое важное обстоятельство, которое надо учитывать при выборе генов для маркер-ориентированной селекции и/или геномного редактирования, – это потенциальная раз-

нонаправленность их регуляторного действия, поскольку продукты генов могут как стимулировать, так и ослаблять биологические процессы, вовлеченные в позитивную или негативную регуляцию целевого признака. Для оценки такой разнонаправленности с помощью модуля «Мастер путей» программы ANDSystem были выявлены регуляторные связи белковых продуктов 30 генов, ассоциированных с устойчивостью риса к засолению, с биологическими процессами, которые, в свою очередь, участвуют в регуляции данного признака (рис. 6).

Среди генов, регулирующих устойчивость к засолению, особый интерес представляют *OsMYB48-1*, *OsCPK10*, *OsCBL10*, *OsDREB2B*, *OsRAM2* и *NBS-LRR*, обладающие однонаправленным действием в виде положительной регуляции ключевых процессов, обеспечивающих толерантность к солевому стрессу (hyperosmotic salinity response, stomatal closure, ABA independent pathway и др.). Высокая степень связанности этих генов с целевым признаком в сочетании с однонаправленным характером регуляции позволяет ожидать, что их использование в маркер-ориентированной селекции или при геномном редактировании окажет более прямое и выраженное влияние на повышение солеустойчивости по сравнению с другими кандидатами.

Заключение

Созданная база знаний SmartCrop является специализированной версией программно-информационной системы ANDSystem, адаптированной для задач генетики и селекции риса и пшеницы. Она интегрирует сведения о широком спектре объектов – генах, белках, метаболитах, некодирующих РНК, биологических процессах, селекционно значимых и фенотипических признаках, патогенах, а также биотических и абиотических факторах и их взаимосвязях. Такая архитектура обеспечивает широкие возможности для исследования молекулярно-генетических механизмов стрессоустойчивости растений, а также для отбора генов, генетических маркеров и фенотипических признаков в рамках маркер-ориентированной селекции сельскохозяйственных культур.

Примеры применения SmartCrop для функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов мягкой пшеницы при солевом стрессе и для планирования экспериментов по повышению солеустойчивости риса с использованием маркер-ориентированной селекции продемонстрировали высокую эффективность системы и ее потенциал в решении прикладных задач селекции и геномного редактирования.

Список литературы / References

Антропова Е.А., Волянская А.Р., Адамовская А.В., Деменков П.С., Яцык И.В., Иванисенко Т.В., Орлов Ю.Л., Чао Х., Чэнь М., Иванисенко В.А. Поиск перспективных генетических маркеров, ассоциированных с молекулярными механизмами снижения устойчивости риса к *Rhizoctonia solani* при избытке азотных удобрений, методом реконструкции и анализа генных сетей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):960-973. doi 10.18699/vjgb-24-103

[Antropova E.A., Volyanskaya A.R., Adamovskaya A.V., Demenkov P.S., Yatsyk I.V., Ivanisenko T.V., Orlov Y.L., Haoyu Ch., Chen M., Ivanisenko V.A. Computational identification of promising genetic markers associated with molecular mechanisms of reduced rice resistance to *Rhizoctonia solani* under excess nitrogen fertilization using gene network reconstruction and analysis methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(8):960-973. doi 10.18699/vjgb-24-103]

Деменков П.С., Сайк О.В., Иванисенко Т.В., Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Иванисенко В.А. Приоритизация генов картофеля, вовлеченных в формирование селекционно-значимых признаков, с использованием базы знаний SOLANUM TUBEROSUM. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(3):312-319. doi 10.18699/VJ19.501

[Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Kochetov A.V., Ivanisenko V.A. Prioritization of potato genes involved in the formation of agronomically valuable traits using the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):312-319. doi 10.18699/VJ19.501]

Деменков П.С., Ощепкова Е.А., Иванисенко Т.В., Иванисенко В.А. Приоритизация биологических процессов на основе реконструкции и анализа ассоциативных генных сетей, описывающих ответ растений на неблагоприятные факторы внешней среды. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(5):580-592. doi 10.18699/VJ21.065

[Demenkov P.S., Oshchepkova E.A., Ivanisenko T.V., Ivanisenko V.A. Prioritization of biological processes based on the reconstruction and analysis of associative gene networks describing the response of plants to adverse environmental factors. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(5):580-592. doi 10.18699/VJ21.065]

Иванисенко Т.В., Сайк О.В., Деменков П.С., Хлесткин В.К., Хлесткина Е.К., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. База знаний SOLANUM TUBEROSUM: раздел по молекулярно-генетической регуляции метаболических путей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):8-17. doi 10.18699/VJ18.325

[Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Khlestkin V.K., Khlestkina E.K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The SOLANUM TUBEROSUM knowledge base: the section on molecular-genetic regulation of metabolic pathways. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):8-17. doi 10.18699/VJ18.325 (in Russian)]

Клещев М.А., Мальцева А.В., Антропова Е.А., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Орлов Ю.Л., Чао Х., Чэнь М., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. Реконструкция и компьютерный анализ генной сети, отражающей роль микроРНК в регуляции ответа пшеницы на засуху. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):904-917. doi 10.18699/vjgb-24-98

[Kleshchev M.A., Maltseva A.V., Antropova E.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Orlov Y.L., Chao H., Chen M., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Reconstruction and computational analysis of the microRNA regulation gene network in wheat drought response mechanisms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(8):904-917. doi 10.18699/vjgb-24-98]

Сайк О.В., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. Разработка методов автоматического извлечения знаний из текстов научных публикаций для создания базы знаний SOLANUM TUBEROSUM. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(1):63-74. doi 10.15389/agrobiology.2017.1.63rus

[Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Development of methods for automatic extraction of knowledge from texts of scientific publications for the creation of a knowledge base SOLANUM TUBEROSUM. *Agric Biol*. 2017;52(1):63-74. doi 10.15389/agrobiology.2017.1.63eng]

Alyahya N., Taybi T. Comparative transcriptomic profiling reveals differentially expressed genes and important related metabolic pathways in shoots and roots of a Saudi wheat cultivar (Najran) under salinity stress. *Front Plant Sci*. 2023;14:1225541. doi 10.3389/fpls.2023.1225541

Ayadi M., Brini F., Masmoudi K. Overexpression of a wheat aquaporin gene, *Td*PIP2;1, enhances salt and drought tolerance in transgenic durum wheat cv. Maali. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2389. doi 10.3390/ijms20102389

Chao H., Zhang S., Hu Y., Ni Q., Xin S., Zhao L., Ivanisenko V.A., Orlov Y.L., Chen M. Integrating omics databases for enhanced crop breeding. *J Integr Bioinform.* 2023;20(4):20230012. doi 10.1515/jib-2023-0012

Chen T., Nomura K., Wang X., Sohrabi R., Xu J., Yao L., Paasch B.C., Ma L., Kremer J., Cheng Y., Zhang L., Wang N., Wang E., Xin X.F., He S.Y. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature*. 2020;580(7805):653-657. doi 10.1038/s41586-020-2185-0

Cheng M., Zhu Y., Yu H., Shao L., Zhang Y., Li L., Tu H., … Orlov Y.L., Chen D., Wong A., Yang Y.E., Chen M. Non-coding RNA notations, regulations and interactive resources. *Funct Integr Genomics.* 2024;24(6):217. doi 10.1007/s10142-024-01494-w

Colebrook E.H., Thomas S.G., Phillips A.L., Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol.* 2014;217(1):67-75. doi 10.1242/jeb.089938

Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biol.* 2012;11(3-4):149-161. doi 10.3233/isb-2012-0449

Do H., Than K., Larmande P. Evaluating named-entity recognition approaches in plant molecular biology. In: Multi-disciplinary Trends in Artificial Intelligence. MIWAI 2018. Lecture Notes in Computer Science. Vol. 11248. Springer, Cham., 2018;219-225. doi 10.1007/978-3-030-03014-8_19

D'Souza J. Agriculture named entity recognition – towards FAIR, reusable scholarly contributions in agriculture. *Knowledge.* 2024;4(1):1-26. doi 10.3390/knowledge4010001

Gemma Team, Google DeepMind. Gemma 2: improving open language models at a practical size. *arXiv*. 2024:2408.00118. doi 10.48550/arXiv.2408.00118

Guindani L.G., Oliveirai G.A., Ribeiro M.H.D.M., Gonzalez G.V., de Lima J.D. Exploring current trends in agricultural commodities forecasting methods through text mining: developments in statistical and artificial intelligence methods. *Heliyon.* 2024;10(23):e40568. doi 10.1016/j.heliyon.2024.e40568

Gupta A., Shaw B.P., Sahu B.B. Post-translational regulation of the membrane transporters contributing to salt tolerance in plants. *Funct Plant Biol*. 2021;48(12):1199-1212. doi 10.1071/FP21153

Hamilton W.L., Ying R., Leskovec J. Inductive representation learning on large graphs. *arXiv.* 2017. doi 10.48550/arxiv.1706.02216

Hoai P.T.T., Tyerman S.D., Schnell N., Tucker M., McGaughey S.A., Qiu J., Groszmann M., Byrt C.S. Deciphering aquaporin regulation and roles in seed biology. *J Exp Bot.* 2020;71(6):1763-1773. doi 10.1093/jxb/erz555

Islamaj R., Wei C.H., Cissel D., Miliaras N., Printseva O., Rodionov O., Sekiya K., Ward J., Lu Z. NLM-Gene, a richly annotated gold standard dataset for gene entities that addresses ambiguity and multi-species gene recognition. *J Biomed Inform.* 2021;118:103779. doi 10.1016/j.jbi.2021.103779

Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. Text mining on PubMed. In: Chen M., Hofestädt R. (Eds) Approaches in Integrative Bioinformatics. Springer, 2014;161-170. doi 10.1007/978-3-642-41281-3_6

Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics.* 2020;21(S11):228. doi 10.1186/s12859-020-03557-8

Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The new version of the ANDDigest tool with improved AI-based short names recognition. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14934. doi 10.3390/ijms232314934

Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. An accurate and efficient approach to knowledge extraction from scientific publications using structured ontology models, graph neural networks, and large language models. *Int J Mol Sci.* 2024;25(21):11811. doi 10.3390/ijms252111811

Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst Biol.* 2015;9(Suppl.2):S2. doi 10.1186/1752-0509-9-s2-s2

Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSystem tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(S1):34. doi 10.1186/s12859-018-2567-6

Kanehisa M. Molecular network analysis of diseases and drugs in KEGG. In: Mamitsuka H., DeLisi C., Kanehisa M. (Eds) Data Mining for Systems Biology. Methods in Molecular Biology. Vol. 939. Humana Press, 2013;263-275. doi 10.1007/978-1-62703-107-3_17

Kong W., Sun T., Zhang C., Deng X., Li Y. Comparative transcriptome analysis reveals the mechanisms underlying differences in salt tolerance between *indica* and *japonica* rice at seedling stage. *Front Plant Sci.* 2021;12:725436. doi 10.3389/fpls.2021.725436

Krallinger M., Rabal O., Leitner F., Vazquez M., Salgado D., Lu Z., Leaman R., … Alves R., Segura-Bedmar I., Martínez P., Oyarzabal J., Valencia A. The CHEMDNER corpus of chemicals and drugs and its annotation principles. *J Cheminform.* 2015;7(S1):S2. doi 10.1186/1758-2946-7-s1-s2

Lei L., Cao L., Ding G., Zhou J., Luo Y., Bai L., Xia T., … Xie T., Yang G., Wang X., Sun S., Lai Y. *OsBBX11* on *qSTS4* links to salt tolerance at the seeding stage in *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*. *Front Plant Sci.* 2023;14:1139961. doi 10.3389/fpls.2023.1139961

Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature.* 2016;529(7584):84-87. doi 10.1038/nature16467

Liu L., Liu E., Hu Y., Li S., Zhang S., Chao H., Hu Y., Zhu Y., Chen Y., Xie L., Shen Y., Wu L., Chen M. ncPlantDB: a plant ncRNA database with potential ncPEP information and cell type-specific interaction. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(D1):D1587-D1594. doi 10.1093/nar/gkae1017

Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 2006;11(1):15-19. doi 10.1016/j.tplants.2005.11.002

Naithani S., Gupta P., Preece J., D'Eustachio P., Elser J.L., Garg P., Dikeman D.A., … Bolton E., Papatheodorou I., Stein L., Ware D., Jaiswal P. Plant Reactome: a knowledgebase and resource for comparative pathway analysis. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D1093-D1103. doi 10.1093/nar/gkz996

Ni Y., Aghamirzaie D., Elmarakeby H., Collakova E., Li S., Grene R., Heath L.S. A machine learning approach to predict gene regulatory networks in seed development in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* 2016;7:1936. doi 10.3389/fpls.2016.01936

Nykiel M., Gietler M., Fidler J., Prabucka B., Labudda M. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Plants*. 2023;12(19):3405. doi 10.3390/plants12193405

Otasek D., Morris J.H., Bouças J., Pico A.R., Demchak B. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis. *Genome Biol.* 2019;20(1):185. doi 10.1186/s13059-019-1758-4

Pearson H. Biology's name game. *Nature*. 2001;411(6838):631-632. doi 10.1038/35079694

Saha C., Saha S., Bhattacharyya N.P. LncRNAOmics: a comprehensive review of long non-coding RNAs in plants. *Genes*. 2025;16(7):765. doi 10.3390/genes16070765

Shewry P.R., Hey S.J. The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur.* 2015;4(3):178-202. doi 10.1002/fes3.64

Shrestha A.M.S., Gonzales M.E.M., Ong P.C.L., Larmande P., Lee H.S., Jeung J.U., Kohli A., Chebotarov D., Mauleon R.P., Lee J.S., McNally K.L. RicePilaf: a post-GWAS/QTL dashboard to integrate pangenomic, coexpression, regulatory, epigenomic, ontology, pathway, and text-mining information to provide functional insights into rice QTLs and GWAS loci. *GigaScience*. 2024;13:giae013. doi 10.1093/gigascience/giae013

Statello L., Guo C.J., Chen L.L., Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22:96-118. doi 10.1038/s41580-020-00315-9

Sun X., Zheng H., Sui N. Regulation mechanism of long non-coding RNA in plant response to stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(2):402-407. doi 10.1016/j.bbrc.2018.07.072

Supriya P., Srividya G.K., Solanki M., Manvitha D., Prakasam V., Balakrishnan M., Neeraja C.N., Rao C.S., Sundaram R.M., Mangrauthia S.K. Identification and expression analysis of long non-coding RNAs of rice induced during interaction with *Rhizoctonia solani*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2024;134:102389. doi 10.1016/j.pmpp.2024.102389

Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D605-D612. doi 10.1093/nar/gkaa1074

Tian F., Yang D.C., Meng Y.Q., Jin J., Gao G. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D1104-D1113. doi 10.1093/nar/gkz1020

Vaswani A., Shazeer N., Parmar N., Uszkoreit J., Jones L., Gomez A.N., Kaiser L., Polosukhin I. Attention is all you need. *arXiv*. 2017. doi 10.48550/arXiv.1706.03762

Verma V., Ravindran P., Kumar P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 2016;16(1):86. doi 10.1186/s12870-016-0771-y

Virlouvet L., Avenson T.J., Du Q., Zhang C., Liu N., Fromm M., Avramova Z., Russo S.E. Dehydration stress memory: gene networks linked to physiological responses during repeated stresses of *Zea mays*. *Front Plant Sci*. 2018;9:1058. doi 10.3389/fpls.2018.01058

Volyanskaya A.R., Antropova E.A., Zubairova U.S., Demenkov P.S., Venzel A.S., Orlov Y.L., Makarova A.A., Ivanisenko T.V., Gorshkova T.A., Aglyamova A.R., Kolchanov N.A., Chen M., Ivanisenko V.A. Reconstruction and analysis of the gene regulatory network for cell wall function in *Arabidopsis thaliana* L. leaves in response to water deficit. *Vavilov J Genet Breed.* 2023;27(8):1031-1041. doi 10.18699/vjgb-23-118

Wang S., Shi M., Zhang Y., Xie X., Sun P., Fang C., Zhao J. FvMYB24, a strawberry R2R3-MYB transcription factor, improved salt stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *Biochem Biophysical Res Commun.* 2021;569:93-99. doi 10.1016/j.bbrc.2021.06.085

Wang X., Niu Y., Zheng Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):6125. doi 10.3390/ijms22116125

Wei T., Guo D., Liu J. PtrMYB3, a R2R3-MYB transcription factor from *Poncirus trifoliata*, negatively regulates salt tolerance and hydrogen peroxide scavenging. *Antioxidants*. 2021;10(9):1388. doi 10.3390/antiox10091388

Yan J., Wang X. Unsupervised and semi-supervised learning: the next frontier in machine learning for plant systems biology. *Plant J.* 2022;111(6):1527-1538. doi 10.1111/tpj.15905

Zhang D., Zhao R., Xian G., Kou Y., Ma W. A new model construction based on the knowledge graph for mining elite polyphenotype genes in crops. *Front Plant Sci.* 2024;15:1361716. doi 10.3389/fpls.2024.1361716

Zhao S., Zhang Q., Liu M., Zhou H., Ma C., Wang P. Regulation of plant responses to salt stress. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4609. doi 10.3390/ijms22094609

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 18.08.2025. После доработки 01.10.2025. Принята к публикации 06.10.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1235-1245

doi 10.18699/vjgb-25-133

Валидация маркеров, разработанных для выявления локусов устойчивости к *Pyrenophora teres* f. *teres* на хромосомах ячменя 3H, 4H и 6H при полигенном наследовании признака

О.С. Афанасенко [1], Н.В. Мироненко [1], Н.М. Лашина [1], И.В. Розанова [2], Е.И. Кырова [1], Ю.С. Никольская [1], А.А. Зубкович [3]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург, Россия
[2] Научно-технологический университет «Сириус», Центр генетики и наук о жизни, Сочи, Россия
[3] Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию, Жодино, Беларусь
olga.s.afan@gmail.com

Аннотация. Возбудитель сетчатой пятнистости листьев ячменя *Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres* (*Ptt*) относится к эпифитотийно опасным патогенам ячменя. Разработка генетической защиты от этой болезни – важное звено ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий возделывания ячменя. Для селекции на устойчивость к *Ptt* необходимы эффективные маркеры QTL, контролирующих как качественную, так и количественную устойчивость. При проведении полногеномного анализа (GWAS) нами выявлены образцы ячменя различного происхождения, SNP-гаплотипы которых ассоциировались с локусами устойчивости одновременно на разных хромосомах. Целью исследований была валидация SNP-маркеров локусов устойчивости к *Ptt* на хромосомах 3H, 4H и 6H с использованием F_2 популяции от скрещивания шести устойчивых образцов к-5900, к-8829, к-8877, к-14936, к-30341 и к-18552 с восприимчивым сортом Tatum. Расщепление по устойчивости во всех комбинациях скрещиваний подтвердило наличие нескольких генетических детерминант устойчивости у изучаемых образцов. Для изучения полиморфизма родительских компонентов скрещиваний и соответствия фенотипа наличию/отсутствию маркера в расщепляющихся популяциях были разработаны праймеры со специфичным 3′-концом, CAPS- и KASP-маркеры. Значимая связь ($p < 0.05$) наличия CAPS-маркера JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII на хромосоме 6H и фенотипа устойчивости к *Ptt* у растений F_2 выявлена в комбинациях скрещивания восприимчивого сорта Tatum с образцами к-5900, к-8829, к-8877 и к-18552; на хромосоме 4H при фрагментном анализе значимая связь с фенотипом устойчивости в популяции F_2 с участием образца к-8877 выявлена для маркера JHI-Hv50k-2016-237924, образца к-5900 для маркера SCRI_RS_181886 и образца к-8829 для маркера JHI-Hv50k-2016-166356. Наличие QTL на хромосоме 6H, контролирующего качественную устойчивость у четырех образцов ячменя, маскирует проявление других генов с меньшим фенотипическим проявлением, что и является причиной несоответствия фенотипа устойчивости и наличия молекулярного маркера в расщепляющихся популяциях. Доноры устойчивости и молекулярные маркеры с доказанной эффективностью могут быть использованы в MAS для создания устойчивых к возбудителю сетчатой пятнистости сортов ячменя.

Ключевые слова: образцы ячменя; сетчатая пятнистость; устойчивость; SNP-маркеры; CAPS-маркеры; KASP-маркеры; доноры устойчивости

Для цитирования: Афанасенко О.С., Мироненко Н.В., Лашина Н.М., Розанова И.В., Кырова Е.И., Никольская Ю.С., Зубкович А.А. Валидация маркеров, разработанных для выявления локусов устойчивости к *Pyrenophora teres* f. *teres* на хромосомах ячменя 3H, 4H и 6H при полигенном наследовании признака. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1235-1245. doi 10.18699/vjgb-25-133

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ № 24-26-00072.

Validation of markers for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* loci on barley chromosomes 3H, 4H, and 6H in the polygenic inheritance of the trait

O.S. Afanasenko [1], N.V. Mironenko [1], N.M. Lashina [1], I.V. Rozanova [2], E.I. Kyrova [1], Yu.S. Nikolskaya [1], A.A. Zubkovich [3]

[1] All-Russian Research Institute of Plant Protection (VIZR), St. Petersburg, Russia
[2] Sirius University of Science and Technology, Center of Genetics and Life Sciences, Sochi, Russia
[3] Research and Practical Center of Agriculture of the National Academy of Sciences of Belarus, Zhodino, Belarus
olga.s.afan@gmail.com

© Афанасенко О.С., Мироненко Н.В., Лашина Н.М., Розанова И.В., Кырова Е.И., Никольская Ю.С., Зубкович А.А., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. The causal agent of net blotch *Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres* (*Ptt*) is a dangerous pathogen of barley. The development of genetic protection against this disease is a necessary link in resource-saving and environmentally friendly barley cultivation technologies. Effective QTL markers controlling both qualitative and quantitative resistance are required for breeding for resistance to *Ptt*. As a result of GWAS, we identified barley accessions of different origins, the SNP haplotypes of which were associated with resistance loci simultaneously on different barley chromosomes (VIR catalogue numbers: k-5900, k-8829, k-8877, k-14936, k-30341 and k-18552). The aim of the study was to validate SNP markers (MM) of *Ptt* resistance loci on chromosomes 3H, 4H and 6H in F_2 from crossing six resistant accessions with the susceptible variety Tatum. The observed segregation for resistance in all crossing combinations confirmed the presence of several genetic determinants of resistance in the studied accessions. To study the polymorphism of the parents from the crosses and the correspondence between the phenotypes to the presence/absence of the markers in the segregating populations, primers with a specific 3'-end, CAPS markers, and KASP markers were developed. A significant association ($p < 0.05$) between the presence of the CAPS marker JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII on chromosome 6H and the phenotype of resistance to *Ptt* in F_2 plants was revealed in crosses between the susceptible cultivar Tatum and accessions k-5900, k-8829, k-8877 and k-18552. On chromosome 4H, a significant association with the resistance phenotype in the F_2 population from the cross with accession k-8877 was revealed for marker JHI-Hv50k-2016-237924, and in that from the cross with accession k-5900, for marker SCRI_RS_181886. The presence of QTL on chromosome 6H, which controls qualitative resistance in four barley accessions, masks the expression of other genes, which explains the discrepancy between the resistance phenotype and the presence of molecular markers in the segregating populations. Resistance donors and molecular markers with proven efficacy can be used in marker-assisted selection (MAS) to develop barley cultivars resistant to net blotch.

Key words: barley; net blotch; landraces; resistance; SNP markers; CAPS markers; KASP markers

For citation: Afanasenko O.S., Mironenko N.V., Lashina N.M., Rozanova I.V., Kyrova E.I., Nikolskaya Yu.S., Zubkovich A.A. Validation of markers for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* loci on barley chromosomes 3H, 4H, and 6H in the polygenic inheritance of the trait *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(8):1235-1245. doi 10.18699/vjgb-25-133

Введение

Возбудитель сетчатой пятнистости листьев аскомицет *Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres* (анаморфа: *Drechslera teres* Sacc. (Shoem.) = *Helminthosporium teres*) относится к эпифитотийно опасным патогенам ячменя. Потери урожая от пятнистостей листьев на восприимчивых сортах при благоприятных для развития болезни условиях могут достигать 40 %, ежегодные потери оцениваются в 12–17 %. По нашим данным, большинство зарегистрированных в Госреестре как яровых, так и озимых сортов ячменя восприимчивы к возбудителю сетчатой пятнистости. Отчасти это связано с методическими сложностями работы с гемибиотрофными патогенами: сильная зависимость экспрессии устойчивости от факторов среды, неполное доминирование устойчивости и в связи с этим трудности отбора в расщепляющихся гибридных популяциях, сложное наследование признака устойчивости, обусловленное несколькими QTLs, эпистатические взаимодействия генов устойчивости.

Генетически защищенные от болезней сорта – необходимое звено ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий возделывания сельскохозяйственных культур. Разработка эффективной генетической защиты базируется на наличии генетически разнообразных доноров генов качественной и количественной устойчивости и рациональным размещением их, с учетом ареалов популяций фитопатогенов, в различных агроклиматических регионах. Своевременная смена генетически защищенных сортов позволяет стабилизировать популяционный состав фитопатогенов и снизить вероятность эпифитотий.

В настоящее время с использованием двуродительских картирующих популяций и технологии ассоциативного картирования (GWAS – genome wide associated studies) гены и локусы количественной устойчивости (QTL) к *P. teres* f. *teres* (*Ptt*) идентифицированы на всех хромосомах ячменя (Steffenson et al., 1996; Richter et al., 1998; Friesen et al., 2006; Manninen et al., 2006; Yun et al., 2006; Grewal et al., 2008, 2012; Gupta et al., 2010; Cakir et al., 2011; Liu et al., 2011; König et al., 2013, 2014; O'Boyle et al., 2014; Afanasenko et al., 2015, 2022; Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017; Amezrou et al., 2018; Martin et al., 2018; Dinglasan et al., 2019; Novakazi et al., 2019; Rozanova et al., 2019; Clare et al., 2021; Rehman et al., 2025). В наших исследованиях на основе полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) устойчивости ячменя к *Ptt* в коллекции, состоящей из 449 сортов и образцов ячменя, генотипированных с помощью SNP-chip 50K Illumina на 33818 маркерах, были обнаружены 15 локусов и 43 SNP, значимо ассоциированные с устойчивостью к *Ptt* (Novakazi et al., 2019). В результате этой работы выявлена группа устойчивых образцов ячменя, SNP-гаплотипы которых ассоциировались с локусами устойчивости одновременно на разных хромосомах ячменя, что свидетельствует, по-видимому, о наличии нескольких QTL и возможном аддитивном эффекте. Так, у шести устойчивых образцов ячменя, включенных в наше исследование (к-5900, к-8829, к-8877, к-14936, к-30341, к-18552), гаплотипы SNP-маркеров у каждого образца были ассоциированы с 5–8 локусами устойчивости на хромосомах 3H, 4H, 6H и 7H.

Выявленные в результате этих исследований и в работах других авторов молекулярные маркеры (MM) генов и локусов устойчивости к *P. teres* f. *teres* в большинстве случаев не были валидированы в другой генетической среде для их эффективного использования в селекции ячменя.

Целью исследований была валидация выявленных нами (Novakazi et al., 2019) и известных из литературы SNP-маркеров для локусов устойчивости к *Ptt* на хромосомах 3H, 4H и 6H в популяциях F_2, полученных от скрещивания шести устойчивых образцов с восприимчивым сортом Tatum.

Таблица 1. Происхождение и хромосомная локализация QTL, ассоциированных с устойчивостью образцов ячменя (Novakazi et al., 2019)

Номер по каталогу ВИР	Разновидность	Происхождение	Список QTL
к-5900	*pallidum*	Туркменистан	6H-1, 6H-2, 6H-3, 7H
к-8829		Италия	4H, 6H-1, 6H-2, 6H-3, 3H-1, 7H
к-8877		Испания	4H, 6H-1, 6H-2, 6H-3, 3H-1, 7H
к-14936		Таджикистан	4H, 6H-1, 6H-2, 6H-3, 7H
к-18552		Австралия	4H, 6H-1, 6H-2, 6H-3, 3H-1, 3H-2, 7H
к-30341	*nigrum*	Перу	4H, 6H-1, 6H-2, 3H-1, 7H

Примечание. Локусы находятся в интервалах, определенных с использованием ресурса Barleymap (https://barleymap.eead.csic.es/barleymap): 4H – 58942545–67692302 и 448603913–449611912 п.н., 6H-1 – 64219990–67138358 п.н., 6H-2 – 125903650–151127756 п.н., 6H-3 – 338755997–378210479 п.н., 3H-1 – 119627830–130790360 п.н., 3H-2 – 490244247–491381651 п.н., 7H – 5165127 п.н. Рядность всех образцов ячменя равна шести.

Материалы и методы

Генотипы ячменя. Для скрещивания и получения расщепляющихся популяций F_2 были выбраны шесть устойчивых образцов ячменя (номера по каталогу ВИР): к-5900, к-8829, к-8877, к-14936, к-18552 (сорт Zolo) и к-30341, у которых гаплотипы SNP-маркеров проявляли ассоциации с локусами устойчивости на разных хромосомах ячменя, в том числе и на хромосомах 3H, 4H, 6H. В качестве восприимчивого родителя был использован продуктивный сорт ячменя Tatum (разновидность *nutans*) из Германии. Характеристика образцов представлена в табл. 1.

Изоляты *P. teres* f. *teres*. Для оценки устойчивости при проведении GWAS были использованы пять изолятов *Ptt*: № 13 (Россия), Hoehenstedt (Германия), NFNB 50, NFNB 73 и NFNB 85 (Австралия) (Novakazi et al., 2019). В данном исследовании устойчивость шести образцов была изучена дополнительно к девяти изолятам *Ptt* различного происхождения (табл. S1)[1]. Для всех изолятов определена формула вирулентности на стандартном наборе сортов-дифференциаторов (Afanasenko et al., 2009) (табл. S2).

Изучение устойчивости ячменя к *P. teres* f. *teres*. Методы выделения гриба в чистую культуру, хранение, культивирование на модифицированной среде Чапека и получение суспензии конидий *Ptt* для инокуляции растений подробно описаны в работах (Afanasenko et al., 2022; Лашина и др., 2023). Родительские компоненты скрещивания и по 65 семян каждой гибридной популяции F_1 высевали в контейнеры с почвогрунтом Terra Vita® объемом 1 л. Растения культивировали в контролируемых условиях климатической комнаты ВИЗР при температуре 20–22 °С и 16-часовом фотопериоде в течение 10–14 дней. Инокуляцию растений ячменя проводили в фазе двух–трех листьев путем опрыскивания суспензией моноконидиальных изолятов из расчета 0.2 мл на растение. Титр конидий в суспензии составлял 6000 на 1 мл. После инокуляции растения накрывали полиэтиленовыми пакетами и оставляли на 48 ч при температуре 20–22 °С без света. Через двое суток зараженные растения переносили в светоустановки, оснащенные светодиодными светильниками серии TL-FITO VR с 16-часовым фотопериодом, и поддерживали влажность воздуха 60–70 %.

[1] Табл. S1– S14 и рис. S1–S8 см. в Приложении по адресу: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx47.pdf

Типы реакций проростков оценивали на втором листе через 10–12 суток после инокуляции по модифицированной десятибалльной шкале A. Tekauz (1985), где значения 1.0–4.9 баллов характеризовали устойчивость; 5.0–5.9 – промежуточный тип реакции; 6.0–10 – восприимчивость.

Разработка праймеров. Для валидации выявленных SNP-маркеров использовали три подхода: а) Allele-Specific PCR (AS_PCR) – разработка праймеров с 3′-концом, который расположен на позиции SNP интереса. В зависимости от соответствия (комплементарности) SNP 3′-конца целевому участку ДНК получается наличие или отсутствие продукта ПЦР-амплификации; б) Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) – детекция SNP с помощью CAPS-маркеров: исследуемый SNP находится в сайте распознавания рестрикционной эндонуклеазы. В результате полиморфизм продуктов рестрикции определяет наличие или отсутствие сайта рестрикции в ампликоне – разным генотипам будут соответствовать разные по длине фрагменты рестрикции в агарозном или полиакриламидном геле; в) Kompetitive allele specific PCR (KASP) – использование флуоресцентной системы генотипирования на основе ПЦР.

Позиция кандидатного SNP подтверждена с использованием ресурса Barleymap (https://barleymap.eead.csic.es/barleymap). Нуклеотидные последовательности, фланкирующие SNP (по 500 п.н. с каждой стороны), были экспортированы в базы данных Essembl Plants (http://plants.ensembl.org/index.html). Дизайн праймеров разрабатывался в программном пакете UGENE (v 49.1). Для CAPS-маркеров дополнительно использовался программный пакет SnapGene Viewer (https://www.snapgene.com) для анализа последовательности и подбора эндонуклеазы рестрикции, дифференцирующей генотипы по наличию/отсутствию сайта рестрикции в позиции SNP.

Для разработки KASP-маркеров нуклеотидные последовательности, фланкирующие ассоциированный с устойчивостью SNP (по 50 п.н. с каждой стороны), были экспортированы из базы данных Essembl Plants (http://plants.ensembl.org/index.html). На их основе разработаны специфичные к аллелям SNP последовательности праймеров для которых были использованы флуоресцентно меченные последовательности по протоколу, описанному в работе (Jatayev et al., 2017).

Выделение ДНК и условия проведения ПЦР. ДНК из замороженных листьев ячменя выделяли с помощью CTAB (цетилтриметиламмония бромид). Для этого первый лист каждого растения до инокуляции изолятом F18 растирали в ступке с жидким азотом с добавлением 2 % CTAB. Затем гомогенат лизировали при температуре 65 °C в течение двух часов. Очистку и экстракцию ДНК проводили по протоколу Murray, Thompson (1980). Осадок ДНК растворяли в деионизированной бидистиллированной стерильной воде до концентрации 100–150 мкг/мкл. Для амплификации использовали термоциклер C1000 (BIO-RAD). Реакцию проводили в 25 мкл: буфер (×10) – 2.5 мкл, $MgCl_2$ (50 mM) – 1.25 мкл, dNTP (10 mM) – 0.5 мкл, прямой и обратный праймеры (10 пмоль) – по 0.25 мкл, Taq-полимераза – 0.25 мкл, вода (бидистиллят) – 19.0 мкл, ДНК (10–20 нг) – 1.0 мкл. Для каждого праймера проводился подбор оптимальных условий ПЦР. Для большинства праймеров температура отжига составляла 60 °C. Праймеры приобретены в фирме Beagle Biotechnology (г. Санкт-Петербург, Россия). Рестрикцию эндонуклеазами HindIII, NruI и RsaI проводили согласно протоколам, предложенным фирмой-производителем (SibEnzyme), визуализацию продуктов рестрикции проводили в 2 % агарозном геле.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с использованием критерия χ^2. Расчеты выполняли в программе STATISTICA 13.0 (Statsoft, www.statsoft.com) и с применением методики, описанной в работе N. Pandis (2016). При $p < 0.05$ для критерия χ^2 дополнительно применялся точный тест Фишера.

Диагностическая эффективность тестируемых маркеров определялась как отношение суммы истинно положительных и истинно отрицательных результатов к общему числу исследованных растений.

Результаты

Устойчивость родительских компонентов скрещивания

Устойчивость родительских компонентов скрещивания изучена к девяти изолятам различного происхождения, принадлежащим к восьми патотипам *Ptt* (см. табл. S2). Все образцы ячменя отличались расоспецифической устойчивостью (табл. 2). К образцам к-8829, к-8877, к-14936 и к-18552 из девяти изученных изолятов один отличался вирулентностью, тогда как к образцу к-30341 четыре изолята были вирулентны.



Типы реакции родительских компонентов скрещиваний при заражении изолятом F18, в скобках указан балл поражения: *1* – Tatum (10), *2* – к-5900 (3), *3* – к-8829 (3.5), *4* – к-8877 (2), *5* – к-14936 (3), *6* – к-18552 (2), *7* – к-30341 (4).

Для анализа расщепления по устойчивости в гибридных популяциях F_2 от скрещивания устойчивых образцов ячменя с восприимчивым сортом Tatum был использован изолят F18, так как все изучаемые образцы были к нему устойчивы, а сорт Tatum демонстрировал максимальный тип реакции – 10 баллов (восприимчивость) (см. рисунок).

Расщепление по устойчивости к *Ptt* в популяциях F_2 от скрещивания устойчивых образцов ячменя с восприимчивым сортом Tatum

Фактическое расщепление по устойчивости в гибридных популяциях F_2 во всех комбинациях скрещиваний не соответствовало простому наследованию признака устойчивости как при объединении класса с промежуточными реакциями с классом устойчивых, так и с классом

Таблица 2. Тип реакции образцов ячменя на инокуляцию изолятами *P. teres* f. *teres*

Образец ячменя	Тип реакции, балл									
	F18	S18	B18	V13	Pr2	Ger7	Cz11.1	Can11	SA7	Среднее
к-5900	3	5	2	2	3	3	5	2	4	3.2
к-8829	3	4	2	1	4	6	4	3	2	3.2
к-8877	2	7	1	1	2	1	1	3	2	2.2
к-14936	3	2	3	3	2	1	6	2	1	2.9
к-18552	2	3	1	1	4	6	2	3	2	2.7
к-30341	4	4	4	9	7	8	8	5	2	5.7
Контроли устойчивости и восприимчивости										
Canadian Lake Shore (CLS) $QPtt3H_{CLS}$ (R)	1	3	3	2	3	5	1	3	2	2.6
C.I. 5791 $QPtt6H_{5791\ 55см}$ (R)	1	2	5	5	3	2	3	2	2	2.8
Harrington (S)	10	10	10	10	9	10	10	9	9	9.7
Tatum (S)	10	10	9	10	10	9	10	10	9	9.7

Таблица 3. Расщепление по устойчивости к изоляту F18 в популяции F_2 от скрещивания устойчивых образцов ячменя с восприимчивым сортом Tatum

Устойчивый образец	Реакция родителей		Число устойчивых/восприимчивых и с промежуточной реакцией растений в популяциях F_2		
	P1 устойчивый	P2 восприимчивый	Устойчивые	Промежуточный тип реакции	Восприимчивые
к-5900	3.0	10.0	8	7	38
к-8829	3.5	10.0	4	7	54
к-8877	2.0	9.0	28	11	25
к-14936	3.0	10.0	17	14	28
к-18552	2.0	9.0	31	8	24
к-30341	4.0	9.0	13	11	41

Примечание. Реакция родителей оценена по десятибалльной шкале A. Tekauz (1985).

Таблица 4. Позиции SNP-маркеров, ассоциированных с ювенильной устойчивостью к *Ptt* на хромосомах 4H, 3H и 6H

Маркер	Хромосома	Позиция на генетической и физической картах генома ячменя		Литературный источник
JHI-Hv50k-2016-237471	4H	50.00	58942545	Novakazi et al., 2019
JHI-Hv50k-2016-237347		50.00	57098155	
JHI-Hv50k-2016-237684		50.20	60114530	
JHI-Hv50k-2016-237839		50.30	61872363	
JHI-Hv50k-2016-241935		50.40	67692302	
JHI-Hv50k-2016-237924		50.99	63065507	
SCRI_RS_170494		52.00	448603913	Richards et al., 2017
SCRI_RS_181886		52.20	449611912	
SCRI_RS_153184		97.00	584761404	Amezrou et al., 2018
SCRI_RS_154517		2.00	2772827	Wonneberger et al., 2017
JHI-Hv50k-2016-183463	3H-2	54.53	491373166	Novakazi et al., 2019
JHI-Hv50k-2016-183478		54.53	491381651	
JHI-Hv50k-2016-183207		52.46	490244247	
JHI-Hv50k-2016-165152	3H-1	45.82	73225203	
JHI-Hv50k-2016-166392		47.1	130790360	
JHI-Hv50k-2016-166356		47.2	119627830	
JHI-Hv50k-2016-391380	6H-2	52.2	125903650	
BOPA2_12_31178	6H-3	55.00	378210479	Manninen et al., 2006

Примечание. Генетическая позиция определена из текущей версии MorexV3 (Mascher et al., 2021).

восприимчивых растений, что подтверждает наличие нескольких генетических детерминант устойчивости у изучаемых образцов (табл. 3).

Полиморфизм родительских компонентов скрещивания по молекулярным маркерам на хромосоме 4H

Для изучения полиморфизма родительских компонентов скрещиваний использовали праймеры со специфичным 3′-концом (табл. S3), CAPS-маркеры и конкурентную аллель-специфичную ПЦР (KASP-маркеры). Изучено 10 маркеров на хромосоме 4H: пять маркеров, которые были определены по данным GWAS, были ассоциированы с устойчивостью к изоляту № 13 *P. teres* f. *teres* в интервале 50.0–50.4 cM (Novakazi et al., 2019) и пять маркеров, которые были ассоциированы с устойчивостью к *Ptt* в работах других исследователей (Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017; Amezrou et al., 2018). Позиции всех 10 маркеров приведены в табл. 4. Для двух SNP-маркеров на хромосоме 4H были разработаны CAPS-маркеры.

При использовании эндонуклеазы рестрикции NruI для маркера JHI-Hv50k-2016-237684 различают два аллеля: при наличии аллеля T, где отсутствует сайт рестрикции, образуется фрагмент длиной 548 п. н.; при наличии аллеля C, который имеет сайт рестрикции, образуются фрагменты 197 и 351 п. н. При использовании эндонуклеазы рестрикции RsaI для маркера JHI-Hv50k-2016-237924 также можно различить два аллеля: аллель G разрезается на фрагменты 177, 105, 38, 55 п. н., а аллель C – на фрагменты 177, 29, 76, 38, 55 п. н. Четыре SNP-маркера на хромосоме 4H были преобразованы в формат KASP-маркеров (табл. S4).

Таблица 5. Результаты выявления полиморфных фрагментов рестрикции продуктов амплификации маркеров на хромосоме 4H у родительских компонентов скрещиваний

Маркер	Праймер	Рестриктаза	Фрагменты рестрикции продуктов амплификации у образцов ячменя, п. н.						
			к-5900	к-8829	к-8877	к-14936	к-18552	к-30341	Tatum
JHI-Hv50k-2016-237684	4H-684	NruI	548	351, 197	351, 197	351, 197	548	351, 197	548
JHI-Hv50k-2016-237924	4H-924	RsaI	177, 105, 55, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 105, 55, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 105, 55, 38

Таблица 6. Полиморфизм KASP-маркеров на хромосоме 4H у родительских компонентов

Образец ячменя	4H-471	4H-839	4H-935	4H-347
Tatum	CC	GG	GG	CC
к-8829	GG	AA	AA	AA
к-14936	GG	AA	AA	AA
к-8877	AA	AA	AA	AA

Фрагментный анализ

Результаты тестирования разработанных праймеров на родительских компонентах скрещивания приведены в табл. S5. Критерием перспективного маркера считали наличие продуктов амплификации для устойчивых генотипов ячменя и отсутствие для восприимчивого или наоборот. Полиморфизм по наличию продуктов амплификации у определенных генотипов ячменя выявлен для маркеров JHI-Hv50k-2016-237924 (4H-924), SCRI_RS_153184 (4H-184) и SCRI_RS_181886 (4H-886). На рис. S1 представлен пример выявления полиморфизма у родительских компонентов скрещивания с использованием маркера SCRI_RS_181886. Наличие продукта амплификации как у устойчивых, так и восприимчивого генотипов ячменя обнаружено с использованием праймеров остальных восьми маркеров.

Анализ длины фрагментов продуктов амплификации маркеров после обработки рестриктазами

Рестрикционный анализ продуктов амплификации выявил полиморфизм для маркеров JHI-Hv50k-2016-237684 и JHI-Hv50k-2016-237924 (табл. 5): маркер JHI-Hv50k-2016- 237684 (рестриктаза NruI): у четырех устойчивых образцов к-8829, к-8877, к-14936, к-30341 выявлены два фрагмента, 351 и 197 п. н. Продукт амплификации восприимчивого сорта Tatum и образцов к-5900 и к-18552 имел длину 548 п. н. (рис. S2); маркер JHI-Hv50k-2016-237924 (рестриктаза RsaI): у устойчивых образцов к-8829, к-8877, к-14936, к-30341 выявлены пять фрагментов, у восприимчивого сорта Tatum и образцов к-5900 и к-18552 – четыре фрагмента (см. рис. S2). Таким образом, для изучения косегрегации ММ и признака устойчивости в расщепляющихся популяциях ячменя использованы маркеры JHI-Hv50k-2016-237684 и JHI-Hv50k-2016-237924 и соответствующие рестриктазы NruI и RsaI для расщепления продуктов амплификации обоих маркеров.

Результаты изучения полиморфизма по KASP-маркерам на хромосоме 4H родительских компонентов скрещивания представлены в табл. 6. Аллельный полиморфизм устойчивых образцов и восприимчивого сорта Tatum выявлен для четырех маркеров JHI-Hv50k-2016-237471 (4H-471), JHI-Hv50k-2016-237839 (4H-839), JHI-Hv50k-2016-241935 (4H-935) и JHI-Hv50k-2016-237347 (4H-347), которые были использованы для изучения косегрегации фенотипа устойчивости и генотипа маркера.

Полиморфизм молекулярных маркеров на хромосоме 3H у родительских компонентов, использованных для скрещивания

По данным GWAS, устойчивость образцов к-8829, к-8877, к-18552 и к-30341 ассоциирована также с локусами 3H-1 и 3H-2 (см. табл. 1 и 4). Ранее нами были валидированы в расщепляющихся популяциях KASP-маркеры этих локусов на хромосоме 3H, которые были высокоэффективны (более 80 %) у генотипов ячменя CLS, Morex и Fox – носителей главного гена резистентности *qPttCLS* (Afanasenko et al., 2022). Эти KASP-маркеры, находящиеся в интервале 45.82–47.2 и 52.46–54.53 cM, были использованы для анализа расщепляющихся популяций, полученных от скрещивания сорта Tatum с устойчивыми к *Ptt* образцами (табл. S6).

Для фрагментного анализа продуктов амплификации маркеров на хромосоме 3H были также использованы праймеры, предложенные в работе (Afanasenko et al., 2022) (табл. S7). При фрагментном анализе полиморфизм по наличию продуктов амплификации у трех устойчивых образцов (к-8877, к-5900 и к-8829) и восприимчивого сорта Tatum выявлен только для маркера JHI-Hv50k-2016-166356, который был использован для анализа расщепляющихся популяций. Для остальных шести маркеров наблюдалось отсутствие полиморфизма между устойчивыми образцами и восприимчивым сортом Tatum.

При использовании KASP-маркеров полиморфизм по SNP-гаплотипам выявлен только у одного устойчивого образца к-14936 (GG) и восприимчивого сорта Tatum (CC) и только для маркера JHI-Hv50k 2016-165152. KASP-маркеры JHI-Hv50k-2016-166392, JHI-Hv50k-2016-183463, JHI-Hv50k-2016-183207 показывали гетерозиготные SNP-гаплотипы, что делает их непригодными для маркирования образцов (табл. S8).

Полиморфизм родительских компонентов скрещивания по молекулярным маркерам на хромосоме 6H

Устойчивость изучаемых образцов ассоциирована также с несколькими локусами на хромосоме 6H (см. табл. 1 и 4). Ранее с использованием дигаплоидных картирующих популяций на хромосоме 6H в интервале 52.00–55.03 cM у образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874 был определен большой ген *RPt5*, детерминирующий высокую качествен-

ную устойчивость к *Ptt* (Manninen et al., 2006; Потокина и др., 2010; Koladia et al., 2017). Результаты GWAS (Novakazi et al., 2019) подтвердили в этом интервале наличие локусов устойчивости, маркеры которых были объединены в четыре группы в зависимости от их расположения на генетической и физической картах ячменя (см. табл. 1 и 4). В предыдущих исследованиях, с использованием в качестве тестерных генотипов образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874, нами была показана эффективность двух маркеров локусов устойчивости на хромосоме 6H, которые были использованы в данном исследовании (см. табл. 4): JHI-Hv50k-2016-391380 (6H-380) в позиции 52.20 (6H-2) и BOPA2_12_31178 (6H-178) в позиции 55.03 cM (6H-3) (неопубликованные данные). На основе маркера 6H-380 разработан CAPS-маркер с использованием рестриктазы HindIII. Аллель A: сайт рестрикции → два фрагмента 282 и 254 п. н.; аллель G: нерасщепленный фрагмент, размером 536 п. н.

Праймеры для маркеров, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres* f. *teres* на хромосоме 6H, приведены в табл. S9. Оба маркера показали полиморфизм для родительских компонентов скрещивания. Маркер 6H-380: рестриктаза HindIII не расщепляла продукт амплификации маркера 6H-380 у всех шести устойчивых генотипов (один фрагмент), но расщепляла у восприимчивого сорта Tatum (два фрагмента). Маркер 6H-178 выявил полиморфизм между устойчивыми образцами ячменя к-5900, к-8829 и восприимчивом сортом Tatum (рис. S3).

Изучение косегрегации устойчивости к *Ptt* и молекулярных маркеров в расщепляющихся популяциях

Для изучения косегрегации по устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости и выявленных полиморфных маркеров на хромосомах 4H, 3H и 6H в каждой гибридной популяции были отобраны 10 устойчивых и 10 восприимчивых линий. В некоторых комбинациях скрещиваний для подтверждения результатов расщепления анализируемая выборка гибридных растений была расширена до 40: 20 устойчивых и 20 восприимчивых.

Фрагментный анализ с использованием полиморфных молекулярных маркеров

Результаты соответствия фенотипа устойчивости растений F_2 с наличием/отсутствием продуктов амплификации ММ представлены в табл. 7. Значимая связь между маркером и устойчивостью растений при использовании критерия χ^2 выявлена для маркера 3H-56 в комбинации Tatum × к-8829, но точный тест Фишера не подтвердил достоверность ассоциации (см. табл. 7).

Достоверная связь признака устойчивости растений F_2 и маркера 4H-924 выявлена в комбинации скрещивания Tatum × к-8877, а также маркера 4H-886 (F × Rin1) в комбинации Tatum × к-5900. Для остальных изученных ММ, несмотря на полиморфность на родительских компонентах скрещиваний, достоверная связь с устойчивостью в расщепляющихся популяциях не выявлена. Полученные данные свидетельствуют о наличии QTL устойчивости к *Ptt* на хромосоме 4H у образцов к-8829, к-8877 и к-5900.

Анализ соответствия фенотипа устойчивости растений F_2 и продуктов рестрикции CAPS-маркеров

Полиморфными на родительских компонентах скрещиваний по размерам продуктов рестрикции оказались два маркера на хромосоме 4H: 4H-684 NruI и 4H-924 RsaI. На рис. S4 и S5 демонстрируется полиморфизм фрагментов рестрикции маркера 4H-684 эндонуклеазой NruI в потомстве скрещивания Tatum × к-8829 и Tatum × к-8877.

Таблица 7. Достоверность связи признака устойчивости к *Ptt* и молекулярных маркеров, полиморфных на родительских компонентах скрещивания (фрагментный анализ)

Комбинация скрещивания сорта Tatum и устойчивых образцов	Маркер (праймеры)	χ^2	*p*-value
к-8829	4H-184 (F × R)	2.50	> 0.05
	4H-347 (F × R1)	**4.62**	**< 0.05**
	6H-178 (F × R)	2.50	> 0.05
	3H-56 (F × R)	**4.29**	**< 0.05**
к-8877	**4H-924 (Fin1 × Rout)**	**7.07**	**< 0.05**
	4H 886 (F × R)	0.00	> 0.05
	3H-56 (F × R)	3.14	> 0.05
к-14936	4H-924 (Fin1 × Rout)	0.19	> 0.05
	4H 886	2.33	> 0.05
к-30341	4H-924 (Fin2 × Rout)	0.40	> 0.05
	4H 886 (F × Rin1)	0.00	> 0.05
к-5900	**4H-886 (F × Rin1)**	**4.41**	**< 0.05**
	6H-178 (F × R)	2.61	> 0.05
	3H-56 (F × R)	0.01	> 0.05
к-18552	4H-924	0.02	> 0.05

Примечание. Связь фенотипа устойчивости и маркера значима при $p < 0.05$, отмечена полужирным шрифтом.

Таблица 8. Соответствие фенотипической устойчивости и продуктов рестрикции CAPS-маркера JHI-Hv50k-2016-391380 (HindIII) на хромосоме 6H в F_2 от скрещивания устойчивых образцов и восприимчивого сорта Tatum

Комбинация скрещивания восприимчивого сорта Tatum с устойчивыми образцами	Размер продукта рестрикции	Генотип	У	В	Расчетное значение χ^2	Достоверность *p*
к-18552	**536**	**GG (У)**	**4**	**0**	**34.693**	**< 0.001**
	536, 282, 254	**AG**	**14**	**0**		
	282, 254	**AA (В)**	**0**	**10**		
к-8877	**536**	**GG (У)**	**13**	**0**	**21.0115**	**< 0.05**
	536, 282, 254	**AG**	**6**	**13**		
	282, 254	**AA (В)**	**1**	**8**		
к-14936	536	GG (У)	6	3	1.54553	> 0.05
	536, 282, 254	AG	9	12		
	282, 254	AA (В)	3	4		
к-8829	**536**	**GG (У)**	**5**	**1**	**10.37037**	**< 0.05**
	536, 282, 254	**AG**	**0**	**6**		
	282, 254	**AA (В)**	**0**	**2**		
к-5900	**536**	**GG (У)**	**3**	**1**	**6.831019**	**< 0.05**
	536, 282, 254	**AG**	**5**	**10**		
	282, 254	**AA (В)**	**0**	**7**		
30341	536	GG (У)	2	2	0.31111	> 0.05
	536, 282, 254	AG	5	4		
	282, 254	AA (В)	2	3		

Примечание. У – устойчивость, В – восприимчивость. Связь фенотипа устойчивости и маркера значима при $p < 0.05$, отмечена полужирным шрифтом. Минимальное табличное значение χ^2 при уровне значимости α, равном 0.05, составило 5.991 для всех образцов.

Статистически значимой связи между генотипом и фенотипом устойчивости к болезни не обнаружено ($p > 0.05$) (табл. S10). Выявленная значимая связь признаков для маркера 4H-924 при фрагментном анализе отсутствовала при использовании CAPS-маркера 4H-924 RsaI.

На хромосоме 6H полиморфизм по размерам продуктов рестрикции выявлен для маркера JHI-Hv50k-2016-391380, HindIII (6H-380 HindIII) на восприимчивом сорте Tatum и устойчивых образцах к-18552, к-8877, к-14936, к-8829, к-5900 и к-30341. Значимая связь ($p < 0.05$) между генотипом и фенотипом устойчивости к *Ptt* у растений F_2 выявлена в комбинациях Tatum × к-18552, Tatum × к-8877, Tatum × к-8829 и Tatum × к-5900 (табл. 8, рис. S6–S8). Таким образом, образцы к-18552, к-8877, к-8829 и к-5900 имеют QTL устойчивости на хромосоме 6H в позиции 52.2 сМ.

Результаты KASP-генотипирования

В трех комбинациях скрещиваний устойчивые родители к-8829, к-14936, к-8877 и восприимчивый сорт Tatum были полиморфны по SNP-гаплотипам ММ на хромосоме 4H. В гибридных комбинациях с участием образца к-8829 только для маркера 4H-471 диагностическая эффективность была более 0.5 (0.6), для остальных маркеров этот показатель был <0.5. В комбинации Tatum × к-8877 диагностическая эффективность маркеров 4H-471, 4H-935 и 4H-347 составляла 0.71–0.73 (табл. S11).

Для KASP-маркера JHI-Hv50k-2016-165152 на хромосоме 3H аллельный полиморфизм выявлен у сорта Tatum (CC) и образца к-14936 (GG). В расщепляющейся популяции от их скрещивания не обнаружено соответствия устойчивости растений и их гаплотипов (см. табл. S11).

QTL на хромосоме 6H, который выявляет маркер 6H380 HindIII, у четырех образцов ячменя детерминирует их высокую устойчивость к *Ptt* и маскирует наличие других QTL (табл. S12– S14). Поэтому признак устойчивости не коррелирует с остальными изученными молекулярными маркерами. Другое дело – отсутствие/присутствие ММ у восприимчивых растений определенной гибридной комбинации. Например, в классе восприимчивых растений F_2 в комбинации Tatum × к-8877 гомозиготы восприимчивого родителя для маркера 4H-924 RsaI составляли 100 %, маркера 4H-684 NruI – шесть растений из десяти были гомозиготными и два гетерозиготными по восприимчивости. Такие же результаты получены и для KASP-маркеров: по всем четырем маркерам из десяти восприимчивых растений шесть оказались гомозиготными по аллелю восприимчивого родителя и три гетерозиготными. В этой комбинации скрещивания четыре маркера на хромосоме 4H имели диагностическую эффективность более 0.7 (см. табл. S12).

В комбинации к-8829 × Tatum преобладали восприимчивые растения. Расщепление по фенотипу устойчивости составило 4 (У):7(УВ):54(В), поэтому в анализ были включены только эти четыре устойчивых растения и десять восприимчивых. По CAPS-маркерам 6H380HindIII и 4H-684NruI, а также KASP-маркеру 4H-471 все гетерозиготные растения ассоциировались с восприимчивостью,

что предполагает рецессивный характер наследования. По маркеру 4H-924RsaI все восприимчивые растения имели генотип восприимчивого родителя (см. табл. S13).

В комбинации к-5900 × Tatum кроме доказанной значимой корреляции CAPS-маркера 6H380 HindIII и маркера 4H-886 (F × Rin1) при фрагментном анализе нет очевидного соответствия наличия/отсутствия маркеров 6H-178 и 3H-56 в группе восприимчивых растений (см. табл. S14).

Обсуждение

В настоящее время с использованием технологии GWAS и картирования в дигаплоидных популяциях идентифицировано 103 локуса, ассоциированных с ювенильной и взрослой устойчивостью к *Ptt* и большое число ММ (Steffenson et al., 1996; Richter et al., 1998; Friesen et al., 2006; Manninen et al., 2006; Yun et al., 2006; Grewal et al., 2008, 2012; Cakir et al., 2011; Liu et al., 2011; Berger et al., 2013; König et al., 2013, 2014; O'Boyle et al., 2014; Afanasenko et al., 2015, 2022; Wang et al., 2015; Koladia et al., 2017; Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017; Amezrou et al., 2018; Martin et al., 2018; Dinglasan et al., 2019; Novakazi et al., 2019; Rozanova et al., 2019; Rehman et al., 2025). Однако имеются только единичные публикации, в которых представлены результаты валидации выявленных в GWAS маркеров QTL устойчивости к *Ptt* в другой генетической среде (Grewal et al., 2010; Afanasenko et al., 2022).

Для селекции ячменя на устойчивость к *Ptt* необходимы эффективные маркеры QTL, контролирующих как качественную, так и количественную устойчивость. Для валидации выявленных в GWAS (Richards et al., 2017; Amezrou et al., 2018; Novakazi et al., 2019) SNP-маркеров локусов устойчивости к *Ptt* на хромосомах 3H, 4H и 6H были выбраны образцы ячменя, SNP-гаплотипы которых ассоциировались с несколькими локусами устойчивости к *Ptt* (см. табл. 1). Эти образцы отличались устойчивостью к широкому спектру патотипов *Ptt* в ювенильной фазе (см. табл. 2) и на провокационном фоне (поздний посев) в фазе взрослых растений в поле (неопубликованные данные).

Анализ расщепления по ювенильной устойчивости в F_2 от скрещивания этих образцов с восприимчивым сортом Tatum свидетельствовал о сложном наследовании признака, что подтверждало результаты GWAS. Особенностью оценки устойчивости в расщепляющихся популяциях к *Ptt*, также, как и к другим гемибиотрофным патогенам, является наличие группы растений с промежуточными реакциями (баллы 5.0–5.9). При наличии нескольких QTL у родительских компонентов скрещивания промежуточные реакции растений обусловлены наличием рекомбинантов с различным числом генетических детерминант устойчивости и различными генными взаимодействиями.

На хромосоме 4H известно несколько локусов устойчивости к *Ptt* в интервалах: 1.13 cM (Grewal et al., 2008), 3.31 cM (Afanasenko et al., 2015; Wonneberger et al., 2017), 47.27–52.69 cM (Richards et al., 2017; Novakazi et al., 2019), 64.3 cM (Steffenson et al., 1996), 77.0 cM (Martin et al., 2018), 97.66 cM (Amezrou et al., 2018), 113.1 cM (Martin et al., 2018), 121–123 cM (König et al., 2014), 150–175 cM (Friesen et al., 2006).

В нашей работе изучены маркеры локуса, находящегося на хромосоме 4H в интервале 50.0–50.4 cM, выявленного нами ранее в результате GWAS (Novakazi et al., 2019), а также маркеры локусов, определенных другими исследователями в интервале 52.0–52.2 cM (Richards et al., 2017), 97.00–97.20 cM (Amezrou et al., 2018) и в позиции 2.0 cM (Wonneberger et al., 2017). Выбор ММ для изучения косегрегации в расщепляющихся популяциях был основан на корреляции определенных SNP-гаплотипов выявленных в GWAS маркеров с фенотипом устойчивости. Так, на хромосоме 4H выявлено четыре «пиковых» маркера, ассоциированных с устойчивостью к изоляту № 13 *Ptt* у 98 образцов ячменя; средний балл поражения 3.54 (табл. 9). SNP-гаплотипы CCAT этих четырех маркеров были ассоциированы с устойчивостью, тогда как SNP-гаплотипы этих же маркеров GTGC были ассоциированы с восприимчивостью (средний балл поражения 5.45) у 347 образцов ячменя. (Данные любезно предоставлены F. Novakazi.) Однако среди 98 образцов – 16 с гаплотипом CCAT были восприимчивы к патогену, а среди 347 образцов 147 отличались устойчивостью, хотя и имели гаплотип GTGC. Эти данные свидетельствуют, что, несмотря на ассоциацию определенных гаплотипов SNP-маркеров с устойчивостью, возможны случайные комбинации тех же SNP-гаплотипов у восприимчивых образцов и наоборот, что предполагает возможность ложной предпосылки о наличии у определенных образцов локусов, ассоциированных с устойчивостью, выявляемых в GWAS.

Для большинства изученных маркеров локусов устойчивости на хромосомах 3H, 4H и 6H не выявлено полиморфизма по ММ у родительских компонентов скрещивания (устойчивый образец × восприимчивый сорт Tatum).

Из 10 маркеров и 28 различных комбинаций праймеров этих маркеров на хромосоме 4H только три оказались полиморфными при фрагментном анализе ПЦР, два при использовании их как CAPS-маркеров, и один KASP-маркер был полиморфен на родительских компонентах скрещивания только в одной комбинации. Достоверная связь признака устойчивости растений F_2 и маркера 4H-924 выявлена в комбинации скрещивания Tatum × к-8877, а также маркера 4H-886 (F × Rin1) в комбинации Tatum × к-5900. Полученные данные свидетельствуют о возможности ис-

Таблица 9. Средний балл поражения изолятом *P. teres* f. *teres* № 13 образцов ячменя с определенными SNP-гаплотипами четырех маркеров на хромосоме 4H

JHI-Hv50k-2016-237471, 50.0 cM	JHI-Hv50k-2016-237684, 50.2 cM	JHI-Hv50k-2016-237839, 50.3 cM	JHI-Hv50k-2016-241935, 50.4 cM	Число образцов	Средний балл поражения
C	C	A	C	4	3.66
C	C	A	T	98	3.54
G	T	G	C	347	5.45

пользования этих маркеров в селекции, если в качестве доноров устойчивости к *Ptt* будут привлечены образцы к-8877 и к-5900.

В исследованиях, проведенных ранее, определение эффективности SNP-маркеров локуса устойчивости на хромосоме 3H в интервале 46.29–54.3 cM путем KASP-генотипирования позволило выявить пять маркеров, которые в дигаплоидной популяции и в двух расщепляющихся популяциях были эффективны на 100–80 % и ассоциировались с устойчивостью у сортов CLS, Morex, Fox и образца к-21578 (Afanasenko et al., 2022). Показано, что в локусе устойчивости на хромосоме 3H имеется, по крайней мере, два QTL, контролирующих устойчивость к *Ptt* в интервале 46.00–48.44 и 51.27–54.80 cM (Afanasenko et al., 2022). В нашем исследовании для изучения расщепляющихся популяций ячменя были использованы те же маркеры, находящиеся в интервале 45.82–47.2 cM (3H-1) и 52.46–54.53 cM (3H-2) (см. табл. 4). Из семи изученных пар праймеров маркеров на хромосоме 3H только один маркер JHI-Hv50k-2016-166356 (3H-56) выявлял полиморфизм пяти устойчивых образцов с сортом Tatum, но только в одной комбинации скрещивания Tatum × к-8829 выявлена значимая связь между маркером и устойчивостью растений. Не обнаружена корреляция этих же маркеров с фенотипом устойчивости при использовании KASP-генотипирования.

Устойчивость изучаемых образцов была ассоциирована также с несколькими локусами на хромосоме 6H. Ранее с использованием дигаплоидных картирующих популяций на хромосоме 6H в интервале 52.00–55.03 cM у образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874 был определен большой ген *RPt5*, детерминирующий высокую качественную устойчивость к *Ptt* (Manninen et al., 2006; Потокина и др., 2010; Koladia et al., 2017). В результате GWAS (Novakazi et al., 2019) в этом интервале также были выявлены локусы устойчивости, маркеры которых были объединены в четыре группы в зависимости от их расположения на генетической и физической картах ячменя (см. табл. 4). Ранее с использованием в качестве тестерных генотипов образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874 нами была показана эффективность двух маркеров локусов устойчивости на хромосоме 6H, которые были использованы в данном исследовании: JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII (6H-380) в позиции 52.20 (6H-2) и BOPA2_12_31178 (6H-178) в позиции 55.03 cM (6H-3) (неопубликованные данные).

Значимая связь ($p < 0.05$) маркера JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII (6H-380) и фенотипа устойчивости к *Ptt* у растений F_2 выявлена в комбинациях от скрещивания восприимчивого сорта Tatum с образцами к-5900 (Туркменистан), к-8829 (Италия), к-8877 (Испания) и к-18552 (Австралия). Эти данные свидетельствуют о возможности использования этих образцов в качестве доноров устойчивости и CAPS-маркера JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII в маркер-ориентированной селекции (MAS).

Известно, что QTLs на хромосоме 6H в изучаемом локусе контролируют высокую устойчивость у генотипов ячменя (Afanasenko et al., 1998; Manninen et al., 2006; Koladia et al., 2017). Наличие высоко значимой связи фенотипа устойчивости растений F_2 в четырех комбинациях скрещиваний с участием образцов к-5900, к-8829, к-8877 и к-18552 SNP-гаплотипа маркера 6H-380 HindIII маскирует наличие других QTL. Однако в классе восприимчивых растений в определенной комбинации скрещивания маркеры должны соответствовать генотипу восприимчивого родителя. Например, KASP-маркеры 4H-471, 4H-347 и 4H-935 и CAPS-маркер 4H-924 RsaI в комбинации с участием образца к-8877 могут быть эффективны для выбраковки восприимчивых растений, в то время как при использовании всей выборки растений достоверной корреляции фенотипов устойчивости и генотипов этих маркеров не выявлено.

Заключение

Таким образом, отсутствие/присутствие продуктов амплификации полиморфного на родительских компонентах скрещивания маркера у устойчивых растений F_2 при полигенном наследовании не может быть доказательством, что нет корреляции маркера и признака устойчивости, так как наличие большого (major) гена устойчивости маскирует проявление других QTL.

Выявлены новые доноры устойчивости к *Ptt*: образцы к-5900 (Туркменистан), к-8829 (Италия), к-8877 (Испания) и к-18552 (Австралия), у которых QTL на хромосоме 6H находится в позиции 52.2 cM, 125903650 п. н. У образцов к-8877 и к-5900 также имеется QTL на хромосоме 4H в интервале 50.00–50.99 cM, 57098155–63065507 п. н., а у образца к-8829 QTL на хромосоме 3H в позиции 47.2 cM, 119627830 п. н. Доноры устойчивости и валидированные ММ с доказанной эффективностью могут быть использованы в MAS для создания устойчивых к возбудителю сетчатой пятнистости сортов ячменя.

Список литературы / References

Лашина Н.М., Мироненко Н.В., Зубкович А.А., Афанасенко О.С. Ювенильная устойчивость сортов и образцов ячменя к net-, spot- и гибридной (net × spot) формам *Pyrenophora teres*. *Микология и фитопатология*. 2023;57(1):48-59. doi 10.31857/S0026364823010099

[Lashina N.M., Mironenko N.V., Zubkovich A.A., Afanasenko O.S. Juvenile resistance of barley varieties and samples to net-, spot- and hybrid (net × spot) forms of *Pyrenophora teres*. *Mycol Phytopathol*. 2023;57(1):48-59. doi 10.31857/S0026364823010099 (in Russian)]

Потокина Е.К., Хедлэй П., Афанасенко О.С., Лашина Н.М., Анисимова А.В., Козьяков А.В., Ялли М., Маннинен О. Картирование QTL (Quantitative Trait Loci), детерминирующих устойчивость к сетчатой пятнистости ячменя. В: Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб., 2010;229-236

[Potokina E.K., Hedley P., Afanasenko O.S., Lashina N.M., Anisimova A.V., Kozyakov A.V., Yalli M., Manninen O. Mapping of QTL (Quantitative Trait Loci) determining resistance to net blotch of barley. In: Technologies for creating and using varieties and hybrids with group and complex resistance to pests in plant protection. St. Petersburg, 2010;229-236 (in Russian)]

Afanasenko O., Jalli M., Pinnschmidt H., Filatova O., Platz G. Development of an international standard set of barley differential genotypes for *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Plant Pathol*. 2009;58(4):665-676. doi 10.1111/j.1365-3059.2009.02062.x

Afanasenko O.S., Koziakov A.V., Hedlay P.E., Lashina N.M., Anisimova A.V., Manninen O., Jalli M., Potokina E.K. Mapping of

the loci controlling the resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Cochliobolus sativus* in two double haploid barley populations. *Russ J Genet Appl Res.* 2015;5(3):242-253. doi 10.1134/S2079059715030028

Afanasenko O., Rozanova I., Gofman A., Lashina N., Novakazi F., Mironenko N., Baranova O., Zubkovich A. Validation of molecular markers of barley net blotch resistance loci on chromosome 3H for marker-assisted selection. *Agriculture*. 2022;12(4):439. doi 10.3390/agriculture12040439

Amezrou R., Verma R.P.S., Chao S., Brueggeman R.S., Belgadi L., Arbaoui M., Rehman S., Gyawali S. Genome-wide association studies of net form of net blotch resistance at seedling and adult plant stages in spring barley collection. *Mol Breed*. 2018;38:58. doi 10.1007/s11032-018-0813-2

Cakir M., Gupta S., Li C., Hayden M., Mather D.E., Ablett G.A., Platz G.J., Broughton S., Chalmers K.J., Loughman R., Jones M.G.K., Lance R.C.M. Genetic mapping and QTL analysis of disease resistance traits in the barley population Baudin×AC Metcalfe. *Crop Pasture Sci*. 2011;62(2):152-161. doi 10.1071/cp10154

Clare S.J., Çelik Oğuz A., Effertz K., Sharma Poudel R., See D., Karakaya A., Brueggeman R.S. Genome-wide association mapping of *Pyrenophora teres* f. *maculata* and *Pyrenophora teres* f. *teres* resistance loci utilizing natural Turkish wild and landrace barley populations. *G3*. 2021;11(11):jkab269. doi 10.1093/g3journal/jkab269

Dinglasan E., Hickey L., Ziems L., Fowler R., Anisimova A., Baranova O., Lashina N., Afanasenko O. Genetic characterization of resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in the International barley differential Canadian lake Shore. *Front Plant Sci.* 2019;10:326. doi 10.3389/fpls.2019.00326

Friesen T.L., Faris J.D., Lai Z., Steffenson B.J. Identification and chromosomal location of major genes for resistance to *Pyrenophora teres* in a doubled-haploid barley population. *Genome*. 2006;49(7):855-859. doi 10.1139/g06-024

Grewal T.S., Rossnagel B.G., Pozniak C.J., Scoles G.J. Mapping quantitative trait loci associated with barley net blotch resistance. *Theor Appl Genet*. 2008;116(4):529-539. doi 10.1007/s00122-007-0688-9

Grewal T.S., Rossnagel B.G., Scoles G.J. Mapping quantitative trait loci associated with spot blotch and net blotch resistance in a doubled-haploid barley population. *Mol Breed.* 2012;30(1):267-279. doi 10.1007/s11032-011-9616-4

Gupta S., Li C.D., Loughman R., Cakir M., Platz G., Westcott S., Bradley J., Broughton S., Lance R. Quantitative trait loci and epistatic interactions in barley conferring resistance to net type net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) isolates. *Plant Breed*. 2010;129(4):362-368. doi 10.1111/j.1439-0523.2009.01716.x

Jatayev S., Kurishbayev A., Zotova L., Khasanova G., Serikbay D., Zhubatkanov A., Botayeva M., Zhumalin A., Turbekova A., Soole K., Langridge P., Shavrukov Yu. Advantages of Amplifluor-like SNP markers over KASP in plant genotyping. *BMC Plant Biol*. 2017;17(2):254. doi 10.1186/s12870-017-1197-x

Koladia V.M., Faris J.D., Richards J.K., Brueggeman R.S., Chao S., Friesen T.L. Genetic analysis of net-form net blotch resistance in barley lines CIho 5791 and Tifang against a global collection of *P. teres* f. *teres* isolates. *Theor Appl Genet.* 2017;130(1):163-173. doi 10.1007/s00122-016-2801-4

König J., Perovic D., Kopahnke D., Ordon F. Development of an efficient method for assessing resistance to the net type of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in winter barley and mapping of quantitative trait loci for resistance. *Mol Breed*. 2013;32:641-650. doi 10.1007/s11032-013-9897-x

König J., Perovic D., Kopahnke D., Ordon F. Mapping seedling resistance to net form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in barley using detached leaf assay. *Plant Breed.* 2014;133(3):356-365. doi 10.1111/pbr.12147

Liu Z., Ellwood S.R., Oliver R.P., Friesen T.L. *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Mol Plant Pathol.* 2011;12(1):1-19. doi 10.1111/j.1364-3703.2010.00649.x

Manninen O.M., Jalli M., Kalendar R., Schulman A., Afanasenko O., Robinson J. Mapping of major spot-type and net-type net-blotch resistance genes in the Ethiopian barley line CI 9819. *Genome*. 2006;49(12):1564-1571. doi 10.1139/g06-119

Martin A., Platz G.J., de Klerk D., Fowler R.A., Smit F., Potgieter F.G., Prins R. Identification and mapping of net form of net blotch resistance in South African barley. *Mol Breed.* 2018;38(5):53. doi 10.1007/s11032-018-0814-1

Mascher M., Wicker T., Jenkins J., Plott C., Lux T., Koh C.S., Ens J., … Šimková H., Moscou M.J., Grimwood J., Schmutz J., Stein N. Long-read sequence assembly: A technical evaluation in barley. *Plant Cell*. 2021;33(6):1888-1906. doi 10.1093/plcell/koab077

Novakazi F., Afanasenko O., Anisimova A., Platz G.J., Snowdon R., Kovaleva O., Zubkovich A., Ordon F. Genetic analysis of a worldwide barley collection for resistance to net form of net blotch disease (*Pyrenophora teres* f. *teres*). *Theor Appl Genet.* 2019;132(9):2633-2650. doi 10.1007/s00122-019-03378-1

O'Boyle P.D., Brooks W.S., Barnett M.D., Berger G.L., Steffenson B.J., Stromberg E.L., Maroof M.A.S., Liu S.Y., Griffey C.A. Mapping net blotch resistance in 'Nomini' and CIho 2291 barley. *Crop Sci.* 2014;54(6):2596-2602. doi 10.2135/cropsci2013.08.0514

Pandis N. The chi-square test. *Am J Orthodontics Dentofacial Orthopaedics*. 2016;150(5):898-899. doi 10.1016/j.ajodo.2016.08.009

Rehman S., Al-Jaboobi M., Verma R.P.S., Sanchez-Garcia M., Visioni A. Genome-wide association mapping of net form net blotch resistance in barley at seedling and adult plant stages. *Front Agron*. 2025;7:1525588. doi 10.3389/fagro.2025.1525588

Richards J.K., Friesen T.L., Brueggeman R.S. Association mapping utilizing diverse barley lines reveals net form net blotch seedling resistance/susceptibility loci. *Theor Appl Genet.* 2017;130(5):915-927. doi 10.1007/s00122-017-2860-1

Richter K., Schondelmaier J., Jung C. Mapping of quantitative trait loci affecting Drechslera teres resistance in barley with molecular markers. *Theor Appl Genet*. 1998;97:1225-34. doi 10.1007/s001220051014

Rozanova I.V., Lashina N.M., Mustafin Z.S., Gorobets S.A., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophora teres* f. *teres*. *BMC Genomics*. 2019;20:292. doi 10.1186/s12864-019-5623-3

Steffenson B.J., Hayes P.M., Kleinhofs A. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theor Appl Genet.* 1996;92:552-558. doi 10.1007/bf00224557

Tekauz A. A numerical scale to classify reactions of barley to *Pyrenophora teres*. *Can J Plant Pathol*. 1985;7(2):181-183. doi 10.1080/07060668509501499

Wonneberger R., Ficke A., Lillemo M. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to net form net blotch in a collection of Nordic barley germplasm. *Theor Appl Genet*. 2017;130:2025-2043. doi 10.1007/s00122-017-2940-2

Yun S.J., Gyenis L., Bossolini E., Hayes P.M., Matus I., Smith K.P., Steffenson B.J., Tuberosa R., Muehlbauer G.J. Validation of quantitative trait loci for multiple disease resistance in barley using advanced backcross lines developed with a wild barley. *Crop Sci*. 2006;46(3):1179-1186. doi 10.2135/cropsci2005.08-0293

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 08.08.2025. После доработки 18.09.2025. Принята к публикации 18.09.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1246-1254

doi 10.18699/vjgb-25-134

Identification of *CtE1* gene nucleotide polymorphisms and development of SNP-based KASP markers in guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.)

L. Criollo Delgado [1*], D. Zewude [1*], D.S. Karzhaev [2], D.E. Polev [3], E.K. Potokina [1]

[1] Skolkovo Institute of Science and Technology (Skoltech), Moscow, Russia
[2] Institute of Forest and Environmental Management, Saint-Petersburg State Forest Technical University, St. Petersburg, Russia
[3] Laboratory of Metagenomics Research, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

e.potokina@skoltech.ru

Abstract. Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub), is an important short-day legume crop, whose cultivation is limited at high latitudes due its photoperiod sensitivity, that negatively impacts flowering and maturation of this industrial-oriented crop. In its close relative, soybean, the *E1* gene has been highly associated with the regulation of flowering time under long-day conditions. In this study we investigated the natural diversity of the *E1* homologue gene (*CtE1*) in a panel of 144 guar accessions. For this purpose, the *CtE1* gene was amplified and sequenced using Illumina. As a result, five novel SNPs were identified in the 5′-untranslated region, coding region, and 3′-untranslated region of the *CtE1* gene. One non-synonymous SNP was located in the coding region causing a conservative Arg→Lys substitution. Based on the identified SNP, five KASP markers linked to polymorphism in the target gene were developed and tested in the guar collection. No significant associations were detected between discovered SNPs and available data on variability in flowering time or vegetation period length in the cohort of 144 accessions. These findings suggest that natural variation of the *CtE1* gene in the studied germplasm collection has minimal effect on flowering or maturation. The limited functional allelic diversity observed in the *CtE1* gene of guar compared to the *E1* gene in soybean likely reflects differences in their evolutionary histories, domestication bottlenecks, and selection pressures.

Key words: guar; photoperiod; flowering time; *CtE1* gene; GT-seq genotyping; SNP; KASP markers

For citation: Criollo Delgado L., Zewude D., Karzhaev D.S., Polev D.E., Potokina E.K. Identification of *CtE1* gene nucleotide polymorphisms and development of SNP-based KASP markers in guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1246-1254. doi 10.18699/vjgb-25-134

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-26-00073).

Выявление нуклеотидного полиморфизма гена *CtE1* и разработка KASP-маркеров для гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.)

Л. Криолло Дельгадо [1*], Д. Зевуде [1*], Д.С. Каржаев [2], Д.Е. Полев [3], Е.К. Потокина [1]

[1] Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия
[2] Институт леса и природопользования, Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] Лаборатория метагеномных исследований, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

e.potokina@skoltech.ru

Аннотация. Гуар (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub) – бобовое растение короткого дня, возделывание которого в высоких широтах ограничено из-за его чувствительности к длинному фотопериоду, что негативно влияет на цветение и созревание этой новой индустриально значимой сельскохозяйственной культуры. У ее близкого родственника – сои – ген *E1* вовлечен в регуляцию процессов цветения в условиях длинного дня. В нашем исследовании естественное разнообразие гена *CtE1* (гомолога *E1*) проанализировано на выборке из 144 образцов гуара. Для этой цели ген *CtE1* был амплифицирован и секвенирован с использованием Illumina, в результате чего идентифицировано пять новых SNP в 5′- и 3′-нетранслируемых областях, а также в кодирующей части гена *CtE1*. На основе выявленных SNP разработаны и протестированы пять KASP-маркеров, связанных с полиморфизмом целевого гена в изученной коллекции гуара. Один несинонимичный SNP был локализован в кодирующей области; этот полиморфизм приводит к консервативной аминокислотной замене Arg→Lys в кодируемом белке. Значимой связи между обнаруженными SNP и имеющимися данными об изменчивости сроков начала цветения или продолжительности вегетационного периода в выборке из 144 образцов не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о том, что естественный нуклеотидный полиморфизм

© Criollo Delgado L., Zewude D., Karzhaev D.S., Polev D.E., Potokina E.K., 2025

* Both authors contributed equally to the work.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

гена *CtE1*, представленный в изученной коллекции образцов гуара, не оказывает существенного влияния на цветение и созревание растений. Ограниченное функциональное аллельное разнообразие, выявленное в гене *CtE1* гуара по сравнению с аллельным разнообразием гена *E1* у сои, вероятно, отражает различия в их эволюционной истории и различные направления искусственного отбора в процессе селекции.
Ключевые слова: гуар; фотопериод; время цветения; ген *CtE1*; GT-seq генотипирование; SNP; KASP-маркеры

Introduction

Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub), is an industrial-oriented short-day legume crop mainly cultivated for the production of guar gum (galactomannan) – a compound present in the seed endosperm of guar. This polysaccharide forms a viscous gel in water, and due to its thickening properties is widely used in several industrial sectors including oil and gas industry, cosmetics and food production (Benakanahalli et al., 2021). Currently, India and Pakistan are the main manufacturers and exporters of guar gum in the world market. However, there is growing interest in guar gum in many countries, and in the past two decades, guar rightfully gained the status of an important economical crop worldwide (Verma et al., 2025).

The main limiting factor for guar cultivation in Russia is its photoperiod sensitivity, which affects the timing of flowering and maturation of guar plants (Grigoreva et al., 2021 a, b). For the closely related legume soybean, loci that influence flowering and maturation under long-day conditions have been the subject of in-depth study for decades (Cao et al., 2017; Han et al., 2019). As a result, different alleles of genes involved in the photoperiod response were discovered, which are now used in breeding programs to adapt soybean varieties to diverse geographic regions and farming systems (Liu et al., 2020).

Among the genes identified to date as related to soybean vegetation period, *E1* has been recognized as the most critical regulator of flowering time in soybean (Watanabe et al., 2012; Xia et al., 2012), and as a key selection locus in breeding programs (Xia, 2017). These characteristics made *E1* the first and most significant target for CRISPR-Cas mutagenesis, aimed at developing new soybean germplasm with broad adaptability across different latitudes (Han et al., 2019).

Recently, an ortholog of the soybean *E1* gene was identified in the guar genome, showing 80 % identity at the coding peptide level and a similar intron–exon structure (Criollo Delgado et al., 2025). Like the other members from *E1* family genes, *CtE1* encodes a protein containing a putative bipartite nuclear localization signal (NLS) and a DNA-binding B3-like domain. This suggests that the genetic pathways underlying the basic mechanisms of photoperiod response may be similar in soybean and guar, and therefore the selection of photoperiod-insensitive guar varieties may follow the same pathway as in soybean.

In soybean, the legume-specific *E1* gene suppresses flowering of plants under long-day (LD) conditions, thus, non-synonymous mutations in this gene result in a dysfunctional polypeptide, promoting flowering of plants in high latitudes (Xu et al., 2015). At least 5 misfunctional alleles were described for the *E1* locus in soybean: *e1-fs* (frame shift), *e1-as* (amino acid substitution), *e1-b3a* (mutation in B3 domain), *e1-re* (retrotransposon insertion), *e1-p* (have SNPs or InDels in the coding sequence or 5′ upstream), and *e1-nl* (null) allele has a 130 kb deletion which includes the entire *E1* gene (Liu et al., 2020). Development of functional markers for *E1* polymorphisms has made significant contributions to both germplasm evaluation and marker-assisted selection (MAS) of soybean. Specifically, Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) markers developed for SNPs at the *E1-E4* loci, allowed to reveal the most advantageous allele combinations for soybean cultivars propagated in various regions of China (Liu et al., 2020). In this regard, it might be relevant to assess the level of polymorphism of the *CtE1* gene in guar, represented in the natural intraspecific diversity of this legume crop, in order to identify alleles as possible targets for selection.

In the present paper we have evaluated nucleotide variability of *CtE1* gene using the diversity panel of 144 guar accessions of different geographic origin. We developed KASP markers for all SNPs detected and estimated association between the revealed haplotypes and phenotypic performance of the guar varieties.

Materials and methods

Plant material. A diversity panel consisting of 144 guar accessions, encompassing early- and late flowering/maturing varieties and landraces originating from India, Pakistan, United States, were described earlier (Grigoreva et al., 2021 a). In the same paper the performance of these accessions under field conditions in Krasnodar region (45°02′55″ N) in 2017 and 2018 was evaluated. Here, we used the field evaluation data to search for a link between alleles of *CtE1* gene and variation of the agrobiological traits of guar plants from different accessions. Two traits most relevant to the putative function of *CtE1* gene were considered: (1) flowering time defined as the number of days from sowing to flowering, recorded when 50 % of the plants in the accession have produced flower buds, and (2) length of vegetation period, which was calculated as the number of days from sowing to maturation (50 % of plants per accessions had mature pods).

Isolation of DNA, amplification of PCR and Sanger sequencing. As a first step, Sanger sequencing of *CtE1* was performed on several plants with contrasting maturation times to assess the presence of polymorphisms within a small but diverse panel of genotypes. For Sanger sequencing genomic DNA from one plant per each accession was extracted from the 7-days seedlings following the protocol described by Ivanova et al. (2008). For further high-throughput genotyping using Illumina, a bulk DNA (5–7 plants) per accession was analyzed.

The extracted DNA was stored at −20 °C and subsequently assessed for quality and integrity using 1.5 % agarose gel electrophoresis. DNA concentration and purity were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Desjardins, Conklin, 2010). For Sanger sequencing genomic DNA was subjected to PCR using a pair of primers designed for the *CtE1* predicted sequence (Criollo Delgado et al., 2025) to amplify the 5′ untranslated region (5′ UTR), coding region, and 3′ untranslated region (3′ UTR). Information on the primer sequences is present on Table 1 (primers E1-F and E1-R).

Table 1. Primer pairs used for amplification of the *CtE1* gene in guar. Primers 1, 2 were used for Sanger sequencing. Primers 3–8 were included for Illumina sequencing purposes; adapter sequences are marked in color: forward (yellow) and reverse (green)

No.	Name of primers	Sequence
1	E1-F	GAGCCTCCATTCTCATTTCACAAAG
2	E1-R	CGACCAATAACAGTGTTGGCATAG
3	Guar_E1_P1_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCCACGACAAAGGTGAAATG
4	Guar_E1_P1_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCTCCTCCTTTGTTCTTCTC
5	Guar_E1_P2_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGAAGAACAAAGGAGGAGGAG
6	Guar_E1_P2_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTGATTCCACTTCCCAATAAG
7	Guar_E1_P3_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGGAAGGAACGCCGATTAG
8	Guar_E1_P3_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAGTGTTGGCATAGTGATAGAA

PCR amplification was performed using primers E1-F and E1-R to generate 803 bp product. The PCR reaction mix (25 µL) consisted of 1 µl genomic DNA, 1× PCR buffer, 3 mM MgCl2, 0.4 µM of each primer, 100 µM dNTPs, and 2.5 unit of TaqDNA polymerase. The initial denaturation was performed at 94 °C for 2 min; followed by 30 cycles of denaturation at 98 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 45 s; and with a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were purified from PCR mix using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). The purified samples were submitted to a commercial sequencing facility (Evrogen, Moscow) for further processing.

Primer design for Illumina sequencing. High-quality DNA samples of 144 guar accessions were used for PCR with specifically designed primers. Three pairs of primers were designed to amplify three overlapping regions of *CtE1* gene covering the same region as for Sanger sequencing, but overhangs were included in the primer's sequences to facilitate subsequent Illumina application. Table 1 lists the forward (Guar_E1_P1_F, Guar_E1_P2_F, Guar_E1_P3_F) and reverse (Guar_E1_P1_R, Guar_E1_P2_R, Guar_E1_P3_R) primer sequences, the overhangs are color-coded: yellow for the forward and green for the reverse primers. Primer design was performed using the Integrated DNA Technologies (IDT) online primer design tool (https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest).

PCR amplification was carried out using the cycler C1000 Touch (Bio-Rad, USA) to target the genomic region of *CtE1* in the guar genome. Each primer pair was tested separately using genomic DNA as the template. The PCR mix (25 µL) contained 1× HF buffer, 0.4 µM of each primer, 200 µM dNTPs, and 1 unit of Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, USA). The thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 98 °C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 98 °C for 30 s, annealing at 62 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 45 s. A final extension step was performed at 72 °C for 10 min.

Library preparation, sample pooling and Illumina sequencing. The sequencing library was prepared for a Genotyping-in-Thousands by Sequencing (GT-SEQ) (Campbell et al., 2015) approach from the PCR-amplified products. All PCR products were first purified using ammonium acetate precipitation to eliminate unincorporated nucleotides, salts, and other impurities from the reaction mixture. The concentration of each cleaned DNA sample was then measured using a NanoDrop spectrophotometer (Desjardins, Conklin, 2010). Each sample had an initial volume of 20 µL. For pooling, 4 µL was taken from samples with a DNA concentration below 10 ng/µL, while 2 µL was taken from samples with a concentration above 10 ng/µL. Approximately equal concentrations were allowed, since Illumina sequencing provides excess coverage of the target locus for each sample. This compensates for variability in concentration without exact quantification, which is acceptable for amplicon sequencing at high coverage depths (e. g., 16S) (Kennedy et al., 2014).

The selected volumes were pooled together into a single 2 mL Eppendorf tube to create a composite library. The pooled library was then prepared for high-throughput sequencing with the Illumina MiSeq. Nextera XT DNA Library Prep Kit was used for a two-step PCR workflow. First PCR was performed with gene specific primers + overhangs (Table 1), the second PCR was performed to add Illumina adapters + indices. For the pooled library, only one dual Illumina index was used, which significantly reduced the cost of sequencing. Paired-end sequencing was employed with 2 × 250 bp read mode.

Bioinformatics pipeline for SNP detection. Quality assessment of the raw reads was performed using FastQC (Andrews, 2010) with default parameters to evaluate base quality, GC content, and potential adapter contamination. Subsequently, high-quality reads were aligned to the reference target sequence, specifically, the *CtE1* guar gene (Criollo Delgado et al., 2025), using the BWA-MEM algorithm. SNPs were then identified using a variant calling pipeline that involved SAMtools for alignment processing and BCFtools for SNP calling and variant filtration (Li, 2011; Danecek et al., 2021).

Development of KASP assays. The KASP primers genotyping assay design tool (https://primerdigital.com/tools/kasp.html) (Kalendar et al., 2022) was used to design KASP primers for detected SNPs. Two allele-specific primers were designed carrying unique tails: FAM (5′ GAAGGTGACCAAGTTCAT GCT 3′) and HEX (5′ GAAGGTCGGAGTCAACGGATT 3′)

Table 2. KASP primers for *CtE1* gene assessment: two allele-specific forward primers with unique 5′ tails (shown in bold) and targeted SNPs at their 3′ ends

Primers name	Sequence	SNP position
F_SNP1_FAM	**GAAGGTGACCAAGTTCATGCT**TTACATGCAAAGCAAATAACAATAGTTG	–89
F_SNP1_HEX	**GAAGGTCGGAGTCAACGGATT**TTTTACATGCAAAGCAAATAACAATAGTAG	
R_SNP1	GGTGGGAATTTTAGTTGTGATGAAAT	
F_SNP2_FAM	**GAAGGTGACCAAGTTCATGCT**AAAAACCCTTTCATCATTTCAATTTTAATGTA	–54
F_SNP2_HEX	**GAAGGTCGGAGTCAACGGATT**AAAACCCTTTCATCATTTCAATTTTAATGAA	
R_SNP2	TGTTCATGTTTGAAGTAGAAGAGATG	
F_SNP3_FAM	**GAAGGTGACCAAGTTCATGCT**GGTGATGATCACGCGAGA	+296
F_SNP3_HEX	**GAAGGTCGGAGTCAACGGATT**GGGTGATGATCACGCGAAA	
R_SNP3	CAAACTCTAATCGGCGTTCC	
F_SNP4_FAM	**GAAGGTGACCAAGTTCATGCT**CTTCTTAATTGGTATTCTCTTCACCTTT	*43
F_SNP4_HEX	**GAAGGTCGGAGTCAACGGATT**TCTTAATTGGTATTCTCTTCACCTCT	
R_SNP4	ACCAATAACAGTGTTGGCATAGT	
F_SNP5_FAM	**GAAGGTGACCAAGTTCATGCT**GGTATTCTCTTCACCTTTCAACTC	*49
F_SNP5_HEX	**GAAGGTCGGAGTCAACGGATT**GTATTCTCTTCACCTTTCAACCC	
R_SNP5	ACCAATAACAGTGTTGGCATAGT	

Note. SNP positions are numbered relative to the *CtE1* CDS: – upstream of start codon; + within CDS; * downstream of stop codon (den Dunnen et al., 2016).

respectively, with the targeted SNPs at the 3′end (penultimate nucleotide), and a common primer was designed to pair with both forward and reverse primers. KASP genotyping primers are provided in Table 2. SNP positions were numbered relative to the *CtE1* coding sequence (CDS), where positive numbers indicate positions within the CDS (with 1 corresponding to the A of the ATG start codon), negative numbers (−) indicate nucleotides upstream (5′) of the start codon, and asterisks (*) denote nucleotides downstream (3′) of the stop codon (den Dunnen et al., 2016).

The KASP assay was conducted in 8 μL PCR reaction volume comprising 2 μL of genomic DNA (5 ng/μL), 3 μL of 2×KASP-TF V5.0 2X Master Mix (LGC, Biosearch Technologies) and 0.2 μL of allele-specific primer mix, making the final concentration of forward primers in the reaction volume 0.05 mM each, and 0.10 mM of common reverse primer. PCR cycling was performed with QuantStudio 5 cycler (Thermo Fisher Scientific, USA) using the following protocol: pre-incubation 30 °C 30 s (Pre-Read stage fluorescence measurement), pre-denaturation at 95 for 10 min, followed by 10 touchdown cycles (95 °C for 15 s; touchdown from 62 °C to 55 °C with 1.5 °C decrease per cycle for 60 s), followed by 60 additional cycles (94 °C for 20 s; 55 °C for 60 s), 30 °C for 1 min (Post-Read stage fluorescence measurement).

Statistical analysis. Descriptive statistics and estimates of variance were done by using the R package '*agricolae*' (https://cran.r-project.org/package = agricolae) (de Mendiburu, 2023). To check the effect of allelic variants on flowering and maturation time traits, ANOVA was used. For each analysis of variance, we also evaluated normality of residuals distribution using the Shapiro–Wilk Test. When the assumptions for residuals normality were not satisfied, the Kruskal–Wallis rank sum test served as a robust non-parametric alternative.

Results

Identification of novel SNPs in the gene *CtE1*

Sanger sequencing of *CtE1* in eight guar varieties with contrasting maturation times confirmed the presence of polymorphisms in the sequence of the gene previously predicted *in silico*, and identified five SNPs (Table 3). Positions of the SNPs were determined relatively to the CDS of the *CtE1* gene (Criollo Delgado et al., 2025) and a reference sequence of 1846 bp encompassing the CDS and upstream/downstream regions of the *CtE1* gene, which was extracted from guar genome assembly Cte V1.0 (GCA_037177725.1). Two SNPs were identified in the upstream region of the *CtE1* gene, the first SNP was located in the 5′ untranslated region (5′ UTR) at position –89 relative to CDS (SNP1) and the second SNP was located in the 5′ UTR at position –54 (SNP2), where the nucleotide thymine (T) was substituted with adenine (A) in both cases. One non-synonymous SNP was found within the coding region at position 296 from the start codon (SNP3), showing a guanine (G) to adenine (A) substitution that causes an amino acid change from arginine to lysine. Additionally, two SNPs were detected in the 3′ untranslated region (3′ UTR) at positions *43 (SNP4) and *49 (SNP5), both involving a transition from thymine (T) to cytosine (C). The analyzed *CtE1* gene sequence spans 803 base pairs, covering the 5′ UTR, coding region, and 3′ UTR, and all 5 SNPs are shown in Figure 1. As shown in Table 3, out of the 8 varieties examined by Sanger sequencing, the only distinct *CtE1* haplotype was revealed in accession Cat.52580.

Illumina sequencing

To extend the *CtE1* genotyping to the entire guar collection of over 144 accessions we avoided the use of cost-consuming Sanger sequencing and instead applied a method previously

Table 3. Polymorphisms of the *CtE1* gene among 8 guar accessions showing variation of flowering and maturation time

VIR cat. No.	Variety/Origin	Flowering time 2017, days	Vegetation period 2017, days	Flowering time 2018, days	Vegetation period 2018, days	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5
94	–/India	39	94	30	78	AA	TT	GG	TT	TT
52586	Lewis/USA	35	94	30	76	TT	TT	GG	TT	TT
22	–/India	35	94	33	87	TT	TT	GG	TT	TT
52572	Vavilovskij 130/–	36	91	34	86	TT	TT	GG	TT	TT
52581	–/India	35	99	34	110	TT	TT	GG	TT	TT
52580	–/India	39	87	39	110	AA	TA	AA	CC	TC
–	–/India	nd	nd	nd	nd	TT	TT	GG	TT	TT
–	–/Pakistan	nd	nd	nd	nd	TT	TT	GG	TT	TT

Note. For the accessions the variety/origin is indicated if known. nd – not determined.

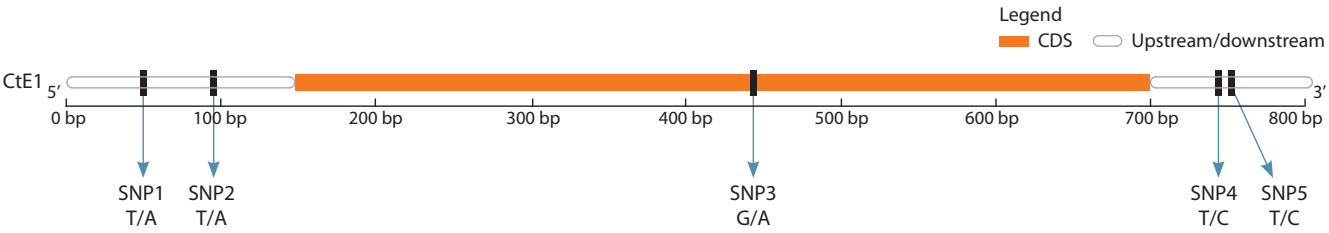


Fig. 1. Location of SNPs in the CDS and upstream/downstream regions of the *CtE1* gene revealed by Sanger sequencing among 8 guar cultivars differing in flowering/maturing time.

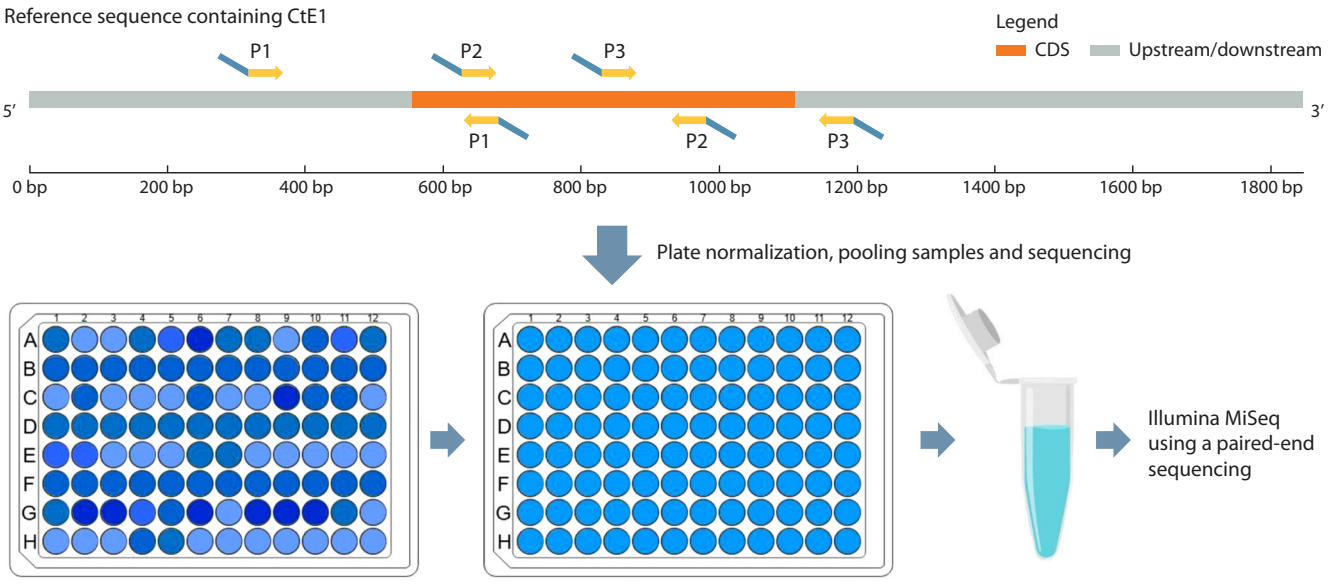


Fig. 2. Scheme of the GT-seq approach and distribution of primers for GT-seq in the CDS and upstream/downstream regions of the *CtE1* gene. By numbers primer pairs (forward and reverse) are indicated. The green part of the primers represents the target-specific sequence. Blue tails of the primers represent the Illumina sequencing adapters.

described as Illumina Genotyping in Thousands by Sequencing (GT-Seq) (Campbell et al., 2015). We created a pooled library containing multiplex PCR products of 3 regions spanning the *CtE1* gene to identify all possible polymorphisms in the target sequence in the collection of 144 accessions. Three pairs of primers with Illumina sequencing adapters were designed (Table 1) enabling all amplicons of all individuals to be pooled into a single sequencing library. Figure 2 shows the location of the primers in the sequenced region (847 bp) compared to a reference sequence of 1846 bp.

No barcoding of individual samples was performed, so when running the Illumina MiSeq, only one dual Illumina

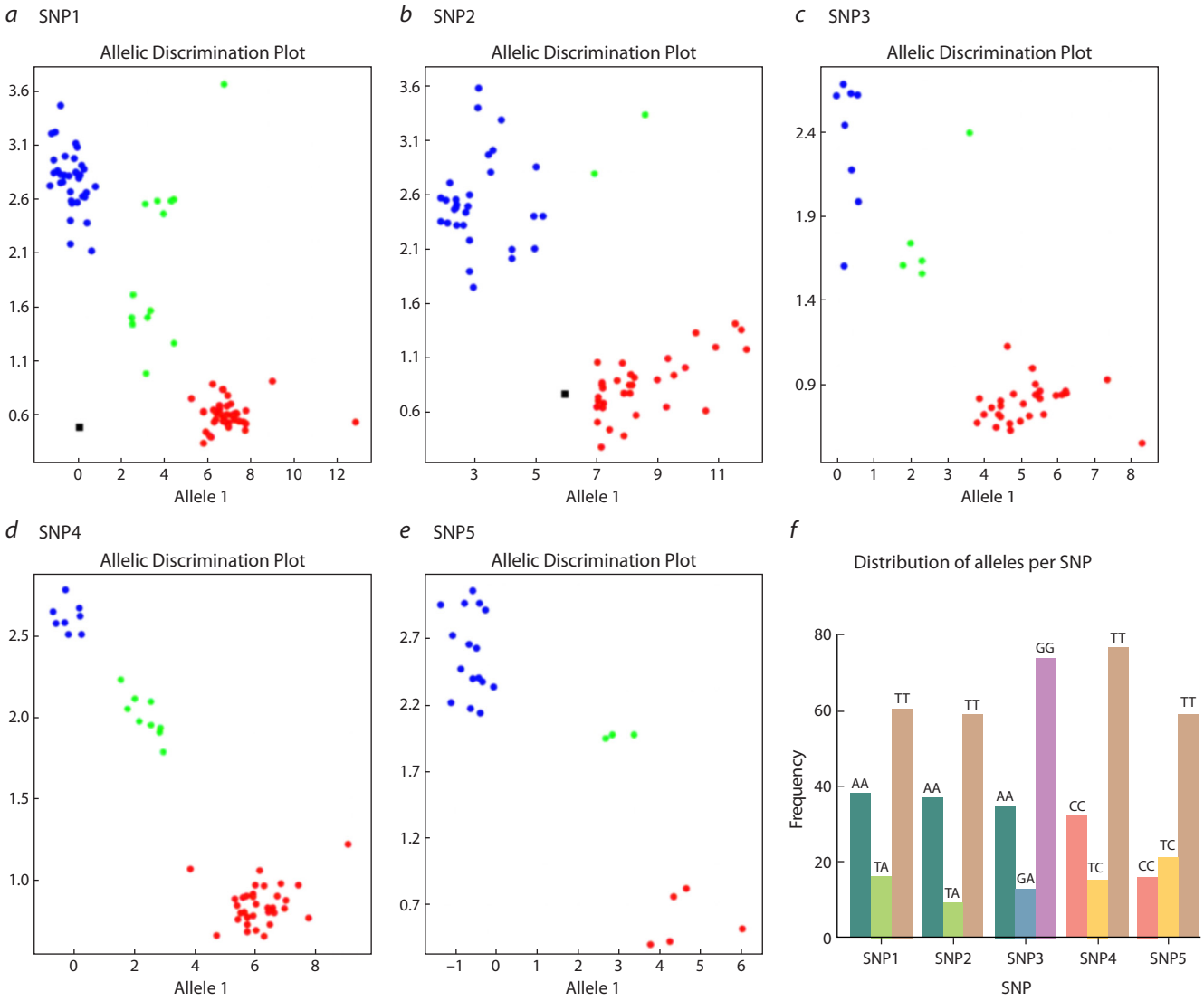


Fig. 3. Clustering of alleles of SNPs in the *CtE1* gene using KASP assays.
a–e, allelic discrimination plots of KASP markers located on the five SNP loci. SNP1–SNP5 correspond to these in Table 3. The clusters of accessions are represented on the scatter plot on the x-axis (Allele 1) and y-axis (Allele 2); *f*, distribution of alleles per SNP loci. The Figure does not reflect genotyping results for the entire collection: if some samples were incorrectly or incompletely genotyped, they were re-analyzed in additional runs.

index was used to barcode the entire library. As a result, 4,880,840 raw reads were obtained from Illumina and quality-checked using FastQC to evaluate base quality, GC content, and adapter contamination. 4,513,800 (92.48 %) of the reads were then successfully aligned to the *CtE1* reference guar genome assembly (Cte V1.0, GCA_037177725.1). With the data available, each of the three amplicons was covered by an average of 10,448 reads for each of the 144 guar accessions. As a result, the same 5 SNPs, that were discovered by Sanger sequencing of 8 accessions contrasting in flowering and maturing time, were again detected, and no additional polymorphism was found among 144 guar accessions.

The GT-seq analysis revealed a single missense mutation in the coding sequence of the *CtE1* gene within the examined intraspecific diversity of guar, resulting in an Arg→Lys amino acid substitution. However, unlike the loss-of-function mutations observed in soybean that lead to truncated or nonfunctional *E1* proteins, no such deleterious variants were detected. Nevertheless, an attempt was made to assess the field performance of guar plants carrying different *CtE1* alleles. To facilitate this, KASP assays were developed for the identified SNPs.

High-throughput KASP genotyping of polymorphisms in the *CtE1* gene

Five KASP markers linked to polymorphisms in the *CtE1* gene were developed based on the SNPs identified through the Illumina GT-seq approach and tested with 144 guar accessions. Each KASP marker enabled apparent clustering of accessions into three genotype classes (homozygous allele1, homozygous allele2, and heterozygous) (Fig. 3). The heterozygosity level estimated for SNPs in the *CtE1* gene in the studied collection of 144 guar accessions ranged from 0.086 to 0.218 (Fig. 3*f*), which is in line with the average heterozygosity level of 0.127 reported for soybean germplasm collections (Potapova et al., 2023).

Analysis of association between SNPs in the *CtE1* gene and flowering/maturation time of guar varieties

Since the guar diversity panel encompassing studied 144 guar accessions was evaluated in 2017 and 2018 in the field conditions of Krasnodar region (Grigoreva et al., 2021a), we use the opportunity to explore any possible correlation existing between the revealed nucleotide polymorphisms of *CtE1* and agronomic performance of guar varieties carrying different alleles of the gene.

Flowering time observed for the studied accessions varied from 32 to 45 days in 2017 and from 29 to 42 days in 2018. Notably, the correlation between flowering time of the guar collection in 2017 and 2018 was not statistically significant (r2 = 0.05, *p*-value > 0.05). Heritability of flowering time in guar estimated under stable natural conditions in India ranged from 52 % (Remzeena, Anitha, 2021) to 81 % (Choyal et al., 2022). However, guar propagation in the Krasnodar region often faces challenges, such as, for example, the spring drought of 2018, which resulted in damage to plant seedlings. Therefore, the observed year-to-year variations in the flowering time of guar genotypes may be due to differences in environmental factors, as well as the lack of standardized agricultural practices for this recently introduced legume crop.

Length of vegetation period varied respectively in the range 72–116 days and 72–110 days in two years. Here, the correlation between the overall vegetative period of guar accessions in 2017 and 2018 was low, but statistically significant (r2 = 0.19, *p*-value < 0.01). As with flowering time, this low correlation can presumably be explained by extreme drought conditions in spring 2018.

Given genotyping data for 5 SNPs in the *CtE1* gene for 144 guar accessions, we attempted to perform ANOVA for each SNP, considering the three genotypes (two alternative homozygous and heterozygous) as factor levels and the number of days from sowing to flowering (maturing) as the dependent variable.

Of all the markers we tested, only one SNP (SNP2) demonstrated an association with flowering time in guar in 2018, that approached statistical significance (ANOVA, $p = 0.052$). Heterozygous genotypes for SNP2 (TA) tended to flower slightly later than both homozygotes (TT and AA), a result that is difficult to explain from a biological perspective. Therefore, it can be concluded that the natural polymorphisms of the *CtE1* gene identified in the available collection of 144 guar genotypes do not exert a significant effect on flowering or maturation time.

Discussion

In the present study, we assessed natural allelic variation of the *CtE1* gene using a diversity panel of 144 guar accessions from different geographic origins. *CtE1* was previously identified as a homolog of *E1*, the major flowering time regulator in soybean; however, its genetic diversity and functional role in guar had not yet been reported. The *E1* gene plays a key role in the functional network of photoperiodic flowering regulation in soybean. Since the molecular identity of this gene was successfully elucidated in 2012 (Xia et al., 2012), numerous studies have underscored the significant impact that mutations in this gene can have on photoperiod sensitivity (Zhai et al., 2015; Han et al., 2019; Fang et al., 2024a, b; Gao et al., 2024).

During the adaptation of cultivated soybean northward to high latitudes under longer daylengths, the *E1* gene, like some other important flowering inhibitor genes (e. g., *E3*, *E4*, *Tof5*, *Tof11*, and *Tof12*), has accumulated sequence polymorphisms, which reduced photoperiod sensitivity to produce early flowering. Thus, the variation leading to early flowering was artificially selected, allowing cultivated soybean to adapt to high latitude areas (Lin et al., 2021). Several functional and non-functional/dysfunctional *E1* alleles (e. g., *E1*, *e1-as*, *e1-fs*, *e1-nl*) have been identified in soybean, which vary by geography/maturity group (Hou et al., 2023). However, not all of them equally contribute to flowering phenotype. For example, *e1fs* and *e1nl* are functionally deficient, leading to very early flowering and maturity, while *e1-as* is a weak mutant allele with an effect intermediate between that of the *E1* genotype and the functionally deficient alleles (Xia et al., 2012).

The high similarity in coding peptide sequences between the soybean *E1* gene and the guar *CtE1* gene, along with their comparable intron-exon structures, suggests that the genetic pathways governing the fundamental mechanisms of photoperiod response may be conserved across these two legume species (Criollo Delgado et al., 2025). This structural and sequence conservation implies that intraspecific genetic variation at the *CtE1* locus in guar could potentially contribute to variation in photoperiod sensitivity, similar to the functional allelic diversity observed at the *E1* locus in soybean.

However, within the natural allelic diversity of *CtE1* evaluated in this study, no clearly dysfunctional alleles were identified. Of the five SNPs discovered in the *CtE1* gene, only one (SNP3) was found in the coding region and resulted in a non-synonymous arginine-to-lysine substitution. This alteration is located at amino acid position 99, situated within the B3-like domain, which in guar spans amino acid residues 61–171 (Criollo Delgado et al., 2025). Among the soybean *E1* polymorphisms discovered to date, a similar *e1-b3a* mutation was found, which also occurs in the middle of the B3 domain of the *E1* gene. The *e1-b3a* represents 5bp (3 SNP and 2-bp deletion) mutation which leads to a frameshift causing a premature stop codon at the middle of the B3-like domain. As a result, the soybean *e1-b3a/e1-b3a* genotype flowered significantly earlier than *E1/E1* and *E1/e1-b3a* (Zhai et al., 2015). In contrast, the functional significance of the Arg→Lys amino acid substitution identified within the B3 domain of guar, remains uncertain, as arginine and lysine share similar physicochemical properties. This substitution is considered conservative and is therefore predicted to have a minimal effect on protein function (Betts, Russell, 2003; Ryan, Ó'Fágáin, 2007; Banayan et al., 2024). On the other hand, it has been reported that amino acid substitutions in the *E1* sequence also can lead to significant functional changes, if they occur in the region of bipartite Nuclear Localization Signal (NLS). For example, the point mutation from arginine to threonine at position 15 in the soybean *E1* gene (known as *e1-as* mutant) occurs at exactly the first basic domain of the bipartite NLS, leading to different subcellular localization of the resulting protein and affecting flowering phenotype (Xia et al., 2012).

Two SNPs (SNP1 and SNP2) were discovered in 5′UTR region of the *CtE1* gene. Similarly, mutations *e1-re* and *e1-p* were described at the 5′UTR region of the *E1* gene in soy-

bean. The *e1-re* allele is characterized by the insertion of a long interspersed nuclear element (LINE) located 148 bases upstream of the start codon, whereas the *e1-p* mutant exhibits sequence variation in the 5′ upstream region compared to *E1*. The effects of both alleles on flowering time in soybean have not been well studied (Tsubokura et al., 2014).

The limited functional allelic diversity observed in the *CtE1* gene of guar, compared to the *E1* gene in soybean, likely reflects differences in their evolutionary histories, domestication bottlenecks, and selection pressures. Soybean was domesticated in a region spanning 30–45°N in China and is now cultivated globally across a broad latitudinal range, from 53°N to 35°S (Lin et al., 2021). In contrast, guar was domesticated in India and Pakistan (Ravelombola et al., 2021), and to this day, these countries remain the primary centers of guar cultivation. This more geographically restricted domestication of guar and cultivation range may have resulted in reduced selection for photoperiodic adaptation and, consequently, lower allelic diversity at key flowering-time loci such as *CtE1*.

On other hand, it is still possible that within the intraspecific diversity of guar there exist genotypes carrying more severe mutations in the *CtE1* gene that can substantially impair its function; however, such genotypes were not present in the studied cohort of 144 accessions.

Furthermore, it has been reported that *E1* homologues in various legumes exhibit differing roles in flowering, highlighting functional diversification within the *E1* gene family (Zhang et al., 2016; Cao et al., 2017). For instance, in *Phaseolus vulgaris*, the *E1* homologue known as *PvE1L* acts as a flowering repressor, mirroring the function of the *E1* gene in soybean. Ectopic expression of *PvE1L* has been shown to delay flowering onset in soybean (Zhang et al., 2016). In contrast, *Medicago truncatula*'s *E1* homologue, *MtE1L*, does not influence flowering when ectopically expressed in soybean. This variation suggests that the functional roles of *E1* homologues in legumes may be linked to lineage specificity and genomic duplication events. This underscores the complexity of flowering regulation within the legume family.

The CRISPR/Cas9 system has recently emerged as a powerful tool for targeted genome editing and functional genomics research. In soybean, its application has enabled in-depth investigation of the *E1* gene's role in photoperiod regulation, through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis followed by phenotypic analysis of flowering time (Wan et al., 2022). A similar approach can be implemented in guar by generating CRISPR/Cas9-induced mutants with targeted alterations in the *CtE1* gene. This would allow for a direct functional assessment of *CtE1* and its role in regulating flowering time and photoperiod sensitivity in guar. In addition, the application of CRISPR/Cas-based mutagenesis could potentially benefit guar breeding programs not only by enabling the creation of *CtE1* mutants, but also by targeting other flowering-related genes homologous to the soybean *E* maturity genes, such as *CtE2–CtE4*. This approach could facilitate a detailed investigation of the genetic network regulating flowering time in guar. This may also facilitate the development of novel photoperiod-insensitive guar germplasm, analogous to soybean mutants that have expanded soybean cultivation into higher latitudes.

Conclusions

In this study, we characterized nucleotide variability of the *CtE1* gene, the guar ortholog of soybean *E1* gene, in a diverse panel of 144 guar accessions and identified five novel SNPs across the 5′ UTR, coding, and 3′ UTR regions. We developed KASP markers for these SNPs to provide a robust genotyping tool to explore *CtE1* haplotypes in larger germplasm collections. Genotyping of 144 guar samples for five *CtE1* SNPs revealed only one SNP in the coding part of the gene, causing an Arg→Lys substitution. Given the conservative nature of this amino acid substitution, its functional impact is likely limited. No significant associations were detected so far between discovered SNPs and available data on variability in flowering time or vegetation period length. Our findings indicate that natural variation in *CtE1* within the studied guar germplasm has little impact on flowering time or maturation. We hypothesize that the geographically restricted domestication and cultivation range of guar may have led to reduced selection pressure for photoperiodic adaptation, resulting in lower allelic diversity at key flowering-time loci such as *CtE1*.

References

Andrews S. FastQC. A Quality control tool for high throughput sequence data. Babraham bioinformatics, 2010. Available: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Banayan N.E., Loughlin B.J., Singh S., Forouhar F., Lu G., Wong K., Neky M., Hunt H.S., Bateman L.B., Tamez A., Handelman S.K., Price W.N., Hunt J.F. Systematic enhancement of protein crystallization efficiency by bulk lysine-to-arginine (KR) substitution. *Protein Sci*. 2024;33(3):e4898. doi 10.1002/pro.4898

Benakanahalli N.K., Sridhara S., Ramesh N., Olivoto T., Sreekantappa G., Tamam N., Abdelbacki A.M.M., Elansary H.O., Abdelmohsen S.A.M. A framework for identification of stable genotypes basedon MTSI and MGDII indexes: An example in guar (*Cymopsis tetragonoloba* L.). *Agronomy*. 2021;11(6):1221. doi 10.3390/agronomy11061221

Betts M.J., Russell R.B. Amino acid properties and consequences of substitutions. In: Barnes M.R., Gray I.C. (Eds.) Bioinformatics for geneticists. John Wiley & Sons. 2003;289-316. doi 10.1002/0470867302.ch14

Campbell N.R., Harmon S.A., Narum S.R. Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Mol Ecol Resour*. 2015;15(4):855-867. doi 10.1111/1755-0998.12357

Cao D., Takeshima R., Zhao C., Liu B., Jun A., Kong F. Molecular mechanisms of flowering under long days and stem growth habit in soybean. *J Exp Bot*. 2017;68(8):1873-1884. doi 10.1093/jxb/erw394

Choyal P., Dewangan R., Nd R., Xaxa S., Seervi K.S., Seervi D. Genetic variability studies in cluster bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub]. *Pharma Innovation J*. 2022;11(2):2364-2368

Criollo Delgado L., Zamalutdinov A., Potokina E. Identification of soybean *E1-E4* gene orthologs in the guar genome using comprehensive transcriptome assembly and annotation. *Front Biosci*. 2025;17(2):26548. doi 10.31083/fbs26548

Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., Whitwham A., Keane T., McCarthy S.A., Davies R.M., Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 2021;10(2):giab008. doi 10.1093/gigascience/giab008

de Mendiburu F. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research (Version 1.3-7). Computer software. 2023. Available: https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html

den Dunnen J.T., Dalgleish R., Maglott D.R., Hart R.K., Greenblatt M.S., McGowan-Jordan J., Roux A.-F., Smith T., Antonarakis S.E., Taschner P.E.M. HGVS recommendations for the descrip-

tion of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat*. 2016;37(6): 564-569. doi 10.1002/humu.22981

Desjardins P., Conklin D. NanoDrop Microvolume quantitation of nucleic acids. *J Visualized Exp*. 2010;45:e25651. doi 10.3791/2565

Fang C., Du H., Wang L., Liu B., Kong F. Mechanisms underlying key agronomic traits and implications for molecular breeding in soybean. *J Genet Genomics*. 2024a;51(4):379-393. doi 10.1016/j.jgg.2023.09.004

Fang C., Sun Z., Li S., Su T., Wang L., Dong L., Li H., … Lin X., Zatybekov A., Liu B., Kong F., Lu S. Subfunctionalisation and self-repression of duplicated *E1* homologues finetunes soybean flowering and adaptation. *Nat Commun*. 2024b;15(1):6184. doi 10.1038/s41467-024-50623-3

Gao Y., Zhang Y., Ma C., Chen Y., Liu C., Wang Y., Wang S., Chen X. Editing the nuclear localization signals of *E1* and *E1Lb* enables the production of tropical soybean in temperate growing regions. *Plant Biotechnol J*. 2024;22(8):2145-2156. doi 10.1111/pbi.14335

Grigoreva E., Barbitoff Y., Changalidi A., Karzhaev D., Volkov V., Shadrina V., Safronycheva E., Ben C., Gentzbittel L., Potokina E. Development of SNP set for the marker-assisted selection of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) based on a custom reference genome assembly. *Plants*. 2021a;10(10):2063. doi 10.3390/plants10102063

Grigoreva E., Tkachenko A., Arkhimandritova S., Beatovic A., Ulianich P., Volkov V., Karzhaev D., Ben C., Gentzbittel L., Potokina E. Identification of key metabolic pathways and biomarkers underlying flowering time of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) via integrated transcriptome-metabolome analysis. *Genes*. 2021b; 12(7):952. doi 10.3390/genes12070952

Han J., Guo B., Guo Y., Zhang B., Wang X., Qiu L.-J. Creation of early flowering germplasm of soybean by CRISPR/Cas9 technology. *Front Plant Sci*. 2019;10:1446. doi 10.3389/fpls.2019.01446

Hou Z., Fang C., Liu B., Yang H., Kong F. Origin, variation, and selection of natural alleles controlling flowering and adaptation in wild and cultivated soybean. *Mol Breeding*. 2023;43(5):36. doi 10.1007/s11032-023-01382-4

Integrated DNA Technologies. IDT (n.d.). Retrieved December 16, 2024. Available: https://www.idtdna.com/page

Ivanova N.V., Fazekas A.J., Hebert P.D.N. Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants. *Plant Mol Biol Rep*. 2008;26(3):186-198. doi 10.1007/s11105-008-0029-4

Kalendar R., Shustov A.V., Akhmetollayev I., Kairov U. Designing allele-specific competitive-extension PCR-based assays for high-throughput genotyping and gene characterization. *Front Mol Biosci*. 2022;9:773956. doi 10.3389/fmolb.2022.773956

Kennedy K., Hall M.W., Lynch M.D.J., Moreno-Hagelsieb G., Neufeld J.D. Evaluating bias of illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(18):5717-5722. doi 10.1128/AEM.01451-14

Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011;27(21):2987-2993. doi 10.1093/bioinformatics/btr509

Lin X., Liu B., Weller J.L., Abe J., Kong F. Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean. *J Integr Plant Biol*. 2021;63(6):981-994. doi 10.1111/jipb.13021

Liu L., Song W., Wang L., Sun X., Qi Y., Wu T., Sun S., Jiang B., Wu C., Hou W., Ni Z., Han T. Allele combinations of maturity genes *E1-E4* affect adaptation of soybean to diverse geographic regions and farming systems in China. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235397. doi 10.1371/journal.pone.0235397

Potapova N.A., Zlobin A.S., Perfil'ev R.N., Vasiliev G.V., Salina E.A., Tsepilov Y.A. Population structure and genetic diversity of the 175 soybean breeding lines and varieties cultivated in West Siberia and other regions of Russia. *Plants*. 2023;12(19):3490. doi 10.3390/plants12193490

Ravelombola W., Manley A., Adams C., Trostle C., Ale S., Shi A., Cason J. Genetic and genomic resources in guar: A review. *Euphytica*. 2021;217(11):199. doi 10.1007/s10681-021-02929-2

Remzeena A., Anitha P. Genetic variability, heritability and genetic advance in cluster bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.] genotypes. *Indian J Agric Res*. 2021. doi 10.18805/IJARe.A-5779

Ryan B.J., Ó'Fágáin C. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness. *BMC Biotechnology*. 2007;7(1):86. doi 10.1186/1472-6750-7-86

Tsubokura Y., Watanabe S., Xia Z., Kanamori H., Yamagata H., Kaga A., Katayose Y., Abe J., Ishimoto M., Harada K. Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. *Ann Bot*. 2014;113(3):429-441. doi 10.1093/aob/mct269

Verma S., Dubey N., Dhugga K.S., Gill K.S., Randhawa G.S. Cluster bean: From garnering industrial importance to molecular research interventions for the improvement of commercially viable traits. *S Afr J Bot*. 2025;178:307-317. doi 10.1016/j.sajb.2025.01.022

Wan Z., Liu Y., Guo D., Fan R., Liu Y., Xu K., Zhu J., Quan L., Lu W., Bai X., Zhai H. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutation of the *E1* decreases photoperiod sensitivity, alters stem growth habits, and decreases branch number in soybean. *Front Plant Sci*. 2022;13: 1066820. doi 10.3389/fpls.2022.1066820

Watanabe S., Harada K., Abe J. Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. *Breed Sci*. 2012;61(5): 531-543. doi 10.1270/jsbbs.61.531

Xia Z. Research progress in whole-genome analysis and cloning of genes underlying important agronomic traits in soybean. *Chin Bull Bot*. 2017;52(2):148-158. doi 10.11983/CBB16087

Xia Z., Watanabe S., Yamada T., Tsubokura Y., Nakashima H., Zhai H., Anai T., Sato S., Yamazaki T., Lü S., Wu H., Tabata S., Harada K. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(32):E2155-E2164. doi 10.1073/pnas.1117982109

Xu M., Yamagishi N., Zhao C., Takeshima R., Kasai M., Watanabe S., Kanazawa A., Yoshikawa N., Liu B., Yamada T., Abe J. The soybean-specific maturity gene *E1* family of floral repressors controls night-break responses through down-regulation of *FLOWERING LOCUS T* orthologs. *Plant Physiol*. 2015;168(4):1735-1746. doi 10.1104/pp.15.00763

Zhai H., Lü S., Wu H., Zhang Y., Zhang X., Yang J., Wang Y., Yang G., Qiu H., Cui T., Xia Z. Diurnal expression pattern, allelic variation, and association analysis reveal functional features of the *E1* gene in control of photoperiodic flowering in soybean. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0135909. doi 10.1371/journal.pone.0135909

Zhang X., Zhai H., Wang Y., Tian X., Zhang Y., Wu H., Lü S., Yang G., Li Y., Wang L., Hu B., Bu Q., Xia Z. Functional conservation and diversification of the soybean maturity gene *E1* and its homologs in legumes. *Sci Rep*. 2016;6(1):29548. doi 10.1038/srep29548

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

Received August 18, 2025. Revised October 24, 2025. Accepted October 29, 2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1255-1266

doi 10.18699/vjgb-25-130

Использование линии пшеницы с генетическим материалом дикой полбы для улучшения современных сортов *Triticum aestivum* L. по комплексу хозяйственно полезных признаков

О.А. Орловская [1] ✉, К.К. Яцевич [1], Л.В. Милько [1], Н.М. Казнина [2], Н.И. Дубовец [1], А.В. Кильчевский [1]

[1] Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2] Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, Россия
✉ O.Orlovskaya@igc.by

Аннотация. Образцы дикой полбы *Triticum dicoccoides* обладают высоким содержанием белка и микроэлементов в зерне, но при скрещивании с сортами мягкой пшеницы гибридам наряду с ценными признаками могут передаваться и нежелательные свойства дикорастущего сородича (низкая урожайность, ломкость колоса, трудный обмолот). В рамках данного исследования изучена возможность улучшения современных сортов мягкой пшеницы по комплексу хозяйственно полезных признаков посредством использования линии пшеницы с генетическим материалом дикой полбы (л29), сочетающей высокую цитологическую стабильность с улучшенной питательной ценностью и продуктивностью. Исследовали гибриды F_4–F_5, полученные от скрещивания в прямом и обратном направлениях четырех сортов яровой мягкой пшеницы с л29. Фрагменты интрогрессии генетического материала *T. dicoccoides* выявляли с применением метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) и генотипирования маркерами SSR. Оценку цитологической стабильности проводили на основе изучения поведения хромосом в микроспорогенезе. Содержание макро- (K, P, Ca, Mg) и микроэлементов (Zn, Fe, Cu, Mn) в зерне определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; показатели качества зерна – на анализаторе «Инфра ЛЮМ ФТ-12». Данные С-бэндинга и микросателлитного анализа свидетельствуют о высокой частоте включения чужеродного генетического материала в геном гибридных форм. Среди потомства восьми комбинаций скрещивания выявлены все характерные для л29 варианты интрогрессий материала полбы (1BL, 2BS, 3B, 5B, 6AL), причем рекомбинантная хромосома 3B обнаружена во всех гибридных комбинациях. Для гибридов характерен высокий уровень цитологической стабильности (мейотический индекс составил 90.0–98.0 %). Показана эффективность использования линии пшеницы с включением генетического материала *T. dicoccoides* для улучшения современных сортов по содержанию белка, клейковины и минерального состава зерна без снижения продуктивности. Выделены вторичные интрогрессивные гибриды, превосходящие родительские сорта по комплексу признаков качества зерна в оба года исследования и не уступающие им по основным показателям продуктивности.

Ключевые слова: мягкая пшеница *Triticum aestivum* L.; дикая полба *Triticum dicoccoides*; интрогрессивные линии; С-бэндинг; SSR-анализ; микроспорогенез; качество зерна; продуктивность

Для цитирования: Орловская О.А., Яцевич К.К., Милько Л.В., Казнина Н.М., Дубовец Н.И., Кильчевский А.В. Использование линии пшеницы с генетическим материалом дикой полбы для улучшения современных сортов *Triticum aestivum* L. по комплексу хозяйственно полезных признаков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1255-1266. doi 10.18699/vjgb-25-130

Финансирование. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № Б20Р-240) и проекта 2.10.2 ГПНИ «Биотехнологии-2».

Using a wheat line with wild emmer genetic material to improve modern *Triticum aestivum* L. varieties by a complex of economically useful traits

O.A. Orlovskaya [1] ✉, K.K. Yatsevich [1], L.V. Milko [1], N.M. Kaznina [2], N.I. Dubovets [1], A.V. Kilchevsky [1]

[1] Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2] Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia
✉ O.Orlovskaya@igc.by

Abstract. Wild emmer *Triticum dicoccoides* samples have a high content of protein and microelements in their grain, but when crossed with common wheat varieties, undesirable properties of a wild relative (low yield, spike fragility and difficult threshing) can be transmitted to the hybrid along with valuable traits. The possibility of improving

© Орловская О.А., Яцевич К.К., Милько Л.В., Казнина Н.М., Дубовец Н.И., Кильчевский А.В., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

economically useful traits of modern common wheat varieties using a wheat line with wild emmer genetic material (l29), combining high cytological stability with improved nutritional value and productivity, was studied. The F_4–F_5 hybrids obtained as a result of crossing in the forward and reverse directions of four common spring wheat varieties with l29 were studied. A C-banding technique and genotyping with SSR markers were used to determine the introgression fragments of *T. dicoccoides* genetic material. Cytological stability was assessed based on the study of chromosome behavior in microsporogenesis. The grain content of macro- (K, P, Ca and Mg) and microelements (Zn, Fe, Cu and Mn) was established by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma; the grain quality indices were measured on an Infra LUM FT-12 analyzer. The C-banding and microsatellite analysis data indicate a high frequency of alien genetic material introgression in the genome of hybrid forms. All variants of the l29 introgression of wild emmer material (1BL, 2BS, 3B, 5B and 6AL) were identified among the progeny of eight crossing combinations. The recombinant chromosome 3B was found in all hybrid combinations. The hybrids were characterized by a high level of cytological stability (the meiotic index was 90.0–98.0 %). The effectiveness of using a wheat line with *T. dicoccoides* genetic material to enhance modern varieties in terms of the content of protein, gluten and mineral composition of grain without reducing productivity was shown. Secondary introgression hybrids, exceeding the initial varieties by a set of grain quality characteristics and not inferior to them in terms of basic productivity indicators, were obtained.

Key words: common wheat *Triticum aestivum* L.; wild emmer *Triticum dicoccoides*; wheat introgressive lines; C-banding; SSR analysis; microsporogenesis; grain quality; productivity

For citation: Orlovskaya O.A., Yatsevich K.K., Milko L.V., Kaznina N.M., Dubovets N.I., Kilchevsky A.V. Using a wheat line with wild emmer genetic material to improve modern *Triticum aestivum* L. varieties by a complex of economically useful traits. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1255-1266. doi 10.18699/vjgb-25-130

Введение

Пшеница, являясь одной из самых распространенных зерновых культур в мире, выступает основным источником питательных веществ в рационе человека. Между тем процесс интенсивной селекции, направленный на повышение продуктивности, привел к значительной эрозии генофонда пшеницы по питательной ценности зерна, вследствие чего современные сорта имеют низкое содержание белка, минералов и витаминов в зерне (Shewry et al., 2016; Marcos-Barbero et al., 2021). Исследования последних двух десятилетий показали, что дикорастущие сородичи и стародавние образцы (ландрасы) характеризуются более высокой биологической ценностью зерна, чем культивируемые сорта (Heidari et al., 2016; Goel et al., 2018; Arora et al., 2019; Zeibig et al., 2022). Кроме того, родственные мягкой пшенице виды обладают большей вариабельностью по хозяйственно ценным признакам (Cakmak et al., 2000; Akcura, Kokten, 2017), что также представляет ценность для селекции. В связи с этим большие надежды для решения проблемы дефицита питательных веществ в зерне пшеницы возлагаются на отдаленную гибридизацию. В настоящее время есть примеры создания линий пшеницы с повышенным содержанием минералов и белка в зерне, благодаря включению в их геном генетического материала различных родственных видов (Tiwari et al., 2010; Savin et al., 2018; Liu et al., 2021).

Как правило, генотипы пшеницы с улучшенным качеством зерна имеют пониженную продуктивность, в связи с чем одним из приоритетных направлений селекции является создание сортов, сочетающих высокую урожайность и хорошее качество зерна. В рамках данного исследования изучена возможность улучшения сортов мягкой пшеницы по комплексу хозяйственно полезных признаков при использовании линии с генетическим материалом дикой полбы (*Triticum dicoccoides*). Ранее у созданных нами интрогрессивных линий пшеницы была установлена хромосомная локализация генетического материала образцов тетра- и гексаплоидных видов рода *Triticum* по данным С-бэндинга и результатам генотипирования с помощью маркеров микросателлитного (SSR) и однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (Orlovskaya et al., 2020; Орловская и др., 2023б).

Анализ основных показателей качества (содержание белка, массовая доля и качество клейковины, стекловидность, масса 1000 зерен) и минерального состава зерна (содержание K, P, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn) позволил выделить линии с чужеродным генетическим материалом, превышающие исходные сорта по изученным признакам и представляющие интерес для селекции мягкой пшеницы (Орловская и др., 2023а). Линия 29 комбинации Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199, сочетающая высокие показатели питательной ценности и продуктивности, включена в скрещивания с современными сортами для улучшения селекционно ценных признаков мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили гибриды F_4–F_5, полученные от скрещивания в прямом и обратном направлениях современных сортов яровой мягкой пшеницы белорусской селекции, Дарья, Тома, Ласка, Любава с интрогрессивной линией 29 комбинации Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199 (л29), в целом восемь комбинаций скрещивания. Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2021–2022 гг. (г. Минск, РБ; 53.924256° северной широты, 27.695015° восточной долготы) на дерново-подзолистой супесчаной почве.

Минеральные удобрения вносили в следующих дозах: азотные – 80 кг действующего вещества на 1 га (кг д. в./га), фосфорные – 70 кг д. в./га, калийные – 90 кг д. в./га. При уборке проводили учет следующих признаков: «количество продуктивных побегов на растение»; «длина, число колосков и зерен главного колоса»; «масса зерна главного колоса и растения»; «масса 1000 зерен». Для оценки признаков случайным образом отбирали 15 растений каждого генотипа.

Для анализа геномной структуры гибридного материала был использован вариант метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) (Badaeva et al., 1994), позволяющий распознавать в кариотипе индивидуальные хромосомы геномов A, B, D, а также аберрации хромосом, в которых задействованы участки с наличием диагностических С-блоков. Окрашенные препараты анализировали с использованием микроскопа Ампливал (Карл Цейс, Йена, Германия) с объективом Апохромат 100х, апертура 1.32 МИ. Отобранные метафазные пластинки фотографировали с помощью цифровой видеокамеры LeicaDC 300 (Leica Camera AG, Германия). Обработку полученных изображений осуществляли с использованием графического редактора Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems, США).

ДНК выделяли из проростков пяти растений для каждого генотипа с применением набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) согласно протоколу производителя. Генотипирование гибридов и родительских форм проводили с помощью маркеров SSR (WMC, GWM), картированных в геноме гексаплоидной пшеницы (Somers et al., 2004). Проведенное ранее генотипирование л29 с помощью маркеров SSR и SNP показало наличие генетического материала дикой полбы в хромосомах 1BL, 2BS, 3B, 5B, 6AL (Орловская и др., 2023б). В связи с этим использовали маркеры только для данных хромосом: *Xgwm18*, *Xgwm374.2*, *Xgwm403*, *Xgwm274*, *Xgwm268*, *Xgwm11*, *Xgwm131*, *Xgwm498* для 1B; *Xgwm210*, *Xgwm614*, *Xgwm257*, *Xgwm410*, *Xgwm630*, *Xgwm148*, *Xgwm429*, *Xgwm319* – 2BS; *Xgwm389*, *Xgwm493*, *Xgwm533.2*, *Xgwm566*, *Xgwm285*, *Xgwm108*, *Xgwm107*, *Xgwm 264* – 3B; *Xgwm234*, *Xgwm159*, *Xgwm544*, *Xgwm67*, *Xgwm499*, *Xgwm554*, *Xgwm271*, *Xgwm408*, *Xgwm604*, *Xwmc99* – 5B; *Xgwm427*, *Xwmc621*, *Xwmc254*, *Xgwm169* – 6AL.

Условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) описаны в работе M.S. Röder с коллегами (1998). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с применением компьютерной программы Gene Mapper (версия 5.0), разработанной компанией Applied Biosystems, США. Предполагаемую хромосомную локализацию определяли на основании консенсусных карт хромосом пшеницы для маркеров SSR (Somers et al., 2004). Для визуализации карт хромосом использовали программу MapChart 2.32.

Микроспорогенез изучали на временных давленых препаратах по общепринятой методике (Паушева, 1988). Для каждой комбинации скрещивания и исходных форм анализировали по 30 пластинок метафазы I и по 50–80 пластинок следующих стадий мейоза: анафазы I и II, метафазы II, тетрад. Исследование препаратов проводили на микроскопе Ампливал (Карл Цейс) с объективом Апохромат 100х апертура 1.32 МИ.

Содержание макро- (K, P, Ca, Mg) и микроэлементов (Zn, Fe, Cu, Mn) в зерне определяли в Центре аналитических и спектральных измерений Государственного научного учреждения «Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси» на атомно-эмиссионном спектрометре IRIS Intrepid II XDL DUO. Для каждого образца анализ выполняли в двукратной биологической повторности, измерения повторяли 10 раз для каждой пробы. Общее содержание белка и клейковины в зерне, качество клейковины определяли на инфракрасном анализаторе «Инфра ЛЮМ ФТ-12» («Люмэкс», РФ) по ГОСТ ISO 12099-2017. Для оценки качества клейковины использовали показатель ИДК (индекс деформации клейковины, ГОСТ 13586.1-68). Согласно значениям ИДК выделяют: сильную клейковину (45–77 усл. ед., I группа качества), удовлетворительно слабую (78–102 усл. ед., II группа качества) и неудовлетворительно слабую (более 102 усл. ед., III группа качества).

Результаты эксперимента проанализированы с использованием методов описательной статистики, дисперсионного анализа в программных пакетах Statistica 10.0 (StatSoft, США) и MS Excel. Оценку различий между группами выполняли при помощи дисперсионного анализа и критерия LSD Fisher (Fisher's least significant difference – наименьшая значимая разность Фишера).

Результаты

Анализ характера интрогрессий генетического материала *T. dicoccoides* в геном гибридных форм

Для хромосомной идентификации чужеродного хроматина в геноме мягкой пшеницы использовали цитологический (С-бэндинг) и молекулярный (SSR-анализ) методы. Кариотип л29, послужившей донором генетического материала дикой полбы, детально изучен и описан нами ранее (Орловская и др., 2023б). Линия содержит фрагменты генетического материала *T. dicoccoides* в проксимальном районе длинного плеча хромосомы 1B и в дистальных районах короткого плеча хромосомы 2B и длинного плеча 5B, а также пару хромосом 3B полбы, заместивших соответствующие гомологи сорта Рассвет. Наличие полиморфизма по рисунку дифференциального окрашивания этих четырех хромосом между включенными в эксперимент сортами пшеницы Тома, Любава и л29 позволило проследить процесс передачи чужеродного хроматина в кариотип гибридных форм на основе данных сортов. Потомство от скрещивания Тома × л29 и л29 × Тома было неоднородным по хромосомному составу. В прямой комбинации скрещивания Тома × л29 выявлены интродуцированные от л29 хромосома 1B с фрагментом хроматина полбы в L-плече и хромосома 3B полбы, причем последняя присутствовала как в дисомном, так и в моносомном состоянии (одна хромосома от сорта пшеницы, другая – от полбы) (рис. 1).

У всех растений, полученных в обратной комбинации скрещивания л29 × Тома, выявлены пара хромосом 5B с фрагментом генетического материала *T. dicoccoides* в L-плече и хромосома 3B полбы, которая у половины проанализированных растений присутствовала в дисомном состоянии, а у второй половины – в моносомном (рис. 2, *а*).

У части растений в дополнение к перечисленным хромосомам присутствовала пара хромосом 2B с фрагментом генетического материала полбы (см. рис. 2, *б*). Отсутствие вариаций в хромосомном составе было характерно для потомства гибридов от скрещивания Любава × л29 – все

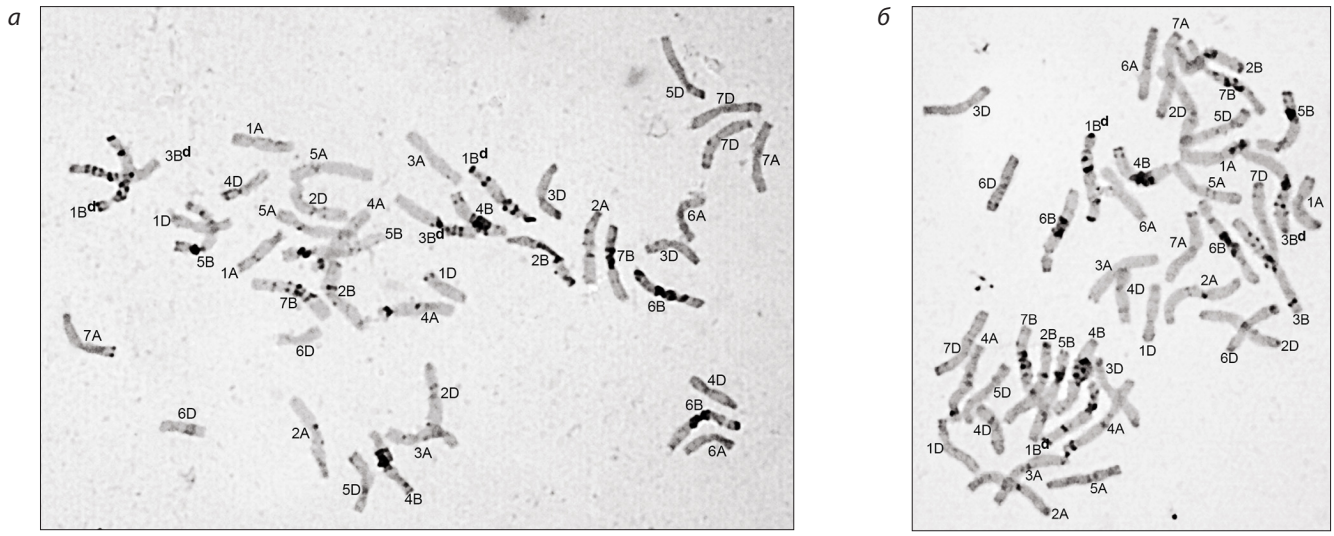


Рис. 1. Кариотипы растений в потомстве от скрещивания Тома × л29.

а – с парой хромосом 1B с фрагментом генетического материала *T. dicoccoides* и парой хромосом 3B полбы; *б* – с парой хромосом 1B с фрагментом генетического материала *T. dicoccoides* и гетероморфной парой хромосом 3B/3B^{d}. Интродуцированные от линии 29 хромосомы с генетическим материалом *T. dicoccoides* обозначены надстрочной буквой "d".

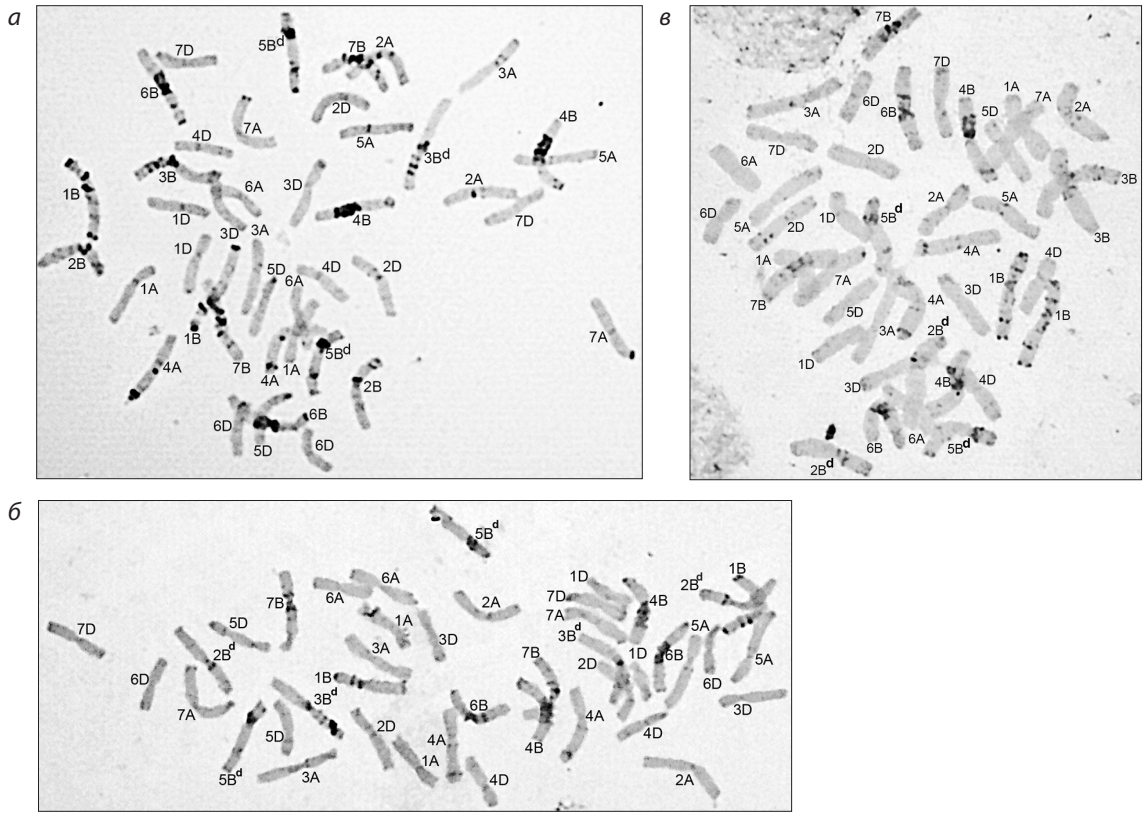


Рис. 2. Кариотипы растений с различными вариантами интрогрессии генетического материала *T. dicoccoides.*

а и *б* – гибрид л29 × Тома; *в* – гибрид Любава × л29. Интродуцированные от линии 29 хромосомы с генетическим материалом *T. dicoccoides* обозначены надстрочной буквой "d".

растения содержали в кариотипах интродуцированные от л29 хромосомы 2B и 5B с фрагментами генетического материала полбы (см. рис. 2, *в*). Растения в потомстве комбинации л29 × Любава содержали интрогрессии хроматина полбы, аналогичные прямой комбинации скрещивания. Здесь необходимо отметить, что найти методом С-бэндинга возможное замещение в кариотипах гибридов хромосом 3B сорта Любава соответствующими гомологами полбы не представлялось возможным вследствие сходства рисунков их дифференциального окрашивания.

Таблица 1. Хромосомная локализация генетического материала *T. dicoccoides* у гибридов пшеницы по данным С-бэндинга и SSR-анализа

Комбинация скрещивания	С-бэндинг	SSR-анализ
Линия 29 Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199	1BL, 2BS, 3B, 5BL	1BL, 2BS, 3B, 5B, 6AL
Дарья × л29	–	3B, 5BL, 6AL
Тома × л29	1BL, 3B	1BL, 3B, 6AL
Ласка × л29	–	2BS, 3B
Любава × л29	2BS, 5BL	2BS, 3B, 5BL
л29 × Дарья	–	2BS, 3B, 5B, 6AL
л29 × Тома	2BS, 3B, 5BL	2BS, 3B, 5BL, 6AL
л29 × Ласка	–	2BS, 3B
л29 × Любава	2BS, 5BL	2BS, 3BS, 5B

Примечание. «–» – выявление генетического материала *T. dicoccoides* методом С-бэндинга не проводили.

Из-за отсутствия полиморфизма оценить частоту включения хроматина полбы в кариотипы гибридов, полученных с участием сортов Дарья и Ласка, с помощью С-бэндинга нам не удалось. Для выявления интрогрессированных фрагментов у данных гибридов, а также для обнаружения чужеродного материала в хромосомах с малым количеством диагностических гетерохроматиновых блоков были использованы маркеры SSR. Из 38 использованных маркеров SSR 23 маркера выявили полиморфизм между родительскими сортами и л29. Молекулярный анализ позволил обнаружить рекомбинационные события у всех проанализированных гибридов. Для гибридных форм на основе сортов Тома и Любава микросателлитный анализ подтвердил результат С-бэндинга, а также выявил генетический материал *T. dicoccoides* и в других хромосомах (табл. 1, рис. 3).

Так, у гибридов Тома × л29 и л29 × Тома обнаружен фрагмент чужеродного генетического материала в длинном плече хромосомы 6А, который не удалось установить с помощью С-бэндинга из-за малого количества гетерохроматиновых блоков в хромосомах генома А. У гибридов на основе сорта Любава, кроме вставки чужеродного хроматина, в хромосомах 2В и 5В обнаружены фрагменты полбы в хромосоме 3В, которые не были найдены из-за сходства рисунков дифференциального окрашивания хромосом 3В сорта Любава и л29. Для гибридов, созданных с участием сорта Дарья, включение чужеродного материала установлено в хромосомах 3В, 5В и 6А, а в обратной комбинации скрещивания есть еще фрагмент от полбы в коротком плече хромосомы 2В (см. рис. 3). Меньше всего фрагментов интрогрессии среди изученного материала было у гибридов на основе сорта Ласка (см. табл. 1, рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте включения генетического материала *T. dicoccoides* в геном гибридных форм. Среди проанализированного потомства восьми комбинаций скрещивания выявлены все варианты характерных для л29 интрогрессий материала полбы, причем в большинстве случаев они присутствуют у обоих гомологов, что говорит о близком завершении процесса стабилизации кариотипа. Самая высокая частота включения генетического материала *T. dicoccoides* в геном мягкой пшеницы обнаружена для хромосомы 3В, а наименьшая – для хромосомы 1В (соответственно в 8 и 1 гибридных комбинациях из 8).

Анализ цитологической стабильности

Проведенный нами ранее анализ поведения хромосом на различных стадиях микроспорогенеза у линий мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом показал, что л29 относится к наиболее стабильным генотипам среди интрогрессивных линий. Уровень спаривания хромосом на стадии метафазы I у л29 был высоким – количество хромосом, входящих в биваленты, составило 99.76 %. Мейотический индекс (важный показатель нормального течения всего мейоза) данного генотипа был максимальным среди линий с включением генетического материала дикой полбы – 93.0 % (Орловская и др., 2023б). Высокая цитологическая стабильность интрогрессивной линии 29 позволяет предположить, что у созданных с ее участием гибридов все этапы мейоза также будут протекать без существенных нарушений.

Анализ стадии метафазы I в материнских клетках пыльцы (МКП) у изученных генотипов пшеницы показал высокий уровень бивалентного спаривания хромосом как у родительских сортов, так и у гибридного материала. Количество хромосом, входящих в состав бивалентов, превышало 99 % (табл. 2).

В исследованном материале обнаружены клетки только с двумя унивалентами, причем частота встречаемости их невысока (3.33–6.67 %). Высокий уровень спаривания хромосом в метафазе I обеспечил незначительное количество нарушений на последующих стадиях мейоза (рис. 4). Нарушений во втором делении (анафаза II), как правило, было меньше, чем в первом. Можно отметить в анафазе II сокращение количества МКП с мостами (1.25–6.25 %) и асинхронным делением (1.43–16.25 %) по сравнению с предыдущими фазами мейоза: 2.5–14.28 и 3.64–18.64 % соответственно. На заключительной стадии доля нормальных тетрад у всего изученного материала превышала 90 % (см. рис. 4). Основным нарушением на данной стадии было наличие в тетрадах микроядер, количество которых варьировало от 1 до 4, однако чаще

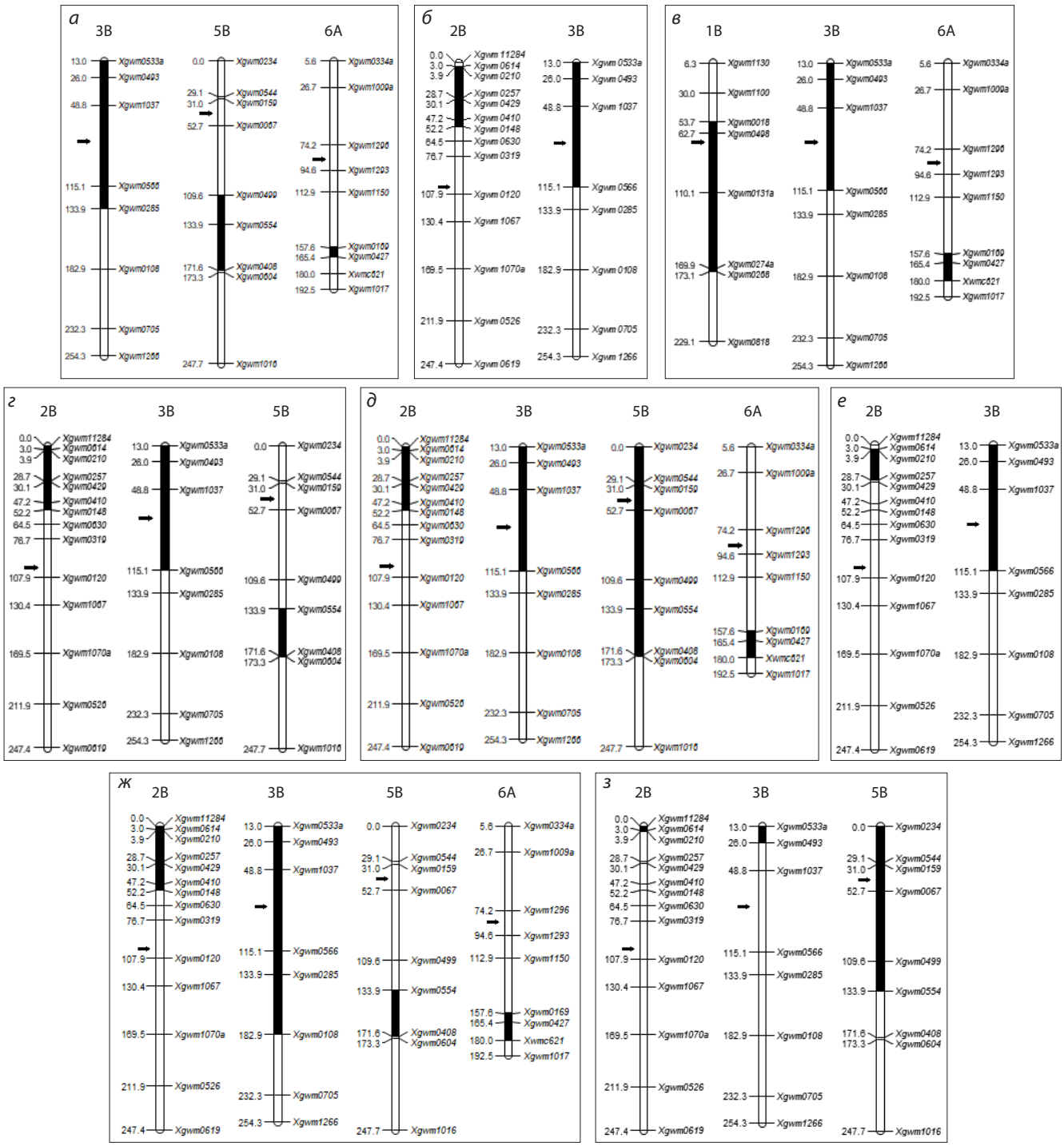


Рис. 3. Схематическая иллюстрация фрагментов генома *T. dicoccoides* у гибридов.

а – Дарья × л29; *б* – Ласка × л29; *в* – Тома × л29; *г* – Любава × л29; *д* – л29 × Дарья; *е* – л29 × Ласка; *ж* – л29 × Тома; *з* – л29 × Любава. Порядок микросателлитных маркеров соответствует генетическим картам хромосом *T. aestivum* (Somers et al., 2004). Темные блоки показывают протяженность фрагментов интрогрессии. Слева от хромосомы представлены дистанции между маркерами в сантиморганах; позиция центромеры показана стрелкой.

всего формировались тетрады с 1 и 2 микроядрами. МКП с 4 микроядрами характерны только для трех гибридов, л29 × Ласка, Ласка × л29, Дарья × л29, и частота встречаемости их составила всего 0.91–1.11 % от общего числа проанализированных клеток.

Количество МКП без нарушений было, как правило, немного выше у гибридов обратных комбинаций скрещивания, но на заключительной стадии существенных различий между гибридами разного направления скрещивания не обнаружено (см. рис. 4). Максимальный мейотический индекс (98 %) среди гибридного материала отмечен в комбинации Любава × л29.

Таким образом, гибриды F_4 от скрещивания современных сортов яровой мягкой пшеницы с интрогрес-

Таблица 2. Поведение хромосом в метафазе I мейоза вторичных интрогрессивных гибридов мягкой пшеницы F_4 и их родительских форм

Генотип	Биваленты, шт.				Униваленты, шт.
	закрытые	открытые	всего	%	
Дарья	20.60 ± 0.12	0.40 ± 0.12	21.00 ± 0.00	100	–
Тома	19.87 ± 0.24	1.07 ± 0.24	20.93 ± 0.05	99.67	0.14 ± 0.09
Ласка	20.65 ± 0.13	0.3 ± 0.13	20.95 ± 0.05	99.76	0.10 ± 0.10
Любава	19.3 ± 0.21	1.47 ± 0.21	20.93 ± 0.07	99.97	0.14 ± 0.13
Дарья × л29	20.07 ± 0.20	0.90 ± 0.19	20.97 ± 0.03	99.86	0.06 ± 0.07
Тома × л29	20.40 ± 0.16	0.60 ± 0.16	21.00 ± 0.00	100	0
Ласка × л29	19.23 ± 0.66	1.03 ± 0.18	20.93 ± 0.05	99.67	0.14 ± 0.09
Любава × л29	20.27 ± 0.16	0.73 ± 0.16	21.00 ± 0.00	100	0
л29 × Дарья	19.97 ± 0.19	1.03 ± 0.19	21.00 ± 0.00	100	0
л29 × Тома	20.37 ± 0.15	0.60 ± 0.14	20.97 ± 0.03	99.86	0.06 ± 0.07
л29 × Ласка	20.17 ± 0.21	0.80 ± 0.21	20.97 ± 0.03	99.86	0.06 ± 0.07
л29 × Любава	20.33 ± 0.15	0.60 ± 0.15	20.93 ± 0.05	99.67	0.14 ± 0.09

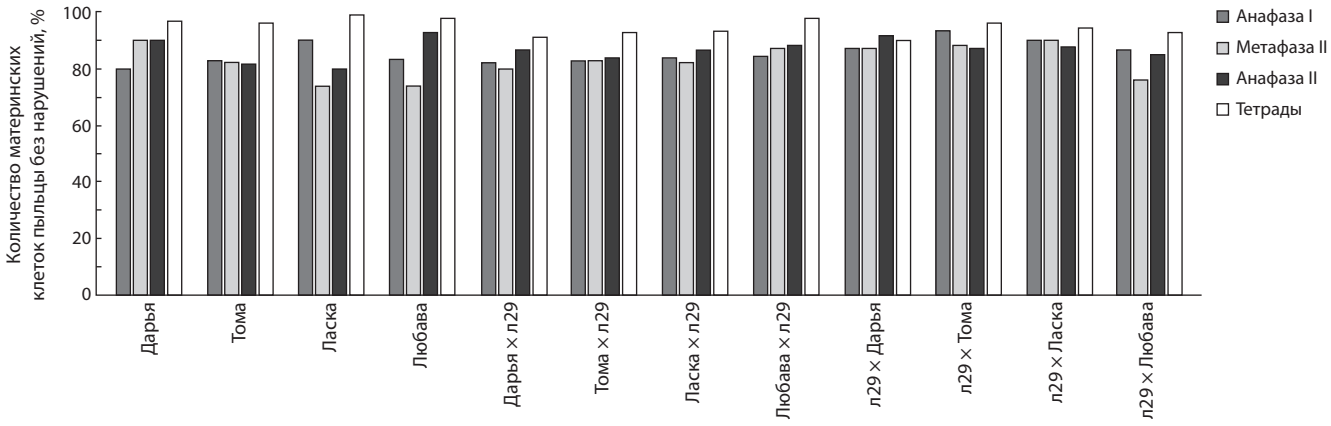


Рис. 4. Количество материнских клеток пыльцы без нарушений (%) на различных стадиях мейоза вторичных интрогрессивных гибридов мягкой пшеницы F_4 и родительских сортов.

сивной линией 29 Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199 на всех изученных стадиях мейоза проявили высокий уровень стабильности, сопоставимый с родительскими сортами, что обеспечивает успешную репродукцию созданного гибридного материала.

Минеральный состав зерна

Повышение содержания минеральных веществ в зерне основных сельскохозяйственных культур является актуальной проблемой, так как дефицит микроэлементов (так называемый скрытый голод) оказывает существенное влияние на здоровье и благополучие человека (Gupta et al., 2021). В связи с этим мы оценили минеральный состав зерна вторичных интрогрессивных гибридов мягкой пшеницы в сравнении с родительскими формами. Обнаружено, что содержание микроэлементов в среднем за два года у л29 составило: Cu – 3.1; Fe – 54.4; Mn – 25.1 и Zn – 30.9 мг/кг (рис. 5), что оказалось значимо выше, чем в группе сортов, у которых эти значения составляли 1.9; 45.4; 20.6 и 27.4 мг/кг соответственно.

Данная интрогрессивная линия в оба года исследования превосходила все изученные сорта по содержанию Cu, Fe, Mn, но незначительно уступала сорту Любава по содержанию Zn (см. рис. 5). В среднем за 2021–2022 гг. большинство гибридов накапливало больше Cu, Fe и Mn, чем исходный сорт (статистически достоверное превышение по содержанию Fe выявлено для генотипов Тома × л29, Ласка × л29, л29 × Любава, а по содержанию Mn – Тома × л29, л29 × Дарья, л29 × Тома). При этом в 2022 г. содержание всех изученных микроэлементов у гибридов было, как правило, значимо выше, чем у исходного сорта. В 2021 г. такая тенденция отмечена по содержанию Fe для генотипов на основе сорта Дарья; по содержанию Mn – на основе сортов Дарья и Тома; по содержанию Cu – генотипов Тома × л29 и Ласка × л29. Для гибридов, созданных с участием сортов Дарья и Тома, показано также высокое количество Zn, достоверно превышающее родительский сорт (см. рис. 5).

Максимальным уровнем накопления Cu и Fe характеризовались гибриды Дарья × л29 и л29 × Дарья. В частно-

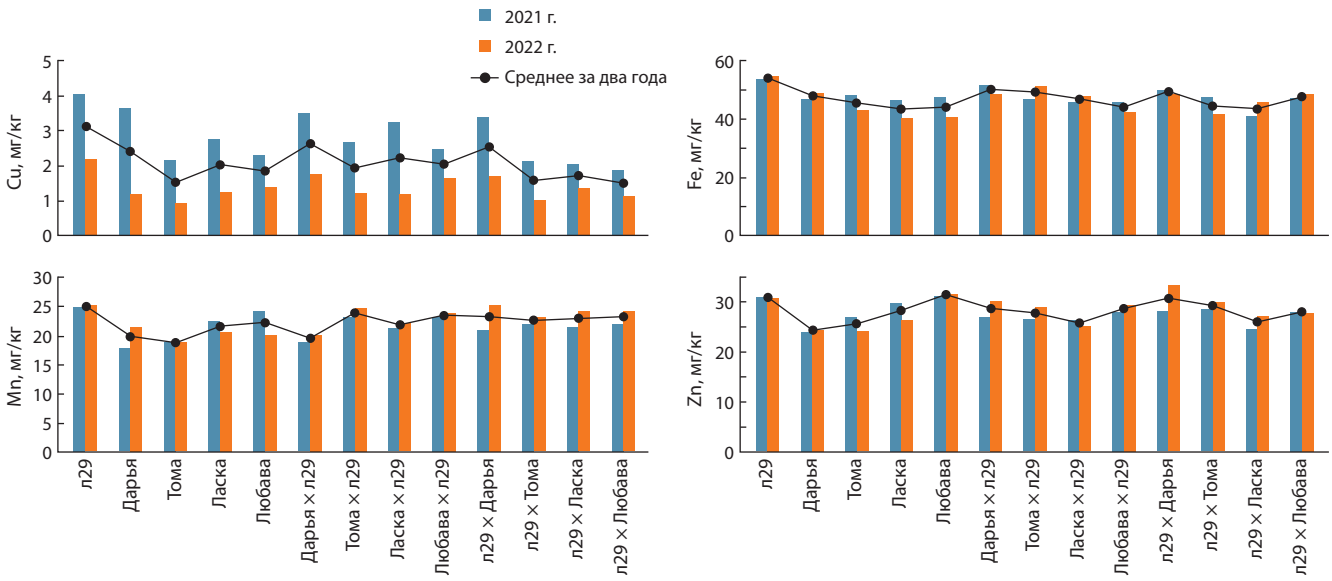


Рис. 5. Содержание микроэлементов в зерне вторичных гибридов яровой мягкой пшеницы и их родительских форм в 2021 и 2022 гг. и в среднем за два года.

сти, среднее за два года содержание Cu в зерне данных гибридов было 2.7 и 2.6 мг/кг соответственно, железа – 50.3 и 49.7 мг/кг соответственно. Наиболее высокое содержание Mn отмечено у гибридов Тома × л29 и Любава × л29 (24.0 и 23.6 мг/кг соответственно), а Zn – у гибридов л29 × Дарья и л29 × Тома (30.7 и 29.2 мг/кг соответственно). Данные гибриды по количеству Cu, Fe, Mn в зерне превосходили все изученные генотипы, за исключением л29, а по содержанию Zn – за исключением л29 и сорта Любава.

Что касается макроэлементов, то л29 по содержанию Ca (в среднем за два года 369.0 мг/кг) уступала сортам мягкой пшеницы (478.5 мг/кг), гибриды также не достигали уровня родительского сорта (Приложение, табл. S1)[1]. По содержанию остальных макроэлементов л29 несколько превышала сорта. Так, в среднем за два года содержание K, Mg и P у л29 составило соответственно 5207.8; 1370.0 и 4505.5 мг/кг, а в группе сортов – 5083.7; 1364.9 и 4137.8 мг/кг. В оба года исследования значимое преимущество над исходным сортом выявлено только для гибридов на основе сорта Ласка по содержанию K и для гибрида л29 × Дарья – по содержанию P. Достоверное превышение над сортом по содержанию Mg наблюдали только в 2022 г. в обратных комбинациях скрещивания (кроме л29 × Любава).

Основные показатели качества зерна

При оценке качества зерна большое значение имеют такие показатели, как содержание белка, клейковины и качество клейковины, поскольку они определяют питательные и хлебопекарные свойства зерна пшеницы. Высокобелковые генотипы представляют особый интерес для селекционеров во всем мире, так как установлена большая роль белка в формировании качества зерна пшеницы (Tanin et al., 2022).

В оба года исследования у л29 уровень накопления белка и клейковины был выше, чем у современных сортов белорусской селекции. Так, содержание белка у л29 в 2021 и 2022 гг. составило 18.3 и 16.5 % соответственно, а у родительских сортов – 17.1–17.6 и 14.9–16.1 % соответственно. Массовая доля клейковины у л29 в 2021 и 2022 гг. составила 43.0 и 28.1 % соответственно, у сортов – 30.7–32.7 и 23.6–27.8 % соответственно. Большинство гибридов в оба года исследований характеризовалось более высоким содержанием белка и клейковины в зерне по сравнению с родительским сортом (рис. 6). При этом гибриды л29 × Дарья и л29 × Тома по белковости превосходили все генотипы. Количество клейковины у данных гибридов уступало только генотипу л29.

Превышение изученных гибридов над исходным сортом по признаку «качество клейковины» в оба года установлено для комбинаций на основе сорта Дарья. В 2022 г. такая тенденция характерна для большинства гибридных генотипов (см. рис. 6). В среднем за два года гибриды Любава × л29 (85.3 усл. ед. ИДК) и Ласка × л29 (85.5 усл. ед. ИДК) имели самые низкие значения ИДК среди всего гибридного материала и незначительно уступали по качеству клейковины только сорту Ласка (84.8 усл. ед. ИДК).

Показатели продуктивности

В настоящее время особую ценность имеют сорта пшеницы, сочетающие высокие показатели качества зерна и продуктивности. Мы оценили полученные гибриды по основным количественным признакам (табл. S2 и S3). В среднем за два года л29 превышала изученные сорта по всем изученным количественным признакам, однако статистически достоверное превосходство отмечено только для показателей «длина колоса» и «масса зерна с растения». В отдельные годы интрогрессивная линия характеризовалась значимо более высокой продуктивной кустистостью (2022 г.), массой зерна с колоса (2021 г.) и массой 1000 зерен (2021 г.). В среднем для группы «гибриды»

[1] Табл. S1–S3 Приложения см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx48.pdf

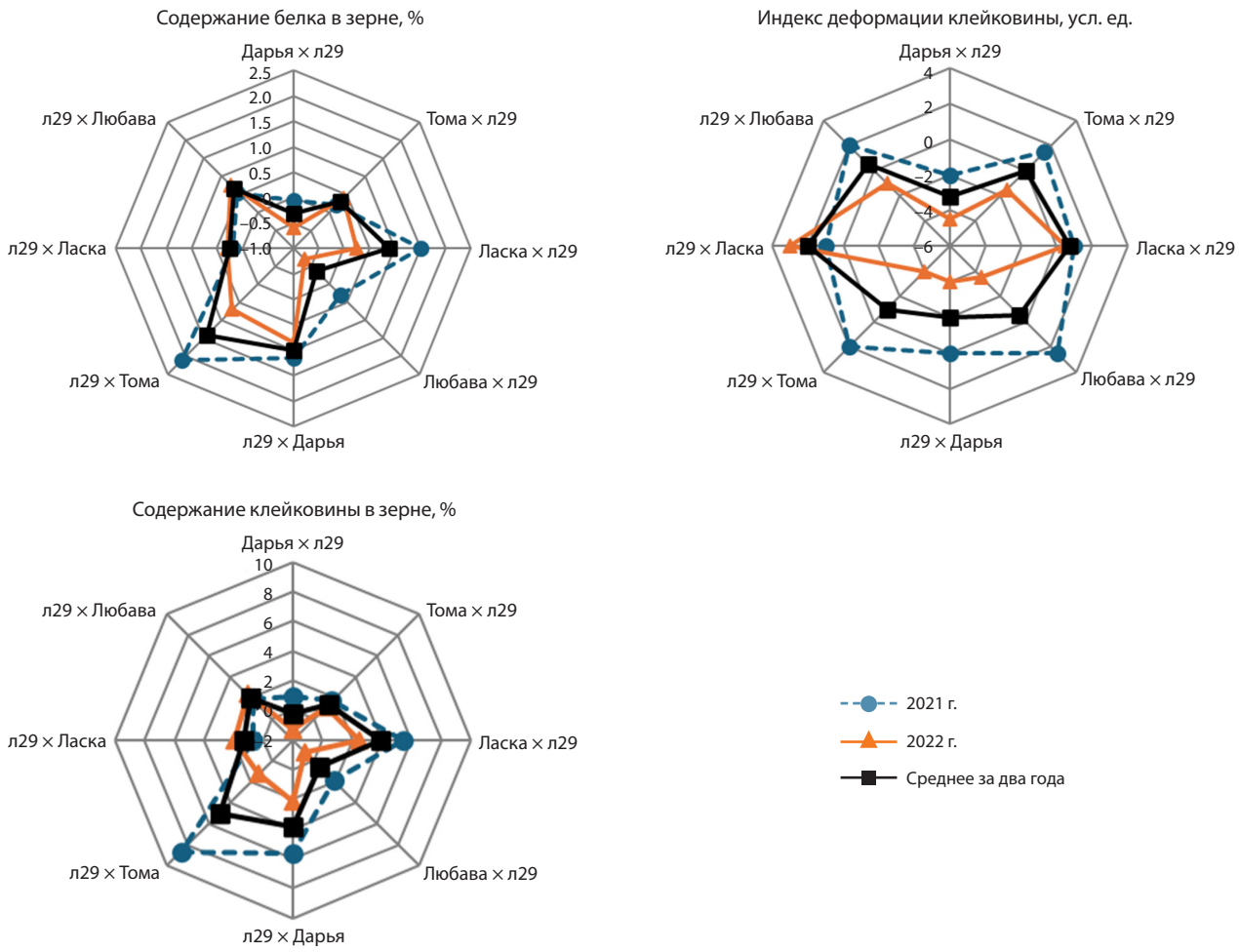


Рис. 6. Разность между средними значениями признаков качества зерна гибридов пшеницы и их родительскими сортами в 2021, 2022 гг. и в среднем за два года.

Таблица 3. Значения количественных признаков в группах генотипов пшеницы в среднем за два года (X ± SEM)

Признак	Линия 29	Сорта	Гибриды
Продуктивная кустистость, шт.	3.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1
Длина колоса, см	10.3 ± 0.2*	9.8 ± 0.0	10.3 ± 0.1*
Число колосков в колосе, шт.	19.6 ± 0.3	18.9 ± 0.2	19.8 ± 0.1*
Число зерен с колоса, шт.	46.6 ± 1.2	42.2 ± 1.2	46.4 ± 0.8*
Масса зерна с колоса, г	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Масса зерна с растения, г	4.7 ± 0.5*	3.7 ± 0.2	4.1 ± 0.1
Масса 1000 зерен, г	39.9 ± 1.1	36.6 ± 1.3	35.4 ± 0.9

* Статистически значимые различия по сравнению с группой «сорта» при $p < 0.05$; X – средние значения признаков; SEM – стандартная ошибка среднего.

отмечены более высокие значения по всем признакам (за исключением массы 1000 зерен) по сравнению с группой «сорта», при этом значимое преимущество выявлено для признаков продуктивности колоса (табл. 3).

Главный колос вносит большой вклад в общую продуктивность растения. Длина колоса, число колосков и зерен в главном колосе у исследованных гибридов с высоким уровнем достоверности превышали показатели исходного сорта или были на его уровне. По зерновой продуктивности колоса можно выделить гибриды Ласка × л29 и Любава × л29, которые превосходили не только родительские сорта, но и остальные гибриды по числу и массе зерна главного колоса (см. табл. S3). По признакам «масса зерна с растения» и «масса 1000 зерен» между гибридами и родительскими сортами не выявлено значимых различий: данные показатели находились соответственно в пределах 3.2–4.3 и 33.8–41.0 г у сортов и 3.4–4.5 и 33.1–38.2 г – у гибридов.

Обсуждение

Известно, что образцы *T. dicoccoides* обладают рядом хозяйственно полезных признаков: «высокое содержание белка и микроэлементов в зерне», «устойчивость к биотическим и абиотическим факторам» (Chatzav et al., 2010; Lucas et al., 2017; Mohammadi et al., 2021). Однако при скрещивании сортов мягкой пшеницы с дикой полбой гибриды наряду с ценными признаками могут унаследовать и нежелательные свойства дикорастущего сородича (низкая продуктивность, ломкость колоса, трудный обмолот) (Özkan et al., 2011). Кроме того, при межвидовой гибридизации возможны интрогрессии, затрагивающие функционирование главных генов синапсиса хромосом, что приводит к существенному снижению мейотического индекса и длительному формообразовательному процессу (расщеплению по морфологическим и хозяйственно полезным признакам).

Для генетических и селекционных исследований представляют интерес цитогенетически стабильные формы с включением чужеродного генетического материала, положительно влияющего на хозяйственно важные признаки. Считается, что при замещении плеча хромосомы негативный эффект интрогрессии меньше, чем при замещении целой хромосомы пшеницы чужеродной хромосомой (Millet et al., 2013). Полученная нами линия 29 комбинации Рассвет × *T. dicoccoides* обладает высокой цитологической стабильностью, несмотря на наличие фрагментов чужеродного генома в пяти хромосомах, в том числе в хромосомах 3B и 5B, на которых локализованы основные гены, регулирующие процесс мейоза у пшеницы (Bhullar et al., 2014; Darrier et al., 2022). Ценность данной линии состоит в том, что наряду с высоким мейотическим индексом и улучшенными питательными свойствами л29 по основным количественным показателям находится на уровне современных сортов мягкой пшеницы.

Включение чужеродного генетического материала установлено в геномах всех гибридов, полученных от скрещивания сортов с л29. В потомстве, созданном с участием сортов Дарья, Тома, Ласка и Любава, количество и сочетание вариантов интродуцированных фрагментов полбы разные, что говорит о влиянии на процесс закрепления чужеродного генетического материала в гибридном геноме сорта пшеницы, а точнее, генотипической среды формирующейся гибридной формы. При этом все гибриды были цитологически стабильны уже в четвертом поколении, что обеспечивает успешную репродукцию созданного гибридного материала.

В нашей работе показана эффективность улучшения современных сортов пшеницы по содержанию белка, клейковины и минерального состава зерна посредством использования интрогрессивной линии пшеницы в качестве источника генетического материала дикой полбы. Получены гибриды, которые в оба года исследования значимо превосходили родительские сорта по накоплению: Cu – Тома × л29, л29 × Дарья; Mn – Тома × л29, л29 × Дарья, л29 × Тома; Zn – Дарья × л29, л29 × Дарья, л29 × Тома; K – Ласка × л29, л29 × Ласка; P – л29 × Дарья; белка и клейковины – Тома × л29, Ласка × л29; все обратные комбинации скрещивания.

Кроме того, все изученные гибридные генотипы не уступали сортам по основным количественным признакам, а иногда превосходили их: л29 × Тома – по длине главного колоса; Тома × л29 и л29 × Любава – по числу колосков в колосе; Любава × л29, л29 × Тома и л29 × Любава – по числу зерен в колосе. Сравнение вторичных интрогрессивных гибридов со стандартом яровой мягкой пшеницы (сортом Любава) показало, что на протяжении всего периода исследований Дарья × л29 статистически достоверно превышала стандарт по содержанию Cu, Fe, K; л29 × Дарья – Cu, Fe, K, P, белка и клейковины; л29 × Тома и л29 × Любава – белка и клейковины; Ласка × л29 и л29 × Ласка – Ca. По остальным признакам существенных различий между сортом-стандартом и гибридами не выявлено. Только число зерен в колосе у сорта Любава было значимо ниже, чем у гибридов (кроме Дарья × л29 и л29 × Любава).

На сегодняшний день повышенное внимание уделяется поиску генов, влияющих на содержание микро- и макроэлементов в зерне пшеницы. Наибольшее число исследований в этой области связано с изучением цинка и железа как наиболее важных микроэлементов для формирования продуктивности растений. Например, ряд локусов, связанных с содержанием данных микроэлементов, был идентифицирован с помощью QTL (quantitative trait loci – локусы количественных признаков) картирования и методического подхода GWAS (genome wide association study – полногеномный поиск ассоциаций) (Hao et al., 2014; Velu et al., 2018). В селекционном центре CIMMYT использование GWAS для анализа генетики накопления в зерне Zn на материале 330 линий мягкой пшеницы позволило выявить 39 ассоциаций маркер–признак. На хромосомах 2B и 7B обнаружено два района QTL с большим эффектом на исследуемый признак (Velu et al., 2018). В работе J. Tong с коллегами (2020) на основании сведений о генах, вовлеченных в гомеостаз Zn и Fe у модельных растений (арабидопсиса и риса), у пшеницы идентифицировано 254 ортологичных гена. Данные гены обнаружены на всех хромосомах пшеницы, при этом наибольшее их количество – на второй (23 %), пятой (15 %) и третьей (14 %) гомологичных группах хромосом.

В нашем исследовании максимальный уровень накопления Zn в зерне отмечен для гибридов л29 × Дарья и л29 × Тома с фрагментами генетического материала дикой полбы в хромосомах 2BS, 3B, 5B и 6AL. Причем ассоциированные с содержанием Zn и Fe в зерне пшеницы QTL, которые описаны в работе (Tong et al., 2020), совпадают по локализации с областями интрогрессии чужеродного генетического материала в хромосомах 2B, 3B и 5B у данных гибридов. Можно отметить, что эти генотипы имели также высокое содержание белка и клейковины в зерне, превосходящее таковое у родительских сортов и других гибридов. Высокие показатели по этим признакам выявлены также у гибрида Тома × л29 с включением чужеродного материала в хромосомах 1BL, 3B и 6AL.

В работах зарубежных ученых встречаются данные о роли различных хромосом в регуляции процесса накопления белка в зерне пшеницы (Liu et al., 2019; Alemu et al., 2021). Например, на хромосоме 5B обнаружены локусы,

ассоциированные с содержанием белка и клейковины в зерне растений, выращенных в разных условиях среды (Gonzalez-Hernandez et al., 2004; Giancaspro et al., 2019; Alemu et al., 2021). Генетические области, контролирующие содержание белка у пшеницы, найдены также на хромосомах 3A и 3B (Kartseva et al., 2023), 2B и 6A (Muqaddasi et al., 2020). В обзоре (Paina, Gregersen, 2023) приводятся данные о наличии на всех хромосомах пшеницы 325 QTL, участвующих в регуляции накопления белка в зерне. Некоторые из этих локусов оказывают негативный эффект на урожайность. Однако изучение линий пшеницы, полученных от скрещивания с дикой полбой (Liu et al., 2019; Fatiukha et al., 2020), показало отсутствие значимой ассоциации между содержанием белка и массой 1000 зерен. В настоящее время имеются сведения о выявлении участков генома пшеницы, которые оказывают положительный эффект на накопление белка в зерне без влияния на урожайность, а также участков с благоприятным эффектом на оба показателя (Thorwarth et al., 2019; Ruan et al., 2021), что говорит о возможности преодоления отрицательной корреляции между двумя хозяйственно ценными признаками и создания генотипов с высоким содержанием белка в зерне без снижения продуктивности.

Заключение

Показана эффективность использования линии пшеницы с включением генетического материала *T. dicoccoides* для улучшения современных сортов по содержанию белка, клейковины и минерального состава зерна без снижения продуктивности. Данные С-бэндинга и микросателлитного анализа свидетельствуют о высокой частоте включения генетического материала дикой полбы в геном гибридных форм, полученных от скрещивания сортов яровой мягкой пшеницы белорусской селекции Дарья, Тома, Ласка, Любава с интрогрессивной линией 29 Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199 (четыре прямые и четыре обратные комбинации скрещивания).

Среди проанализированного потомства восьми комбинаций скрещивания выявлены все варианты интрогрессий чужеродного генетического материала, характерные для линии 29, причем в большинстве случаев они присутствуют у обоих гомологов, что говорит о стабилизации кариотипа. Для всех гибридов F_4 характерен высокий уровень цитологической стабильности (мейотический индекс составил 90.0–98.0 %). Выделены вторичные интрогрессивные гибриды, превосходящие родительские сорта по комплексу признаков качества зерна в оба года: л29 × Дарья (содержание белка, клейковины, Cu, Mn, Zn, P); л29 × Тома (содержание белка, клейковины, Mn, Zn); Ласка × л29 и л29 × Ласка (содержание белка, клейковины, K); Тома × л29 (содержание белка, клейковины, Cu, Mn). Кроме того, данные гибриды по основным показателям продуктивности не уступают современным сортам мягкой пшеницы, что повышает ценность их для селекции.

Список литературы / References

Орловская О.А., Вакула С.И., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. Минеральный состав зерна линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023а;184(1):42-52. doi 10.30901/2227-8834-2023-1-42-52
[Orlovskaya O.A., Vakula S.I., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Mineral composition of bread wheat lines with introgressions of alien genetic material. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023a;184(1):42-52. doi 10.30901/2227-8834-2023-1-42-52 (in Russian)]

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. dicoccum* и *T. dicoccoides*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023б;27(6):553-564. doi 10.18699/VJGB-23-67
[Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Solovey L.A., Dubovets N.I. Molecular cytological analysis of alien introgres sions in common wheat lines created by crossing of *Triticum aestivum* with *T. dicoccoides* and *T. dicoccum*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2023b;27(6):553-564. doi 10.18699/VJGB-23-67]

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988
[Pausheva Z.P. Practical Course on Plant Cytology. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988 (in Russian)]

Савин Т.В., Абугалиева А.И., Чакмак И., Кожахметов К. Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):88-96. doi 10.18699/VJ18.335
[Savin T.V., Abugaliyeva A.I., Cakmak I., Kozhakhmetov K. Mineral composition of wild relatives and introgressive forms in wheat selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2018;22(1):88-96. doi 10.18699/VJ18.335 (in Russian)]

Akcura M., Kokten K. Variations in grain mineral concentrations of Turkish wheat landraces germplasm. *Qual Assur Saf Crops Foods*. 2017;9(2):153-159. doi 10.3920/QAS2016.0886

Alemu A., El Baouchi A., El Hanafi S., Kehel Z., Eddakhir K., Tadesse W. Genetic analysis of grain protein content and dough quality traits in elite spring bread wheat (*Triticum aestivum*) lines through association study. *J Cereal Sci*. 2021;100:103214. doi 10.1016/j.jcs.2021.103214

Arora S., Cheema J., Poland J., Uauy C., Chhuneja P. Genome-wide association mapping of grain micronutrients concentration in *Aegilops tauschii*. *Front Plant Sci*. 2019;10:54. doi 10.3389/fpls.2019.00054

Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill D.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (*Poaceae*). *Plant Syst Evol*. 1994;192(1):117-145. doi 10.1007/BF00985912

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

Cakmak I., Ozkan H., Braun H.J., Welch R.M., Romheld V. Zinc and iron concentration in seeds of wild, primitive and modern wheats. *Food Nutr Bull*. 2000;21(4):401-403. doi 10.1177/15648265000210041 1

Chatzav M., Peleg Z., Ozturk L., Yazici A., Fahima T., Cakmak I., Saranga Y. Genetic diversity for grain nutrients in wild emmer wheat: potential for wheat improvement. *Ann Bot*. 2010;105(7):1211-1220. doi 10.1093/aob/mcq024

Darrier B., Colas I., Rimbert H., Choulet F., Bazile J., Sortais A., Jenczewski E., Sourdille P. Location and identification on chromosome 3B of bread wheat of genes affecting chiasma number. *Plants*. 2022;11(17):2281. doi 10.3390/plants11172281

Fatiukha A., Filler N., Lupo I., Lidzbarsky G., Klymiuk V., Korol A.B., Pozniak C., Fahima T., Krugman T. Grain protein content and thousand kernel weight QTLs identified in a durum × wild emmer wheat mapping population tested in five environments. *Theor Appl Genet*. 2020;133(1):119-131. doi 10.1007/s00122-019-03444-8

Giancaspro A., Giove S.L., Zacheo S.A., Blanco A., Gadaleta A. Genetic variation for protein content and yield-related traits in a durum

population derived from an inter-specific cross between hexaploid and tetraploid wheat cultivars. *Front Plant Sci*. 2019;10:1509. doi 10.3389/fpls.2019.01509

Goel S., Singh B., Gwal S., Jaat R.S., Singh N.K. Variability in Fe and Zn content among Indian wheat landraces for improved nutritional quality. *Indian J Genet Plant Breed*. 2018;78(4):426-432. doi 10.31742/IJGPB.78.4.4

Gonzalez-Hernandez J., Elias E., Kianian S. Mapping genes for grain protein concentration and grain yield on chromosome 5B of *Triticum turgidum* (L.) var. *dicoccoides*. *Euphytica*. 2004;139:217-225. doi 10.1007/s10681-004-3157-4

Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma S., Kumar R. Biofortification and bioavailability of Zn, Fe and Se in wheat: present status and future prospects. *Theor Appl Genet*. 2021;134(1):1-35. doi 10.1007/s00122-020-03709-7

Hao Y., Velu G., Peña R.J., Singh S., Singh R.P. Genetic loci associated with high grain zinc concentration and pleiotropic effect on kernel weight in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed*. 2014;34(4):1893-1902. doi 10.1007/s11032-014-0147-7

Heidari B., Padash S., Dadkhodaie A. Variations in micronutrients, bread quality and agronomic traits of wheat landrace varieties and commercial cultivars. *Aust J Crop Sci*. 2016;10(3):377-384. doi 10.21475/ajcs.2016.10.03.p7231

Kartseva T., Alqudah A.M., Aleksandrov V., Alomari D.Z., Doneva D., Arif M.A.R., Börner A., Misheva S. Nutritional genomic approach for improving grain protein content in wheat. *Foods*. 2023;12(7):1399. doi 10.3390/foods12071399

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 concentrations in wheat advanced lines derived from wild emmer. *Front Plant Sci*. 2021;12:651283. doi 10.3389/fpls.2021.651283

Lucas S.J., Salantur A., Yazar S., Budak H. High-throughput SNP genotyping of modern and wild emmer wheat for yield and root morphology using a combined association and linkage analysis. *Funct Integr Genomics*. 2017;17(6):667-685. doi 10.1007/s10142-017-0563-y

Marcos-Barbero E.L., Pérez P., Martínez-Carrasco R., Arellano J.B., Morcuende R. Genotypic variability on grain yield and grain nutritional quality characteristics of wheat grown under elevated CO_2 and high temperature. *Plants*. 2021;10(6):1043. doi 10.3390/plants10061043

Millet E., Rong J.K., Qualset C.O., McGuire P.E., Bernard M., Sourdille P., Feldman M. Production of chromosome-arm substitution lines of wild emmer in common wheat. *Euphytica*. 2013;190(1):1-17. doi 10.1007/s10681-012-0725-x

Mohammadi M., Mirlohi A., Majidi M.M., Soleimani Kartalaei E. Emmer wheat as a source for trait improvement in durum wheat: a study of general and specific combining ability. *Euphytica*. 2021;217:64. doi 10.1007/s10681-021-02796-x

Muqaddasi Q.H., Brassac J., Ebmeyer E., Kollers S., Korzun V., Argillier O., Stiewe G., Plieske J., Ganal M.W., Röder M.S. Prospects of GWAS and predictive breeding for European winter wheat's grain protein content, grain starch content, and grain hardness. *Sci Rep*. 2020;10(1):12541. doi 10.1038/s41598-020-69381-5

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

Özkan H., Willcox G., Graner A., Salamini F., Kilian B. Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Genet Resour Crop Evol*. 2011;58:11-53. doi 10.1007/s10722-010-9581-5

Paina C., Gregersen P.L. Recent advances in the genetics underlying wheat grain protein content and grain protein deviation in hexaploid wheat. *Plant Biol*. 2023;25(5):661-670. doi 10.1111/plb.13550

Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149:2007-2023. doi 10.1093/genetics/149.4.2007

Ruan Y., Yu B., Knox R.E., Zhang W., Singh A.K., Cuthbert R., Fobert P., DePauw R., Berraies S., Sharpe A., Fu B.X., Sangha J. Conditional mapping identified quantitative trait loci for grain protein concentration expressing independently of grain yield in Canadian durum wheat. *Front Plant Sci*. 2021;12:642955. doi 10.3389/fpls.2021.642955

Shewry P.R., Pellny T.K., Lovegrove A. Is modern wheat bad for health? *Nat Plants*. 2016;2(7):16097. doi 10.1038/nplants.2016.97

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

Tanin M.J., Sharma A., Saini D.K., Singh S., Kashyap L., Srivastava P., Mavi G.S., Kaur S., Kumar V., Kumar V., Grover G., Chhuneja P., Sohu V.S. Ascertaining yield and grain protein content stability in wheat genotypes having the *Gpc-B1* gene using univariate, multivariate, and correlation analysis. *Front Genet*. 2022;13:1001904. doi 10.3389/fgene.2022.1001904

Thorwarth P., Liu G., Ebmeyer E., Schacht J., Schachschneider R., Kazman E., Reif J.C., Würschum T., Longin C. Dissecting the genetics underlying the relationship between protein content and grain yield in a large hybrid wheat population. *Theor Appl Genet*. 2019;132(2):489-500. doi 10.1007/s00122-018-3236-x

Tiwari V.K., Rawat N., Neelam K., Kumar S., Randhawa G.S., Dhaliwal H.S. Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschyi* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. *Theor Appl Genet*. 2010;121(2):259-269. doi 10.1007/s00122-010-1307-8

Tong J., Sun M., Wang Y., Zhang Y., Rasheed A., Li M., Xia X., He Z., Hao Y. Dissection of molecular processes and genetic architecture underlying iron and zinc homeostasis for biofortification: from model plants to common wheat. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9280. doi 10.3390/ijms21239280

Velu G., Singh R.P., Crespo-Herrera L., Juliana P., Dreisigacker S., Valluru R., Stangoulis J., … Balasubramaniam A., Chatrath R., Gupta V., Singh G.P., Joshi A.K. Genetic dissection of grain zinc concentration in spring wheat for mainstreaming biofortification in CIMMYT wheat breeding. *Sci Rep*. 2018;8(1):13526. doi 10.1038/s41598-018-31951-z

Zeibig F., Kilian B., Frei M. The grain quality of wheat wild relatives in the evolutionary context. *Theor Appl Genet*. 2022;135(11):4029-4048. doi 10.1007/s00122-021-04013-8

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.03.2025. После доработки 24.06.2025. Принята к публикации 25.06.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1267-1276

doi 10.18699/vjgb-25-131

Транспозоны льна: роль в генетическом разнообразии, окультуривании и детерминации хозяйственно ценных признаков

М.А. Дук [2], В.А. Станин[1], А.А. Канапин [1], А.А. Самсонова [1], Т.А. Рожмина[3], М.Г. Самсонова [1]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[2] Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
[3] Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок, Россия
m.g.samsonova@gmail.com

Аннотация. Лен – важная сельскохозяйственная культура многофункционального использования. Разнонаправленная селекция на содержание масла в семенах и волокна в стеблях привела к возникновению двух морфотипов – льна-долгунца и льна масличного. Ранее, используя однонуклеотидные полиморфизмы, мы охарактеризовали генетическое разнообразие у 306 образцов льна из коллекции российского Федерального научного центра лубяных культур. Вместе с тем более крупные структурные вариации также играют существенную роль в формировании агрономически важных признаков растений и могут быть применены для дальнейшего улучшения льна. Здесь мы задействовали ту же коллекцию льна, чтобы предсказать сайты новых инсерций транспозонов и оценить роль таких инсерций в формировании агрономически важных признаков, а также в процессе окультуривания льна. Мы обнаружили 588 480 новых сайтов инсерций транспозонов, не содержащихся в референсном геноме льна (сборка NCBI ASM22429v2), из которых большая часть приходилась на ретротранспозоны суперсемейств *Copia* и *Gypsy*, а среди ДНК транспозонов чаще всего встречались сайты инсерции суперсемейств *MULE-MuDR*, *hAT* и *CMC-EnSpm*. В отличие от однонуклеотидных полиморфизмов, которых было значительно больше у льна масличного, чем у долгунцов, мы не обнаружили столь существенной разницы в числе инсерций разных семейств транспозонов на одно растение у образцов разного морфотипа. Анализ геномных областей, затронутых недавними селекционными усилиями, выявил в общей сложности 61 район-кандидат, из которых 18 районов пересекались с QTL, ассоциированными с важными агрономическими признаками. Интересно, что пять участков уменьшения генетического разнообразия у культурных сортов и кряжей при сравнении их со староместными сортами также были идентифицированы как участки уменьшения разнообразия при использовании в качестве маркеров однонуклеотидных полиморфизмов. При полногеномном поиске ассоциаций найдено 50 инсерций TE, ассоциированных с разными фенотипическими признаками, причем многие ассоциации подтверждаются несколькими моделями или обнаруживаются в данных по нескольким годам. Таким образом, сайты инсерции транспозонов – важный источник генетического разнообразия у льна наряду с однонуклеотидными полиморфизмами, что позволяет использовать их для дальнейшего улучшения культуры при селекции.

Ключевые слова: лен; *Linum usitatissimum*; транспозоны; GWAS; генетическое разнообразие; селекция

Для цитирования: Дук М.А., Станин В.А., Канапин А.А., Самсонова А.А., Рожмина Т.А., Самсонова М.Г. Транспозоны льна: роль в генетическом разнообразии, окультуривании и детерминации хозяйственно ценных признаков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1267-1276. doi 10.18699/vjgb-25-131

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-16-00037.

Flax transposons: unraveling their impact on domestication and agronomic trait variation

M.A. Duk [2], V.A. Stanin[1], A.A. Kanapin [1], A.A. Samsonova [1], T.A. Rozhmina[3], M.G. Samsonova [1]

[1] Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia
[2] Ioffe Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
[3] Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Torzhok, Russia
m.g.samsonova@gmail.com

Abstract. Flax is an important agricultural crop with multifunctional uses. Diversified breeding for oil content in seeds and fiber in stems has led to the emergence of two morphotypes – fiber flax and oilseed flax. Previously, using single nucleotide polymorphisms (SNPs), we characterized the genetic diversity of 306 flax samples from the collection of the Russian Federal Research Center for Bast Crops. However, larger structural variations, such as mobile genetic elements, also play a significant role in shaping agronomically important plant traits and can be used for

© Дук М.А., Станин В.А., Канапин А.А., Самсонова А.А., Рожмина Т.А., Самсонова М.Г., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

further flax improvement. Here, we used the same flax collection to predict sites of new transposon insertions and to assess the role of such insertions in the formation of agronomically important traits, as well as in the process of flax domestication. We discovered 588,480 new transposon insertion sites not present in the reference flax genome (NCBI assembly ASM22429v2), the majority of which were attributed to retrotransposons of the *Copia* and *Gypsy* superfamilies, while among DNA transposons, insertion sites of the *MULE-MuDR*, *hAT*, and *CMC-EnSpm* superfamilies were most common. Unlike SNPs, which were significantly more numerous in oilseed flax than in fiber flax, we did not find such a substantial difference in the number of insertions of different transposon families per plant among samples of different morphotypes. Analysis of genomic regions affected by recent breeding efforts revealed a total of 61 candidate regions, of which 18 regions overlapped with QTLs associated with important agronomic traits. Interestingly, 5 regions of reduced genetic diversity in kryazhs and cultivars compared to landraces were also identified as regions of reduced diversity when using single nucleotide polymorphisms as markers. A genome-wide association study (GWAS) identified 50 TE insertions associated with different phenotypic traits, with many associations confirmed by multiple models or detected in data from multiple years. Thus, transposon insertion sites are an important source of genetic diversity in flax, alongside single nucleotide polymorphisms, making them suitable for further crop improvement in breeding.

Key words: flax; *Linum usitatissimum*; transposons; GWAS; genetic diversity; breeding

For citation: Duk M.A., Stanin V.A., Kanapin A.A., Samsonova A.A., Rozhmina T.A., Samsonova M.G. Flax transposons: unraveling their impact on domestication and agronomic trait variation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1267-1276. doi 10.18699/vjgb-25-131

Введение

Лен – важная сельскохозяйственная культура, выращиваемая для получения как волокна, так и масла, используемая во многих сферах, таких как производство лаков и красок, линолеума, в производстве композитов, текстильной и пищевой промышленности (Goudenhooft et al., 2019). Длительная селекция льна на содержание масла в семенах и волокна в стеблях привела к появлению двух морфотипов – лена-долгунца и льна масличного. Для льна-долгунца характерна меньшая ветвистость, большие длина стебля и высота растения, тогда как лен масличный характеризуется большим количеством семян, а значит, большим числом соцветий при меньшей длине основного стебля. В конце XIX–начале XX века Россия была основным поставщиком качественного льняного волокна, получаемого из кряжей – староместных сортов, имеющих смешанное происхождение из Индо-Афганского центра разнообразия и Плодородного полумесяца и полученных в результате народной селекции. Кряжи и российские местные сорта внесли решающий вклад в генофонд современных сортов льна (Helbaek, 1959; Duk et al., 2021).

Ранее с использованием однонуклеотидных полиморфизмов мы охарактеризовали генетическое разнообразие у 306 образцов льна из коллекции Федерального научного центра лубяных культур (ФНЦ ЛК, Россия). Мы обнаружили значительную дифференциацию между популяциями льна масличного и льна-долгунца, а также выявили регионы генома, затронутые современной селекцией (Kanapin et al., 2022; Дук и др., 2025).

Вместе с тем более крупные структурные вариации, такие как инсерции транспозонов (ТЕ), также играют существенную роль в формировании агрономически важных признаков растений и могут быть использованы для дальнейшего улучшения культуры льна. Известно, что ТЕ составляют большую часть генома растений (Quesneville, 2020) и их встройки могут приводить к перестройке генома, сайленсингу генов и изменению генных сетей (Bourque et al., 2018), а также быть материалом для возникновения новых генов и некодирующих РНК (Pulido, Casacuberta, 2023).

Транспозоны условно разделяют на два класса. К классу I относятся ретротранспозоны, которые увеличивают число своих копий в геноме, встраивая их через РНК-посредник (Mhiri et al., 2022), в результате чего длинные терминальные повторы могут составлять до 90 % генома растения. К классу II относят ДНК-транспозоны, работающие по принципу «вырезать-вставить»; они перемещаются по геному и обычно не увеличивают количество своих копий. Наибольшая активность ТЕ наблюдается в периоды стресса (Schrader, Schmitz, 2019). Чаще всего новые инсерции оказывают отрицательное воздействие и удаляются из популяции, однако иногда они могут способствовать адаптации растений к неблагоприятным условиям внешней среды (Niu et al., 2019) и благодаря этому сохраниться в популяции как результат действия положительного отбора.

В настоящей работе мы использовали ту же коллекцию из 306 образцов льна ФНЦ ЛК (Duk et al., 2021; Kanapin et al., 2022), чтобы предсказать сайты новых инсерций ТЕ в группах образцов разного морфотипа и селекционного статуса и сравнить характер распределения сайтов инсерций ТЕ и полиморфных сайтов по геному. Мы также оценили роль инсерций ТЕ в формировании агрономически важных признаков и в процессе окультуривания льна.

Материалы и методы

Материалом исследования были 306 образцов льна из коллекции ФНЦ ЛК (г. Торжок, Россия), из которых 182 образца по морфотипу относятся к льну-долгунцу и 120 – к льну масличному: 99 образцов – к «межеумкам», 16 – к «кудряшам» и 5 – к крупносеменному льну; морфотип остальных четырех образцов не определен. По селекционному статусу образцы разделяются на староместные сорта – 40 образцов, кряжи – 31 образец, и 230 культурных сортов – 89 селекционных линий и 141 селекционный сорт.

ДНК была выделена из листьев с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Нидерланды). Секвенирование ДНК проводили в BGI с помощью протокола Illu-

mina, генерирующего парные прочтения длиной 150 п. о. Получено 1143.850625 Гб и 7626 млн сырых прочтений со средним покрытием генома 9.3× или 3.7 Гб на образец.

Предсказание координат инсерций TE выполнено с применением пакета программ TEMP2 (Yu T. et al., 2021), использован режим поиска insertion2, при котором осуществляется идентификация TE, не содержащихся в референсном геноме (сборка NCBI ASM22429v2). Консенсусные последовательности TE, применявшиеся при поиске, были предсказаны *de novo* с помощью модуля TEdenovo из пакета REPET (Flutre et al., 2011). Поскольку существующие методы анализа не обеспечивают определение координат вставки с точностью до одного нуклеотида, дополнительно проведена операция унификации для инсерций одного и того же TE, имеющих разницу координат, не превышающую удвоенную длину фрагмента секвенирования (в данном случае 200 п. о.). Всем вставкам данного TE, разность между координатами начала вставки которых не превышала указанную длину, была присвоена одна и та же координата, соответствующая центральной позиции региона, содержащего эти инсерции. Для дальнейшего анализа данные были конвертированы в формат VCF. Валидация ключевых инсерций выполнена с помощью программы Integrative Genomics Viewer, которая делает возможной визуализацию выравнивания ридов в месте инсерции.

Для популяционного анализа и поиска ассоциаций данные были преобразованы таким образом, что инсерции TE у разных образцов, расположенные на расстоянии менее 50 п. н., считались одним событием встройки, а позицией инсерции была середина этого окна. Такой подход позволил уменьшить вероятные неточности относительно предсказания сайтов инсерций TE и увеличить количество встроек, найденных более чем у 5 % образцов, что уменьшает вероятность случайного ложноположительного определения ассоциации варианта с признаком. Выбор размера окна 50 п. н. был обусловлен тем, что при таком размере окна количество инсерций, обнаруживаемых более чем у 5 % образцов, было максимальным и уменьшалось при увеличении или уменьшении размера окна.

Для анализа популяционной структуры применяли метод главных компонент, а также метод ADMIXTURE (Alexander et al., 2009) с количеством популяций K = 2, 3, 4, 5. Для филогенетического анализа использовали функцию построения дерева по методу ближайших соседей из пакета ape и функцию визуализации из пакета ggtree для R (Yu G., 2020). Для оценки генетического разнообразия, обусловленного инсерциями TE, и расчета индекса фиксации (Fst) был взят инструмент VCFtools (Danecek et al., 2011) с размером окна 200 kb. Размер окна был выбран в соответствии со средним размером участков, найденных в качестве «горячих точек» в пакете PrimatR для R (https://github.com/daewoooo/primatR).

Чтобы выявить возможные районы генома, испытавшие действие отбора при селекции льна масличного и льна-долгунца, мы сравнили сорта с соответствующими староместными сортами и кряжами. В каждом сравнении мы рассчитывали статистики Fst и ROD = $1-\pi_1/\pi_2$, где π – генетическое разнообразие соответствующей группы образцов. Области генома с высокими популяционными различиями между двумя группами (наивысшие значения Fst, верхние 5 % всего генома и верхние 2.5 % значений ROD) рассматривались в качестве возможных областей со следами селекции.

При поиске ассоциаций использованы значения 13 фенотипических признаков, измеренных у растений, выращенных на экспериментальных полях ФНЦ ЛК в 2019 (одно выращивание), 2020 (два выращивания со сдвигом в две недели) и 2021 (одно выращивание) годах (Kanapin et al., 2022): DSI – индекс тяжести фузариозного увядания; EFL – длина элементарного волокна; FC – содержание волокна; FW – вес волокна; IL – длина соцветия; NI – число междоузий; Oil – содержание масла в семенах; PH – высота растения; Nsed – количество семян с растения; STI – сбежистость; TL – техническая длина стебля; TW – вес технической части растения; Tswgt – вес 1000 семян. Для анализа взяты модели Blink, FarmCPU, SUPER, MLMM, MLM, GLM в пакете GAPIT3 (Wang, Zhang, 2021) с порогом FDR.rate = 0.9. Для связи ассоциаций с генами использовали аннотацию генома, предоставленную группой S. Cloutier (You, Cloutier, 2020). Найденные ассоциации были также подтверждены прямым *t*-тестом между значениями признака у образцов, содержащих вставку и не содержащих ее для исключения ложноположительных ассоциаций. Для расчета эффекта вставки на признак сравнивали значения признака у образцов, содержащих и не содержащих вставку, достоверность подтверждалась статистическим тестом Манна–Уитни (Mann, Whitney, 1947).

Результаты

Состав мобилома льна

Всего в коллекции выявлено 588480 новых инсерций TE в 306 образцах, из них 172984 инсерции не были классифицированы (рис. 1). Из классифицированных больше всего инсерций (41 % от общего числа или 58 % от классифицированных инсерций) приходится на TE суперсемейства *Copia* и порядка 15 % всех инсерций или 20 % классифицированных инсерций, – на TE суперсемейства *Gypsy*. Ретротранспозоны порядка *LINE* составляют 1 % инсерций в коллекцию. Среди TE класса II часто встречаются элементы суперсемейства *Mutator* (*MULE-MuDR*) – около 6 % всех вставок. На ДНК-транспозоны суперсемейства *hAT* приходится 4.3 % всех вставок, *CMC-EnSpm* составляют лишь 1.3 % классифицированных инсерций.

Визуализация данных о вставках TE методом главных компонент показала, что первая главная компонента дифференцирует образцы разного морфотипа (льна-долгунца от льна масличного) только в случае TE суперсемейств *Copia* и *Gypsy*, а также TE семейства *hAT-Ac* (Приложение, рис. S1)[1].

Ландшафт мобилома льна

Расположение сайтов инсерций TE относительно генов льна различалось для разных суперсемейств. Внутри известных генов или на расстоянии менее 2000 п. н. от генов располагалось 22 % всех вставок (рис. 2, табл. S1).

[1] Рис. S1–S4 и табл. S1–S5 Приложения см. по адресу: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx49.pdf



Рис. 1. Общее количество новых вставок ТЕ и количество вставок отдельных суперсемейств ТЕ в образцах коллекции.

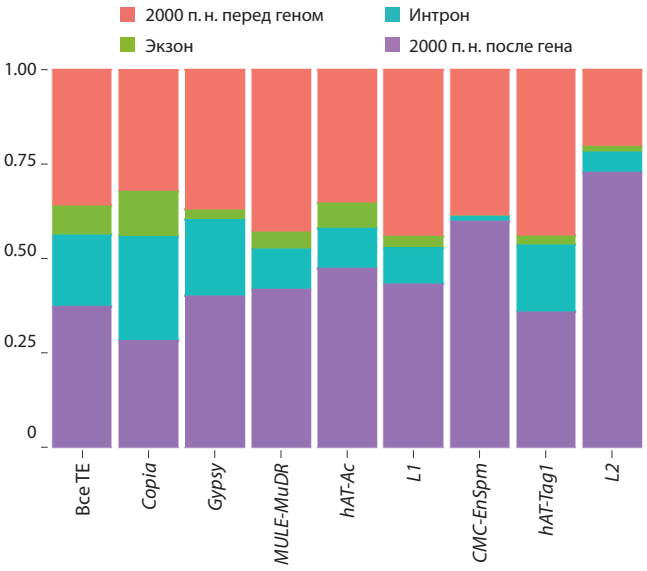


Рис. 2. Расположение сайтов инсерций ТЕ относительно генов.

А 85 % инсерций ТЕ суперсемейств *Gypsy* и 74 % инсерций ТЕ суперсемейства *CMC-EnSpm* располагалось далеко (>2000 п. н.) от известных генов, в отличие от ТЕ *LINE* и *hAT*, для которых около половины инсерций находится вблизи генов (<2000 п. н.). ТЕ *Copia* в 1.4 раза чаще встраивались в гены, как в интроны, так и в экзоны, чем в среднем у вставок всех типов. ТЕ *Gypsy*, попавшие в ген, в 1.3 раза чаще встречались в интронах, чем в целом по всем вставкам ТЕ, и в 3 раза реже в экзонах. Также инсерции в экзоны практически не наблюдались у транспозонов *CMC-EnSpm* и *L2*. В целом 29 % инсерций ТЕ в ген приходилось на экзон и 71 % – на интрон.

Использование данных об инсерциях ТЕ для анализа популяционной структуры и родства образцов

Популяционную структуру образцов коллекции, а также родство между ними исследовали, используя данные об инсерциях ТЕ как замещающих однонуклеотидные полиморфизмы. После снижения размерности методом главных компонент данные были визуализированы для выявления разделения образцов на группы (рис. 3, *а*, *б*). Дифференциация образцов по морфотипу наблюдалась только по второй и третьей принципиальным компонентам, хотя и оставалась нечеткой. Группировка образцов по селекционному статусу отсутствовала (графики не приведены). При запуске программы ADMIXTURE лучшее количество популяций по оценке кросс-валидационной ошибки было определено как K = 2, однако для K = 3 ошибка была лишь немногим больше (см. рис. 3, *в*), при дальнейшем увеличении числа популяций ошибка растет. При количестве популяций больше 2 можно видеть наличие у образцов льна масличного примеси популяции, отмеченной на рис. 3 зеленым цветом. У групп с разным селекционным статусом заметных различий в картине примесей не наблюдалось.

На филогенетическом древе (рис. 4) образцы образуют три клады, две из которых, клада I и клада II, практически полностью состоят из образцов льна-долгунца, а клада III содержит практически все образцы льна масличного.

Большая часть кряжей попадает в кладу I, что отражает их близкое родство и общее происхождение (Duk et al., 2021). Как оказалось, каждая из клад обогащена инсерциями некоторых ТЕ. Всего обнаружено 10 последовательностей ТЕ (табл. S2), характерных для клады I, из которых пять принадлежат суперсемейству *Copia*, две – *Gypsy* и по одной – *RC/Helitron* и *hAT-Ac*. Клады II и III оказались обогащенными соответственно двумя и тремя последовательностями ТЕ, принадлежащими к суперсемейству *Copia*.

Роль инсерций транспозонов в формировании агрономически важных признаков растений

Для выявления следов селекции в геномах образцов проведен поиск районов, которые демонстрируют существенное снижение разнообразия: а) в сортах льна-долгунца по сравнению с местными сортами льна-долгунца или кряжами; б) в кряжах по сравнению с местными сортами льна-долгунца и в) в масличных сортах по сравнению с местными масличными сортами. Также сравнивалось генетическое разнообразие между сортами льна-долгунца и льна масличного для выявления следов селекции по агрономическим признакам, дифференцирующим эти морфотипы. Сопоставляя упомянутые выше группы, мы идентифицировали в общей сложности 61 район-кандидат (рис. 5), из которых 9 были найдены для двух сравнений. Из этих районов 18 пересекаются с QTL (quantitative trait locus – локусы количественных признаков), ассоциированными с важными агрономическими признаками (You, Cloutier, 2020) (табл. S3).

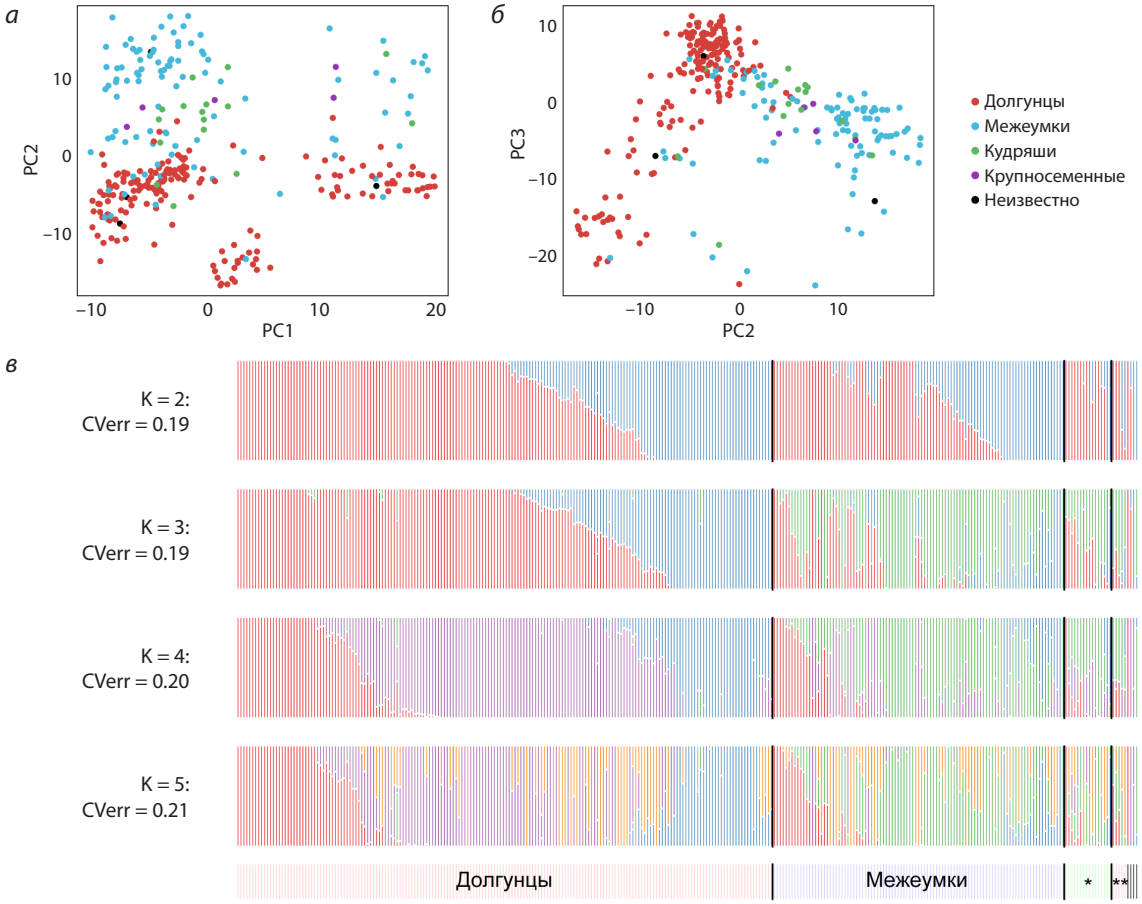


Рис. 3. Популяционная структура образцов коллекции.

а – график для первой и второй главных компонент с раскраской по морфотипу; *б* – график для второй и третьей главных компонент с раскраской по морфотипу; *в* – результаты ADMIXTURE для числа вероятных популяций K = 2–5. CVerr – значение кросс-валидационной ошибки при анализе; * кудряши; ** крупносеменные образцы.

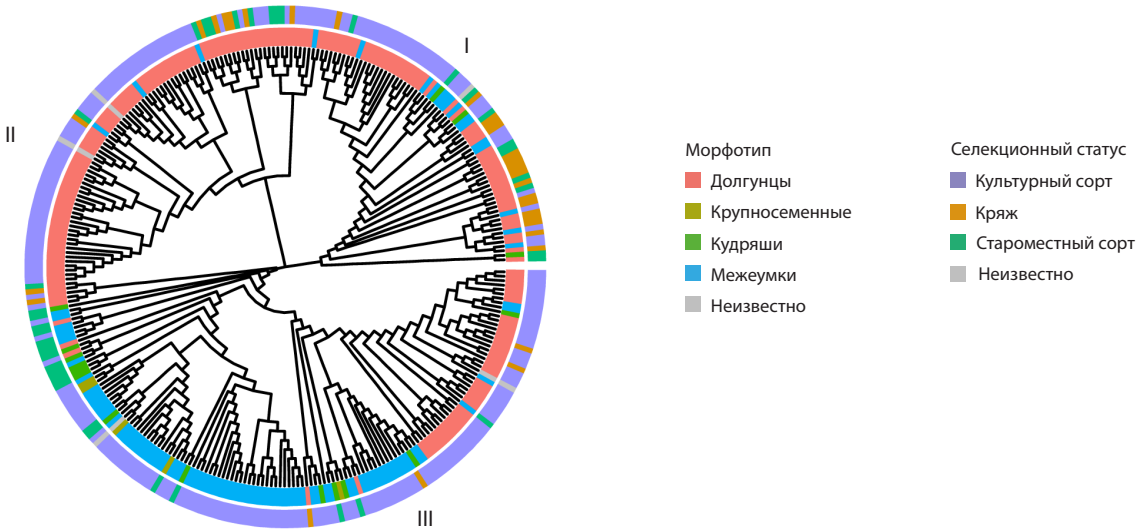


Рис. 4. NJ-дерево, раскрашенное по морфотипу и селекционному статусу.

При сравнении образцов льна масличного и льнов-долгунцов только один выявленный сигнал селекционного выметания (selective sweeps) у долгунцов пересекается с QTL QOIL-Lu6.4 на хромосоме 6, отвечающим за содержание масла (см. табл. S3). При сравнении по селекционному статусу у культурных сортов обоих морфотипов наблюдалось уменьшение разнообразия в участках хромосомы 12, пересекающихся с QTL QIOD-Lu12.3, QLIN-Lu12.3, QLIO-Lu12.3 и ассоциированных с содержанием йода, линолевой и линоленовой кислот соответственно.

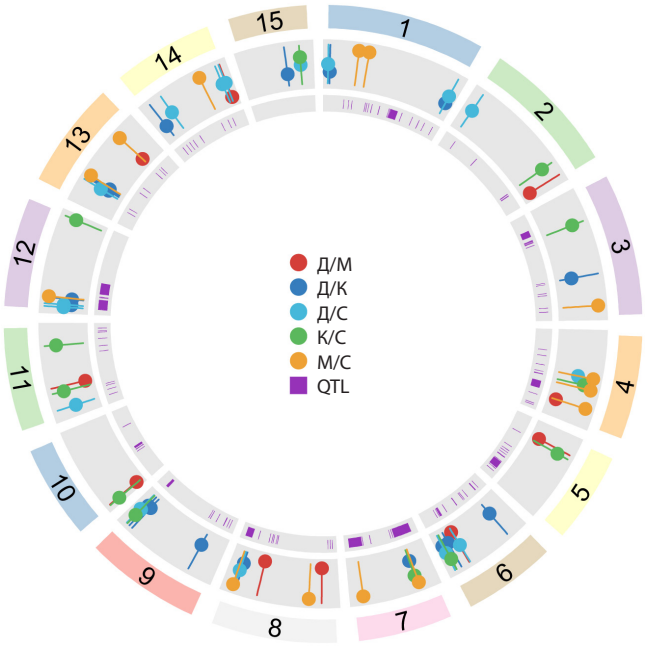


Рис. 5. Районы генома льна, демонстрирующие существенную разницу в разнообразии при сравнении групп образцов разного селекционного статуса и морфотипа. Сопоставлены: сорта льна-долгунца и льна масличного (Д/М), сорта льна-долгунца и кряжи (Д/К), культурные и староместные сорта льна-долгунца (Д/С), кряжи и староместные сорта льна-долгунца (К/С), сорта льна масличного и староместные сорта (М/С). QTL – QTL, опубликованные в (You, Cloutier, 2020).

У культурных сортов льна-долгунца сигналы селекционного выметания отмечены в районах этой же хромосомы, пересекающихся соответственно с QTL uq.C12–1 и uq.C12–1, в районе хромосомы 3, пересекающемся с Lu3-25559600, в районе хромосомы 8, пересекающемся с QOLE-Lu8.1, в районе хромосомы 9, пересекающемся с QSTE-Lu9.2, и в районах хромосомы 6, пересекающихся Lu2564 и QOIL-Lu6. Эти QTL ассоциированы с высотой растения и длиной стебля, содержанием семенной слизи, содержанием олеиновой и стеариновой кислот и содержанием масла соответственно.

У кряжей сигналы селекционного выметания обнаружены в: 1) районах хромосомы 7, пересекающихся с QPM-crc-LG7 и QPAL-Lu7.3, ассоциированных соответственно с заболеваемостью мучнистой росой и содержанием пальмитиновой кислоты; 2) районах хромосомы 2, пересекающихся с scaffold43-1111162 и QOIL-Lu2.1, ассоциированных соответственно с весом 1000 семян и содержанием масла, и 3) в районах хромосомы 3, пересекающихся с QLio-LG3.1, QLin-LG3.1, Marker4371 и scaffold156-76129, для которых показана ассоциация с содержанием линоленовой и линолевой кислот, высотой растения и количеством коробочек соответственно.

У культурных сортов льна масличного также наблюдается уменьшение разнообразия в участках хромосомы 8, пересекающихся с scaffold635-43971 и QOLE-Lu8.1, связанных с количеством ветвей и содержанием олеиновой кислоты соответственно, и, наоборот, увеличение разнообразия, в сравнении с староместными сортами, в участках хромосомы 7, пересекающихся с QLIN-Lu7.2, QLIO-Lu7.2, QPAL-Lu7.3 и QIOD-Lu7.2, ассоциированных с содержанием линоленовой, линолевой, пальмитиновой кислот и йода соответственно.

Далее мы использовали инсерции транспозонов как маркеры, замещающие однонуклеотидные полиморфизмы при полногеномном поиске ассоциаций с признаками устойчивости к фузариозному увяданию, продуктивности и содержания волокна. Было найдено 50 инсерций TE, ассоциированных с разными фенотипическими признаками, причем многие ассоциации подтверждаются несколькими моделями или обнаруживаются в данных по нескольким годам. Порядка 20 % из найденных ассоциированных инсерций полиморфны, т. е. оказались ассоциированными сразу с несколькими признаками (см. таблицу и табл. S4). Четыре инсерции попали в известные QTL и две – в участки уменьшения разнообразия между группами образцов с разным морфотипом и селекционным статусом, указанным на рис. 5.

Из представленных ассоциированных с признаками инсерций TE 15 найдены несколькими моделями и 12 – для разных признаков или для измерения одного признака разных лет. Шесть таких инсерций, широко представленных в образцах (более 50 образцов), были валидированы, результат валидации см. на рис. S2–S4.

Обсуждение

Детальная характеристика генетического разнообразия льна имеет первостепенное значение для его долгосрочного и устойчивого производства и диверсификации, а также для общего успеха программ его селекции. Ранее, используя однонуклеотидные полиморфизмы, мы охарактеризовали генетическое разнообразие коровой коллекции льна (306 образцов) ФНЦ ЛК (Duk et al., 2021; Kanapin et al., 2022). Эта коллекция, одна из лучших в мире, включает сорта льна из Евразии со значительной долей местных сортов. В последнее время, благодаря успехам биоинформатики и совершенствованию технологий секвенирования, доступными для анализа стали другие источники геномного разнообразия, включая TE и структурную вариабельность, которые могут играть существенную роль в формировании агрономически важных признаков растений и могут быть использованы для дальнейшего улучшения сельскохозяйственных культур.

Анализ новых сайтов инсерции TE, выполненный в этой работе, показал, что наряду с однонуклеотидными полиморфизмами TE являются важным источником генетического разнообразия у льна. Преобладающие сайты инсерции, как и у многих других сельскохозяйственных растений (Станин и др., 2025), – это сайты инсерции ретротранспозонов, а среди ДНК-транспозонов чаще всего встречаются сайты инсерции TE суперсемейств *MULE-MuDR*, *hAT* и *CMC-EnSpm* (см. рис. 1).

Вместе с тем, в отличие от однонуклеотидных полиморфизмов, которых было значительно больше у льна масличного, чем у долгунцов, мы не обнаружили столь существенной разницы в числе инсерций разных семейств TE на одно растение у образцов разного морфотипа. Тем не менее, как показывают филогенетический анализ и метод главных компонент (для TE суперсемейств *Copia*,

Инсерции TE, ассоциированные с фенотипическими признаками и расположенные на расстоянии менее чем 3500 п. н. от генов с известной функцией

Координаты инсерции TE (суперсемейство)	Признак (эффект) ***	Положение инсерции относительно ближайшего гена	Ближайший ген (ортолог)	Аннотация
Chr1_3002494 (*Copia*)	Oil (+)	Интрон	*Lus10042426* (*AT5G10770.1*)	Белок семейства эукариотических аспартилпротеаз
Chr1_10250548 (–)	EFL (–) TL (–)		*Lus10022657* (*AT3G04380.1*)	SET-домен, содержащий белок семейства лизинметил-трансфераз
Chr1_11870656 (*hAT-Tag1*)	TL (–) NI (–) PH (–)		*Lus10009386* (*AT1G08230.2*)	Трансмембранный белок семейства переносчиков аминокислот
Chr1_13735350 (*Copia*; *MULE-MuDR*)	TL (–)		*Lus10008435* (*AT5G37290.1*)	Суперсемейство белков с повторами ARM
Chr1_20792291 (–)	TW (–)		*Lus10015841* (*AT3G62870.1*)	Рибосомальный белок семейства L7Ae/L30e/S12e/Gadd45
Chr1_28316405 (*hAT-Ac*)	Tswgt (+)	1309 перед геном	*Lus10018915* (*AT1G71890.1*)	Белок семейства главных посредников
Chr2_2089015 (*Copia*)	Tswgt (+)	Экзон	*Lus10016394* (*AT3G08030.1*)	Белок неизвестной функции, DUF642
Chr3_522289 (*Copia*)	TW (+)	1318 перед геном	*Lus10013432* (*AT5G23130.1*)	Белок, содержащий домен LysM, связывающий пептидогликан
Chr3_19617078 (*Gypsy*)	DSI (–)	Интрон	*Lus10008232* (*AT5G46050.1*)	Пептидный транспортер 3
Chr3_20336100 (*Copia*)	STI (–)	1882 после гена	*Lus10007194* (*AT4G01690.1*)	Семейство флавин-содержащих аминоксидо-редуктаз
Chr3_24121740 (*Copia*)	FC (+)	Экзон	*Lus10017112* (*AT1G48130.1*)	1-цистеин пероксиредоксин 1
Chr3_24426254 (*MULE-MuDR*), *M/C	FC (–)	190 перед геном	*Lus10017063* (*AT5G49480.1*)	Ca^{2+}-связывающий белок 1
Chr4_11952218 (*Copia*)	DSI (–)	853 после гена	*Lus10036789* (*AT1G13980.1*)	Белок, содержащий домен sec7
Chr4_14756320 (*hAT-Ac*)	EFL (–), FW (–), IL (+), NI (–), PH (–), TL (–), FC (–), TW (–)	2059 перед геном	*Lus10041548* (*AT3G61120.1*)	AGAMOUS-подобный 13, **QYLD-Lu4.1 (YLD), QPLH-Lu4.3 (PLH), QDTM-Lu4.1 (DTM)
Chr4_14994752 (*Copia*)	TL (–), NI (–)	Интрон	*Lus10041602* (*AT3G52150.1*)	РНК-связывающий белок (мотивы RRM/RBD/RNP) семейства, **QPLH-Lu4.3 (PLH), QDTM-Lu4.1 (DTM)
Chr6_1356894 (*Copia*)	TL (–)		*Lus10033725* (*AT1G12470.1*)	Связывание ионов цинка
Chr6_11075470 (*Copia*)	TL (+)	2456 перед геном	*Lus10002212* (*AT5G01300.1*)	Белок семейства PEBP (фосфатидил-этаноламин-связывающий белок)
Chr6_11780716 (*hAT-Ac*)	Tswgt (+)	1006 перед геном	*Lus10017263* (*AT4G36040.1*)	Шаперон DnaJ-домен суперсемейства белков
Chr6_17837550 (*Copia*)	TW (+)	400 перед геном	*Lus10024282* (*AT1G58250.1*)	Домен белка локализации Гольджи; промотор РНК-полимеразы II; домен белка Fmp27
Chr7_15829004 (*Copia*)	FW (–)	709 перед геном	*Lus10038370* (*AT4G20050.1*)	Суперсемейство белков, подобных пектинлиазе **QIOD-Lu7.2 (IOD), QLIN-Lu7.2 (LIN), QLIO-Lu7.2 (LIO)
Chr8_4775776 (–)	EFL (–), TW (+), PH (–), TL (–)	34 перед геном	*Lus10023944* (*AT4G38380.1*)	MATE эффлюкс семейства белков
Chr8_12565858 (*hAT-Ac*)	NI (+), PH (+)	1199 после гена	*Lus10025285* (*AT2G37370.1*)	Центросомальный белок

Окончание таблицы

Координаты инсерции TE (суперсемейство)	Признак (эффект) ***	Положение инсерции относительно ближайшего гена	Ближайший ген (ортолог)	Аннотация
Chr8_16467884 (*MULE-MuDR*)	TW (–), FW (–)	972 после гена	*Lus10004540* (*AT1G29850.2*)	Белок семейства двуцепочечных ДНК-связывающих белков
Chr8_16923232 (*Copia*), *Д/М	FC (+)	Интрон	*Lus10000673* (*AT1G32450.1*)	Транспортер нитрата 1.5
Chr8_18366764 (*Copia*)	PH (+), NI (+)	Экзон	*Lus10007810* (*AT5G36930.2*)	Семейство белков устойчивости к болезням (класс TIR-NBS-LRR)
Chr8_22233522 (*Copia*)	PH (+), NI (+)	2260 перед геном	*Lus10039488* (*AT5G43700.1*)	Белок семейства регуляторов транскрипции AUX/IAA **QOLE-Lu8.1 (OLE)
Chr11_14960430 (*Copia*)	TW (–), TL (–), NI (–)	3421 после гена	*Lus10008566* (*AT1G55200.1*)	Протеинкиназный белок с доменом, подобным аденинну клеотид-альфа-гидролазе
Chr12_11155523 (*MULE-MuDR*)	TW (–)	373 перед геном	*Lus10030109* (*AT4G02530.1*)	Хлоропласт тилакоид люмен белок
Chr13_1437052 (*Copia*)	EFL (–)	Экзон	*Lus10010648* (*AT3G03770.1*)	Белок с богатым лейцином повтором, белок семейства киназ
Chr13_2213745 (*Copia*)	Oil (+)	271 перед геном	*Lus10026978* (*AT2G26110.1*)	Белок неизвестной функции (DUF761)
Chr13_3391752 (*Copia*)	PH (–), NI (–), TW (–)	1071 после гена	*Lus10026032* (*AT4G36670.1*)	Белок семейства главных посредников
Chr13_6346942 (*hAT-Ac*)	FW (–)	253 перед геном	*Lus10002084* (*AT5G64040.1*)	Субъединица реакционного центра фотосистемы I PSI-N, хлоропласт, предполагаемый/PSI-N, предполагаемый (PSAN)
Chr13_11641862 (*Copia*)	EFL (–)	972 после гена	*Lus10009758* (*AT4G17650.1*)	Поликетидциклаза/дегидраза и белок транспорта липидов
Chr13_14372739 (*Copia*)	PH (–)	780 перед геном	*Lus10034660* (*AT4G29680.1*)	Белок семейства щелочно-фосфатазоподобных белков
Chr14_9124491 (*Copia*)	DSI (–)	153 перед геном	*Lus10005526* (*AT2G37690.1*)	Фосфорибозил-аминоимидазол-карбоксилаза, предполагаемая/AIR-карбоксилаза, предполагаемая
Chr14_9853868 (*hAT-Ac*)	Nsed (+)	984 после гена	*Lus10000815* (*AT2G27410.1*)	Домен неизвестной функции (DUF313)
Chr14_16743646 (*Copia*)	FW (–)	466 после гена	*Lus10017981* (*AT1G14590.1*)	Белок семейства нуклеотид-дифосфо-сахарных трансфераз

* Вставка попадает в регион различия разнообразия между группами: Д/М – долгунцов и масличных сортов, М/С – культурных и староместных сортов масличного льна. ** Вставка также попадает в QTL, опубликованный в (You, Cloutier, 2020). Координата инсерции TE – середина окна длиной в 50 п.н. *** Эффект инсерции TE на признак: (+) – положительный, (–) – отрицательный.

Gypsy и *hAT-Ac*), картины инсерции TE у льна масличного и у льна-долгунца четко дифференцируют эти морфотипы и подтверждают близкое родство и общее происхождение кряжей – русских староместных сортов (см. рис. S1).

Расположение TE относительно генов существенно влияет на их экспрессию и может привести к различным фенотипическим изменениям. У льна большинство инсерций TE *Gypsy* и *CMC-EnSpm* попадает в межгенные области, а среди инсерций TE в ген только 29 % приходится на экзоны, что отражает предпочтительное выметание таких вставок под действием естественного отбора (см. рис. 2).

Анализ геномных областей, затронутых недавними селекционными усилиями (см. табл. S3), показал неожиданную разницу в количестве районов со следами селекции у сортов льна масличного (9 районов) и льна-долгунца (32 района). Хромосомы 2, 5, 6, 9–11 и 15 вовсе не содержат сигналов селекционного улучшения льна масличного (см. рис. 5), тем не менее 2 из 9 таких сигналов пересекаются с известными QTL, ассоциированными с синтезом жирных кислот. Десять геномных областей содержат следы разнонаправленной селекции по агрономически важным признакам льна масличного и льна-долгунца. Сравнение сортов льна-долгунца и кряжей со староместными сортами выявило много районов селекционного улучшения, которые, однако, практически не пересекаются, что, по всей видимости, отражает различные требования к улучшению льна-долгунца в современную эпоху селекции в свете изменения климата и появления новых областей применения. Эта гипотеза подтверждается обнаружением 13 районов уменьшения разнообразия в геномах сортов льна-долгунца при сравнении с кряжами.

Интересно, что пять участков уменьшения генетического разнообразия у культурных сортов и кряжей при сравнении их со староместными сортами также выделяются как участки уменьшения разнообразия при использовании в качестве маркеров однонуклеотидных полиморфизмов (табл. S5). Из них можно отметить участок уменьшения разнообразия у культурных сортов льна масличного в районах Chr4:12400001–12600000, в который попадает ген *Lus10036915*, связанный с защитой от патогенов, а также район Chr8:22400001–22600000, пересекающийся с QTL scaffold635-43971 и QOLE-Lu8.1, ассоциированными с количеством ветвей и содержанием олеиновой кислоты соответственно.

При полногеномном поиске ассоциаций наиболее обширно была представлена ассоциация инсерции Chr4_14756320, которая была обнаружена 22 раза для разных признаков и данных разных лет всеми моделями (см. таблицу). Это инсерция ТЕ семейства *hAT-Ac* на расстоянии ~2000 п. о. перед геном *Lus10041548*. Данный ген относится к генам типа AGAMOUS, которые определяют прекращение роста меристемы и формирование цветка (Yanofsky et al., 1990). Инсерция ТЕ перед этим геном положительно повлияла на длину соцветия и отрицательно – на различные характеристики волокна, что, вероятно, указывает на негативное влияние данной инсерции на инициацию клеток волокна в апикальной меристеме. Также эта инсерция попадала в три QTL: QYLD-Lu4.1, QPLH-Lu4.3 и QDTM-Lu4.1, ассоциированных с урожайностью семян, высотой растения и скороспелостью.

Интересно, что в некоторых сайтах у разных образцов обнаруживаются инсерции ТЕ разных семейств, например, в Chr1_13735350 встречаются ТЕ суперсемейств *Copia* и *MULE-MuDR*, а в Chr13_2207778 – типов *MULE-MuDR* и *hAT-Tag1*. Однако вставки разных элементов оказывают одинаковое влияние на соответствующий признак.

Несколько инсерций ТЕ в экзоны генов, тем не менее, положительно влияют на ассоциированный признак, как, например, инсерции ТЕ *Copia* Chr2_2089015 в ген *Lus10016394*, Chr3_24121740 в ген *Lus10017112* и Chr8_18366764 в ген *Lus10007810*, что позволяет сделать заключение о негативной роли этих генов в формировании соответствующих признаков (см. таблицу).

Некоторые инсерции были ассоциированы с несколькими признаками. Например, инсерция ТЕ Chr1_11870656 семейства *hAT-Tag1* расположена в интроне гена *Lus10009386* и оказывает негативное воздействие на техническую длину стебля, высоту растений и число междоузлий. Ортолог этого гена отвечает за транспорт аминокислот (Meyer et al., 2006). Также негативное влияние на техническую длину стебля и число междоузлий оказывала инсерция Chr4_14994752 типа *Copia*, попадавшая в интрон гена *Lus10041602*, ортолог которого является компонентом фотосинтетического аппарата, участвует в реакции устойчивости к абиотическим стрессам во время прорастания семян (Xu et al., 2013). Эта инсерция также попадала в QTL, ассоциированные с высотой растения и скороспелостью (см. таблицу).

Инсерция ТЕ Chr8_22233522 суперсемейства *Copia*, наоборот, оказывала положительное воздействие на высоту растений и число междоузлий и была расположена перед геном *Lus10039488*, ортолог которого модулирует экспрессию генов раннего ответа на ауксин (Liscum, Reed, 2002), также эта инсерция попадала в QTL, ассоциированный с олеиновой кислотой.

Инсерция ТЕ Chr1_10250548 попала в интрон гена *Lus10022657*, ортолог которого способствует транскрипционному подавлению псевдогенов и транспозонов (Veiseth et al., 2011), и оказала негативное влияние на техническую длину стебля и длину волокна.

Некоторые инсерции также могут оказывать различное воздействие на разные признаки, так, например, инсерция Chr8_4775776, расположенная перед геном *Lus10023944*, негативно влияла на длину волокна и положительно – на вес технической части; такое влияние более предпочтительно, если речь идет о масличном льне, и инсерция, вероятно, была сохранена в процессе отбора. Ортолог этого гена относится к семейству белков MATE, которые участвуют в защите от токсинов и синтезе полезных соединений (Takanashi et al., 2014).

Ряд ассоциаций обнаружен для одного и того же признака несколькими моделями, что повышает их значимость. Среди них можно отметить инсерцию ТЕ Chr1_3002494 суперсемейства *Copia*, которая оказывала положительное воздействие на содержание масла и попадала в интрон гена *Lus10042426*, ортолог которого участвует в растительном иммунитете (Breitenbach et al., 2014). Другие ассоциации инсерций суперсемейства *Copia*, таких как Chr6_1356894 и Chr8_16923232, попавших в интроны генов, также обнаруживались несколькими моделями, ортологи соответствующих генов участвовали в различных процессах обмена веществ при развитии корней (Takemoto et al., 2018) и переносе нитрата (Lin et al., 2008) соответственно. Кроме того, инсерция Chr8_16923232 попадает в участок уменьшения разнообразия у льна масличного в сравнении с долгунцами (см. таблицу).

Сорта, обладающие инсерциями ТЕ, оказывающими благоприятный эффект на адаптацию растений, можно использовать при селекции для улучшения культуры. Так, например, к уменьшению индекса заболеваемости DSI приводит наличие инсерций Chr3_19617078 и Chr4_11952218, расположенных соответственно рядом с генами *Lus10008232*, ортолог которого участвует в обеспечении устойчивости семян к стрессу во время прорастания и в защите от опасных бактериальных патогенов (Karim et al., 2005), и *Lus10036789*, ортолог которого участвует в транспорте ауксина и требуется для правильной организации клеточной стенки (Geldner et al., 2003).

Заключение

Вставки транспозонов в геноме льна расположены неравномерно и отражают собой следы разнонаправленного отбора образцов с разным морфотипом, выращиваемых для различных целей. Новые вставки могут влиять на величину различных фенотипических признаков и адаптацию растений к условиям внешней среды. Участие транспозонов в формировании агрономических признаков позволяет использовать их наравне с однонуклеотидными полиморфизмами для получения желаемых характеристик при селекции.

Список литературы / References

Дук М.А., Канапин А.А., Самсонова А.А., Банкин М.П., Самсонова М.Г. Метод IIIVmrMLM обнаруживает новые генетические варианты, связанные с устойчивостью к фузариозному увяданию у льна. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025; 29(3):380-391. doi 10.18699/vjgb-25-41
[Duk M.A., Kanapin A.A., Samsonova A.A., Bankin M.P., Samsonova M.G. The IIIVmrMLM method uncovers new genetic variants associated with resistance to Fusarium wilt in flax. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(3): 380-391. doi 10.18699/vjgb-25-41]

Станин В.А., Дук М.А., Канапин А.А., Самсонова А.А., Суркова С.Ю., Самсонова М.Г. Разнообразие нута, обусловленное полиморфизмом вставок транспозонов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):61-71. doi 10.18699/vjgb-25-08
[Stanin V.A., Duk M.A., Kanapin A.A., Samsonova A.A., Surkova S.Y., Samsonova M.G. Chickpea diversity driven by transposon insertion polymorphism. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):61-71. doi 10.18699/vjgb-25-08]

Alexander D.H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009;19(9):1655-1664. doi 10.1101/gr.094052.109

Bourque G., Burns K.H., Gehring M., Gorbunova V., Seluanov A., Hammell M., Imbeault M., Izsvák Z., Levin H.L., Macfarlan T.S., Mager D.L., Feschotte C. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol*. 2018;19(1):199. doi 10.1186/s13059-018-1577-z

Breitenbach H.H., Wenig M., Wittek F., Jordá L., Maldonado-Alconada A.M., Sarioglu H., Colby T., Knappe C., Bichlmeier M., Pabst E., Mackey D., Parker J.E., Vlot A.C. Contrasting roles of the apoplastic aspartyl protease APOPLASTIC, *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*-DEPENDENT1 and LEGUME LECTIN-LIKE PROTEIN1 in Arabidopsis systemic acquired resistance. *Plant Physiol*. 2014;165(2):791-809. doi 10.1104/pp.114.239665

Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C.A., Banks E., DePristo M.A., Handsaker R.E., Lunter G., Marth G.T., Sherry S.T., McVean G., Durbin R.; 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156-2158. doi 10.1093/bioinformatics/btr330

Duk M., Kanapin A., Rozhmina T., Bankin M., Surkova S., Samsonova A., Samsonova M. The genetic landscape of fiber flax. *Front Plant Sci*. 2021;12:764612. doi 10.3389/fpls.2021.764612

Flutre T., Duprat E., Feuillet C., Quesneville H. Considering transposable element diversification in *de novo* annotation approaches. *PloS One*. 2011;6(1):e16526. doi 10.1371/journal.pone.0016526

Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A, Jürgens G. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*. 2003;112(2):219-230. doi 10.1016/s0092-8674(03)00003-5

Goudenhooft C., Bourmaud A., Baley C. Flax (*Linum usitatissimum* L.) fibers for composite reinforcement: exploring the link between plant growth, cell walls development, and fiber properties. *Front Plant Sci.* 2019;10:411. doi 10.3389/fpls.2019.00411

Helbaek H. Domestication of food plants in the Old World. Joint efforts by botanists and archeologists illuminate the obscure history of plant domestication. *Science.* 1959;130(3372):365-372. doi 10.1126/science.130.3372.365

Kanapin A., Rozhmina T., Bankin M., Surkova S., Duk M., Osyagina E., Samsonova M. Genetic determinants of fiber-associated traits in flax identified by Omics data integration. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14536. doi 10.3390/ijms232314536

Karim S., Lundh D., Holmström K.O., Mandal A., Pirhonen M. Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress-induced peptide transporter of *Arabidopsis*. *J Mol Model.* 2005;11(3):226-236. doi 10.1007/s00894-005-0257-6

Lin S.H., Kuo H.F., Canivenc G., Lin C.S., Lepetit M., Hsu P.K., Tillard P., Lin H.L., Wang Y.Y., Tsai C.B., Gojon A., Tsay Y.F. Mutation of the *Arabidopsis NRT1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell*. 2008;20(9):2514-2528. doi 10.1105/tpc.108.060244

Liscum E., Reed J.W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol*. 2002;49(3-4):387-400. doi 10.1023/A:1015255030047

Meyer A., Eskandari S., Grallath S., Rentsch D. AtGAT1, a high affinity transporter for γ-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2006;281(11):7197-7204. doi 10.1074/jbc.M510766200

Mhiri C., Borges F., Grandbastien M.-A. Specificities and dynamics of transposable elements in land plants. *Biology.* 2022;11(4):488. doi 10.3390/biology11040488

Niu X.M., Xu Y.C., Li Z.W., Bian Y.T., Hou X.H., Chen J.F., Zou Y.P., Jiang J., Wu Q., Ge S., Balasubramanian S., Guo Y.L. Transposable elements drive rapid phenotypic variation in *Capsella rubella*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(14):6908-6913. doi 10.1073/pnas.1811498116

Pulido M., Casacuberta J.M. Transposable element evolution in plant genome ecosystems. *Curr Opin Plant Biol*. 2023;75:102418. doi 10.1016/j.pbi.2023.102418

Quesneville H. Twenty years of transposable element analysis in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Mob DNA.* 2020;11:28. doi 10.1186/s13100-020-00223-x

Schrader L., Schmitz J. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol Ecol*. 2019;28(6):1537-1549. doi 10.1111/mec.14794

Takanashi K., Shitan N., Yazaki K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnol*. 2014;31(5): 417-430. doi 10.5511/plantbiotechnology.14.0904a

Takemoto K., Ebine K., Askani J.C., Krüger F., Gonzalez Z.A., Ito E., Goh T., Schumacher K., Nakano A., Ueda T. Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(10):E2457-E2466. doi 10.1073/pnas.1717839115

Veiseth S.V., Rahman M.A., Yap K.L., Fischer A., Egge-Jacobsen W., Reuter G., Zhou M.M., Aalen R.B., Thorstensen T. The SUVR4 histone lysine methyltransferase binds ubiquitin and converts H3K9me1 to H3K9me3 on transposon chromatin in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1001325. doi 10.1371/journal.pgen.1001325

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

Xu T., Lee K., Gu L., Kim J.I., Kang H. Functional characterization of a plastid-specific ribosomal protein PSRP2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Physiol Biochem*. 2013; 73:405-411. doi 10.1016/j.plaphy.2013.10.027

Yanofsky M.F., Ma H., Bowman J.L., Drews G.N., Feldmann K.A., Meyerowitz E.M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature.* 1990; 346(6279):35-39. doi 10.1038/346035a0

You F., Cloutier S. Mapping quantitative trait loci onto chromosome-scale pseudomolecules in flax. *Methods Protoc*. 2020;3(2):28. doi 10.3390/mps3020028

Yu G. Using ggtree to visualize data on tree-like structures. *Curr Protoc Bioinform.* 2020;69(1):e96. doi 10.1002/cpbi.96

Yu T., Huang X., Dou S., Tang X., Luo S., Theurkauf W.E., Lu J., Weng Z. A benchmark and an algorithm for detecting germline transposon insertions and measuring *de novo* transposon insertion frequencies. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(8):e44. doi 10.1093/nar/gkab010

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 30.07.2025. После доработки 24.09.2025. Принята к публикации 25.09.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1277-1287

doi 10.18699/vjgb-25-132

Влияние аллельных вариантов гена *Vrn-A1* на длину вегетационного периода у *Triticum dicoccoides*

Г.Ю. Чепурнов [1, 2], Ч. Чэнь [2, 3], А.Г. Блинов [2], В.М. Ефимов [2, 3], Н.П. Гончаров [2, 3]

[1] Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

chepurnovgy@bionet.nsc.ru

Аннотация. Длина (продолжительность) вегетационного периода является одним из ключевых хозяйственно важных признаков зерновых культур. У пшениц основное влияние на него оказывают гены *Vrn*, контролирующие тип (яровость *vs*. озимость) и скорость развития растений. В настоящей работе по признаку «тип развития» изучено 137 образцов дикой полбы *Triticum dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., среди которых выявлено 39 яровых. Методом секвенирования у яровых образцов установлены нуклеотидные последовательности промоторной области гена *Vrn-A1*. Идентифицировано пять аллельных вариантов: *Vrn-A1b.1*, *Vrn-A1b.2*, *Vrn-A1b.4*, *Vrn-A1d*, *Vrn-A1u*. Три яровых образца, PI355457, PI190919 и PI560817 *T. dicoccoides*, содержали одновременно два аллеля гена *Vrn-A1*: *Vrn-A1d* и не описанный ранее аллельный вариант, обозначенный авторами как *Vrn-A1b.8*. Промоторная область этого аллеля имела несколько делеций относительно интактного варианта, одна из которых захватывала 8 п. н. VRN-бокса. В контролируемых условиях теплицы у образцов была определена длина вегетационного периода и методом 2B-PLS анализа (two-block partial least squares analysis) оценена связь между аллельными вариантами гена *Vrn-A1* и длиной вегетационного периода яровых образцов *T. dicoccoides*. Коэффициент корреляции (r) между этими признаками составил 0.534. Был рассчитан также коэффициент корреляции между длиной вегетационного периода растений и регионами происхождения образцов (r = 0.478). Показано, что образцы, имеющие одинаковые аллели гена *Vrn-A1* и происходящие из одного региона, могут значительно отличаться между собой по длине вегетационного периода. Наличие фенотипических различий при одинаковом аллельном составе гена *Vrn-A1* указывает на вклад иных наследственных факторов, локализованных в геномах этих образцов, что обусловливает их ценность в качестве новых источников генетических ресурсов, способствующих расширению биоразнообразия сортов возделываемых видов пшениц.

Ключевые слова: дикая полба; *Triticum dicoccoides*; яровой тип развития; ген *Vrn-A1*; аллели; длина вегетационного периода; 2B-PLS анализ

Для цитирования: Чепурнов Г.Ю., Чэнь Ч., Блинов А.Г., Ефимов В.М., Гончаров Н.П. Влияние аллельных вариантов гена *Vrn-A1* на длину вегетационного периода у *Triticum dicoccoides*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1277-1287. doi 10.18699/vjgb-25-132

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного бюджетного проекта FWNR-2025-0009.

Благодарности. Растения выращены в ЦПК репродукции растений ИЦиГ СО РАН в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0017. Секвенирование выполнено в ЦКП геномики СО РАН (Новосибирск, РФ, URL: http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility, дата обращения 02.04.2025). Авторы благодарны д.б.н. А.Б. Щербаню (ИЦиГ СО РАН) за предоставление дополнительной информации по образцам *Triticum dicoccoides*, изученным в его работе.

The influence of allelic variants of the *Vrn-A1* gene on the duration of the vegetation period in *Triticum dicoccoides*

G.Yu. Chepurnov [1, 2], Z. Chen [2, 3], A.G. Blinov [2], V.M. Efimov [2, 3], N.P. Goncharov [2, 3]

[1] Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

chepurnovgy@bionet.nsc.ru

Abstract. The duration of the vegetation period (DVP) is an important agronomic trait in cereal. The main influence on it in wheat is exerted by *Vrn* genes, which determine the growth habit (spring *vs.* winter) and DVP. In the present study, 137 wild emmer *Triticum dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf. accessions were evaluated according to the growth habit trait, among which 39 spring ones were identified. The nucleotide sequences of the promoter region of the *Vrn-A1* gene were established in the spring accessions by sequencing. Five allelic variants of *Vrn-A1* genes previously found in *T. dicoccoides* were identified, namely *Vrn-A1b.1*, *Vrn-A1b.2*, *Vrn-A1b.4*, *Vrn-A1d*, *Vrn-A1u*. Three spring

© Чепурнов Г.Ю., Чэнь Ч., Блинов А.Г., Ефимов В.М., Гончаров Н.П., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

accessions PI355457, PI190919, PI560817 simultaneously contained two alleles of the *Vrn-A1* gene: *Vrn-A1d* and previously undescribed functional allelic variant designated by the authors as *Vrn-A1b.8*. The promoter region of this allele had several deletions relative to the intact variant. One of such deletions covered 8 bp of the VRN box. In a single experiment, under controlled greenhouse conditions, the relationship between the allelic variants of the *Vrn-A1* gene and the duration of the vegetation period of the *T. dicoccoides*' spring accessions was studied using the 2B-PLS (Two-Block Partial Least Squares) analysis. The correlation coefficient (r) between these traits was 0.534. The correlation coefficient between the duration of the vegetation period of wild emmer plants and the regions of origin of the studied accessions was also calculated (r = 0.478). It was shown that accessions with identical alleles of the *Vrn-A1* gene and originating from the same region can differ significantly from each other in the duration of the vegetation period. The presence of phenotypic differences with the same allelic composition of the *Vrn-A1* gene indicates the contribution of other hereditary factors localized in the genomes of these accessions, which determines their value as new donors of genetic resources that contribute to the expansion of the biodiversity of common and durum wheat commercial cultivars.
Key words: wild emmer; *Triticum dicoccoides*; spring growth habit; *Vrn-A1* gene; alleles; duration of vegetation period; 2B-PLS analysis

For citation: Chepurnov G.Yu., Chen Z., Blinov A.G., Efimov V.M., Goncharov N.P. The influence of allelic variants of the *Vrn-A1* gene on the duration of the vegetation period in *Triticum dicoccoides*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1277-1287. doi 10.18699/vjgb-25-132

Введение

Дикая полба *Triticum dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf. является одним из возможных предков культивируемых тетраплоидных ($2n = 4x = 28$) пшениц (Rivera et al., 2025). Ее ареал охватывает Плодородный полумесяц (Юго-Западная Азия) и простирается от Израиля, Иордании, Ливана, Сирии, юга Турции и северного Ирака до юго-запада Ирана (Özkan et al., 2011; Lack, van Slageren, 2020), в котором, вероятнее всего, и была доместицирована полба *T. dicoccum* Schrank ex Schübl. (Novoselskaya-Dragovich et al., 2025). Благодаря такому обширному ареалу *T. dicoccoides* сохраняет значительный полиморфизм и обладает существенным потенциалом для улучшения современных сортов возделываемых видов пшениц (Kato et al., 1997; Nevo, 2001; Dong et al., 2010; Feng et al., 2017). Аллельные варианты генов *T. dicoccoides*, контролирующих хозяйственно важные признаки, часто использовались для повышения устойчивости растений твердой и мягкой пшеницы к различным болезням, таким как фузариоз колоса (Soresi et al., 2017, 2021), желтая ржавчина (Sela et al., 2014; Zhang H. et al., 2016), мучнистая роса (Xue et al., 2012; Ouyang et al., 2014; Liang et al., 2015; Saidou et al., 2015; Qiu et al., 2021) и др. Помимо интрогрессии генов, связанных с иммунитетом, дикая полба широко привлекается для улучшения возделываемых видов пшеницы и по другим признакам, включая повышение адаптивности сортов, за счет переноса доминантных генов *Vrn* (от англ. "response to vernalization") и их аллелей, ответственных за формирование типа (яровость *vs*. озимость) и скорости развития растений (Strejčková et al., 2023).

Тип развития является важнейшим признаком, обусловливающим широкую адаптивность растений пшеницы к различным климатическим условиям (Law, Worland, 1997). Растения с озимым типом развития не переходят к генеративному развитию при отсутствии продолжительного (обычно не менее 50 дней) воздействия низкими положительными температурами – яровизации (Kiss et al., 2025). Этот механизм обеспечивает задержку растений в вегетативной фазе, предотвращая повреждение флоральных меристем низкими температурами. Растения с яровым типом развития могут переходить от вегетативного к генеративному развитию без яровизации в течение одного вегетационного сезона (Distelfeld et al., 2009a). Ранее неоднократно показано, что гены *Vrn*, контролирующие особенности роста и развития (продолжительность онтогенеза) растений пшеницы, определяют не только тип (яровость/озимость) развития, но и продолжительность отдельных фаз развития (Ефремова, Чуманова, 2023), т. е. контролируют длительность жизненного цикла от всходов до созревания и, как следствие, влияют на скороспелость и урожайность (Flood, Halloran, 1986; Goncharov, 1998; Distelfeld et al., 2009a; Kamran et al., 2014; Shcherban et al., 2015a; Afshari-Behbahanizadeh et al., 2024; Plotnikov et al., 2024; и др.). Помимо этих генов, на длину вегетационного периода растений пшеницы влияют и другие гены, такие как *Ppd* (от англ. "response to photoperiod"), контролирующие реакцию растений на длину дня (фотопериод), и гены *Eps* (от англ. "ealiness *per se*"), детерминирующие скорость созревания растений без воздействия внешних сигналов (Distelfeld et al., 2009a; Kamran et al., 2014; Würschum et al., 2018). Отмечается, что на систему генов *Vrn* приходится до 75 % всей изменчивости по данному признаку, тогда как на оставшиеся две системы – около 25 % (Stelmakh, 1998). Значительное влияние генов *Vrn* на скороспелость – одна из причин их активного изучения. К настоящему времени известны структура, геномная и хромосомная локализация этих генов, а также изучены взаимодействия между ними и другими генами, влияющими на указанный признак (Yan et al., 2003, 2004b, 2006; Fu et al., 2005; Distelfeld et al., 2009b; Chen A., Dubcovsky, 2012; Shcherban et al., 2012a, b, 2013, 2015a; Chen F. et al., 2013; Kippes et al., 2014–2016; Shcherban, Salina, 2017).

Мутации трех генов, *Vrn-1*, *Vrn-2* и *Vrn-3*, контролируют яровой тип развития у многих видов рода *Triticum* L. (Goncharov, 2004a, b; Yan et al., 2004a, b, 2006; Golovnina et al., 2010; Shcherban, Salina, 2017). Четвертый ген *Vrn – Vrn-D4* – описан у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (Kippes et al., 2014, 2015) и *T. sphaerococcum* Perc. (Гончаров, Шитова, 1999). Экспрессия *Vrn-1* является основным инициирующим фактором начала каскада процессов формирования соцветий (Yan et al., 2003; Trevaskis et al., 2007). Ген *Vrn-1* кодирует транскрипционные факторы MADS-box (Yan et al., 2004a; Trevaskis et al., 2007), которые снижают экспрессию генов *Vrn-2* и ин-

дуцируют экспрессию генов *Vrn-3*, выполняющих функцию флоригенов (Dubcovsky et al., 2006; Yan et al., 2006; Hemming et al., 2008). Показано, что яровой тип развития у гексаплоидных ($2n = 6x = 42$) пшениц может определяться мутациями в генах *Vrn-1*, *Vrn-D4* и *Vrn-3*, которые обусловливают их экспрессию без воздействия низкими положительными температурами (яровизации) (Yan et al., 2003, 2004b, 2006; Fu et al., 2005; Chen A., Dubcovsky, 2012; Shcherban et al., 2012a, b, 2013, 2015a; Kippes et al., 2014, 2015; Shcherban, Salina, 2017) или за счет мутаций, приводящих к уменьшению числа доменов цинковых пальцев и CCT, кодируемых генами *Vrn-2*, или изменяющих аминокислотный состав обозначенных доменных структур (Distelfeld et al., 2009b; Chen F. et al., 2013; Kippes et al., 2016).

Яровой тип развития у *T. dicoccoides* наследуется по доминантному типу (Goncharov, 1998). У этого вида аллельные варианты гена, детерминирующего яровой тип развития, описаны только в локусе VRN-1 (Yan et al., 2004a; Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016; и др.). На сегодняшний день описано семь таких аллелей, четыре из которых содержат делеции разной длины в промоторном регионе (*Vrn-A1b.2*, *Vrn-A1b.7*, *Vrn-A1f* и *Vrn-A1d*), два аллеля имеют встройку мобильного элемента в этой же области (*Vrn-A1a.3*) и делецию в первом интроне (*Vrn-A1c*), и один отличается от интактного варианта 29-ю нуклеотидными заменами, одной делецией и одной вставкой SNP в промоторной области (*Vrn-B1dic*) (Yan et al., 2004a; Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016).

Все перечисленные выше аллельные варианты генов *Vrn-1* были обнаружены ранее при изучении 92 яровых и озимых образцов *T. dicoccoides* (Yan et al., 2004a; Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016). Эти работы охватывают лишь часть имеющихся в коллекциях образцов дикой полбы. Согласно отчету GRIN NPGS, по результатам испытаний 2001 г. на Исследовательской станции USDA в штате Айдахо высевали 792 образца *T. dicoccoides*, из которых 292 были отнесены к формам с яровым или факультативным типом развития (URL: https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/method?id=491608, дата обращения 02.04.2025). Однако, в отличие от мягкой пшеницы, опубликованные к настоящему времени исследования не дают информации о влиянии выявленных аллельных вариантов генов *Vrn-1* на изменение длины вегетационного периода яровых растений *T. dicoccoides*.

Настоящее исследование имеет две основные задачи: 1) секвенирование и анализ участка промоторной области гена *Vrn-A1*, включающего VRN-box и GArG-box, у 39 не изученных ранее яровых образцов *T. dicoccoides*; 2) оценка ассоциативной связи между аллельными вариантами гена *Vrn-A1* и длиной вегетационного периода у яровых образцов *T. dicoccoides* в контролируемых условиях.

Материал и методы

Растительный материал, условия выращивания, оценка типа развития и продолжительности вегетационного периода. Материалом для исследования послужили 137 образцов *T. dicoccoides* различного эколого-географического происхождения, из которых было выявлено 39 образцов с яровым типом развития, взятых в дальнейшее изучение (табл. 1, рис. 1). От каждого образца было получено потомство семян для оценки типа развития и сроков колошения растений. Растения высаживали 5-днев-

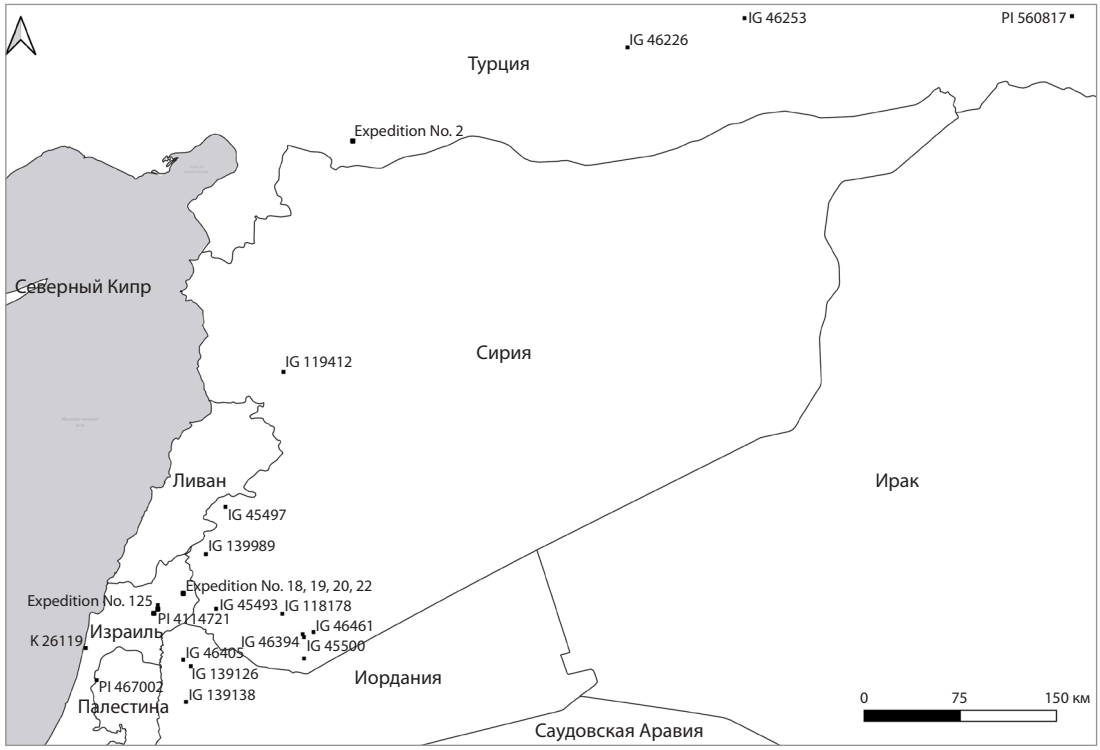


Рис. 1. Места сбора образцов *T. dicoccoides*, изученных в данной работе.

Таблица 1. Использованные в исследовании образцы *T. dicoccoides*, место сбора образцов, продолжительность периода до наступления колошения и аллельные варианты гена *Vrn-A1*

№ п/п	Наименование образца	Место сбора образца	Дней до колошения, среднее ± стандартное отклонение	Аллельный вариант *Vrn-A1*
1	IG 46405	Иордания	93 ± 10.1	*Vrn-A1u*
2	IG 45491	Сирия	83 ± 1.7	
3	IG 139138	Иордания	83 ± 5.1	
4	IG 45493	Сирия	69 ± 2.4	
5	IG 46394		83 ± 1.8	
6	IG 45500		69 ± 9.4	
7	IG 46226	Турция	73 ± 2.9	
8	Expedition No. 2		89 ± 7.7	
9	IG 46461	Сирия	69 ± 1.3	
10	IG 45497		73 ± 4.3	
11	PI 415151	Израиль	86 ± 7.5	*Vrn-A1d*
12	PI 414721		83 ± 6.9	
13	IG 139126	Иордания	62 ± 7.8	
14	PI 467016	Израиль	83 ± 1.9	
15	PI 467002		44 ± 2.8	
16	к-26119		46 ± 2.1	
17	PI 467027		56 ± 8.6	
18	DC 91	Неизвестно	76 ± 7.4	
19	PI 346783	Венгрия	67 ± 6.9	
20	PI 355457	Германия	62 ± 8.7	*Vrn-A1d/Vrn-A1b.7*
21	PI 190919	Бельгия	56 ± 1.6	
22	PI 560817	Турция	62 ± 1.5	
23	Expedition No. 20	Израиль	54 ± 4.3	*Vrn-A1d*
24	Expedition No. 8		45 ± 5.4	
25	Expedition No. 19		46 ± 7.4	
26	Expedition No. 18		54 ± 5.8	
27	Expedition No. 22		72 ± 5.3	
28	Expedition No. 125		72 ± 3.3	
29	к-5199	Израиль	41 ± 9.4	*Vrn-A1b.1*
30	IG 45495	Сирия	93 ± 7.2	
31	Неизвестно	Белоруссия	38 ± 2.4	*Vrn-A1b.2*
32	PI 352366	Германия	38 ± 3.6	
33	к-41965	Израиль	48 ± 8.2	
34	IG 46253	Турция	34 ± 6.4	
35	PI 30989	Израиль	93 ± 3.6	*Vrn-A1b.4*
36	IG 139989	Сирия	86 ± 9.7	
37	IG 119412		80 ± 10.2	
38	IG 118178		93 ± 7.8	
39	Expedition No. 116	Израиль	86 ± 3.6	

ными проростками в количестве 10 штук на образец в гидропонной теплице ИЦиГ СО РАН без предварительной яровизации. Выращивали при температуре 23–25 °С на длинном дне (16 ч) при стандартной влажности. Число дней от высадки проростков до колошения регистрировали для каждого растения индивидуально. На основе полученных данных оценивали среднее значение этого признака для каждого образца.

Выделение тотальной ДНК, ПЦР-амплификация и анализ нуклеотидных последовательностей промотора гена *Vrn-A1*. Суммарную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Хильден, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Для экстракции ДНК использовали 50–100 мг свежесобранных листьев, полученных от растений каждого образца. Количество и качество выделенной ДНК определяли с помощью спек-

трофотометра NanoDrop2000 (Thermo Scientific, Уолтем, США) и электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле, содержащем бромид этидия (0.5 мг/мл) в 1xTAE. Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Tris-HCl (pH 8.9), 1 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 4 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ каждого dNTP, 0.5 мкМ каждого праймера, 1 ед. *Taq* ДНК-полимеразы и 0.1 мкг геномной ДНК. Для исследования целевого участка промоторной области использовались праймеры VRN1AF (5′-GAAAGGAAAAATTCTGCTCG-3′) и VRN1-INT1R (5′-GCAGGAAATCGAAATCGAAG-3′). Праймеры амплифицировали фрагмент длиной 688 п. н. (в случае интактного аллельного варианта) от положения –439 п. н. выше стартового кодона до 246 п. н. выше стартового кодона. Программа ПЦР включала начальный этап денатурации в течение 5 мин при 94 °C и 33 цикла амплификации, состоящих из 30 с денатурации при 94 °C, 40 с отжига при 52 °C и 1 мин элонгации при 72 °C. Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в агарозном геле и очищали с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Продукты ПЦР клонировали в вектор pAL2-T по протоколу набора Quick-TA («Евроген», Москва, Россия). Реакции секвенирования проводили с использованием 200 нг продукта и набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 (Thermo Scientific, США) на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, Уолтем, США) в Центре геномики СО РАН (URL: http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility, дата обращения 02.04.2025).

Статистический анализ. Для статистической обработки использовались количественные и качественные характеристики образцов. Анализ аллельных вариантов генов *Vrn-A1* и их связи со сроками колошения (длиной вегетационного периода) проводился с учетом ранее опубликованных данных, полученных в идентичных условиях выращивания (гидропонная система, 16-часовой фотопериод) (Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016). Данные представлены в виде матрицы «образцы–признаки». Каждый объект описан тремя признаками: дата колошения образца (количественный), аллельный вариант гена *Vrn-A1* (качественный), регион сбора образца (качественный). К каждой паре блоков применялся двухблочный метод частичных наименьших квадратов (Two-Block Partial Least Squares, 2B-PLS) (Rohlf, Corti, 2000). Затем рассчитывались корреляции между полученными бикомпонентами. Расчеты и визуализацию результатов проводили в программном пакете для статистического анализа Statistica 12.6 (StatSoft).

Результаты

Установление типа развития и продолжительности вегетационного периода у исследуемых образцов *T. dicoccoides*

Для определения типа развития растений (яровой/озимый) 137 образцов дикой полбы *T. dicoccoides* были выращены в гидропонной теплице Института цитологии и генетики СО РАН. Двенадцать из изученных образцов (IG 45495, IG 45491, IG 46394, PI 414721, IG 45500, PI 355457, PI 560817, к-41965, к-26119, PI 467002, к-5199, PI 352366) ранее были охарактеризованы как яровые (URL: https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/method?id=491608; URL: https://www.genesys-pgr.org; URL: https://grs.icarda.org, дата обращения 02.04.2025). Мы использовали их в качестве яровых контролей. Среди контролей позднее остальных выколашивались растения образца IG 45495 (Сирия). Из 125 не исследованных ранее образцов 98 не переходили к генеративному развитию и оставались в фазе кущения, остальные 27 формировали колосья не позднее ярового контроля IG 45495. Учитывая тот факт, что проростки всех растений высаживались без предварительной яровизации, мы отнесли 98 образцов, не переходящих к колошению, к озимым, а 27 образцов – к яровым. В дальнейшем изучение генетической структуры аллелей гена *Vrn-A1* проводилось только у 27 выявленных яровых образцов и 12 яровых контролей.

У всех яровых образцов определяли продолжительность периода от высадки проростков до колошения (в днях). Растения демонстрировали большой разброс по длине вегетационного периода; самый скороспелый образец IG 46253 (Турция) выколашивался за 34 дня, а самый позднеспелый IG 45495 – за 93 дня (см. табл. 1). Полученные данные были использованы для расчета корреляции между аллельными вариантами гена *Vrn-A1* и длиной вегетационного периода растений.

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторной области гена *Vrn-A1*

У исследованных образцов *T. dicoccoides* выявлено шесть вариантов промотора гена *Vrn-A1*. Пять из них соответствовали аллелям, описанным ранее у этого вида. Десять образцов имели аллель *Vrn-A1u*, два – аллель *Vrn-A1b.1*, четыре – аллель *Vrn-A1b.2*, пять – аллель *Vrn-A1b.4* и восемнадцать – аллель *Vrn-A1d* (см. табл. 1). Среди 39 проанализированных последовательностей ни одна не содержала никаких дополнительных SNP или иных мутаций в районах VRN-box и GArG-box относительно описанных ранее вариантов (рис. 2). Три образца (PI 355457, PI 190919, PI 560817) представляли наибольший интерес, так как содержали одновременно два промотора гена *Vrn-A1*. Одна из последовательностей была идентична аллельному варианту *Vrn-A1d*. Другая последовательность содержала три делеции относительно интактного варианта промотора, а именно: одну длиной 32 п. н., расположенную между –234 и –201 п. н. выше стартового кодона, вторую длиной 19 п. н. – между –159 и –139 п. н. выше стартового кодона, и третью делецию длиной 1 п. н. – на 138 п. н. выше стартового кодона. Делеция, расположенная дальше других от стартового кодона, захватывала 8 п. н. в составе VRN-box, а оставшаяся последовательность этого сайта содержала замену T на C в положении –197 п. н. выше стартового кодона. Этот аллельный вариант, обнаруженный в настоящей работе, был обозначен как *Vrn-A1b.8*. Все последовательности опубликованы в GenBank (номера последовательностей PV699347–PV699388).

Проведение 2B-PLS анализа

При статистической обработке полученных результатов мы использовали три блока описаний образцов: время ко-

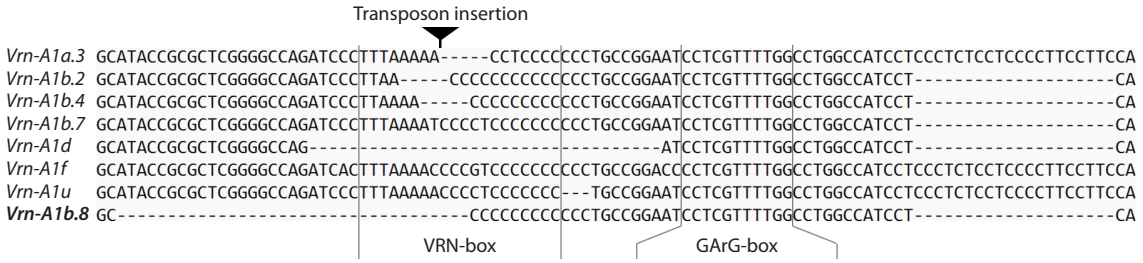


Рис. 2. Выравнивание последовательностей промотора гена *Vrn-A1*, обнаруженных у 39 яровых *T. dicoccoides*. Впервые выявленная последовательность обозначена полужирным шрифтом.

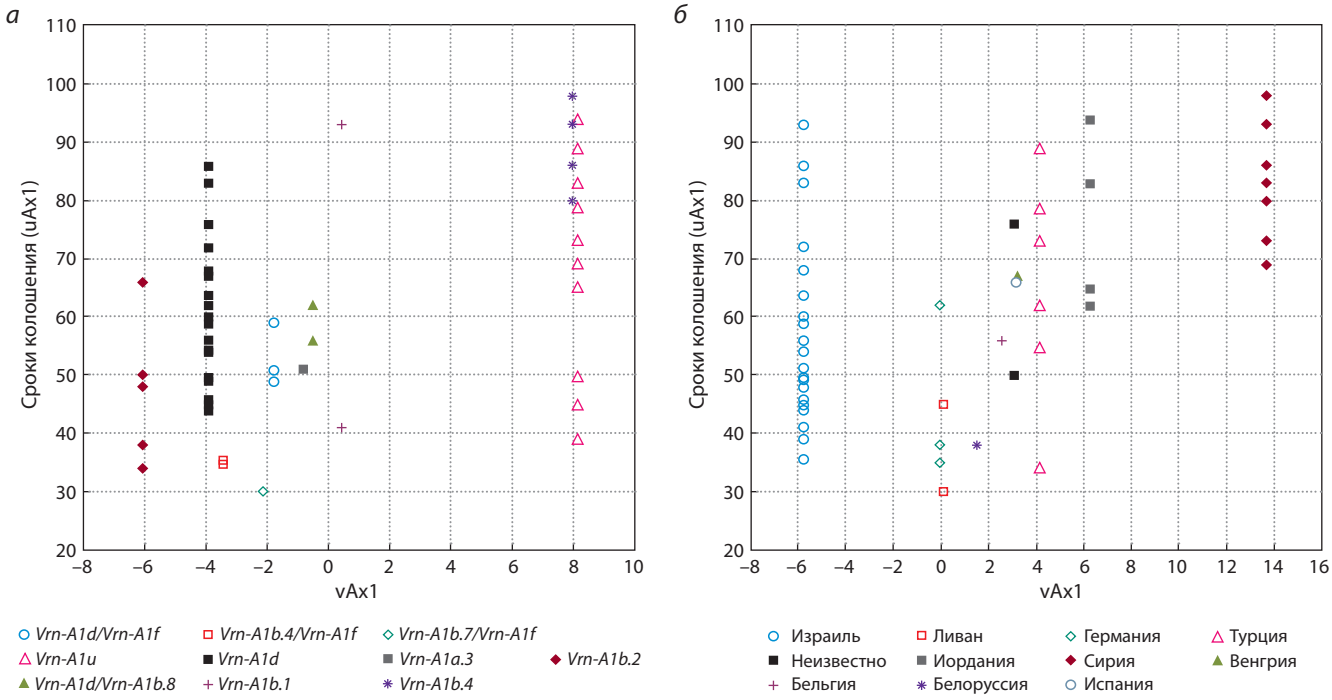


Рис. 3. Конфигурация образцов на плоскости первых бикомпонент.

а – vAx1 рассчитана по аллельным вариантам гена *Vrn-A1*; *б* – vAx1 рассчитана по регионам происхождения образцов.

лошения (количественный признак), аллельный вариант гена *Vrn-A1* (число двоичных признаков равно числу аллелей) и регион происхождения (число двоичных признаков равно числу регионов происхождения). К каждой паре блоков (колошение–аллель, колошение–регион происхождения, аллель–регион происхождения) был применен двухблочный метод частичных наименьших квадратов (2B-PLS) (Rohlf, Corti, 2000). Данные об аллельных вариантах гена *Vrn-A1* и сроках колошения образцов, изученные в настоящей работе, мы дополнили аналогичными данными, взятыми из ранее опубликованных исследований, в которых растения выращивались в таких же условиях (гидропонная теплица, 16-часовой световой день) (Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016).

В ходе анализа мы учитывали и информацию о месте происхождения (сбора) образцов, чтобы оценить влияние на колошение растений различных аллелей генов *Vrn-1*, обеспечивающих приспособленность растений пшеницы к среде произрастания. Если в одном образце обнаруживалось по два аллеля гена *Vrn-A1*, мы учитывали такой случай как отдельный вариант, записывая имеющиеся в образце аллели через косую черту, например *Vrn-A1d/Vrn-A1f*. Рассматривалась только первая пара осей (обозначены как uAx1 и vAx1), имеющая наибольшую ковариацию (рис. 3). Если блок состоял только из одного признака («сроки колошения»), то анализируемый признак составлял единственную (первую) бикомпоненту этого блока (uAx1).

Применяя 2B-PLS анализ для расчета связи между длиной вегетационного периода и аллельными вариантами гена *Vrn-A1*, мы выразили одну ось (uAx1) из признака «сроки колошения», а другую (vAx1) – из двоичной матрицы «образцы аллели». Коэффициент корреляции (r) между осями составлял 0.53 (средняя связь), p-value = $= 3.88 \times 10^{-6}$ (табл. 2). Ни один конкретный аллельный вариант гена *Vrn-A1* не имел значения коэффициента корреляции с осью uAx1 ≥0.5. Единственным аллелем, имевшим близкие значения (0.45), оказался *Vrn-A1b.4*, у остальных аллельных вариантов значение корреляции с признаком «сроки колошения» было <0.3. Наибольшая связь с осью vAx1 была у аллелей *Vrn-A1d* (r = –0.61) и *Vrn-A1u* (r = 0.8). Разные знаки коэффициента корреляции

Таблица 2. Матрица корреляции (×1000) между аллельными вариантами *Vrn-A1* и временем колошения растений

Признак	uAx1	vAx1	Сроки колошения	*Vrn-A1a.3*	*Vrn-A1b.1*	*Vrn-A1b.2*	*Vrn-A1b.4*	*Vrn-A1b.4/ Vrn-A1f*	*Vrn-A1b.7/ Vrn-A1f*	*Vrn-A1d*	*Vrn-A1d/ Vrn-A1f*	*Vrn-A1d/ Vrn-A1b.8*	*Vrn-A1u*
uAx1	–	534	–	–75	55	–295	450	–274	–229	–109	–111	–21	290
vAx1	534	–	534	–19	14	–347	415	–110	–48	–611	–71	–21	802
Сроки колошения	–	534	–	–75	55	–295	450	–274	–229	–109	–111	–21	290
Vrn-A1a.3	–75	–19	–75	–	–22	–39	–36	–22	–15	–106	–27	–27	–67
Vrn-A1b.1	55	14	55	–22	–	–56	–51	–31	–22	–152	–39	–39	–96
Vrn-A1b.2	–295	–347	–295	–39	–56	–	–91	–56	–39	–271	–69	–69	–171
Vrn-A1b.4	450	415	450	–36	–51	–91	–	–51	–36	–246	–62	–62	–155
Vrn-A1b.4/Vrn-A1f	–274	–110	–274	–22	–31	–56	–51	–	–22	–152	–39	–39	–96
Vrn-A1b.7/Vrn-A1f	–229	–48	–229	–15	–22	–39	–36	–22	–	–106	–27	–27	–67
Vrn-A1d	–109	–611	–109	–106	–152	–271	–246	–152	–106	–	–187	–187	–466
Vrn-A1d/Vrn-A1f	–111	–71	–111	–27	–39	–69	–62	–39	–27	–187	–	–48	–118
Vrn-A1d/Vrn-A1b.8	–21	–21	–21	–27	–39	–69	–62	–39	–27	–187	–48	–	–118
Vrn-A1u	290	802	290	–67	–96	–171	–155	–96	–67	–466	–118	–118	–

Примечание. Здесь и в табл. 3: светло-красный, светло-зеленый фон – $p < 0.001$, красный, зеленый – $p < 10^{-4}$.

Таблица 3. Матрица корреляции (×1000) между регионом происхождения или местонахождения образцов и временем колошения растений

Признак	uAx1	vAx1	Сроки колошения	Бельгия	Белоруссия	Германия	Венгрия	Израиль	Иордания	Ливан	Испания	Сирия	Турция	Неизвестно
uAx1	–	478	–	–41	–171	–213	39	–265	213	–249	31	460	65	14
vAx1	478	–	478	44	26	–1	56	–864	221	2	55	812	182	75
Сроки колошения	–	478	–	–41	–171	–213	39	–265	213	–249	31	460	65	14
Бельгия	–41	44	–41	–	–15	–27	–15	–132	–32	–22	–15	–52	–39	–22
Белоруссия	–171	26	–171	–15	–	–27	–15	–132	–32	–22	–15	–52	–39	–22
Германия	–213	–1	–213	–27	–27	–	–27	–232	–55	–39	–27	–92	–69	–39
Венгрия	39	56	39	–15	–15	–27	–	–132	–32	–22	–15	–52	–39	–22
Израиль	–265	–864	–265	–132	–132	–232	–132	–	–270	–188	–132	–449	–336	–188
Иордания	213	221	213	–32	–32	–55	–32	–270	–	–45	–32	–107	–80	–45
Ливан	–249	2	–249	–22	–22	–39	–22	–188	–45	–	–22	–75	–56	–31
Испания	31	55	31	–15	–15	–27	–15	–132	–32	–22	–	–52	–39	–22
Сирия	460	812	460	–52	–52	–92	–52	–449	–107	–75	–52	–	–134	–75
Турция	65	182	65	–39	–39	–69	–39	–336	–80	–56	–39	–134	–	–56
Неизвестно	14	75	14	–22	–22	–39	–22	–188	–45	–31	–22	–75	–56	–

Примечание. В случае с Германией, Венгрией, Белоруссией и Бельгией это не места произрастания, а генбанки.

для двух аллельных вариантов позволяют предположить разнонаправленность их действия на признак.

Этим же способом проанализировали влияние генетических адаптационных механизмов, выразив ось vAx1 через матрицу «образцы × регионы происхождения». Вторая ось (uAx1), как и в первом случае, совпадает с признаком «сроки колошения». Коэффициент корреляции между осями показал меньшую связь, чем в случае связи между длиной вегетационного периода и аллелями гена *Vrn-A1* ($r = 0.47$, p-value $= 4.92 \times 10^{-5}$) (табл. 3). Образцы из Сирии имели коэффициент корреляции со сроками колошения растений $r = 0.46$, образцы из остальных регионов демонстрировали незначительную связь с этим признаком ($r < 0.3$). Наибольшее значение с осью vAx1 получено для образцов из Израиля и Сирии ($r = –0.864$ и $r = 0.812$ соответственно). Различие в знаках коэффициента корреляции указывает на противоположное влияние разных генетических адаптационных механизмов на длину вегетационного периода.

Обсуждение

Комбинации аллельных вариантов генов *Vrn-1* оказывают значительное влияние на хозяйственно важный признак «продолжительность вегетационного периода растений» у возделываемых видов пшениц (Flood, Halloran, 1986; Goncharov, 1998; Kato et al., 1998; Distelfeld et al., 2009a; Kamran et al., 2014; Shcherban et al., 2015a; Смоленская и др., 2022; Смоленская, Гончаров, 2023; Afshari-Behbahanizadeh et al., 2024; Plotnikov et al., 2024; Гончаров и др., 2025). Изучение аллельного состава этих генов у диких видов пшениц и связи различных аллелей с длиной вегетационного периода очень важно для расширения разнообразия и повышения пластичности коммерческих сортов и их адаптации к специфическим условиям разных регионов возделывания. В популяциях *T. dicoccoides* обнаружены яровые образцы, у которых мутантные варианты генов *Vrn-1* появились независимо от таковых у широко возделываемых в настоящее время видов *T. aestivum* и *T. durum* Desf. (Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016). Интрогрессия аллелей дикой полбы в возделываемые сорта этих видов позволит увеличить их полиморфизм и даст возможность проводить более тонкую настройку сроков колошения у коммерческих сортов.

В настоящей работе мы исследовали тип развития у 137 образцов *T. dicoccoides* и изучили промоторную область гена *Vrn-A1* у 39 выявленных яровых образцов. У 36 из них было идентифицировано пять аллельных вариантов – *Vrn-A1b.1*, *Vrn-A1b.2*, *Vrn-A1b.4*, *Vrn-A1d*, *Vrn-A1u*, которые были описаны ранее у *T. dicoccoides* (Yan et al., 2004a; Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016). Показано, что присутствие в геноме пшениц аллелей *Vrn-A1b.1*, *Vrn-A1b.2* или *Vrn-A1d* является определяющим фактором для формирования ярового типа развития (Yan et al., 2004a; Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016). Три из 39 яровых образцов *T. dicoccoides* обладали одновременно двумя различными вариантами гена *Vrn-A1*. Последовательность одного аллеля совпадала с описанным ранее вариантом промотора гена *Vrn-A1d*, другая имела отличные от выявленных у него делеции. В БД National Center for Biotechnology Information (NCBI) не представлено нуклеотидных последовательностей, идентичных данному аллельному варианту. Наиболее близок к нему аллель *Vrn-A1b.7*, от которого выявленный в нашей работе вариант отличался делецией 32 п. н., расположенной между –234 п. н. и –201 п. н. выше стартового кодона, а также заменой T на C в положении –197 п. н. выше стартового кодона. Мы обозначили обнаруженный вариант как *Vrn-A1b.8*. Делеция в промоторе *Vrn-A1b.8* захватывала 8 п. н. области VRN-box.

Мы провели поиск нуклеотидных последовательностей промоторного региона *Vrn-A1*, имеющих подобные делеции в VRN-box, и обнаружили, что наиболее близким вариантом является аллель *Vrn-A1o* (Zhang B. et al., 2023), который несет делецию с 5′ конца VRN-box (как и в случае *Vrn-A1b.8*) несколько большего размера (10 п. н.). Показано, что аллель *Vrn-A1o* контролирует яровой тип развития растений мягкой пшеницы (Zhang B. et al., 2023). Исходя из этого сделано предположение, что аллель *Vrn-A1b.8* тоже обусловливает яровой тип развития. Однако из-за присутствия в образцах второго доминантного аллеля *Vrn-A1d*, детерминирующего яровость даже будучи в единственной копии в геноме растения (Golovnina et al., 2010), влияние аллеля *Vrn-A1b.8* на тип развития остается неопределенным. Наличие двух аллелей у одного образца может быть объяснено гетерогенностью растительного материала или CNV вследствие дупликации исследуемого участка. Закрепление в геноме растений *T. dicoccoides* двух различных аллелей гена *Vrn-1* было показано и ранее (Konopatskaia et al., 2016). Кроме того, подобный феномен был выявлен у ряда других тетраплоидных видов пшеницы (Golovnina et al., 2010; Chhuneja et al., 2015). Исходя из этого предположение о наличии CNV в геноме трех яровых образцов *T. dicoccoides* с двумя копиями промотора *Vrn-A1* более вероятно.

После установления нуклеотидных последовательностей промотора гена *Vrn-A1* мы провели оценку связи между его аллельными вариантами и длиной вегетационного периода растений дикой полбы. При проведении анализа мы дополнили данные значениями сроков колошения образцов из ряда других исследований, в которых аллельные варианты промотора были точно определены секвенированием нуклеотидных последовательностей (Shcherban et al., 2015b; Konopatskaia et al., 2016; Muterko et al., 2016). Хотя объединение данных из различных источников даже при сходных условиях может приводить к определенным искажениям, исключение части наблюдений представлялось нам неоправданным, так как существенно сократило бы объем обрабатываемой выборки. Принимая во внимание специфику имеющихся данных, для статистического анализа был выбран метод 2B-PLS, что обусловлено его преимуществами перед традиционными методами. Классические подходы, такие как ANOVA и множественная регрессия, требуют соблюдения строгих предпосылок, включая нормальность распределения, и демонстрируют высокую чувствительность к мультиколлинеарности и наличию выбросов. Применение квадратичных критериев в этих методах может приводить к смещенным оценкам, особенно при работе с малыми выборками, увеличивая вероятность ошибок первого рода. В отличие от них, метод 2B-PLS обладает повышенной устойчивостью благодаря использованию латентных переменных, что обеспечивает меньшую чувствительность к выбросам и мультиколлинеарности. Эти характеристики делают используемый нами метод особенно подходящим для анализа биологических данных, характеризующихся статистическим шумом и сложными взаимодействиями факторов, что особенно важно, учитывая особенности нашего исследования, включая ограниченный размер выборок.

Ввиду того, что вариация числа копий (CNV) доминантного гена *Vrn-A1* влияет на продолжительность периода от всходов до колошения (Grogan et al., 2016), мы учитывали наличие двух различных аллелей этого гена в одном образце как отдельный вариант. Были установлены коэффициенты корреляции $r = 0.534$ и $r = 0.478$ между признаками «сроки колошения» × «аллельные варианты» и «сроки колошения» × «регионы происхождения» соответственно. Коэффициенты позволили оценить связь между исследуемыми параметрами, однако из полученных значений нельзя сделать однозначные выводы о доминирующем влиянии аллельных вариантов гена *Vrn-A1* или

генетических факторов, свойственных регионам происхождения образцов, на выраженность признака «длина вегетационного периода» у *T. dicoccoides*.

Ранее неоднократно описывалось существенное влияние конкретных доминантных аллелей гена *Vrn-A1* на сроки колошения (созревания) растений гексаплоидной мягкой пшеницы (Royo et al., 2020; Qiu et al., 2021; Chumanova, Efremova, 2024). На основании полученных нами результатов можно сделать вывод о том, что аналогичное влияние аллельных вариантов этого гена у растений тетраплоидной дикой полбы *T. dicoccoides* выражено значительно слабее. Следует учитывать, что проведенные в рамках настоящего исследования эксперименты осуществлялись исключительно в контролируемых условиях теплицы, без повторностей и с ограниченным числом исследуемых образцов. Эти методологические особенности накладывают определенные ограничения на интерпретацию результатов. Вместе с тем, несмотря на указанные ограничения, полученные данные демонстрируют слабую степень выраженности взаимосвязей между исследуемыми параметрами. Аналогичные экспериментальные подходы – в частности, проведение испытаний в контролируемых условиях без повторностей – применялись в ряде опубликованных работ, посвященных оценке сроков колошения у растений. Несмотря на упрощенный характер дизайна, авторы подтверждали наличие фенотипических различий между сравниваемыми группами (Kippes et al., 2014, 2015; Palomino, Cabrera, 2023). Это свидетельствует о допустимости использования подобного подхода. Также следует принять во внимание, что в нашей работе анализировался только промоторный регион *Vrn-A1*. Хотя эта область и является наиболее вариабельной у *T. dicoccoides*, все же комбинации гена *Vrn-A1* с аллелями гена *Vrn-B1*, а также комбинации аллелей гена *Ppd-1* могут влиять на длину вегетационного периода. Генотипы, характерные для конкретных регионов сборов дикой полбы, имели коэффициент корреляции со сроками колошения ниже, чем аллельные варианты *Vrn-A1*, поэтому в данном случае можно констатировать отсутствие значительного влияния этой характеристики на сроки колошения растений.

Полученная нами информация может быть полезной при селекции яровой мягкой и твердой пшеницы, учитывая, что *T. dicoccoides* активно используется в качестве донора генетического материала для этих культур (Бадаева и др., 2024). Кроме того, ранее неоднократно показано, что образцы *Aegilops tauschii* Coss. (syn. *Ae. squarrosa* L.) (Takumi et al., 2011; Chepurnov et al., 2023) так же, как и *T. dicoccoides* (см. табл. 1), обладают значительным полиморфизмом по признаку «продолжительность вегетационного периода». Поэтому при гибридизации растений этого вида эгилопса с яровыми образцами *T. dicoccoides* возможно создание искусственных гексаплоидных ($2n = 6x = 42$) амфидиплоидов, которые могут послужить перспективной платформой для успешной интрогрессии в мягкую пшеницу новых аллельных вариантов генов *Vrn*, детерминирующих длину вегетационного периода, от этих видов.

Заключение

В данной работе у яровых образцов *T. dicoccoides* выявлен новый аллельный вариант *Vrn-A1b.8*. Обнаружена достоверная (p-value = 3.88×10^{-6}) связь между аллельными вариантами доминантного гена *Vrn-A1* и длиной вегетационного периода и достоверная связь (p-value = $= 4.92 \times 10^{-5}$) между последним показателем и регионами происхождения (сбора) образцов этого вида. Установлено, что часть образцов *T. dicoccoides* с одинаковыми аллелями доминантного гена *Vrn-A1*, происходящих из одного эколого-географического региона, демонстрируют существенные отличия по признаку «продолжительность вегетационного периода». Наблюдаемая фенотипическая вариабельность по этому признаку при неизменном аллельном составе гена *Vrn-A1* может указывать на участие дополнительных генетических детерминант в контроле признака у данных образцов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о потенциальной ценности образцов дикой полбы как источников (доноров) для расширения генетического разнообразия коммерческих сортов мягкой и твердой пшеницы.

Список литературы / References

Бадаева Е.Д., Давоян Р.О., Терещенко Н.А., Лялина Е.В., Зощук С.А., Гончаров Н.П. Цитогенетические особенности межродовых амфидиплоидов и геномно-замещенных форм пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):716-730. doi 10.18699/VJGB-24-80

[Badaeva E.D., Davoyan R.O., Tereshchenko N.A., Lyalina E.V., Zoshchuk S.A., Goncharov N.P. Cytogenetic features of intergeneric amphydiploids and genome-substituted forms of wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):716-730. doi 10.18699/VJGB-24-80]

Гончаров Н.П., Шитова И.П. Наследование типа развития у стародавних и местных сортов гексаплоидных пшениц. *Генетика*. 1999;35(4):467-473

[Goncharov N.P. Shitova I.P. The inheritance of growth habit in old local varieties and landraces of hexaploid wheat. *Russ J Genet*. 1999;35(4):386-392]

Гончаров Н.П., Плотников К.О., Чепурнов Г.Ю., Каменев И.А., Немцев Б.Ф., Смоленская С.Э., Блинов А.Г. Глобальное потепление и генетика типа и скорости развития пшениц. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2025;69:68-75. doi 10.17223/19988591/69/8

[Goncharov N.P., Plotnikov K.O., Chepurnov G.Y., Kamenev I.A., Nemtsev B.F., Smolenskaya S.E., Blinov A.G. Global warming and the genetics of wheat type and rate of development. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:68-75. doi 10.17223/19988591/69/8 (in Russian)]

Ефремова Т.Т., Чуманова Е.В. Стадии роста и развития пшеницы и их значение в формировании элементов продуктивности. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(2):54-80. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-09

[Efremova T.T., Chumanova E.V. Stages of growth and development of wheat and their importance in the formation of productivity elements. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(2):54-80. doi 10.18699/LettersVJ-2023-9-09 (in Russian)]

Смоленская С.Э., Гончаров Н.П. Аллельное разнообразие генов *Vrn* и контроль типа и скорости развития у пшениц. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):933-946. doi 10.18699/VJGB-23-108

[Smolenskaya S.E., Goncharov N.P. Allelic diversity of the *Vrn* genes and the control of growth habit and earliness in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):933-946. doi 10.18699/VJGB-23-108]

Смоленская С.Э., Ефимов В.М., Кручинина Ю.В., Немцев Б.Ф., Чепурнов Г.Ю., Овчинникова Е.Ю., Белан И.А., Зуев Е.В., Чэньси

Чжоу, Пискарев В.В., Гончаров Н.П. Скороспелость и морфотип сортов мягкой пшеницы Западной и Восточной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7):662-674. doi 10.18699/VJGB-22-81
[Smolenskaya S.E., Efimov V.M., Kruchinina Y.V., Nemtsev B.F., Chepurnov G.Y., Ovchinnikova E.Y., Belan I.A., Zuev E.V., Chenxi Zhou, Piskarev V.V., Goncharov N.P. Earliness and morphotypes of common wheat cultivars of Western and Eastern Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):662-674. doi 10.18699/VJGB-22-81]

Afshari-Behbahanizadeh S., Puglisi D., Esposito S., De Vita P. Allelic variations in vernalization (*Vrn*) genes in *Triticum* spp. *Genes.* 2024; 15:251. doi 10.3390/genes15020251

Chen A., Dubcovsky J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *Vrn1* down-regulates the flowering repressor *Vrn2* in leaves but is not essential for flowering. *PLoS Genet.* 2012;8: e1003134. doi 10.1371/journal.pgen.1003134

Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X., Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol.* 2013;13:199. doi 10.1186/1471-2229-13-199

Chepurnov G., Ovchinnikova E., Blinov A., Chikida N., Belousova M., Goncharov N.P. Analysis of the structural organization and expression of the *Vrn-D1* gene controlling growth habit (spring vs. winter) in *Aegilops tauschii* Coss. *Plants.* 2023;12:3596. doi 10.3390/plants12203596

Chhuneja P., Arora J.K., Kaur P., Kaur S., Singh K. Characterization of wild emmer wheat *Triticum dicoccoides* germplasm for vernalization alleles. *J Plant Biochem Biotechnol.* 2015;24:249-253. doi 10.1007/s13562-014-0281-7

Chumanova E., Efremova T. Marker-assisted development of wheat lines of the winter cultivar Bezostaya 1 and the effects of interaction between alleles of *Vrn-A1L* and *Vrn-B1* loci on heading time. *Cereal Res Commum.* 2024;52(4):1287-1298. doi 10.1007/s42976-023-00478-z

Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals. *Curr Opin Plant Biol.* 2009a;12:178-184. doi 10.1016/j.pbi.2008.12.010

Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubcovsky J. Genetic and molecular characterization of the *Vrn2* loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol.* 2009b;149:245-257. doi 10.1104/pp.108.129353

Dong P., Wei Y.-M., Chen G.-Y., Li W., Wang J.-R., Nevo E., Zheng Y.-L. Sequence-related amplified polymorphism (*SRAP*) of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) in Israel and its ecological association. *Biochem Syst Ecol.* 2010;38(1):1-11. doi 10.1016/j.bse.2009.12.015

Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D., Valarik M., Sanchez A., Yan L. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *Vrn1* and *Vrn2*. *Plant Mol Biol.* 2006;60:469-480. doi 10.1007/s11103-005-4814-2

Feng K., Nie X., Cui L., Deng P., Wang M., Song W. Genome-wide identification and characterization of salinity stress-responsive miRNAs in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*). *Genes.* 2017;8:156. doi 10.3390/genes8060156

Flood R.G., Halloran G.M. Genetics and physiology of vernalization response in wheat. *Adv Agron*. 1986;39:87-125. doi 10.1016/S0065-2113(08)60466-6

Fu D., Szűcs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., Von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *Vrn1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics*. 2005;273:54-65. doi 10.1007/s00438-004-1095-4

Golovnina K.A., Kondratenko E., Blinov A.G., Goncharov N.P. Molecular characterization of vernalization loci *Vrn1* in wild and cultivated wheats. *BMC Plant Biol*. 2010;10:168. doi 10.1186/1471-2229-10-168

Goncharov N.P. Genetic resources of wheat related species: the *Vrn* genes controlling growth habit (spring *vs*. winter). *Euphytica*. 1998; 100:371-376. doi 10.1023/A:1018323600077

Goncharov N.P. Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature. *Cereal Res Commun*. 2004a;32:323-330. doi 10.1007/BF03543317

Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs. winter) in tetraploid wheats: production and analysis of near-isogenic lines. *Hereditas*. 2004b;130:125-130. doi 10.1111/j.1601-5223.1999.00125.x

Grogan S.M., Brown-Guedira G., Haley S.D., McMaster G.S., Reid S.D., Smith J., Byrne P.F. Allelic variation in developmental genes and effects on winter wheat heading date in the U.S. great plains. *PLoS One*. 2016;11:e0152852. doi 10.1371/journal.pone.0152852

Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis E.S., Trevaskis B. Low-temperature and daylength cues are integrated to regulate *FLOWERING LOCUS T* in barley. *Plant Physiol*. 2008;147:355-366. doi 10.1104/pp.108.116418

Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. *Euphytica*. 2014; 197:1-26. doi 10.1007/s10681-014-1075-7

Kato K., Mori Y., Beiles A., Nevo E. Geographical variation in heading traits in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. I. Variation in vernalization response and ecological differentiation. *Theor Appl Genet*. 1997;95:546-552. doi 10.1007/s001220050595

Kato K., Tanizoe C., Beiles A., Nevo E. Geographical variation in heading traits in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. II. Variation in heading date and adaptation to diverse ecogeographical conditions. *Hereditas*. 1998;128(1):33-39. doi 10.1111/j.1601-5223.1998.00033.x

Kippes N., Zhu J., Chen A., Vanzetti L., Lukaszewski A., Nishida H., Kato K., Dvorak J., Dubcovsky J. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *Vrn-D4* in hexaploid wheat. *Mol Gen Genomics*. 2014;289:47-62. doi 10.1007/s00438-013-0788-y

Kippes N., Debernardi J.M., Vasquez-Gross H.A., Akpinar B.A., Budak H., Kato K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of the *Vernalization 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(39):E5401-E5410. doi 10.1073/pnas.151488311

Kippes N., Chen A., Zhang X., Lukaszewski A.J., Dubcovsky J. Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with no functional *Vrn2* genes. *Theor Appl Genet*. 2016;129:1417-1428. doi 10.1007/s00122-016-2713-3

Kiss T., Horváth Á.D., Cseh A., Berki Z., Balla K., Karsai I. Molecular genetic regulation of the vegetative–generative transition in wheat from an environmental perspective. *Ann Bot*. 2025;135(4):605-628. doi 10.1093/aob/mcae174

Konopatskaia I., Vavilova V., Kondratenko E.Ya., Blinov A., Goncharov N.P. *Vrn1* genes variability in tetraploid wheat species with a spring growth habit. *BMC Plant Biol*. 2016;16:244. doi 10.1186/s12870-016-0924-z

Lack H.W., Van Slageren M. The discovery, typification and rediscovery of wild emmer wheat, *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* (Poaceae). *Willdenowia*. 2020;50(2):207-216. doi 10.3372/wi.50.50206

Law C.N., Worland A.J. Genetic analysis of some flowering time and adaptive traits in wheat. *New Phytol*. 1997;137(1):19-28. doi 10.1046/j.1469-8137.1997.00814.x

Liang Y., Zhang D.-Y., Ouyang S., Xie J., Wu Q., Wang Z., Cui Y., … Dvorak J., Huo N., Sun Q., Gu Y.-Q., Liu Z. Dynamic evolution of resistance gene analogs in the orthologous genomic regions of powdery mildew resistance gene *MlIW170* in *Triticum dicoccoides* and *Aegilops tauschii*. *Theor Appl Genet*. 2015;128:1617-1629. doi 10.1007/s00122-015-2536-7

Muterko A., Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMC Plant Biol*. 2016;16(Suppl.1):9. doi 10.1186/s12870-015-0691-2

Nevo E. Genetic resources of wild emmer, *Triticum dicoccoides*, for wheat improvement in the third millennium. *Isr J Plant Sci*. 2001; 49(1):77-92. doi 10.1560/XJQN-9T4H-VTL3-CDXU

Novoselskaya-Dragovich A.Yu., Fisenko A.V., Konovalov F.A., Lyapunova O.A., Kudryavtsev A.M., Badaeva E.D., Goncharov N.P. Assessment of genetic diversity of tetraploid wheat *Triticum dicoc-*

cum Schrank ex Schübl. based on long terminal repeat (LTR) retrotransposon integration sites and C-banding analysis. *Genet Resour Crop Evol*. 2025;72:8819-8839. doi 10.1007/s10722-025-02487-9

Ouyang S., Zhang D., Han J., Zhao X., Cui Y., Song W., Huo N., … Ling H.-Q., Luo M., Gu Y., Sun Q., Liu Z. Fine physical and genetic mapping of powdery mildew resistance gene *MlIW172* originating from wild emmer (*Triticum dicoccoides*). *PLoS One*. 2014;9: e100160. doi 10.1371/journal.pone.0100160

Özkan H., Willcox G., Graner A., Salamini F., Kilian B. Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Genet Resour Crop Evol*. 2011;58:11-53. doi 10.1007/s10722-010-9581-5

Palomino C., Cabrera A. Evaluation of the allelic variations in vernalisation (*Vrn1*) and photoperiod (*PPD1*) genes and genetic diversity in a spanish spelt wheat collection. *Int J Mol Sci.* 2023;24:16041. doi 10.3390/ijms242216041

Plotnikov K.O., Klimenko A.I., Ovchinnikova E.S., Lashin S.A., Goncharov N.P. Analysis of the effects of the *Vrn1* and *Ppd-1* alleles on adaptive and agronomic traits in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants*. 2024;13:1453. doi 10.3390/plants13111453

Qiu L., Liu N., Wang H., Shi X., Li F., Zhang Q., Wang W., Guo W., Hu Z., Li H., Ma J., Sun Q., Xie C. Fine mapping of a powdery mildew resistance gene *MlIW39* derived from wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*). *Theor Appl Genet*. 2021;134: 2469-2479. doi 10.1007/s00122-021-03836-9

Rivera D., Ferrer-Gallego P., Obón C., Alcaraz F., Laguna E., Goncharov N.P., Kislev M. Fossil or non-fossil: a case study in the archaeological wheat *Triticum parvicoccum* (Poaceae: Triticeae). *Genes*. 2025;16(3):274. doi 10.3390/genes16030274

Rohlf F.J., Corti M. Use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Syst Biol*. 2000;49:740-753. doi 10.1080/10635150075004980 6

Royo C., Dreisigacker S., Soriano J.M., Lopes M.S., Ammar K., Villegas D. Allelic variation at the vernalization response (*Vrn-1*) and photoperiod sensitivity (*Ppd-1*) genes and their association with the development of durum wheat landraces and modern cultivars. *Front Plant Sci*. 2020;11:838. doi 10.3389/fpls.2020.00838

Saidou M., Wang C., Alam Md.A., Chen C., Ji W. Genetic analysis of powdery mildew resistance gene using SSR markers in common wheat originated from wild emmer (*Triticum dicoccoides* Thell). *Turkish J Field Crops*. 2015;21:10. doi 10.17557/tjfc.83589

Sela H., Ezrati S., Ben-Yehuda P., Manisterski J., Akhunov E., Dvorak J., Breiman A., Korol A. Linkage disequilibrium and association analysis of stripe rust resistance in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) population in Israel. *Theor Appl Genet*. 2014;127:2453-2463. doi 10.1007/s00122-014-2389-5

Shcherban A., Salina E.A. Evolution of *Vrn1* homoeologous loci in allopolyploids of *Triticum* and their diploid precursors. *BMC Plant Biol*. 2017;17:188. doi 10.1186/s12870-017-1129-9

Shcherban A., Emtseva M., Efremova T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions. *Cereal Res Commun*. 2012a;40:351-361. doi 10.1556/CRC.40.2012.3.4

Shcherban A., Efremova T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Mol Breed*. 2012b;29:675-685. doi 10.1007/s11032-011-9581-y

Shcherban A., Khlestkina E., Efremova T., Salina E.A. The effect of two differentially expressed wheat *Vrn-B1* alleles on the heading time is associated with structural variation in the first intron. *Genetica*. 2013;141(4-6):133-141. doi 10.1007/s10709-013-9712-y

Shcherban A., Börner A., Salina E.A. Effect of *Vrn-1* and *Ppd D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. *Plant Breed*. 2015a;134(1):49-55. doi 10.1111/pbr.12223

Shcherban A., Strygina K., Salina E.A. *Vrn-1* gene-associated prerequisites of spring growth habit in wild tetraploid wheat *T. dicoccoides* and the diploid A genome species. *BMC Plant Biol*. 2015b;15:94. doi 10.1186/s12870-015-0473-x

Soresi D., Zappacosta D., Garayalde A., Irigoyen I., Basualdo J., Carrera A. A valuable QTL for Fusarium head blight resistance from *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccoides* has a stable expression in durum wheat cultivars. *Cereal Res Commun*. 2017;45:234-247. doi 10.1556/0806.45.2017.007

Soresi D., Bagnaresi P., Crescente J.M., Díaz M., Cattivelli L., Vanzetti L., Carrera A. Genetic characterization of a fusarium head blight resistance QTL from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Plant Mol Biol Rep*. 2021;39:710-726. doi 10.1007/s11105-020-01277-0

Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat. *Euphytica*. 1998;100(1-3):359-369. doi 10.1023/A:1018374116006

Strejčková B., Mazzucotelli E., Čegan R., Milec Z., Brus J., Çakır E., Mastrangelo A.M., Özkan H., Šafář J. Wild emmer wheat, the progenitor of modern bread wheat, exhibits great diversity in the *Vernalization1* gene. *Front Plant Sci*. 2023;13:1106164. doi 10.3389/fpls.2022.1106164

Takumi S., Koyama K., Fujiwara K., Kobayashi F. Identification of a large deletion in the first intron of the *Vrn-D1* locus, associated with loss of vernalization requirement in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss. *Genes Genet Syst*. 2011;86:183-195. doi 10.1266/ggs.86.183

Trevaskis B., Hemming M.N., Dennis E.S., Peacock W.J. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci*. 2007;12:352-357. doi 10.1016/j.tplants.2007.06.010

Würschum T., Langer S.M., Longin C.F.H., Tucker M.R., Leiser W.L. A three component system incorporating *Ppd-D1*, copy number variation at *Ppd-B1*, and numerous small effect quantitative trait loci facilitates adaptation of heading time in winter wheat cultivars of worldwide origin. *Plant Cell Environ*. 2018;41:1407-1416. doi 10.1111/pce.13167

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;124:1549-1560. doi 10.1007/s00122-012-1809-7

Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *Vrn1*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6263-6268. doi 10.1073/pnas.0937399100

Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *Vrn1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet*. 2004a;109:1677-1686. doi 10.1007/s00122-004-1796-4

Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J. The wheat *Vrn2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*. 2004b;303:1640-1644. doi 10.1126/science.1094305

Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *Vrn3* is an orthologue of FT. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:19581-19586. doi 10.1073/pnas.060714210

Zhang B., Guo Y., Fan Q., Li R., Chen D., Zhang X. Characterization and distribution of novel alleles of the vernalization gene *Vrn-A1* in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Crop J*. 2023;11:852-862. doi 10.1016/j.cj.2022.10.002

Zhang H., Zhang L., Wang C., Wang Y., Zhou X., Lv S., Liu X., Kang Z., Ji W. Molecular mapping and marker development for the *Triticum dicoccoides* – derived stripe rust resistance gene *YrSM139-1B* in bread wheat cv. Shaanmai 139. *Theor Appl Genet*. 2016;129:369-376. doi 10.1007/s00122-015-2633-7

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.04.2025. После доработки 22.07.2025. Принята к публикации 23.07.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1288-1294

doi 10.18699/vjgb-25-135

Frame-based mathematical models – a tool for the study of molecular genetic systems

F.V. Kazantsev [1, 2, 3], S.A. Lashin [1, 2, 3], Yu.G. Matushkin [1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
kazfdr@bionet.nsc.ru

Abstract. This paper reviews existing approaches for reconstructing frame-based mathematical models of molecular genetic systems from the level of genetic synthesis to models of metabolic networks. A frame-based mathematical model is a model in which the following terms are specified: formal structure, type of mathematical model for a particular biochemical process, reactants and their roles. Typically, such models are generated automatically on the basis of description of biological processes in terms of domain-specific languages. For molecular genetic systems, these languages use constructions familiar to a wide range of biologists in the form of a list of biochemical reactions. They rely on the concepts of elementary subsystems, where complex models are assembled from small block units ("frames"). In this paper, we have shown an example with the generation of a classical repressilator model consisting of three genes that mutually inhibit each other's synthesis. We have given it in three different versions of the graphic standard, its characteristic mathematical interpretation and variants of its numerical calculation. We have shown that even at the level of frame models it is possible to identify qualitatively new behaviour of the model through the introduction of just one gene into the model structure. This change provides a way to control the modes of behaviour of the model through changing the concentrations of reactants. The frame-based approach opens the way to generate models of cells, tissues, organs, organisms and communities through frame-based model generation tools that specify structure, roles of modelled reactants using domain-specific languages and graphical methods of model specification.

Key words: Hill functions; mathematical modelling; gene networks; frame-based models; domain-specific languages

For citation: Kazantsev F.V., Lashin S.A., Matushkin Yu.G. Frame-based mathematical models – a tool for the study of molecular genetic systems. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1288-1294. doi 10.18699/vjgb-25-135

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific-technical programme for genetic technologies development for 2019–2030, agreement No. 075-15-2025-516).

Фреймовые математические модели – инструмент исследования молекулярно-генетических систем

Ф.В. Казанцев [1, 2, 3], С.А. Лашин [1, 2, 3], Ю.Г. Матушкин [1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
[3] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
kazfdr@bionet.nsc.ru

Аннотация. Представлен обзор подходов реконструкции фреймовых математических моделей молекулярно-генетических систем от уровня генетического синтеза до метаболических сетей. Фреймовые математические модели – это модели, в которых заданы: формальная структура, математический формализм под конкретный биохимический процесс, реагенты этого процесса и их роль в нем. Обычно такие модели созданы в автоматическом режиме на базе описания биологического процесса в терминах языков предметной области. Для молекулярно-генетических систем такие языки используют конструкции, привычные для широкого круга исследователей-биологов, например список биохимических реакций. Они основываются на концепции элементарных подсистем, где комплексная модель собрана из небольших блоков – «фреймов». В настоящей работе мы показали пример с генерацией классической модели репрессилятора, состоящей из трех генов, продукты синтеза которых последовательно ингибируют биосинтез друг друга. Для этого примера мы привели три версии графической нотации описания структуры модели, их типичную математическую интерпретацию

© Kazantsev F.V., Lashin S.A., Matushkin Yu.G., 2025
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

и варианты вычислительных экспериментов. Показали, что даже на уровне фреймовых моделей возможно идентифицировать качественно новое поведение благодаря добавлению в структуру модели всего одного гена. Такая модификация предоставляет пути контроля режимами функционирования модели через изменение концентраций ее реагентов. Подход, основанный на фреймах, открывает пути генерации моделей клеток, тканей, органов, организмов и сообществ с помощью программных инструментов, которые формализуют структуру модели и роль ее реагентов, используя как предметно-ориентированные языки, так и графические методы спецификации моделей.
Ключевые слова: функции Хилла; математическое моделирование; генные сети; фреймовые модели; предметно-ориентированные языки спецификации модели

Introduction

In the era of accumulation of large genetic data, the question of high-throughput analysis of these data using methods of mathematical and computer modelling has arisen. The last 30 years of scientific experience have prepared the theoretical basis for computational analysis tasks. The mechanisms of biochemical catalysis were studied, the rates of biochemical processes were estimated, and the scenarios of transcriptional synthesis and the influence of external factors were examined (Alon, 2007; Wittig et al., 2018; Kolmykov et al., 2021; Vorontsov et al., 2024; Rigden, Fernández, 2025). A mathematical foundation has been prepared, which, together with the development of experimental and computational technologies, has set the trend for the transition from small models of enzymatic kinetics to full-genome models of bacterial (Karr et al., 2014) and animal cells (Norsigian et al., 2019). Existing approaches rely on the concepts of elementary subsystems, where complex models are assembled from small block units. The rejection of "monolithic" models in a single mathematical formalism (e. g. the ODE system) in favour of representing and storing models as a set of model units has set the direction for the integration of multiple tools through standards. These model units carry structural information about the role of each reactant and the mathematical interpretation of the biological process (Malik-Sheriff et al., 2019). This tremendous amount of knowledge allows to pass through ordering of information to the formalization of models, that is, the ability to propose a formal structure and type of mathematical model for a specific biochemical process with known reactants – a *frame model*. If we can offer a formal algorithm for translating knowledge into a model, then the way of setting the initial configuration can be left as usual for scientists – through a domain-specific language to describe the model.

What are frame models?

Frame-based mathematical models in the field of molecular genetic systems (MGS) modelling are most often understood as models that have been made using domain-specific model description languages (DSL) and tools for model generation on their basis. For MGS, such languages use constructions familiar to a wide range of biologists in the form of a list of biochemical reactions, for example (Shapiro et al., 2003, 2013; Hoops et al., 2006). This way allows one to set the reactants of biochemical processes and their roles. It is the information about the role of reactants that is the necessary element for algorithms of frame models construction, crucial parameters for formal generation rules. Moreover, the mathematical formalism may differ depending on the problem to be solved. These can be likened to models in the form of ODE system, discrete models or based on Boolean logic (Beal et al., 2011; Galdzicki et al., 2014).

In this paper, we review approaches for describing models that consider only the levels of transcription, translation, enzymatic synthesis, signaling networks and metabolic pathways. This limitation reveals the structure and hierarchical arrangement of such models, from the basic processes of synthesis to the arrangement of everything into a system of interacting metabolic pathways. Within the framework of building such MGS models, the bottom-up approach is natural – when one moves from models of simple processes to their combination, obtaining a synergistic/emergent effect (Kolodkin et al., 2012, 2013). This process of increasing the model complexity resembles a design based on the principle of staking "domino tiles" by the rule of reactants overlapping.

In addition to domain specific languages, the process of designing frame models can be started from a structural model/schema/graph of interacting entities with specified roles of participants. Such a graphical way of specifying the reactants and their roles for modelling is more illustrative and allows the use of additional analysis tools in case of working with a big amount of data. These graphs are the input markup for the frame model generation stage. In general, it is possible to unambiguously switch from representing the role of reactants from a list of biochemical reactions to a graph representation and vice versa. There are several standards for the presentation of structural information: SBML (Hucka et al., 2015), SBGN (Moodie et al., 2015), SBOL (Galdzicki et al., 2014).

Basic theorems underlying the approaches

Some theoretical issues concerning the integration of frame models are worth clarifying first. The simple frame models of MGS are built on the basis of chemical kinetics equations representing various ways of the kinetic mass action law. The construction is carried out within the paradigm of local independence of functional properties of elementary subsystems from their compartmental localization within the original system. If a particular structural model or reactions scheme is available, the instantaneous concentration rate of any substance is equal to the sum of the local concentration rates of that substance for each reaction in which that substance participates as a substrate or product. The theoretical basis for this is Korzukhin's theorem, which is crucial for modelling chemical kinetics and states: "For any set of non-negative curves given on a finite time interval and any given accuracy, there exists such (there may be more than one) biochemical scheme composed only of bimolecular and monomolecular reactions that the mathematical model constructed from this biochemical scheme approximates the given set of curves

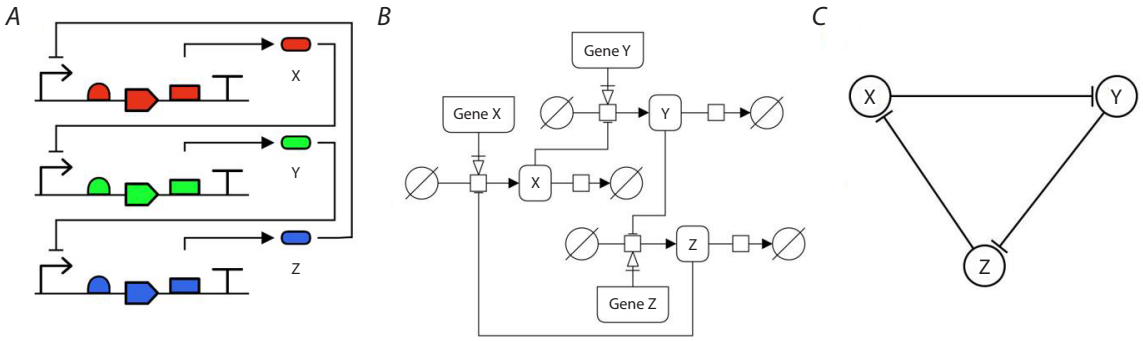


Fig. 1. Graphical representation of the repressilator model in different standards: *A*, SBOL notation describes in detail the arrangement/structure of a DNA molecule and the functional relationship between the elements. *B*, SBGN notation carries more information about the processes that compose the model. *C*, Notation of protein-protein regulatory interactions, specific for describing Hypothetical Gene Networks (omits many details of the mechanisms).

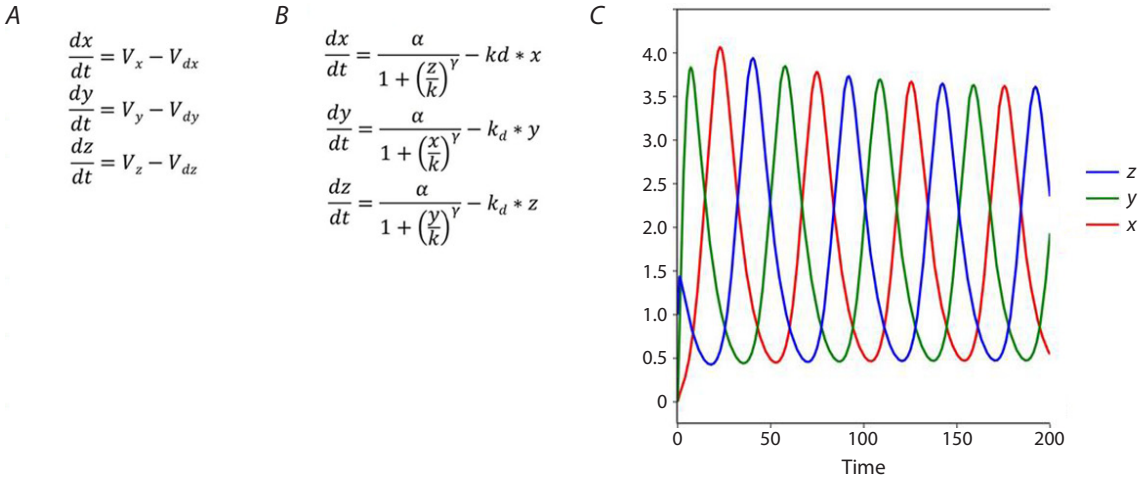


Fig. 2. Generalized view of the frame mathematical model and characteristic plots of concentration variation with time obtained for the structure from Figure 1.

A, Model representation as combination of elementary subsystems. V_i – as synthesis processes, V_{di} – as dissipation processes. *B*, The model ODE system description. *C*, The dynamics is obtained with parameters $\gamma > 2$, $\alpha = 1$, $k = 0.5$, $k_d = 0.1$ and initial point $x_0 = y_0 = 0$, $z_0 = 1.0$.

with a given accuracy" (Zhabotinsky, Zaikin, 1973). The extension of these ideas is formulated in the framework of the generalised chemical kinetic modelling method (GCKMM), proposed by Vitaly Likhoshvay (Likhoshvai et al., 2001). Some examples of this approach are presented below.

Frame model examples

Processes of genetic synthesis – transcription, translation

When designing frame models at the level of genetic synthesis, it is necessary to set the process structure and roles of the reactants in the process. These reactants are genes and transcription factors. An interesting approach to describe the genetic level is the SBOL approach (Galdzicki et al., 2014) (The Synthetic Biology Open Language, sbolstandard.org). It allows describing the structure of a DNA molecule with the location of genes, binding sites of transcription factors, regulatory relations of synthesis products from genes and some other properties. It is possible to describe them both in text form using a domain-specific modelling language or in a graph form using a special graphical editor (Der et al., 2017; Cox et al., 2018). There is a set of tools for working with this standard and tools for graphical interpretation of such models (Fig. 1*A*).

For further presentation a demonstration of a well-known three-genes model is given, each of them inhibits synthesis from a neighboring gene – a repressilator (Elowitz, Leibler, 2000). Figure 1 shows a possible graphical interpretation of such a model under various types of representation.

Once the structure of relations between molecules is given, it is possible to build a "frame mathematical model" describing the dynamics of the process. The role of the element allows one to understand at a glance the contribution of the selected subsystem and its negative/positive effect in the overall system of equations (Fig. 2*A*). For this purpose, we can use approaches that are described in such tools as SBMLSqeezer (Dräger et al., 2015), MGSgenerator (Kazantsev et al., 2009), MicroTranscriptMod (Lakhova et al., 2022). These tools, given the role of each of the reactants in the process, generate equations for the rate of product synthesis (Fig. 2*B*). The more details on the role of the reactants are described, the more precisely

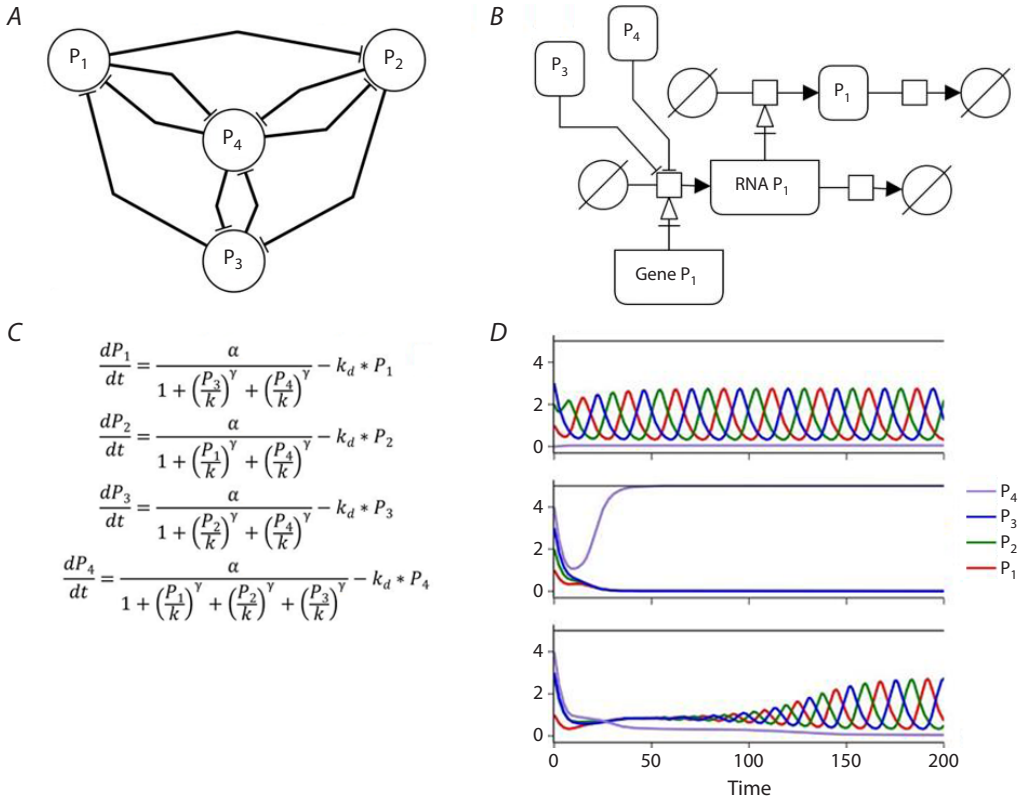


Fig. 3. A four-node model of hypothetical gene network (HGS) and its characteristic behavior. *A*, Structural model, where arcs define the conditions of biosynthesis inhibition. *B*, An extended description of the processes behind each of the HGS nodes in SBGN standard. *C*, Model equations that correspond to the structure. *D*, Characteristic plots of concentration *vs* time obtained for the presented structure from Figure *A*.

The dynamics are obtained at parameters $\gamma = 3$, $\alpha = 1$, kb = 0.5, $k_d = 0.2$ and starting points [P_1, P_2, P_3, P_4]: (1) [1.0, 2.0, 3.0, 0.0]; (2) [1.0, 2.0, 3.0, 4.0]; (3) [1.0, 2.8, 3.0, 4.0].

their behavior can be specified in the model. At the stage of computational experiments, all such tools combine elementary subsystems (separate processes) into one unifying structure, the one common model. The typical view of the mathematical model and its dynamics for each of the structures presented in Figure 1 will look as it is shown in Figure 2.

Hypothetical gene networks

A model does not often require excessive detail. There is a class of models where the relationship of genes and their synthesis products with other genes is modelled. The structural model is represented by a unipartite graph, where each node represents both the process of transcription of the coding part of a gene and translation of its mRNA (or synthesis of its protein) (Fig. 1*C*, Fig. 3). A graph node is considered as a unified transcription-translation process. Directed arcs (arrows) in such a graph define an inhibiting or activating effect on another node (on itself is also allowed). This class of models is named Hypothetical Gene Network (HGN) (Likhoshvai et al., 2003).

Hypothetical gene networks with cyclic inhibitory effects of reactants (which are specified with the relationships: "protein P_i inhibits the synthesis of product P_j from gene g_j", see Figure 3) are exhaustively described in (Fadeev, Likhoshvai, 2003). Each edge in a graph representation of such models affects the generalized transcription/translation process of the node to which it is directed. Moreover, when generating ODE models for these graphs, a third process – decay of the synthesis product – is added to the mentioned processes. A node in such graphs is understood as follows: "An RNA molecule r_i is synthesised from the gene g_i, from which a P_i protein is synthesised and this protein is degraded/dissociated over time". Figure 3*A* shows an example of an HGS model of four nodes and nine edges specifying the conditions of biosynthesis inhibition. The structure is obtained by inserting one additional node into the model shown in Figure 1. The additional node inhibits the others, and they in turn inhibit it. The resulting mathematical model is presented in Figure 3*C*. While the model presented in Figure 1 has one unstable steady-state condition and stable oscillatory behaviour under parameters presented in Figure 2, the introduction of an additional node allows the behaviour of the model to change depending on the concentration of reactants (Figure 3*D*): at low initial concentrations of P_4 the system oscillates stably as the initial model, and at sufficiently high concentrations of P_4 it enters the stationary regime. Moreover, regime switching can be controlled by small changes in concentrations. Changing the regulation mechanism to non-competitive does not change the regimes of the model behavior. The model found in Supplementary Materials[1] as a Copasi file is a model version with the non-competitive regulation mechanism in it.

[1] Supplementary Materials are available at:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx50.zip

Studying such a class of models and forming a knowledge base of their dynamics allows us to identify possible behavior at the level of structural models of target biological systems without performing calculations.

Enzymatic reaction

For enzymatic synthesis processes, the key aspect is the presence of an enzyme, which catalyzes the process but is not consumed in the course of the reaction. To reconstruct a model of enzymatic reactions, the reaction mechanisms, the order of interaction of molecular players of the reaction with the enzyme, the steps of transformation and release of the product should be taken into account. Once one has an assumption about the mechanisms of the enzyme's relationships with substrates and products, a suitable form of representing these interactions as a graph may be suggested. There are a number of works in this area. One can use ready-made solutions for building frame models of enzymatic reactions on graphs (King, Altman, 1956; Cornish-Bowden, 1977) (www.biokin.com/tools/king-altman/). In addition, the Copasi tool has a set of predefined frame-based mathematical models for enzymatic systems (Hoops et al., 2006). These models may not only be used as examples in a case study, but also be valuable in developing and analyzing a model within the Copasi toolkit: design a set of elementary subsystems (model structure); give them a mathematical law of velocity based on frame models; get a ready system of equations; perform computational experiments in both continuous and discrete stochastic formalisms; perform computational analyses of the model to fit the parameters to the experimental data and test the robustness of the model to variation of the parameters.

SBMLsqeezer can serve as an independent source of frame models (Dräger et al., 2015). It is both a database of ready-made model variants and a tool that can match a well-annotated structure in the form of an SBML model to a suitable model variant. This tool can be embedded into the CellDesigner application (Funahashi et al., 2008). There is a ready set of equations adapted to experimental data for both enzymatic reactions and transcription-translation processes in the bacterium *E. coli* (Kazantsev et al., 2018). These models may serve as a training sample because they contain accompanying information about the data items on which the models were built.

Metabolic pathways

Frame models of metabolic pathways can also be derived from structural information in the form of graphs. It is possible to build a model through descriptions of reactions in tabular form with COBRApy (Ebrahim et al., 2013) and BIOUML (Kolpakov et al., 2022). These tools allow the construction of a whole-genome model in terms of flux balance modelling (Orth et al., 2010). But if one needs to work within continuous models, the Path2Models project (Büchel et al., 2013) may be used, in which 140,000 frame models were generated based on structural models from the KEGG database (Kanehisa, 2000). These models are available at the biomodels.net resource (Malik-Sheriff et al., 2019). This kind of automation in model building is also available as part of the Cellerator package for the Mathematica modelling environment (Shapiro et al., 2003, 2013).

Signalling pathways

Signalling pathways require different approaches. Within such pathways, it is necessary to take into account the change of states of one molecule and/or the formation of molecular complexes, the change of conformational states, the consideration of active centres of molecules, etc. For automating the generation of these types models, the BioNetGen resource is being developed (bionetgen.org) (Harris et al., 2016). The key feature is that a series of allowed states of molecules is described, their active centres, and the rules of interaction through the active centres. These data are specified within a domain specific language. The visualization of this kind of relationship is specified within the "SBGN:entity relations" standard (sbgn.github.io). In order to try these models, one can use the VScode development environment module (code.visualstudio.com). BioNetGen algorithms build reaction chains themselves (structural models) and propose frame models for them in the widely used SBML standard. Then one can run a series of computational experiments using both discrete methods and continuous methods in several specialized computational tools that support SBML models as input data.

Designing and depositing of the model

When designing models using automation and autogeneration, one faces the problem of identifying the right entity in the lists of variables and parameters. If the model is formatted as a monolithic system of differential equations within the particular syntax in one of the engineering modelling environments, one has to map each of the x_i of the model to the proper biology entity through reading the accompanying publications. At best, authors will name variables as short acronyms for proteins or metabolites. On the other hand, it is more difficult to come up with some general rule for naming parameters correctly. It was the transition to the representation of MGS models as a set of elementary subsystems corresponding to an independent biochemical process that allowed to solve most of the mentioned issues (Miller et al., 2010; Hucka et al., 2015). In this concept, a model is not a set of equations, but an instruction on how to assemble a target model in the target mathematical formalism from tens, hundreds and thousands of pieces of elementary subsystems distributed over compartments and perform a series of computational experiments with it. In order to end up with a development-friendly model, it is better to follow a series of recommendations for the design of such elementary blocks using the systems biology ontology (SBO) (Courtot et al., 2011). This ontology allows to associate the rate equations of processes and the parameters of these equations with the meanings that were given in classical studies.

The problem of model annotation is well highlighted in a publication on the model reproducibility crisis (Tiwari et al., 2021), where the authors showed that 51 % of mathematical models published on the largest online resource (biomodels.net) are not reproducible, for various reasons. It is the frame models that partially solve the issue of both *repeatability* of computational experiments and *reproducibility* of modelling results, as the relevant toolkits contain references to the formalism, to the methods used and correctly describe the parameters with the use of ontologies. All of those questions are studied in depth due to community efforts. One of such

communities is “co.mbine.org”, an initiative to coordinate the development of various standards and formats for computational models in systems biology.

Discussion

Advancement of technology has given impulse to the processes of development of artificial languages for describing models within scientific fields. We have reviewed existing solutions for designing frame-based mathematical models of molecular genetic systems. For each of them there are specific tools for representing models and performing computational experiments. The publication (Tiwari et al., 2021) proposed metrics for evaluating the resulting models in terms of readiness for reuse in new research. If one follows the proposed guidelines for incorporating annotations into a model that can be made available to modelling tools, it will enhance the possibilities of automating model processing. Model automation is an interesting route with the goal of being able to integrate off-the-shelf subsystems into comprehensive cellular, intercellular and organ level models. More and more software libraries for engineering simulation environments are becoming available where molecular genetic systems modelling approaches can already be used. Even in questions of designing industrial samples of bacterial synthesis, one comes to embrace standardization for the subsequent automation of processes. This applies to the issues of model development, their integration into the production biotechnological cycle and monitoring with updating of knowledge bases (Herold et al., 2017).

Whereas in the 2000s there were trends towards developing proprietary solutions that included a “friendly user interface”, now the trends tend towards the use of highly specialized core software for each of the stages and/or the use of specialized libraries via API calls: VScode as an editor for BioNetGen DSL; yEd or Cytoscape as tools for displaying model structure; Copasi as a general-purpose tool for computational experiments, etc.

Data analysis is also performed by general-purpose statistical processing libraries or off-the-shelf tools (dashboard) that only need to load data. Now a necessary skill for work in systems biology is proficiency in Python/R/Bash scripting languages for building pipelines and linking data between function calls of specific libraries.

References

Alon U. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet.* 2007;8(6):450-461. doi 10.1038/nrg2102

Beal J., Lu T., Weiss R. Automatic compilation from high-level biologically-oriented programming language to genetic regulatory networks. *PLoS One*. 2011;6(8):e22490. doi 10.1371/journal.pone.0022490

Büchel F., Rodriguez N., Swainston N., Wrzodek C., Czauderna T., Keller R., Mittag F., … Saez-Rodriguez J., Schreiber F., Laibe C., Dräger A., Le Novère N. Path2Models: large-scale generation of computational models from biochemical pathway maps. *BMC Syst Biol.* 2013;7:116. doi 10.1186/1752-0509-7-116

Cornish-Bowden A. An automatic method for deriving steady-state rate equations. *Biochem J.* 1977;165(1):55-59. doi 10.1042/bj1650055

Courtot M., Juty N., Knüpfer C., Waltemath D., Zhukova A., Dräger A., Dumontier M., … Wilkinson D.J., Wimalaratne S., Laibe C., Hucka M., Le Novère N. Controlled vocabularies and semantics in systems biology. *Mol Syst Biol.* 2011;7(1):543. doi 10.1038/msb.2011.77

Cox R.S., Madsen C., McLaughlin J., Nguyen T., Roehner N., Bartley B., Bhatia S., … Voigt C.A., Zundel Z., Myers C., Beal J., Wipat A. Synthetic Biology Open Language Visual (SBOL Visual). Version 2.0. *J Integr Bioinform.* 2018;15(1):20170074. doi 10.1515/jib-2017-0074

Der B.S., Glassey E., Bartley B.A., Enghuus C., Goodman D.B., Gordon D.B., Voigt C.A., Gorochowski T.E. DNAplotlib: programmable visualization of genetic designs and associated data. *ACS Synth Biol.* 2017;6(7):1115-1119. doi 10.1021/acssynbio.6b00252

Dräger A., Zielinski D.C., Keller R., Rall M., Eichner J., Palsson B.O., Zell A. SBMLsqueezer 2: context-sensitive creation of kinetic equations in biochemical networks. *BMC Syst Biol.* 2015;9(1):68. doi 10.1186/s12918-015-0212-9

Ebrahim A., Lerman J.A., Palsson B.O., Hyduke D.R. COBRApy: COnstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. *BMC Syst Biol.* 2013;7(1):74. doi 10.1186/1752-0509-7-74

Elowitz M.B., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*. 2000;403(6767):335-338. doi 10.1038/35002125

Fadeev S.I., Likhoshvai V.A. On hypothetical gene networks. *Sib Zh Ind Mat.* 2003;6(3):134-153

Funahashi A., Matsuoka Y., Jouraku A., Morohashi M., Kikuchi N., Kitano H. CellDesigner 3.5: a versatile modeling tool for biochemical networks. *Proc IEEE*. 2008;96(8):1254-1265. doi 10.1109/JPROC.2008.925458

Galdzicki M., Clancy K.P., Oberortner E., Pocock M., Quinn J.Y., Rodriguez C.A., Roehner N., … Villalobos A., Wipat A., Gennari J.H., Myers C.J., Sauro H.M. The Synthetic Biology Open Language (SBOL) provides a community standard for communicating designs in synthetic biology. *Nat Biotechnol.* 2014;32(6):545-550. doi 10.1038/nbt.2891

Harris L.A., Hogg J.S., Tapia J.-J., Sekar J.A.P., Gupta S., Korsunsky I., Arora A., Barua D., Sheehan R.P., Faeder J.R. BioNetGen 2.2: advances in rule-based modeling. *Bioinformatics*. 2016;32(21):3366-3368. doi 10.1093/bioinformatics/btw469

Herold S., Krämer D., Violet N., King R. Rapid process synthesis supported by a unified modular software framework. *Eng Life Sci.* 2017;17(11):1202-1214. doi 10.1002/elsc.201600020

Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. COPASI – a COmplex PAthway SImulator. *Bioinformatics*. 2006;22(24):3067-3074. doi 10.1093/bioinformatics/btl485

Hucka M., Bergmann F.T., Hoops S., Keating S.M., Sahle S., Schaff J.C., Smith L.P., Wilkinson D.J. The Systems Biology Markup Language (SBML): language specification for level 3 version 1 core. *J Integr Bioinform.* 2015;12(2):382-549. doi 10.2390/biecoll-jib-2015-266

Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27-30. doi 10.1093/nar/28.1.27

Karr J.R., Phillips N.C., Covert M.W. WholeCellSimDB: a hybrid relational/HDF database for whole-cell model predictions. *Database* (*Oxford*). 2014;2014:bau095. doi 10.1093/database/bau095

Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Bezmaternykh K.D., Likhoshvai V.A. The tool for automatic generation of gene networks mathematical models. *Vestnik VOGiS.* 2009;13(1):163-169

Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Lashin S.A., Ree N.A., Timonov V.S., Ratushnyi A.V., Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. MAMMOTh: a new database for curated mathematical models of biomolecular systems. *J Bioinform Comput Biol.* 2018;16(01):1740010. doi 10.1142/S0219720017400108

King E.L., Altman C. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions. *J Phys Chem*. 1956;60(10):1375-1378. doi 10.1021/j150544a010

Kolmykov S., Yevshin I., Kulyashov M., Sharipov R., Kondrakhin Y., Makeev V.J., Kulakovskiy I.V., Kel A., Kolpakov F. GTRD: an integrated view of transcription regulation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D104-D111. doi 10.1093/nar/gkaa1057

Kolodkin A., Simeonidis E., Balling R., Westerhoff H.V. Understanding complexity in neurodegenerative diseases: *in silico* reconstruc-

tion of emergence. *Front Physiol.* 2012;3:291. doi 10.3389/fphys.2012.00291

Kolodkin A., Simeonidis E., Westerhoff H.V. Computing life: add *logos* to biology and *bios* to physics. *Prog Biophys Mol Biol.* 2013;111(2-3):69-74. doi 10.1016/j.pbiomolbio.2012.10.003

Kolpakov F., Akberdin I., Kiselev I., Kolmykov S., Kondrakhin Y., Kulyashov M., Kutumova E., Pintus S., Ryabova A., Sharipov R., Yevshin I., Zhatchenko S., Kel A. BioUML – towards a universal research platform. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W124-W131. doi 10.1093/nar/gkac286

Lakhova T.N., Kazantsev F.V., Mukhin A.M., Kolchanov N.A., Matushkin Y.G., Lashin S.A. Algorithm for the reconstruction of mathematical frame models of bacterial transcription regulation. *Mathematics*. 2022;10(23):4480. doi 10.3390/math10234480

Likhoshvai V.A., Matushkin Y.G., Ratushnyi A.V., Anako E.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A. Generalized chemokinetic method for gene network simulation. *Mol Biol.* 2001;35(6):919-925. doi 10.1023/A:1013254822486

Likhoshvai V.A., Matushkin Y.G., Fadeev S.I. Problems in the theory of the functioning of genetic networks. *Sib Zh Ind Mat.* 2003;6(2):64-80

Malik-Sheriff R.S., Glont M., Nguyen T.V.N., Tiwari K., Roberts M.G., Xavier A., Vu M.T., … Park Y.M., Buso N., Rodriguez N., Hucka M., Hermjakob H. BioModels – 15 years of sharing computational models in life science. *Nucleic Acids Res.* 2019;48(D1):D407-D415. doi 10.1093/nar/gkz1055

Miller A.K., Marsh J., Reeve A., Garny A., Britten R., Halstead M., Cooper J., Nickerson D.P., Nielsen P.F. An overview of the CellML API and its implementation. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:178. doi 10.1186/1471-2105-11-178

Moodie S., Le Novère N., Demir E., Mi H., Villéger A. Systems Biology Graphical Notation: Process Description language level 1 version 1.3. *J Integr Bioinform.* 2015;12(2):263. doi 10.1515/jib-2015-263

Norsigian C.J., Pusarla N., McConn J.L., Yurkovich J.T., Dräger A., Palsson B.O., King Z. BiGG Models 2020: multi-strain genome-scale models and expansion across the phylogenetic tree. *Nucleic Acids Res.* 2019;48(D1):D402-D406. doi 10.1093/nar/gkz1054

Orth J.D., Thiele I., Palsson B.Ø. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol.* 2010;28(3):245-248. doi 10.1038/nbt.1614

Rigden D.J., Fernández X.M. The 2025 Nucleic Acids Research database issue and the online molecular biology database collection. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(D1):D1-D9. doi 10.1093/nar/gkae1220

Shapiro B.E., Levchenko A., Meyerowitz E.M., Wold B.J., Mjolsness E.D. Cellerator: extending a computer algebra system to include biochemical arrows for signal transduction simulations. *Bioinformatics*. 2003;19(5):677-678. doi 10.1093/bioinformatics/btg042

Shapiro B.E., Meyerowitz E.M., Mjolsness E. Using cellzilla for plant growth simulations at the cellular level. *Front Plant Sci.* 2013;4:408. doi 10.3389/fpls.2013.00408

Tiwari K., Kananathan S., Roberts M.G., Meyer J.P., Sharif Shohan M.U., Xavier A., Maire M., … Ng S., Nguyen T.V.N., Glont M., Hermjakob H., Malik-Sheriff R.S. Reproducibility in systems biology modelling. *Mol Syst Biol.* 2021;17(2):e9982. doi 10.15252/msb.20209982

Vorontsov I.E., Eliseeva I.A., Zinkevich A., Nikonov M., Abramov S., Boytsov A., Kamenets V., … Medvedeva Y.A., Jolma A., Kolpakov F., Makeev V.J., Kulakovskiy I.V. HOCOMOCO in 2024: a rebuild of the curated collection of binding models for human and mouse transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(D1):D154-D163. doi 10.1093/nar/gkad1077

Wittig U., Rey M., Weidemann A., Kania R., Müller W. SABIO-RK: an updated resource for manually curated biochemical reaction kinetics. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D656-D660. doi 10.1093/nar/gkx1065

Zhabotinsky A.M., Zaikin A.N. Autowave processes in a distributed chemical system. *J Theor Biol.* 1973;40(1):45-61. doi 10.1016/0022-5193(73)90164-1

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
Received June 17, 2025. Revised August 12, 2025. Accepted August 22, 2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1295-1303

doi 10.18699/vjgb-25-136

Компьютерное предсказание сети взаимодействий длинных некодирующих РНК и микроРНК кукурузы на основе транскриптома мутантной линии *fuzzy tassel*

Ц. Янь[1], А.Ю. Пронозин[2, 3], Д.А. Афонников[1, 2, 3]

[1] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
t.yan5@g.nsu.ru

Аннотация. Длинные некодирующие РНК (днРНК) играют важную роль в регуляции экспрессии генов, включая взаимодействия с микроРНК (миРНК), выполняя функцию молекулярных «губок». Для предсказания таких взаимодействий, как правило, применяются методы биоинформатики. Для уточнения предсказаний компьютерных программ можно использовать дополнительные данные на основе коэкспрессии миРНК и днРНК. В настоящей работе исследуются потенциальные взаимодействия между днРНК и миРНК у мутантной линии кукурузы *fuzzy tassel* (*fzt*), характеризующейся сниженной экспрессией некоторых миРНК вследствие мутации в гене *Dicer-like1* (*DCL1*) в тканях побега и соцветия. Проведена сборка транскриптомов на основе данных RNA-seq побега и соцветия кукурузы контрольной и мутантной линий. Данные были взяты из архива SRA NCBI. Для побега было идентифицировано десять днРНК, достоверно изменяющих свой уровень экспрессии между контрольной и мутантной группами, девять из них повышают экспрессию у мутантных растений. Для соцветия идентифицировано 34 дифференциально экспрессирующихся днРНК (20 с повышенным уровнем экспрессии у мутантных линий). Для днРНК с повышенным уровнем собственной экспрессии и миРНК с пониженным уровнем экспрессии в мутантных линиях были предсказаны потенциальные взаимодействия с помощью алгоритма машинного обучения PmliPred. С использованием программы IntaRNA подтверждена возможность комплементарного связывания для выявленных пар миРНК–днРНК, что позволило построить конкурирующие эндогенные РНК-сети. Анализ структуры этих сетей показал, что отдельные днРНК способны связывать несколько миРНК одновременно, подтверждая их регуляторную функцию в качестве «губок» для миРНК. Полученные результаты углубляют понимание посттранскрипционной регуляции у кукурузы и открывают перспективы для селекционных разработок, направленных на повышение стрессоустойчивости и продуктивности растений.

Ключевые слова: днРНК; миРНК; регуляция генов; кукуруза; мутация *fzt*; *DCL1*; биоинформатика; взаимодействие РНК; конкурирующие эндогенные РНК

Для цитирования: Янь Ц., Пронозин А.Ю., Афонников Д.А. Компьютерное предсказание сети взаимодействий длинных некодирующих РНК и микроРНК кукурузы на основе транскриптома мутантной линии *fuzzy tassel*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1295-1303. doi 10.18699/vjgb-25-136

Финансирование. Работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0020.

Благодарности. Обработка данных проводилась с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН.

Computational prediction of the interaction network between long non-coding RNAs and microRNAs in maize based on the transcriptome of the *fuzzy tassel* mutant line

J. Yan[1], A.Yu. Pronozin[2, 3], D.A. Afonnikov[1, 2, 3]

[1] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[3] Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
t.yan5@g.nsu.ru

Abstract. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play an important role in the regulation of gene expression, including interactions with microRNAs (miRNAs), acting as molecular "sponges". Bioinformatics methods are generally used to predict such interactions. To refine computational predictions, additional evidence based on the co-expression of miRNAs and lncRNAs can be incorporated. In the present study, we investigated potential interactions between lncRNAs and miRNAs in the maize mutant line *fuzzy tassel* (*fzt*), which is characterized by reduced expression of certain

© Янь Ц., Пронозин А.Ю., Афонников Д.А., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

miRNAs due to a mutation in the *Dicer-like1* (*DCL1*) gene in shoot and tassel tissues. Transcriptome assembly was performed based on RNA-seq data from maize shoot and tassel tissues of control and mutant lines, with data obtained from the NCBI SRA archive. In the shoot, 10 lncRNAs with significantly altered expression levels between control and mutant groups were identified, 9 of which were upregulated in the mutant plants. In the tassel, 34 differentially expressed lncRNAs were identified, with 20 showing increased expression in the mutant line. For lncRNAs with increased expression and miRNAs with decreased expression in the mutant line, potential interactions were predicted using the machine learning algorithm PmliPred. The IntaRNA program was used to confirm possible complementary binding for the identified miRNA–lncRNA pairs, which enabled the construction of competing endogenous RNA (ceRNA) networks. Structural analysis of these networks revealed that certain lncRNAs are capable of binding multiple miRNAs simultaneously, supporting their regulatory role as "sponges" for miRNAs. The results obtained deepen our understanding of post-transcriptional regulation in maize and open new perspectives for breeding strategies aimed at improving stress tolerance and crop productivity.

Key words: lncRNA; miRNA; gene regulation; maize; *fuzzy tassel* (*fzt*); *DCL1*; bioinformatics; RNA interaction; competing endogenous RNA (ceRNA)

For citation: J. Yan, Pronozin A.Yu., Afonnikov D.A. Computational prediction of the interaction network between long non-coding RNAs and microRNAs in maize based on the transcriptome of the *fuzzy tassel* mutant line. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1295-1303. doi 10.18699/vjgb-25-136

Введение

В последние годы благодаря быстрому развитию технологий высокопроизводительного секвенирования нового поколения стало возможным выявление десятков тысяч транскриптов, не кодирующих белки (Sheng et al., 2023). Первоначально такие последовательности считались шумом. Однако дальнейшие исследования показали, что около 75 % транскриптов в клетках не несут кодирующей функции, но при этом активно участвуют в регуляции экспрессии генов (Wang L., Wang J.W., 2015). Некодирующие РНК (нкРНК) принято классифицировать на служебные и регуляторные. В свою очередь, регуляторные нкРНК делятся на малые и длинные в зависимости от длины молекулы (Li R. et al., 2016). На сегодняшний день биологические функции малых нкРНК, в особенности микроРНК (миРНК), достаточно хорошо изучены, они способны ингибировать экспрессию мРНК на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Однако функции длинных некодирующих РНК (днРНК) остаются недостаточно изученными, особенно у растений.

В последние годы исследователи обнаружили, что между днРНК и миРНК существуют сложные взаимодействия, играющие ключевую роль во множестве биологических процессов. Выделяют несколько механизмов взаимодействия (Pronozin, Afonnikov, 2025). Например, днРНК может выступать в качестве молекулярных «губок», комплементарно связываясь с миРНК, предотвращая их взаимодействие с мРНК мишенями. Такие взаимодействия участвуют в регуляции роста, развития, дифференцировки тканей и ответов на стресс у растений. Однако в связи с ограниченностью масштабных биологических экспериментов существует потребность в применении биоинформатических методов для выявления таких взаимодействий (Sheng et al., 2023).

Разработанный на сегодняшний день метод PmliPred позволяет обнаружить взаимодействия между днРНК и миРНК (Kang et al., 2020). Данный метод основан на использовании глубокого обучения для прогнозирования взаимодействий между молекулами. Информация о потенциальных взаимодействиях между миРНК и днРНК может быть полезна для моделирования регуляторных сетей, участвующих в экспрессии генов. Также полученные результаты могут стать основой для дальнейших функциональных экспериментов и иметь прикладное значение в селекционной практике. Следует отметить, что информацию о потенциальных взаимодействиях миРНК и днРНК можно получить на базе анализа их коэкспрессии (He et al., 2020).

Настоящая работа направлена на идентификацию взаимодействий между днРНК и миРНК у кукурузы с применением биоинформатических подходов с учетом данных по коэкспрессии миРНК и днРНК. В качестве модели для изучения использована мутантная линия кукурузы *fuzzy tassel* (*fzt*), характеризующаяся нарушенным биогенезом миРНК вследствие мутации в гене *Dicer-like1* (*DCL1*), который играет ключевую роль в процессинге предшественников миРНК (Thompson et al., 2014). Нарушения в функции *DCL1* ведут к снижению уровня ряда зрелых миРНК, что, в свою очередь, вызывает дисбаланс в регуляторных взаимодействиях и, следовательно, экспрессии между миРНК и мРНК (Thompson et al., 2014). Мы предполагаем, что снижение концентрации миРНК может приводить к уменьшению образования пар с днРНК, являющимися для них «губками». В этом случае скорость деградации днРНК-«губок» будет снижаться, а концентрация их будет расти. Таким образом, мы считаем, что как и мРНК с повышенной экспрессией в линии кукурузы *fzt* (Thompson et al., 2014), так и днРНК с повышенным уровнем концентрации в этой линии могут быть мишенями этих миРНК. Полученные результаты позволят расширить наши представления о посттранскрипционной регуляции у растений и могут быть использованы для разработки новых селекционных стратегий, направленных на повышение стрессоустойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур (Zhang L. et al., 2009; Sun Q. et al., 2013).

Материалы и методы

Транскриптомные данные. В работе использовали данные RNA-seq из открытой базы данных NCBI SRA, GSM1277448–GSM1277461 (см. таблицу) (Thompson et al., 2014). Образцы делили на две группы: контрольную и мутантную. Мутантные линии содержали делецию в гене *Dicer-like1* (*DCL1*), который играл ключевую роль в

процессинге предшественников миРНК. Экспрессия оценивалась отдельно для тканей всего побега и соцветия как для длинных РНК, так и для миРНК.

Показано (Thompson et al., 2014), что у мутантных линий значимо снижена экспрессия 22 миРНК в побеге (miR398b-5p, miR408a-b-3p, miR408b-5p, miR394a-b-5p, miR167c-3p*, miR156a-3p*, miR167b-3p*, miR319b,d-5p*, miR169i-k-5p, miR167a-d-5p, miR168b-3p*, miR168a-3p*, miR156d-f-g-3p*, miR398a-b-3p, miR528a-b-3p, miR156e-3p*, miR397a-b-5p, miR159a-5p, miR2118b, miR399e,i-j-3p, miR160a-e,g-5p, miR398a-5p*) и 14 миРНК в соцветии (miR167d-3p*, miR167a-d-5p, miR172e, miR408a-b-3p, miR398b-5p*, miR394a-b-5p, miR167c-3p*, miR398a-b-3p, miR319a-d-3p, miR159a-b,f,j-k-3p, miR528a-b-5p, miR160a-e,g-5p, miR166j-k,n-3p, miR159a-5p*).

В качестве референсного генома использовали сборку кукурузы *Zea mays* версии 5 (Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0), загруженную вместе с аннотацией из базы данных Ensembl Plants (Bolser et al., 2017).

Последовательности миРНК были взяты из базы данных miRBase v. 22.1 (https://www.mirbase.org/).

Этапы биоинформатического анализа. Данная работа включала два основных блока биоинформатического анализа: сборку транскриптома с дальнейшим анализом дифференциальной экспрессии днРНК и анализ взаимодействий днРНК и миРНК с применением методов глубокого обучения. Более детальное описание каждого этапа приведено ниже.

Сборка и анализ транскриптома кукурузы. Сборка транскриптома (рис. 1) включала: предобработку данных, сборку транскриптома, выявление и аннотацию днРНК, а также оценку экспрессии транскриптов.

Фильтрацию прочтений производили с использованием программы Trimmomatic (Bolger et al., 2014) с применением следующих параметров: удаление адаптеров, удаление коротких прочтений длиной менее 36 нуклеотидов, а также фильтрацией по качеству прочтений. После предварительной обработки прочтения выравнивали на геном кукурузы с помощью программы STAR (Dobin et al., 2013). На основе полученных результатов картирования осуществляли сборку транскриптома с применением программы StringTie (Pertea et al., 2015). Для оценки качества собранного транскриптома использовали программу BUSCO (Simão et al., 2015). Для выявления и аннотации днРНК применяли программу ICAnnoLncRNA (Pronozin, Afonnikov, 2023). Расчет уровня экспрессии для найденных днРНК и других транскриптов производили с помощью программы Kallisto (Bray et al., 2016).

Библиотеки RNA-seq кукурузы (*Z. mays*), полученные из тканей побега и соцветия для контрольных растений и мутантной линии *fuzzy tassel* (*fzt*)

Идентификатор SRA	Название библиотеки	Источник РНК	Тип растения
GSM1277448	A619_mRNA_1	Побег	Контроль
GSM1277449	A619_mRNA_2		
GSM1277450	A619_mRNA_4		
GSM1277451	A619_mRNA_5		
GSM1277452	fzt_mRNA_1		Мутант
GSM1277453	fzt_mRNA_2		
GSM1277454	fzt_mRNA_4		
GSM1277455	fzt_mRNA_5		
GSM1277456	1Tm_Nsib	Соцветие	Контроль
GSM1277457	2Tm_Nsib		
GSM1277458	3Tm_Nsib		
GSM1277459	1Tm_fzt		Мутант
GSM1277460	2Tm_fzt		
GSM1277461	3Tm_fzt		

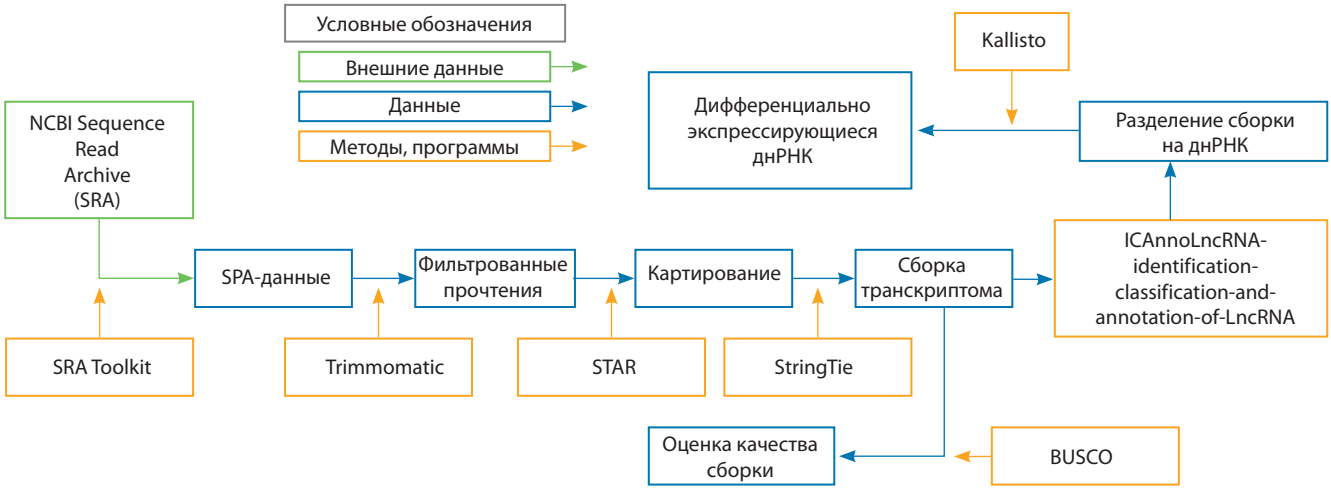


Рис. 1. Этапы биоинформатического конвейера сборки транскриптома кукурузы.

Зеленые прямоугольники содержат описание внешних данных; синие – данных использованных библиотек и промежуточных результатов; оранжевые – использованных программ.

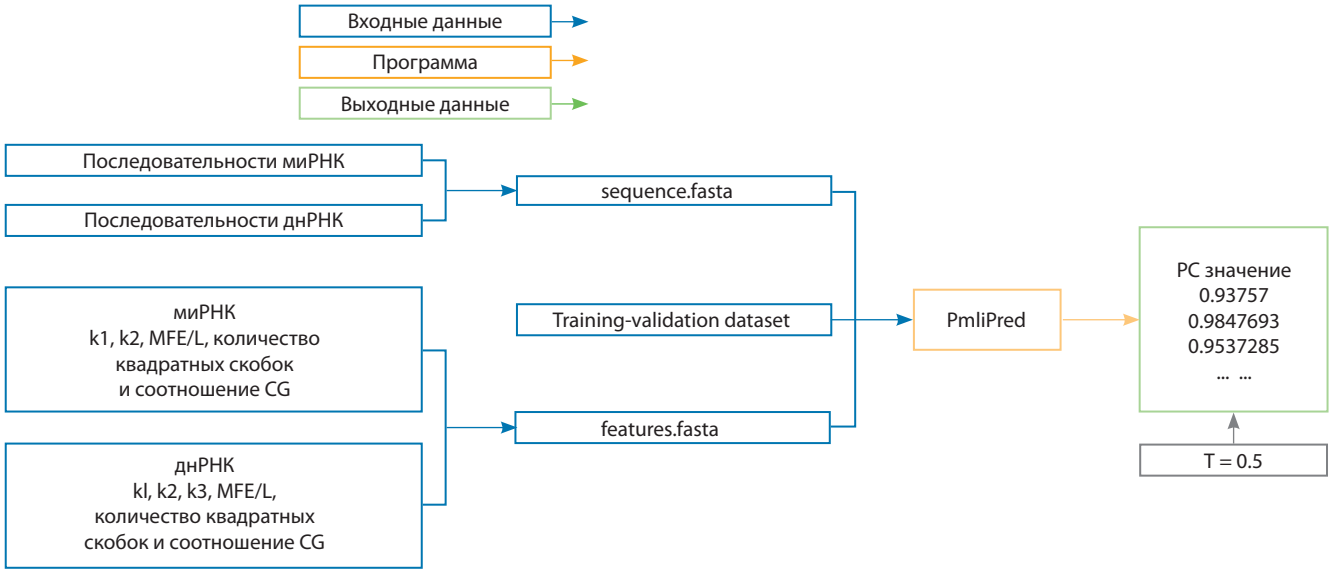


Рис. 2. Этапы предсказания взаимодействий между днРНК и миРНК с использованием модели PmliPred.

Синие прямоугольники содержат описание входных данных; зеленые – выходных данных; оранжевые – использованных программ. Показано пороговое значение доверительной вероятности T = 0.5.

Дифференциальная экспрессия днРНК у кукурузы. Анализ дифференциальной экспрессии днРНК выполняется отдельно для тканей побега и соцветия между контрольными и мутантными (*fzt*) линиями кукурузы. Статистическую обработку проводили с использованием пакетов DESeq2 и edgeR (Robinson et al., 2010; Love et al., 2014), значимыми считались различия в экспрессии при p-value < 0.05 с поправкой на множественное тестирование.

Для дифференциально экспрессирующихся днРНК были построены тепловые карты нормализованных значений экспрессии, позволяющие наглядно оценить паттерны экспрессии в разных биологических повторностях и подтвердить стабильность обнаруженных изменений между контрольной и мутантной группами.

Анализ взаимодействия между миРНК и днРНК. Для предсказания взаимодействий между молекулами днРНК и миРНК применяли метод PmliPred (Kang et al., 2020), включающий несколько последовательных этапов (рис. 2). На первом этапе формировались входные данные: нуклеотидные последовательности миРНК и днРНК, демонстрирующие понижение экспрессии миРНК и повышение экспрессии днРНК у мутантов по сравнению с контролем. На вход программы также подавались количественные характеристики последовательностей, извлеченные с помощью встроенных алгоритмов модели, и обучающая выборка последовательностей, предоставленная вместе с программой (Kang et al., 2020). Для миРНК использовали следующие признаки: «частоты k-меров» (k = 1, k = 2), «минимальная свободная энергия, нормированная по длине (MFE/L)», «количество спаренных нуклеотидов во вторичной структуре» и «отношение GC». Для днРНК дополнительно извлекали показатель частот k-меров (k = 3).

Сформированные данные использованы программой PmliPred для оценки вероятности взаимодействия между парами днРНК–миРНК (выходной параметр PC, доверительная вероятность). Мы считали, что пара днРНК–миРНК взаимодействует, если PC ≥ 0.5. Итоговые данные представляли в виде таблицы с вероятностями, отражающими степень предсказанного взаимодействия между молекулами миРНК и днРНК.

Анализ и визуализация взаимодействий между миРНК и днРНК. Полученные пары днРНК–миРНК разделяли на две группы на основе параметров взаимодействия: днРНК с повышенным уровнем собственной экспрессии в мутантной линии (тестовая группа) и днРНК с пониженным уровнем экспрессии (контрольная группа). Обе группы днРНК сравнивали со всеми миРНК с пониженным уровнем экспрессии (Thompson et al., 2014) (см. раздел «Транскриптомные данные»). В качестве порогового значения для отбора потенциальных взаимодействий в тестовой группе использовали максимальное значение параметра PC, рассчитанного программой PmliPred из контрольной группы. Если для пары миРНК и днРНК из тестовой группы параметр PC превышал любое из значений PC в контрольной группе, то считалось, что такие миРНК и днРНК взаимодействуют.

Последовательности отобранных миРНК и днРНК загружали в программу IntaRNA (Mann et al., 2017) для идентификации и визуализации взаимодействующих пар оснований. Из всех предсказанных взаимодействий отбирали только те пары, у которых число неспаренных оснований в области взаимодействий двух молекул менее 4, а длина области взаимодействий превышает 16 нуклеотидов.

Такие взаимодействия между днРНК и миРНК имеют важное биологическое значение. ДнРНК могут функционировать как конкурентные эндогенные РНК (сеРНК), или как «губки», связываясь с миРНК и тем самым препятствуя их взаимодействию с мРНК-мишенями. Это способствует регуляции экспрессии генов, участвующих в росте, развитии и стрессовых ответах растений (Pronozin, Afonnikov, 2025).

Результаты

Сборка транскриптома

В результате анализа транскриптомных данных *Z. mays*, охватывающих стадии побега и соцветия для контрольных и мутантных линий (*fzt*), было получено высокое качество исходных данных. Средняя доля уникально выровненных прочтений при картировании с использованием STAR (Dobin et al., 2013) составила 84.73 %, при этом только 3.10 % прочтений остались невыровненными. Для выровненных прочтений доля несовпадений на один нуклеотид составила в среднем 0.76 %, что указывает на высокую точность секвенирования и надежность данных для дальнейшего анализа.

Сборка транскриптов, выполненная с использованием StringTie (Pertea et al., 2015), была проверена с помощью инструмента BUSCO (Simão et al., 2015). Во всех 14 библиотеках доля полных BUSCO-групп превышала 95 %, достигая максимума в 98.8 % (в библиотеке SRR1041561 обнаружено 252 из 255 ожидаемых ортологов). Эти метрики указывают на полноту и качество полученных сборок и подтверждают их пригодность для последующего анализа экспрессии и идентификации некодирующих РНК.

Дифференциальная экспрессия днРНК между контрольными и мутантными образцами *Z. mays*

В ткани побега было идентифицировано 10 днРНК, достоверно изменяющих свой уровень экспрессии между контрольной и мутантной группами (табл. S1 Приложения)[1]. Из них девять днРНК отличались повышенной экспрессией у мутантов, что позволяет предположить, что они могут служить мишенями для миРНК и участвовать в механизмах посттранскрипционной регуляции. Эти транскрипты рассматриваются в дальнейшем как кандидаты на мишени для миРНК.

Тепловая карта (рис. 3) демонстрирует систематические различия по экспрессии этих днРНК в исследованных транскриптомных библиотеках. Для 9 из 10 днРНК уровень экспрессии у мутантных растений повышен по сравнению с контролем.

В соцветии количество днРНК с дифференциальной экспрессией оказалось существенно выше – всего 34 (табл. S2). Среди них 20 днРНК показали повышенный уровень экспрессии в мутантной линии. Интересно отметить, что заметные различия в уровне транскрипции наблюдаются у целого ряда днРНК с ярко выраженной стадией специфичности, характерной только для соцветия.

Тепловая карта экспрессии днРНК для соцветия (рис. 4) также демонстрирует систематические различия их экспрессии в исследованных транскриптомных библиотеках. днРНК с пониженным и повышенным уровнями экспрессии у мутантных растений формируют два четко выраженных кластера.

В совокупности выявленные днРНК представляют собой приоритетный набор для последующего анализа взаимодействий с миРНК и дальнейшей функциональной аннотации.

Оценка точности предсказания взаимодействия днРНК и миРНК

Проверка способности используемой модели предсказания различать между собой днРНК из тестовой группы (с повышенным уровнем экспрессии у мутантов) и контрольной группы (с пониженным уровнем экспрессии) представлена на рис. 5.

В ткани побега значения взаимодействия у тестовых днРНК (с повышенным уровнем экспрессии у мутантов) смещены в область выше 0.5, что может свидетельствовать о потенциальной способности этих транскриптов связываться с миРНК. Однако следует отметить, что контрольная группа представлена только одной днРНК, имеющей высокое предсказанное значение. Из-за того, что контрольной в этом эксперименте была всего одна днРНК (с понижением экспрессии у мутантов), оценить точность и дискриминирующую способность модели PmliPred затруднительно.

В ткани соцветия различия между группами проявляются еще более отчетливо: у тестовых днРНК значения взаимодействия преимущественно находятся выше 0.5, тогда как контрольные днРНК имеют распределение, смещенное в область ниже 0.5. Такое поведение модели указывает на ее способность эффективно разграничивать биологические классы на основе предсказанных параметров взаимодействия миРНК–днРНК.

Таким образом, модель PmliPred показала высокую дискриминирующую способность и может быть использована для предварительного отбора днРНК, потенциально вовлеченных во взаимодействие с миРНК.

Сети взаимодействий днРНК–миРНК в тканях кукурузы

Результаты, полученные с использованием программы предсказания взаимодействий миРНК и днРНК IntaRNA, показаны на рис. 6. На примере двух пар РНК видно, что они действительно формируют стабильные и протяженные участки комплементарного связывания друг с другом. В общей сложности было идентифицировано 13 достоверных пар днРНК–миРНК в побеге и 14 – в соцветии. Данные подтверждают, что отобранные днРНК не только демонстрируют повышенную экспрессию у мутантов, но и обладают высоким потенциалом специфического взаимодействия с миРНК, экспрессия которых у мутантов понижена. Это делает их обоснованными кандидатами в мишени для миРНК.

Визуализация сети выявленных взаимодействий в программе Cytoscape (рис. 7 и 8) показала, что некоторые днРНК потенциально способны связывать несколько миРНК одновременно. Например, lncrna_SRR1041561_10348.1 (в соцветии) взаимодействует сразу с пятью различными миРНК: zma-miR160a-e-g-5p, zma-miR167d-3p, zma-miR394a-b-5p, zma-miR408a-b-3p и zma-miR172e, что свидетельствует о ее возможной функции как «губки» в рамках ceRNA-механизма. Другой пример – lncrna_SRR1041554_35279.1 в побеге, связанный с zma-miR2118b, zma-miR160a-e-g-5p и zma-miR167b-3p.

[1] Табл. S1 и S2 Приложения см. по адресу: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx51.pdf

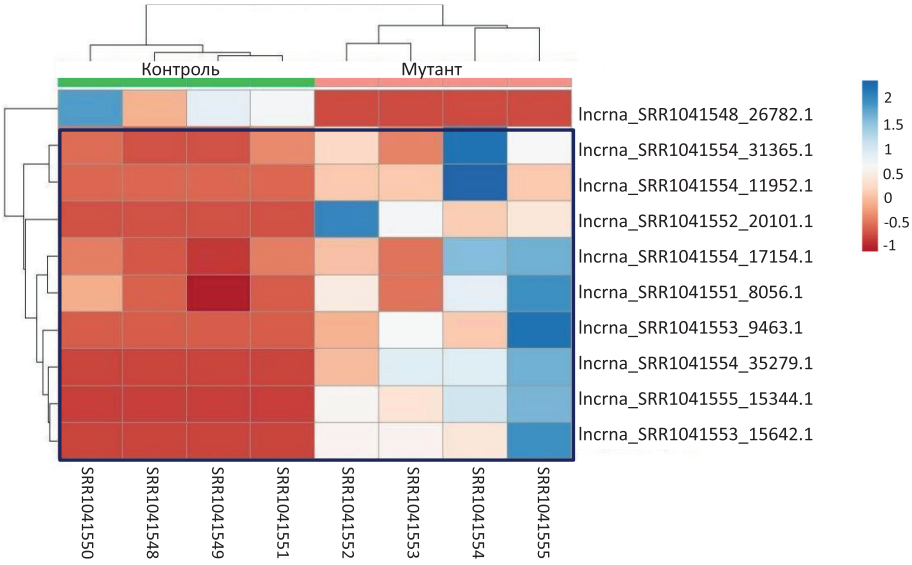


Рис. 3. Тепловая карта экспрессии днРНК с измененной экспрессией в побеге.

Здесь и на рис. 4: цветовая шкала справа отражает нормализованный уровень экспрессии: синий цвет соответствует высокой экспрессии, красный – пониженной. Синей рамкой выделены ячейки, соответствующие днРНК, повышающим экспрессию в мутантной линии.

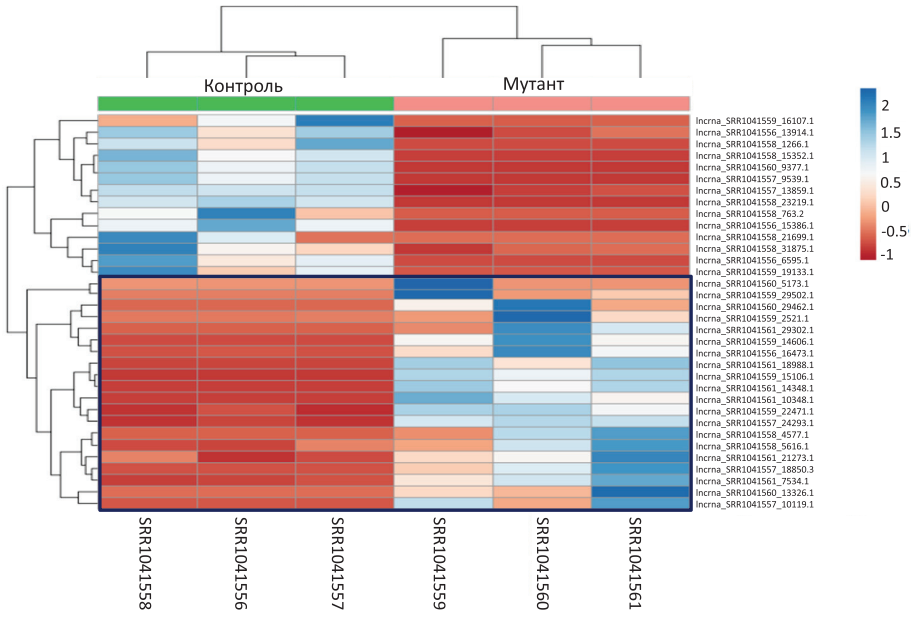


Рис. 4. Тепловая карта экспрессии днРНК с измененной экспрессией в соцветии.

Обсуждение

Проведенный анализ показал, что 9 из 14 идентифицированных днРНК способны формировать потенциальные взаимодействия с несколькими миРНК одновременно, что указывает на их возможную роль в качестве конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA) – молекулярных «губок», связывающих миРНК и препятствующих их взаимодействию с мРНК-мишенями. Это взаимодействие позволяет днРНК опосредованно регулировать экспрессию различных генов, участвующих в ключевых биологических процессах.

Среди предсказанных миРНК-партнеров находятся хорошо охарактеризованные регуляторы роста, развития и стрессовых ответов растений (Jones-Rhoades et al., 2006; Sunkar et al., 2012):

- miR156 контролирует переход от ювенильной к взрослой фазе, цветение, морфогенез листьев и ветвление за счет подавления генов *SPL* (Preston, Hileman, 2013; Wang H., Wang H., 2015);
- miR167 и miR160 регулируют путь ауксина через подавление *ARF*-генов, влияя на корнеобразование, развитие листьев, цветов, семян и соматический эмбриогенез

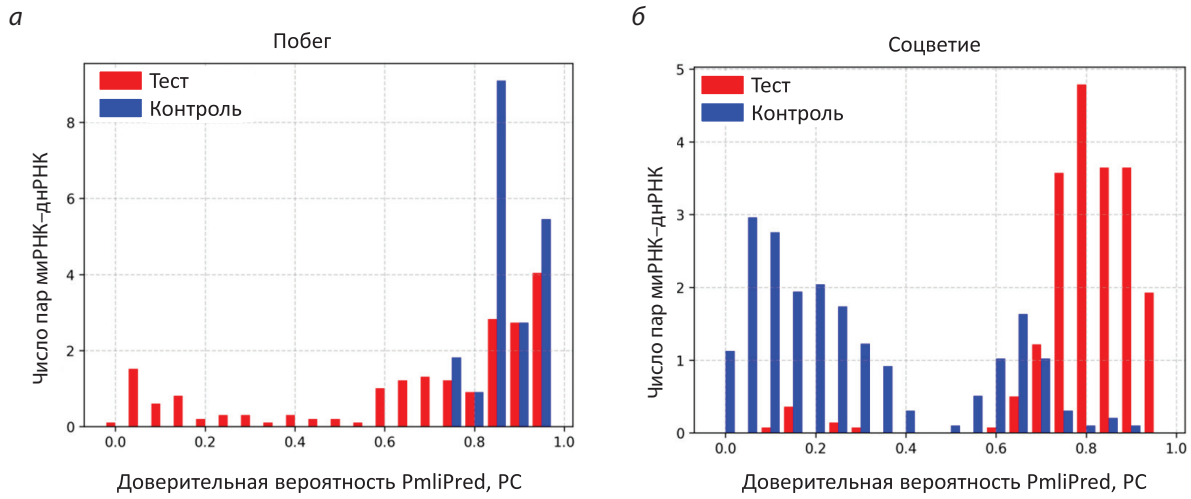


Рис. 5. Распределение предсказанных значений взаимодействий миРНК–днРНК (побег и соцветия).

а – побег: красным цветом показаны значения для тестовой группы (днРНК с повышенным уровнем экспрессии), синим – для контрольной группы (днРНК с пониженным уровнем экспрессии); *б* – соцветие: аналогично красным – тестовая группа, синим – контрольная (днРНК с повышенным уровнем экспрессии). Ось *X* – доверительная вероятность взаимодействия (PC), предсказанная программой PmliPred; ось *Y* – число рассмотренных пар миРНК–днРНК.

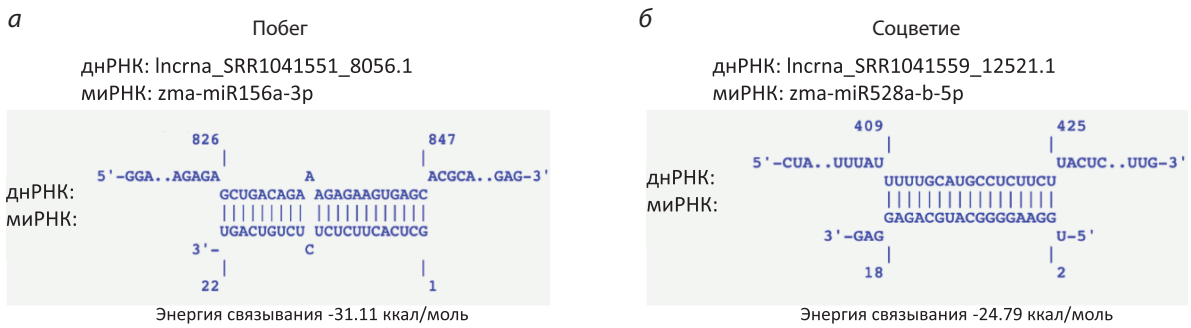


Рис. 6. Примеры взаимодействий миРНК–днРНК, рассчитанных программой IntaRNA.

а – побег: zma-miR156a-3p и lncRNA_mapped_SRR1041551_8056.1; *б* – соцветие: zma-miR528a-b-5p и lncRNA_mapped_SRR1041559_12521.1. Показаны области спаривания и структура взаимодействия, основанная на минимальной свободной энергии (в ккал/моль).

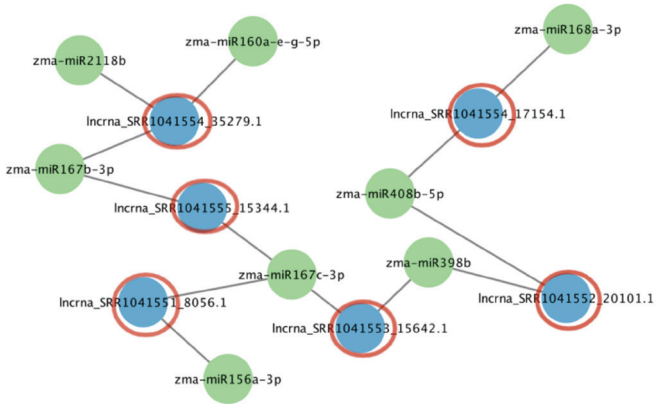


Рис. 7. Сети взаимодействий миРНК–днРНК в побеге кукурузы.

Здесь и на рис. 8: зеленые круглые узлы – миРНК; синие – днРНК; красные круги обозначают днРНК, которые, возможно, обладают функцией «губки».

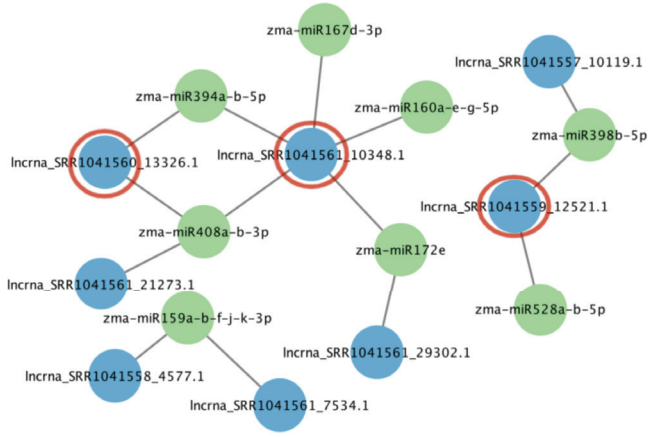


Рис. 8. Сети взаимодействий миРНК–днРНК в соцветии кукурузы.

(Caruana et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Barrera-Rojas et al., 2021);
- miR168 участвует в поддержании стабильного уровня белка AGO1 – центрального компонента РНК-интерференции, регулируя тем самым всю миРНК-систему (Martínez de Alba et al., 2011; Li W. et al., 2012);
- miR172 управляет началом цветения и органогенезом через подавление генов *AP2*-типа (Ripoll et al., 2015; Zhang B. et al., 2015);
- miR2118 активирует биогенез фазированных siRNA (phasiRNA), играя критическую роль в иммунитете и развитии пыльников (Canto-Pastor et al., 2019; Jiang P. et al., 2020);
- miR398 и miR408 обеспечивают антиоксидантную защиту, регулируя уровень супероксиддисмутаз и металл-связывающих белков, а также отвечают на широкий спектр абиотических стрессов (Jiang A. et al., 2021; Zou et al., 2021; Gao et al., 2022);
- miR394 влияет на формирование листьев, развитие плодов и активность меристем (Song et al., 2015; Sun P. et al., 2017);
- miR528 вовлечен в редокс-гомеостаз, устойчивость к вирусным инфекциям, солевому стрессу и регулирование лигнификации (Wu et al., 2017; Sun Q. et al., 2018).

Функциональная аннотация взаимодействующих миРНК свидетельствует о том, что большинство из них участвует не только в развитии морфологических структур растений, но и в сложной системе регуляции ответа на биотические и абиотические воздействия.

Более того, выявленные сети ceRNA подтверждают, что посттранскрипционная регуляция в растениях реализуется через тонко скоординированные взаимодействия между некодирующими и кодирующими РНК. Наличие днРНК, связывающих несколько регуляторных миРНК, указывает на возможность существования центров регуляторного перекрестного влияния в РНК-сетях, что представляет особый интерес для функциональной валидации.

Полученные результаты подчеркивают значимость системного подхода к изучению транскриптомных данных, поскольку именно такие подходы позволяют обнаружить скрытые уровни регуляции и перспективные молекулярные мишени. Кроме того, эти данные могут служить теоретической основой для разработки новых агрономически ценных сортов кукурузы с повышенной устойчивостью к стрессам и улучшенными адаптационными характеристиками.

Заключение

В настоящей работе проведен комплексный анализ транскриптомных данных кукурузы (*Z. mays*) с целью выявления потенциальных взаимодействий между миРНК и днРНК. По результатам дифференциальной экспрессии, полученным при сравнении контрольных и мутантных образцов, определены днРНК и миРНК, имеющие потенциальное взаимодействие.

Для прогноза потенциальных пар миРНК–днРНК была применена модель PmliPred, основанная на методах машинного обучения. Дальнейший структурный анализ с использованием инструмента IntaRNA подтвердил наличие стабильных сайтов комплементарного связывания между выбранными молекулами, что свидетельствует о высокой достоверности предсказанных взаимодействий.

На основе отобранных пар взаимодействий были построены сети конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA-сети), демонстрирующие, что отдельные днРНК способны связывать несколько миРНК одновременно. Это подтверждает гипотезу об их участии в механизмах посттранскрипционной регуляции в качестве «губок» для миРНК, способных модулировать активность регуляторных молекул и влиять на экспрессию генов-мишеней.

Дополнительно была проведена визуализация ключевых взаимодействий в среде Cytoscape, что позволило наглядно представить структуру и потенциальную функциональную значимость выявленных регуляторных связей. Полученные результаты подтверждают роль днРНК как важного компонента регуляторных сетей растений и создают платформу для дальнейших функциональных исследований.

Список литературы / References

Barrera-Rojas C.H., Otoni W.C., Nogueira F.T.S. Shaping the root system: the interplay between miRNA regulatory hubs and phytohormones. *J Exp Bot.* 2021;72(20):6822-6835. doi 10.1093/jxb/erab299

Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. doi 10.1093/bioinformatics/btu170

Bolser D.M., Staines D.M., Perry E., Kersey P.J. Ensembl Plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomic data. In: van Dijk A. (Ed.) Plant Genomics Databases. Methods in Molecular Biology. Vol. 1533. New York: Humana Press, 2017; 1-31. doi 10.1007/978-1-4939-6658-5_1

Bray N., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 2016;34(5):525-527. doi 10.1038/nbt.3519

Canto-Pastor A., Santos B., Valli A., Summers W., Schornack S., Baulcombe D. Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens by short tandem target mimic RNAs in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(7):2755-2760. doi 10.1073/pnas.181438011

Caruana J.C., Dhar N., Raina R. Overexpression of *Arabidopsis microRNA167* induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets *ARF6* and *ARF8*. *Plant Direct.* 2020;4(9):e00270. doi 10.1002/pld3.270

Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi 10.1093/bioinformatics/bts635

Gao Y., Feng B., Gao C., Zhang M., Zhang X., Han X., Liu P., Wang B., Li Z. The evolution and functional roles of *miR408* and its targets in plants. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):530. doi 10.3390/ijms23010530

He X., Guo S., Wang Y., Wang L., Shu S., Sun J. Systematic identification and analysis of heat-stress-responsive lncRNAs, circRNAs and miRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Physiol Plant.* 2020;168(3):736-754. doi 10.1111/ppl.12997

Jiang A., Guo Z., Pan J., Yu B., Chen D., Li Y. The PIF1-miR408-PLANTACYANIN repression cascade regulates light-dependent seed germination. *Plant Cell.* 2021;33(5):1506-1529. doi 10.1093/plcell/koab060

Jiang P., Lian B., Liu C., Fu Z., Shen Y., Cheng Z., Ding Y. 21-nt phasiRNAs direct target mRNA cleavage in rice male germ cells. *Nat Commun.* 2020;11(1):5191. doi 10.1038/s41467-020-19034-y

Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Rev Plant Biol.* 2006;57:19-53. doi 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218

Kang Q., Jun M., Jun C., Zhang Y., Wang W. PmliPred: a method based on hybrid model and fuzzy decision for plant miRNA–lncRNA interaction prediction. *Bioinformatics.* 2020;36(10):2986-2992. doi 10.1093/bioinformatics/btaa074

Li R., Yang Y.F., Li R., Zhu H.L., Luo Y.B. Functions of long non-coding RNA and its interacting mechanisms. *Chin Bull Life Sci.* 2016; 28(6):703-711. doi 10.13376/j.cbls/2016090

Li W., Cui X., Meng Z., Huang X., Xie Q., Wu H., Jin H., Zhang D., Liang W. Transcriptional regulation of Arabidopsis *MIR168a* and *ARGONAUTE1* homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiol.* 2012;158(3):1279-1292. doi 10.1104/pp.111.188789

Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi 10.1186/s13059-014-0550-8

Mann M., Wright P.R., Backofen R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W435-W439. doi 10.1093/nar/gkx279

Martínez de Alba A.E., Jauvion V., Mallory A.C., Bouteiller N., Vaucheret H. The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):9339-9344. doi 10.1093/nar/gkr590

Pertea M., Pertea G.M., Antonescu C.M., Chang T.C., Mendell J.T., Salzberg S.L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 2015;33(3):290-295. doi 10.1038/nbt.3122

Preston J.C., Hileman L.C. Functional evolution in the plant *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) gene family. *Front Plant Sci.* 2013;4:80. doi 10.3389/fpls.2013.00080

Pronozin A.Y., Afonnikov D.A. ICAnnoLncRNA: a snakemake pipeline for a long noncoding RNA search and annotation in transcriptomic sequences. *Genes.* 2023;14(7):1331. doi 10.3390/genes14071331

Pronozin A.Y., Afonnikov D.A. The role of long noncoding RNAs in plants. *Russ J Genet.* 2025;61:1-18. doi 10.1134/S1022795424701345

Ripoll J.J., Bailey L.J., Mai Q.A., Wu S.L., Hon C.T., Chapman E.J., Ditta G.S., Estelle M., Yanofsky M.F. microRNA regulation of fruit growth. *Nat Plants.* 2015;1(4):15036. doi 10.1038/nplants.2015.36

Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26(1):139-140. doi 10.1093/bioinformatics/btp616

Sheng N., Huang L., Gao L., Zhao W., Zhang Y., Wang X. A survey of computational methods and databases for lncRNA-miRNA interaction prediction. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2023; 20(5):2810-2826. doi 10.1109/TCBB.2023.3264254

Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics.* 2015; 31(19):3210-3212. doi 10.1093/bioinformatics/btv351

Song J.B., Shu X.X., Shen Q., Guo C.Y., Jiang J., Xie L.H., Liu Y.F., Yang Z.M. Altered fruit and seed development of transgenic rapeseed (*Brassica napus*) over-expressing microRNA394. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125427. doi 10.1371/journal.pone.0125427

Sun P., Cheng C., Lin Y., Zhu Q., Lin J., Jin Y., Yuan H., Lin Y. Combined small RNA and degradome sequencing reveals complex microRNA regulation of catechin biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*). *PLoS One.* 2017;12(2):e0171173. doi 10.1371/journal.pone.0171173

Sun Q., Csorba T., Skourti-Stathaki K., Proudfoot N.J., Dean C. R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis FLC* locus. *Science.* 2013;340(6132):619-621. doi 10.1126/science.1234848

Sun Q., Liu X., Yang J., Wang Y., Zhang Y., Li J., Wang N., Li H., Wang J. MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Mol Plant.* 2018;11(6):806-814. doi 10.1016/j.molp.2018.03.013

Sunkar R., Li Y.F., Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* 2012;17(4):196-203. doi 10.1016/j.tplants.2012.01.010

Thompson B.E., Basham C., Hammond R., Sidorenko L., Becker M.G., Neuffer M.G., Meeley R.B., Timmermans M.C.P., Chandler V.L., Hake S. The dicer-like1 homolog fuzzy tassel is required for the regulation of meristem determinacy in the inflorescence and vegetative growth in maize. *Plant Cell.* 2014;26(12):4702-4717. doi 10.1105/tpc.114.132670

Wang H., Wang H. The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. *Mol Plant.* 2015;8(5):677-688. doi 10.1016/j.molp.2015.01.008

Wang L., Wang J.W. Coding function for non-coding RNA in plants-insights from miRNA encoded peptide (miPEP). *Sci China Life Sci.* 2015;58(5):503-505. doi 10.1007/s11427-015-4854-z

Wang Y., Liu W., Wang X., Yang R., Wu Z., Wang H., Wang L., Hu Z., Guo S., Zhang H., Lin J., Fu C. MiR156 regulates anthocyanin biosynthesis through *SPL* targets and other microRNAs in poplar. *Hortic Res.* 2020;7:118. doi 10.1038/s41438-020-00341-w

Wu J., Yang R., Yang Z., Yao S., Zhao S., Wang Y., Li P., … Zhou X., Chu C., Qi Y., Cao X., Li Y. ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nat Plants.* 2017;3:16203. doi 10.1038/nplants.2016.203

Zhang B., Wang L., Zeng L., Zhang C., Ma H. *Arabidopsis* TOE proteins convey a photoperiodic signal to antagonize CONSTANS and regulate flowering time. *Genes Dev.* 2015;29(9):975-987. doi 10.1101/gad.251520.114

Zhang L., Chia J.M., Kumari S., Stein J.C., Liu Z., Narechania A., Maher C.A., Guill K., McMullen M.D., Ware D. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genet.* 2009; 5(11):e1000716. doi 10.1371/journal.pgen.1000716

Zou H., Guo X., Yang R., Wang D., Liu K., Gan L., Yuan Y., Qi J., Wang Y. MiR408-*SmLAC3* module participates in salvianolic acid B synthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7541. doi 10.3390/ijms22147541

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.07.2025. После доработки 06.10.2025. Принята к публикации 07.10.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1304-1317

doi 10.18699/vjgb-25-137

Исследование инсектицидного и фунгицидного потенциала бактерий эндофитов пшеницы, сои и рапса методами биоинформатического анализа

Т.Н. Лахова [1, 2] ✉, А.И. Клименко [1], Г.В. Васильев [1], Е.Ю. Гырнец [3], А.М. Асатурова [3], С.А. Лашин [1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений», Краснодар, Россия
✉ tlakhova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Эндофитные бактерии способны влиять на доступность различных соединений, урожайность и рост сельскохозяйственных растений, а также обеспечивать устойчивость к болезням и вредителям. Поэтому исследование эндофитов сельскохозяйственно значимых культурных растений является перспективной задачей в области биологической защиты растений. В данной работе рассмотрены изоляты штаммов бактерий, полученные из листьев и/или корней пшеницы, рапса и сои. Было произведено полногеномное секвенирование изолятов. С помощью аналитического конвейера собраны и охарактеризованы геномы 15 штаммов бактерий-эндофитов культурных растений, проанализирован их инсектицидный и фунгицидный потенциал. Анализ генного репертуара с помощью программы GenAPI показал высокую степень соответствия между генным репертуаром штамма BZR 585 относительно *Alcaligenes phenolicus*, BZR 762 и BZR 278 относительно *Alcaligenes* sp., BZR 588 и BZR 201P относительно *Paenochrobactrum pullorum*. Во всех штаммах, за исключением BZR 162, BZR 588 и BZR 201P, найдены гены, кодирующие белки, обладающие фунгицидной активностью, такие как итурины, фенгицины и сурфактины. Также во всех штаммах найдены гены, кодирующие белки с инсектицидной активностью, а именно: GroEL, Spp1Aa1, Spp1Aa2, Vpb1Ab1, Vpb4Ca1, HldE, фенгицин, микосубтилин и бацилломицин. Полученные геномные данные подтверждены экспериментальными испытаниями: ранее показана высокая инсектицидная активность штаммов BZR 1159, BZR 936, BZR 920 и др. против *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* и *Cydia pomonella*, а также фунгицидные свойства против *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichothecium*. Это демонстрирует практическую значимость выявленных генетических детерминант для создания новых агентов биоконтроля.

Ключевые слова: биоинформатика; сравнительная геномика; эндофиты; биоконтроль

Для цитирования: Лахова Т.Н., Клименко А.И., Васильев Г.В., Гырнец Е.Ю., Асатурова А.М., Лашин С.А. Исследование инсектицидного и фунгицидного потенциала бактерий эндофитов пшеницы, сои и рапса методами биоинформатического анализа. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1304-1317. doi 10.18699/vjgb-25-137

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-16-00260, https://rscf.ru/en/project/23-16-00260/. Секвенирование геномов проведено в ЦКП «Центр геномных исследований» ИЦиГ СО РАН, высокопроизводительные вычисления – с использованием ресурсов ЦКП «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

Study of insecticidal and fungicidal potential of endophytic bacteria of wheat, soybean and rapeseed by bioinformatic analysis methods

T.N. Lakhova [1, 2] ✉, A.I. Klimenko [1], G.V. Vasiliev [1], E.Yu. Gyrnets [3], A.M. Asaturova [3], S.A. Lashin [1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center of Biological Plant Protection", Krasnodar, Russia
✉ tlakhova@bionet.nsc.ru

Abstract. Endophytic bacteria play a key role in agricultural ecosystems, as they can affect the availability of various compounds, crop yield and growth, and provide resistance to diseases and pests. Therefore, the study of endophytes of agriculturally important crop plants is a promising task in the field of biological plant protection. Understanding the mechanisms of interaction between endophytic bacteria and plants will allow the use of these microorganisms as bioagents in the future and thus reduce dependence on chemical pesticides. In this paper, samples obtained from the leaves and/or roots of wheat, rapeseed and soybean are considered. Whole-genome sequencing of the isolates

© Лахова Т.Н., Клименко А.И., Васильев Г.В., Гырнец Е.Ю., Асатурова А.М., Лашин С.А., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

was performed. Using an analytical pipeline, the genomes of 15 strains of endophyte bacteria of cultivated plants were assembled and characterized. Their insecticidal and fungicidal potential was analyzed. Gene repertoire analysis performed with GenAPI showed a high degree of correspondence between the gene repertoires of strain BZR 585 against *Alcaligenes phenolicus*, BZR 762 and BZR 278 against *Alcaligenes* sp., BZR 588 and BZR 201P against *Paenochrobactrum pullorum*. All strains, with the exception of BZR 162, BZR 588 and BZR 201P, were found to contain genes encoding proteins with fungicidal activity, such as iturins, fengycins and surfactins. All strains also contained genes encoding proteins with insecticidal activity, namely GroEL, Spp1Aa1, Spp1Aa2, Vpb1Ab1, Vpb4Ca1, HldE, mycosubtilin, fengycin and bacillomycin. The obtained genomic data are confirmed by the results of previous experimental studies: high insecticidal activity of a number of strains (BZR 1159, BZR 936, BZR 920, etc.) against *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* and *Cydia pomonella*, as well as fungicidal properties against *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, was demonstrated. This shows the practical significance of the identified genetic determinants for the creation of new biocontrol agents.
Key words: bioinformatics; comparative genomics; endophytes; biocontrol

For citation: Lakhova T.N., Klimenko A.I., Vasiliev G.V., Gyrnets E.Yu., Asaturova A.M., Lashin S.A. Study of insecticidal and fungicidal potential of endophytic bacteria of wheat, soybean and rapeseed by bioinformatic analysis methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1304-1317. doi 10.18699/vjgb-25-137

Введение

Эндофитные бактерии – компоненты микробиома растений, способные колонизировать корни, стебли и листья, где они получают питательные вещества и, в свою очередь, повышают устойчивость растений как к биотическим, так и к абиотическим стрессам. Эти симбионты обладают ростостимулирующей активностью за счет фиксации азота, мобилизации фосфора и синтеза фитогормонов, а также продуцируют широкий спектр метаболитов, гидролитических ферментов и летучих соединений, участвующих в биологическом контроле вредителей и болезней сельскохозяйственных культур. Кроме того, эндофиты конкурируют за экологические ниши и формируют системную устойчивость растений, создавая многоуровневую защиту, которая по эффективности может быть сопоставима с химическими пестицидами, но безопасна для человека и окружающей среды (Hamane et al., 2023; Ali et al., 2024). Исследование эндофитов сельскохозяйственно значимых культурных растений открывает перспективу для поиска агентов биоконтроля различных вредителей и патогенов (насекомые, грибы и др.).

Бактерии-эндофиты активно исследуются с применением биоинформатических методов и подходов сравнительной геномики (Wang Z. et al., 2023; Zhang M. et al., 2023; Pellegrinetti et al., 2024; Yang K. et al., 2024; Dai et al., 2025). Секвенирование их полных геномов предоставляет большой массив информации для идентификации генов и их продуктов, обладающих инсектицидным и фунгицидным потенциалом с точки зрения решения задач биоконтроля. Помимо того, функциональная аннотация интересующих генов может быть проведена на основе хорошо охарактеризованных родственных штаммов микроорганизмов, таких как *Bacillus velezensis*, *B. thuringiensis* и др.

Например, в ризосфере растения *B. velezensis* создают благоприятную питательную и физико-химическую среду для корневой микробиоты вследствие образования биопленки, что способствует росту растений и защите от фитопатогенов благодаря секреции антимикробных соединений и формированию у растений фитоиммунного потенциала. В работе (Rabbee et al., 2019) суммировали информацию по штаммоспецифичным кластерам генов *B. velezensis,* связанных с биосинтезом вторичных метаболитов, которые играют важную роль как в подавлении патогенов, так и в стимулировании роста растений. Для штаммов BRI3 *B. velezensis* и родственных линий сравнительный анализ подтвердил сохранение «основных» кластеров генов липопептидсинтетаз (итурин, фенгицин и сурфактин) с одновременным появлением уникальных поликетидных синтаз III типа, что позволяет данным штаммам проявлять широкий фунгицидный потенциал *in vitro* (Liu et al., 2024).

Пангеномные исследования бактерий рода *Burkholderia*, включающие сравнение 18 эндофитных и патогенных штаммов, выявили утрату классических детерминант вирулентности и обогащение кластеров генов синтеза антимикробных соединений у эндофитных симбионтов. Эти изменения являются признаком адаптации к внутриклеточному образу жизни и служат косвенным маркером потенциала биологического контроля (Liu et al., 2024).

Установлено, что *Ochrobactrum quorumnocens* A44, представитель Pseudomonadota, способен нарушать кворум-сенсинг (QS) грамотрицательных бактерий путем инактивации N-ацил-гомосериновых лактонов (AHL) и защищать ткани растений от патогенов мягкой гнили, вирулентность которых регулируется QS. Для этого штамма, выделенного из ризосферы картофеля, и шести родственных типовых штаммов рода *Ochrobactrum* с помощью сравнительной геномики было показано, что коровый геном содержит 50–66 % генов, а на вариабельную часть каждого генома приходится от 8 до 15 % (Krzyżanowska et al., 2019).

Особое место в исследованиях занимает энтомопатогенный штамм *B. thuringiensis* ser. *israelensis*, широко известный источник δ-эндотоксинов (cry, cyt). Полная последовательность 127-кб плазмиды pBtoxis показала, что кластер генов, кодирующих токсины, сохраняет стабильность, тогда как регуляторные и мобильные элементы активно реорганизуются, обеспечивая горизонтальный перенос генов инсектицидных белков и расширяя адаптивный потенциал штамма (Berry et al., 2002; Bolotin et al., 2017).

В то же время у микроорганизмов, устанавливающих симбиотические отношения со своими хозяевами, были обнаружены белки GroEL (АТФ-зависимый молекулярный шаперон, присутствующий во всех формах жизни, один из наиболее консервативных белков в живых организмах), которые выступали в качестве токсина (Horwich et al., 2007; Shi et al., 2012; Kupper et al., 2014). У штамма

Xenorhabdus nematophila был описан гомолог XnGroEL, который сохраняет функцию сворачивания, но приобретает способность связываться с хитиновой кутикулой насекомого и подавлять иммунные реакции хозяина (Horwich et al., 2007).

Таким образом, формирование баз данных по белкам, связанным с инсектицидными и фунгицидными свойствами бактерий-эндофитов, открывает широкие возможности для биоинформатического анализа и *in silico* скрининга бактерий с протективными свойствами, значимыми для сельского хозяйства. Например, база данных BPPRC (Panneerselvam et al., 2022), которая суммирует информацию о некоторых белках и пептидах, обладающих инсектицидной активностью.

В настоящей работе мы представляем сборки и аннотации геномов 15 штаммов бактерий-эндофитов, которые были выделены из различных органов растений пшеницы, сои и рапса. Аннотация проведена относительно найденных близких референсных геномов бактерий. Мы также показали наличие у исследуемых штаммов белков с фунгицидными и инсектицидными свойствами.

Материалы и методы

Штаммы бактерий-эндофитов. В данной работе использована материально-техническая база УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» (http://ckp-rf.ru/usu/671367). Объекты исследования – штаммы бактерий из биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» (https://fncbzr.ru/brk-i-unu/unique-installation-1/). Штаммы были выделены из корней и листьев пшеницы, сои и рапса. Образцы отбирали в четырех районах Краснодарского края (Крыловской, Выселковский, Павловский и г. Краснодар). Общая характеристика исследуемых штаммов микроорганизмов представлена в Приложении 1[1].

Секвенирование. ДНК бактерий выделяли из индивидуальных колоний, выращенных на агаризованной среде на чашках Петри набором D-Cells (Biolabmix, Россия) согласно методике для грамотрицательных бактерий. Колонию переносили в пробирку 1.5 мл и ресуспендировали в 150 мкл буфера PBS. После добавления 20 мкл протеиназы K и 150 мкл лизирующего буфера клетки инкубировали 10 мин при 56 °C. После добавления 500 мкл буфера LB лизат наносили на колонку и центрифугировали 30 с при 12000g. Колонку последовательно промывали 500 мкл буфера WB1 и WB2 с последующим центрифугированием. Элюцию ДНК с колонки выполняли с использованием 60 мкл буфера EB. Ультразвуковую фрагментацию ДНК проводили на соникаторе Covaris M220 (Шелтон, США) в объеме 50 мкл с помощью протокола, оптимизированного для средних длин фрагментов 300 п. н. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit4 набором DNA HS (Thermo Fisher Scientific, США). Геномные библиотеки получали с использованием набора KAPA Hyper Prep (Roche, Швейцария), с двойными индексами KAPA согласно методике производителя. Для работы брали 50 нг озвученной ДНК с девятью циклами финальной ПЦР. Качество и молярность библиотек рассчитывали после анализа на биоанализаторе BA2100 (Agilent, США) и измерения концентраций на флуориметре Qubit4. После нормализации полученные библиотеки были пулированы до концентрации 4 нМ/мкл. Секвенирование проводилось на приборе GenolabM (GeneMind, КНР) парноконцевыми чтениями 2×150 п. н. с использованием набора GenolabM V2.0 (FCM 300) согласно протоколу производителя.

Биоинформатический анализ. Результаты секвенирования геномов проходили проверку качества в программе FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), тримминг осуществлялся с помощью fastp (Chen et al., 2018; Chen, 2023). Также была проведена фильтрация возможной контаминации человеческими прочтениями (Hg38) с использованием BWA MEM (Li, 2013) и синтетическими последовательностями с использованием базы данных Univec (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/UniVec/, дата доступа: апрель 2025) и blastn.

Таксономический состав секвенированного материала анализировали с помощью инструмента MetaPhlan4 (Blanco-Míguez et al., 2023). Первичная таксономическая идентификация первичных сборок геномов производилась путем тетракорреляционного поиска с помощью вебсервиса JSpeciesWS с использованием базы GenomesDB (Richter et al., 2016). Первичные сборки были получены тем же способом, что описан ниже, за исключением того, что не использовались скэффолдинг в Ragout (Kolmogorov et al., 2014) и коррекция Pilon (Walker et al., 2014), а в качестве референсных геномов были взяты результаты тетракорреляционного поиска при первичной таксономической идентификации. В зависимости от качества сборок основной сборкой в GFinisher (Guizelini et al., 2016) выступали либо бины, либо сборка MinYS (Guyomar et al., 2020), либо сборка Spades (Bankevich et al., 2012; Prjibelski et al., 2020) после картирования на референс.

Далее мы уточняли таксономическую идентичность с целью подбора ближайших референсных геномов для проведения сборки геномов бактерий с коррекцией, используя гибридный (*de novo* + reference-guided) каскадный подход на основе множества близкородственных референсов (рис. 1). Для поиска уточненных референсных геномов осуществлялся анализ средней нуклеотидной идентичности (ANI) с помощью fastani (Jain et al., 2018) в рамках рода, установленного при первичном таксономическом скрининге. Черновые сборки сравнивались по ANI со всеми публично доступными геномными сборками в рамках того же рода, депонированными в NCBI Genbank, которые скачивались в ходе пакетной обработки с помощью ncbi-genome-download (https://zenodo.org/records/8192486, дата обращения: апрель 2025).

Были получены три варианта черновых сборок. Первый вариант – *de novo* сборка Spades. Сборка подвергалась биннингу с использованием MaxBin2 (Wu et al., 2016). Полученные бины фильтровались по параметру completeness (полнота). Если данный параметр был <87 %, то такие бины не рассматривались далее. Второй вариант сборки – reference-guided сборка с помощью MinYS. На вход подавались близкородственный референсный геном и фильтрованные прочтения. По результатам сборки MinYS выбирался основной референс из ближайших

[1] Приложения 1–6 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx52.zip

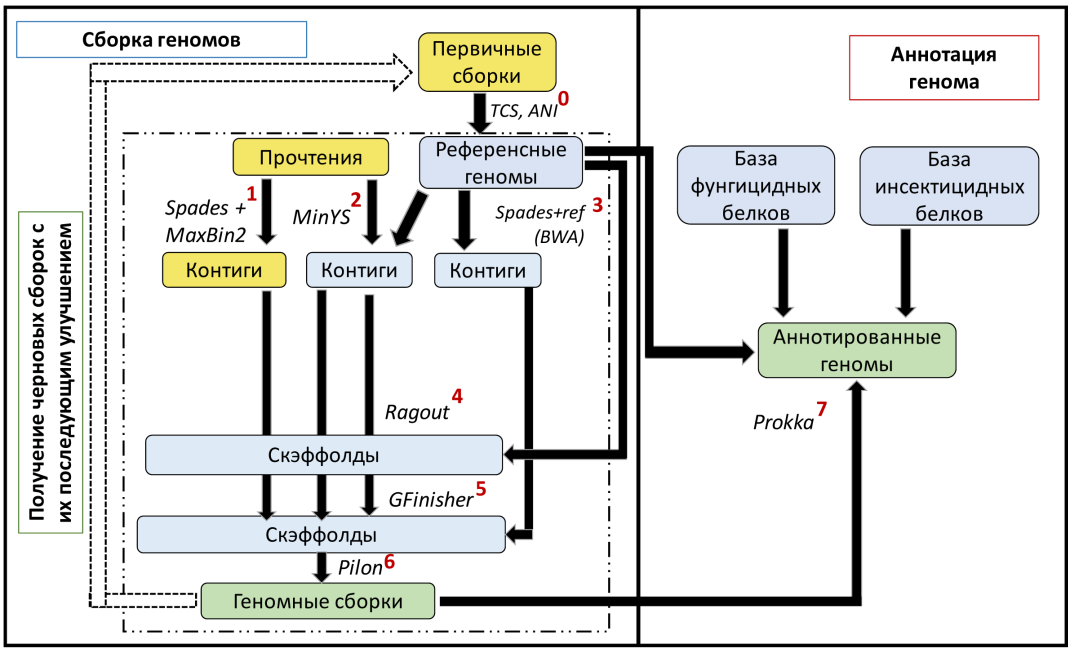


Рис. 1. Аналитический конвейер по сборке бактериальных геномов и их аннотации.

Желтыми блоками отмечены данные, полученные на предварительном этапе первичной сборки геномов, голубыми – полученные в ходе улучшения геномных сборок, зелеными – целевые результаты. Стрелки указывают взаимозависимость по данным, подписи возле стрелки обозначают инструменты и методы, используемые для анализа или преобразования данных. 0 – тетракорреляционный анализ (JSpeciesWS и GenomesDB) и анализ средней нуклеотидной идентичности (fastani) для установления ближайших (и наиболее хорошо аннотированных) референсных геномов из GenBank; 1 – *de novo* сборка с помощью Spades с последующим биннингом в MaxBin2 (фильтр отбора бинов – completeness > 87 %); 2 – reference-guided сборка в MinYS; 3 – сборка с помощью Spades прочтений, предварительно картированных на референс с помощью BWA; 4 – скэффолдинг ранее полученных черновых геномов (контигов) в Ragout, использующий информацию о наиболее близком референсном геноме; 5 – genome polishing в GFinisher, объединяющий результаты ранее полученных черновых сборок в одну общую; 6 – финальная коррекция в Pilon; 7 – аннотация финальных сборок в Prokka с учетом наиболее полных из известных аннотаций геномов соответствующего вида/рода, а также специально подготовленных баз аминокислотных последовательностей фунгицидных и инсектицидных белков, последние включают в себя BPPRC.

референсных геномов, который использовался в третьем варианте сборки и в финальной сборке с коррекцией. Третий вариант сборки осуществлялся сборщиком Spades на основе картированных прочтений на выбранный референсный геном.

Все варианты черновых сборок подвергались скэффолдингу с помощью Ragout, который может использовать информацию о ряде наиболее близких референсных геномов. Конфигурационные файлы для каждого варианта сборки Ragout были сгенерированы с помощью собственного скрипта на Python 3. Полученные черновые сборки на уровне контигов и скаффолдов объединяли в одну общую с использованием программы GFinisher. В зависимости от промежуточных результатов контроля качества основной сборкой в GFinisher были сборки после Ragout или бины, полученные при первом варианте черновой сборки. GFinisher может выдавать две сборки, которые подавались на коррекцию в Pilon. На каждом этапе осуществлялся контроль качества сборок с помощью QUAST (Gurevich et al., 2013). По результатам контроля качества, который выполнялся после коррекции, были выбраны финальные сборки геномов.

Аннотация генома производилась с помощью программного конвейера prokka (Seemann, 2014), дополнительно настроенного, чтобы учитывать подготовленные в рамках данной работы базы последовательностей белков с инсектицидными и фунгицидными свойствами, а также аннотацию уточненных референсных геномов.

Для каждого генома была сформирована своя база для аннотации, которая состояла из следующих частей: аннотированные белковые последовательности из ближайшего референсного генома, белковые последовательности с инсектицидными и фунгицидными свойствами, собранные в настоящей работе (описаны ниже), и база BPPRC (https://www.bpprc-db.org/, дата обращения: июнь 2025).

Для поиска инсектицидных белков в исследуемых геномах была собрана база белковых последовательностей в ручном режиме. В нее вошли аминокислотные последовательности белков Cry и Vip, отобранные из базы UniprotDB (Bateman et al., 2021) и NCBI Protein (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/, дата обращения: октябрь 2024) по названию рода и названию белков/функции. В полных геномных последовательностях бактерий из карточки GenBank находился белковый продукт и скачивалась соответствующая белковая последовательность. Далее по сформированной базе осуществлялся поиск с помощью blastp. Полученные результаты были отфильтрованы по порогу по двум параметрам: identity > 50 % и e-value < 0.001, где identity отвечает за количество совпавших аминокислот (в %), а e-value – за статистическую

значимость результатов. К данному варианту также была добавлена база BPPRC, содержащая белковые последовательности бактериальных пестицидных белков, скачанная из проекта Bacterial Pesticidal Protein Database.

Аналогично была собрана в ручном режиме база белковых последовательностей по некоторым белкам, обладающим фунгицидным действием: итуринам, фенгицинам и сурфактинам. С помощью blastp были получены результаты выравнивания белков, закодированных в геномах анализируемых штаммов, на последовательности из собранной базы. Первоначальная фильтрация результатов производилась по двум параметрам: identity > 50 % и e-value < 0.001.

На рис. 1 изображена графическая схема соответствующего аналитического конвейера. Диаграммы Венна для сравнения генного репертуара анализируемых штаммов с таковым в референсных геномах построены в веб-сервисе Draw Venn Diagram (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/, дата обращения: май 2025).

Последующий анализ результатов выравнивания собранных геномов на базы инсектицидных и фунгицидных белков производился с помощью визуализации информации о найденных белках в исследуемых штаммах в виде тепловой карты на основе значения iScore (см. уравнение 1), представляющего собой степень сходства, взвешенную долей выравненного участка от всей длины референсного белка. Такое представление позволяет учесть не только степень сходства найденного локального выравнивания, но и степень, в которой данное выравнивание покрывает длину исходного белка.

Формула для расчета iScore выглядит следующим образом:

$$\text{iScore} = \text{identity} \cdot \frac{\text{la}}{\text{ls}}, \quad (1)$$

где identity – количество совпавших аминокислот (в %); la –длина выравнивания; ls – исходная длина аминокислотной последовательности белка из собранной базы.

Анализ генного репертуара производился с помощью GenAPI (Gabrielaite, Marvig, 2020).

Множественное выравнивание конкатенированных аминокислотных последовательностей было проведено с использованием инструмента GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2022) на основе поиска 120 маркерных генов бактерий. Множественное выравнивание применялось для построения филогенетического дерева в PhyML (Guindon et al., 2010). В PhyML по умолчанию уровень поддержки внутренних ветвей оценивается с помощью байесовского теста. Для визуализации дерева использовался веб-сервис iTOL (Letunic, Bork, 2024) (https://itol.embl.de/, дата обращения: май 2025).

Версии программ и параметры запуска приведены в Приложении 2.

Результаты

Таксономическая идентификация

Первичная оценка таксономического состава секвенированного генетического материала с использованием Metaphlan выявила гетерогенность большинства проанализированных образцов разной степени выраженности (табл. 1). Поскольку не для всех образцов все прочтения относились к одному организму, было решено провести биннинг первичных черновых геномных сборок, чтобы выделить геномные фрагменты наиболее полно представленных в образце микроорганизмов. Далее для бинов с помощью анализа частот тетрануклеотидов и коэффициентов корреляции (тетракорреляционный поиск, TCS) была произведена таксономическая идентификация.

Таксономическая идентичность собранных геномов (см. раздел «Сборка и аннотация») была уточнена в ходе анализа средней нуклеотидной идентичности путем сравнения с публично доступными в NCBI Genbank референсными геномами, относящимися к тому же роду (Приложение 3). Результаты проведенной идентификации суммированы на рис. 2 и в табл. 2.

В итоге были собраны геномы и таксономически идентифицированы 15 штаммов бактерий. Некоторые из образцов имели прочтения, которые могут быть отнесены к различным бактериям, что может говорить о загрязнении образцов до отправки на секвенирование или о том, что культура была смешанная.

Например, поскольку *Paenochrobactrum pullorum* встречается в образцах, взятых с корней пшеницы (BZR 588) и корня озимого рапса (BZR 201P), мы делаем вывод, что это не случайное загрязнение, а нормальный представитель ризосферы цветковых растений. Так, в работе (Hussain et al., 2025) данный вид использовался в составе сообщества бактерий, влияющих на доступность фосфора, урожайность и рост пшеницы.

Сборка и аннотация

В результате гибридного (*de novo* + reference-guided) подхода были получены сборки 15 геномов бактерий. Основные характеристики финальных сборок, взятые после контроля качества QUAST, приведены в табл. 3. Дополнительно для сравнения даны такие характеристики референса, как длина сборки (длина последовательности генома референса), CG состав референсного генома, референсно-зависимые показатели: доля представленности референса в исследуемом геноме (Genome fraction) и показатель дублирования (Duplication ratio).

Однако предложенный подход не подошел для образцов BZR 635 и BZR 926. Для них были найдены близкородственные референсы, но при сборке показатель Genome fraction был низок (4.274 и 1.511 % соответственно), что привело к невозможности провести успешный скэффолдинг в Ragout. Поэтому для BZR 635 и BZR 926 схема сборки включала следующие шаги. В качестве первичной сборки выступала *de novo* сборка Spades без биннинга (бины не прошли выставленный порог). Осуществлялись черновые сборки MinYS и Spades с картированием на референс. Шаги с Ragout и Pilon пропускались, поскольку здесь необходимы расположения участков в сборке относительно референса. Получившиеся сборки подавались в Gfinisher, результат которой был выбран в качестве финальной сборки.

Аннотация геномов была выполнена с помощью инструмента Prokka с пользовательской базой аннотированных аминокислотных последовательностей, взятых из референсного генома, а также баз фунгицидных и ин-

Таблица 1. Результаты первичного анализа таксономического состава исследуемых образцов и последующего биннинга

Образец	Вид по Metaphlan, доля прочтений, %	Номер бина, полнота бина, %	Вид по TCS
BZR 1159	*Brevundimonas naejangsanensis*, 100	1) 001 – 38.3 2) 002 – 57.9	1) *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858 2) *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858
BZR 162	*Ochrobactrum quorumnocens*, 78.9 Unclassified, 21.1	2) 002 – 87.9	2) *Ochrobactrum quorumnocens* A44
BZR 201	*Leucobacter aridicollis*, 56.1 Unclassified, 43.5 *Paenochrobactrum gallinarii*, 0.4	1) 001 – 95.3 2) 002 – 99.1	1) *Leucobacter aridicollis* L-9 2) *Paenochrobactrum glaciei* JCM 15115
BZR 206	*Leucobacter aridicollis*, 90.5 Unclassified, 9.5	1) 001 – 95.3 2) 002 – 75.7	1) *Leucobacter aridicollis* DSM 17380 2) *Leucobacter chinensis* NC76-1
BZR 278	*Alcaligenes faecalis*, 92.7 *Brevundimonas naejangsanensis* 0.4 Unclassified, 7.3	1) 001 – 100	1) *Alcaligenes nematophilus* A-TC2
BZR 466	*Leucobacter aridicollis*, 69.8 *Brevundimonas naejangsanensis*, 19.3 Unclassified, 11.5	1) 001 – 95.3 2) 002 – 95.3	1) *Leucobacter aridicollis* DSM 17380 2) *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858
BZR 585	*Alcaligenes faecalis*, 91.1 Unclassified, 8.9	1) 001 – 100	1) *Alcaligenes nematophilus* A-TC2
BZR 588	Unclassified, 95.8 *Paenochrobactrum gallinarii* SGB85919, 4.2	1) 001 – 99.1 2) 002 – 94.4 3) 003 – 84.1	1) *Paenochrobactrum glaciei* JCM 15115 2) *Leucobacter chinensis* NC76-1 3) *Leucobacter komagatae* DSM 8803
BZR 635	Unclassified, 99.9 *Mesorhizobium hungaricum* SGB11031, 0.1	1) 001 - 38.3 2) 002 – 57.9	1) *Leucobacter* sp. G161 2) *Leucobacter* sp. G161 (*Leucobacter komagatae*)
BZR 736	*Bacillus cereus*, 87 Unclassified, 13	1) 002 – 99.1	1) *Bacillus cereus* BAG1O-3
BZR 762	*Alcaligenes faecalis*, 92.1 Unclassified, 7.9	1) 001 – 64.5 2) 002 – 35.5	1) *Alcaligenes nematophilus* A-TC2 2) *Alcaligenes nematophilus* A-TC2
BZR 920	*Bacillus velezensis*, 100	1) 001 – 51.4 2) 002 – 46.7	1) *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 2) *Bacillus velezensis* OB9
BZR 926	*Achromobacter* sp. MYb9, 47.9 Unclassified, 52.1	1) 001 – 74.8 2) 002 – 26.2	1) *Achromobacter marplatensis* B2 2) *Achromobacter marplatensis* HLE
BZR 936	*Bacillus velezensis*, 100	1) 001 – 45.8 2) 002 – 54.2	1) *Bacillus amyloliquefaciens* EGD-AQ14 2) *Bacillus velezensis* OB9

Примечание. Сохранено соответствие нумерации бинов в третьем и четвертом столбцах.

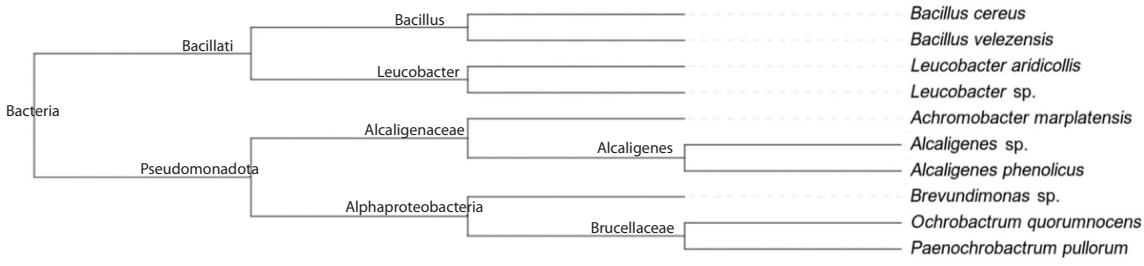


Рис. 2. Общее таксономическое дерево видов, представленных в образцах и взятых в дальнейший анализ.

сектицидных белков. Всего составлено 10 баз, поскольку для ряда штаммов референсные геномы совпадали. Так, для штаммов BZR 201, BZR 206 и BZR 466 референсом является GCF_024806925.1, для BZR 201P и BZR 588 – GCF_041929845.1, для BZR 278 и BZR 762 – GCF_030515105.1, для BZR 920 и BZR 936 – GCF_014230015.1. Для остальных образцов использовались индивидуальные пользовательские базы.

Информация по аннотации геномов бактерий в сравнении с соответствующим референсным геномом приведена в табл. 4. В последнем столбце указана доля предсказанных белков относительно всех генов, предсказанных в геноме, оставшаяся часть проаннотирована как ‘hypothetical protein’. Несмотря на то, что для геномов BZR 635 и BZR 926 показатель Genome fraction был низок, мы использовали эти референсы в качестве аннотации.

Таблица 2. Результаты итоговой таксономической идентификации с указанием NCBI идентификатора ближайшего референсного генома

№ п/п	Штамм	Таксономическая идентичность	Ближайший родственный штамм	Ближайший референсный геном
1	BZR 588	*Paenochrobactrum pullorum*	LMG 28095	GCF_041929845.1
2	BZR 1159	*Brevundimonas* sp.	LPMIX5	GCF_003576505.1
3	BZR 920	*Bacillus velezensis*	X-Bio_1	GCF_014230015.1
4	BZR 936	*Bacillus velezensis*	X-Bio_1	GCF_014230015.1
5	BZR 206	*Leucobacter aridicollis*	JUb111	GCF_024806925.1
6	BZR 926	*Achromobacter marplatensis*	LMG 26219	GCF_902859635.1
7	BZR 466	*Leucobacter aridicollis*	JUb111	GCF_024806925.1
8	BZR 736	*Bacillus cereus*	CMCC P0011	GCF_001635955.1
9	BZR 635	*Leucobacter* sp.	G161	GCF_001482305.1
10	BZR 762	*Alcaligenes* sp.	YSL9	GCF_030515105.1
11	BZR 278	*Alcaligenes* sp.	YSL9	GCF_030515105.1
12	BZR 201	*Leucobacter aridicollis*	JUb111	GCF_024806925.1
13	BZR 201P*	*Paenochrobactrum pullorum*	LMG 28095	GCF_041929845.1
14	BZR 162	*Ochrobactrum quorumnocens*	A44	GCF_002278035.1
15	BZR 585	*Alcaligenes phenolicus*	JC896	GCF_040430305.1

* Поскольку из образца BZR 201 удалось выделить два генома, то второй штамм, относящийся к *Paenochrobactrum pullorum*, обозначен как BZR 201P.

Таблица 3. Характеристики финальной сборки геномов и показатели референсных геномов

№ п/п	Штамм	Длина сборки референса	CG состав референса, %	Genome fraction, %	Duplication ratio	Число контигов, шт.	Наибольший контиг, п. н.	Общая длина сборки, п. н.	N50	L50	CG состав, %
1	BZR 1159	3144717	66.41	87.420	1.000	239	82719	2772387	19497	39	67.17
2	BZR 162	4593578	53.41	88.176	1.002	60	487021	4079562	225616	6	53.23
3	BZR 201	3459535	67.32	93.609	1.000	10	783893	3424442	486624	3	67.45
4	BZR 201P	3664841	48.45	89.886	1.001	53	510935	3452129	153809	7	48.47
5	BZR 206	3459535	67.32	93.600	1.000	13	1015594	3387765	424194	3	67.51
6	BZR 278	4098772	56.49	95.093	1.000	12	1448095	4159417	406907	3	56.45
7	BZR 466	3459535	67.32	93.743	1.005	15	562204	3459663	424178	4	67.37
8	BZR 585	4121371	56.49	94.610	1.000	7	1900810	4183792	871829	2	56.42
9	BZR 588	3664841	48.45	85.527	1.029	60	412949	3238581	144220	8	48.54
10	BZR 635	3554188	65.32	4.274	1.001	69	181203	3024800	66004	16	66.43
11	BZR 736	6097988	34.94	85.014	1.010	16	1408346	5366477	760581	3	35.03
12	BZR 762	4098772	56.49	95.136	1.000	63	486891	3921546	118193	10	56.60
13	BZR 920	3861135	46.54	95.678	0.999	70	267487	3714855	123313	10	46.84
14	BZR 926	6885835	65.11	1.511	1.001	43	737359	6214265	318995	7	64.92
15	BZR 936	3861135	46.54	95.657	1.000	74	283481	3714091	123326	10	46.85

Анализ генного репертуара с помощью GenAPI показал различия между анализируемыми штаммами и использованными референсными геномами (рис. 3).

Были аннотированы геномы бактерий, а также проведен анализ генного репертуара каждого генома относительно соответствующих референсных геномов. Анализ пересечений множеств генов для разных образцов показал различные результаты. Например, высокое соответствие с референсом продемонстрировали штаммы BZR 920 и BZR 936 относительно *B. velezensis* и штаммы BZR 206, BZR 466 и BZR 201 относительно *L. aridicollis*. При этом выявление 160 генов только у референсного генома

Таблица 4. Характеристики аннотаций геномов бактерий из анализируемых образцов в сопоставлении с соответствующими референсными геномами

Штамм/референс	Идентификатор	Общая длина сборки, п. н.	Количество генов, шт.	CDS, шт.	Предсказанные белки, %
Штамм	BZR 1159	2772387	2692	2655	79.16
Референс	GCF_003576505.1	3144717	3026	2953	83.58
Штамм	BZR 162	4079562	3831	3786	78.86
Референс	GCF_002278035.1	4593578	5344	5118	95.92
Штамм	BZR 201	3424442	3088	3034	80.47
	BZR 206	3387765	3052	2997	81.26
	BZR 466	3459663	3147	3092	79.41
Референс	GCF_024806925.1	3459535	3152	3079	81.63
Штамм	BZR 201P	3452129	3277	3227	84.50
	BZR 588	3238581	3031	2991	86.26
Референс	GCF_041929845.1	3664841	3523	3355	89.64
Штамм	BZR 278	4159417	3862	3807	85.81
	BZR 762	3922022	3606	3551	89.57
Референс	GCF_030515105.1	4098772	3753	3677	93.15
Штамм	BZR 585	4184220	3863	3807	85.63
Референс	GCF_040430305.1	4121371	3752	3679	93.58
Штамм	BZR 635	3024800	2707	2652	77.39
Референс	GCF_001482305.1	3554188	3404	3285	85.40
Штамм	BZR 736	5366477	5456	5407	79.73
Референс	GCF_001635955.1	6097988	6148	5781	87.64
Штамм	BZR 920	3715092	3643	3579	88.28
	BZR 936	3714897	3640	3570	88.41
Референс	GCF_014230015.1	3861135	3828	3691	92.74
Штамм	BZR 926	6214265	5705	5638	85.17
Референс	GCF_902859635.1	6885835	6393	6280	90.94

B. velezensis, но не в исследованных штаммах этого вида может быть связано как с фрагментированностью сборки геномов BZR 920 и BZR 936, так и с накопленными изменениями в последовательностях, на основе гомологии которых оценивается отсутствие и присутствие генов. Также возможно, что эти штаммы действительно не имеют некоторых генов относительно выбранного референсного генома. Данные рассуждения применимы ко всем результатам, представленным на рис. 3.

Высокую степень соответствия между генным репертуаром исследованных штаммов и соответствующих референсных геномов показали также BZR 585 относительно *A. phenolicus*, BZR 762 и BZR 278 относительно *Alcaligenes* sp., BZR 588 и BZR 201P относительно *P. pullorum*. Кроме того, хорошая степень соответствия выявлена у BZR 736 относительно *B. cereus*, BZR 1159 относительно *Brevundimonas* sp. и BZR 162 относительно *O. quorumnocens*. В то же время BZR 926 показывает лишь средний уровень соответствия референсному геному *A. marplatensis*, а BZR 635 при сравнении с ближайшим к нему референсным геномом *Leucobacter* sp. имеет лишь незначительное число пересечений, что может быть связано как с отличной таксономической идентичностью, так и с фрагментированностью сборки генома данного штамма.

Сравнение штаммов, анализ их инсектицидного и фунгицидного потенциала

Ниже приведены результаты анализа инсектицидного (рис. 4) и фунгицидного (Приложение 5) потенциала исследуемых штаммов на основе сравнения их белковых репертуаров с соответствующей функциональной активностью. Тепловые карты отражают результаты поиска фунгицидных и инсектицидных белков среди наших штаммов в виде iScore, представляющего собой степень сходства, взвешенную долей выравненного участка от всей длины референсного белка (см. Материалы и методы).

Во всех проанализированных штаммах был обнаружен ген, кодирующий шаперонин GroEl (см. рис. 4). При этом у образцов, относящихся к роду *Bacillus* (BZR 736, BZR 920, BZR 936), найдено наибольшее количество генов, ко-

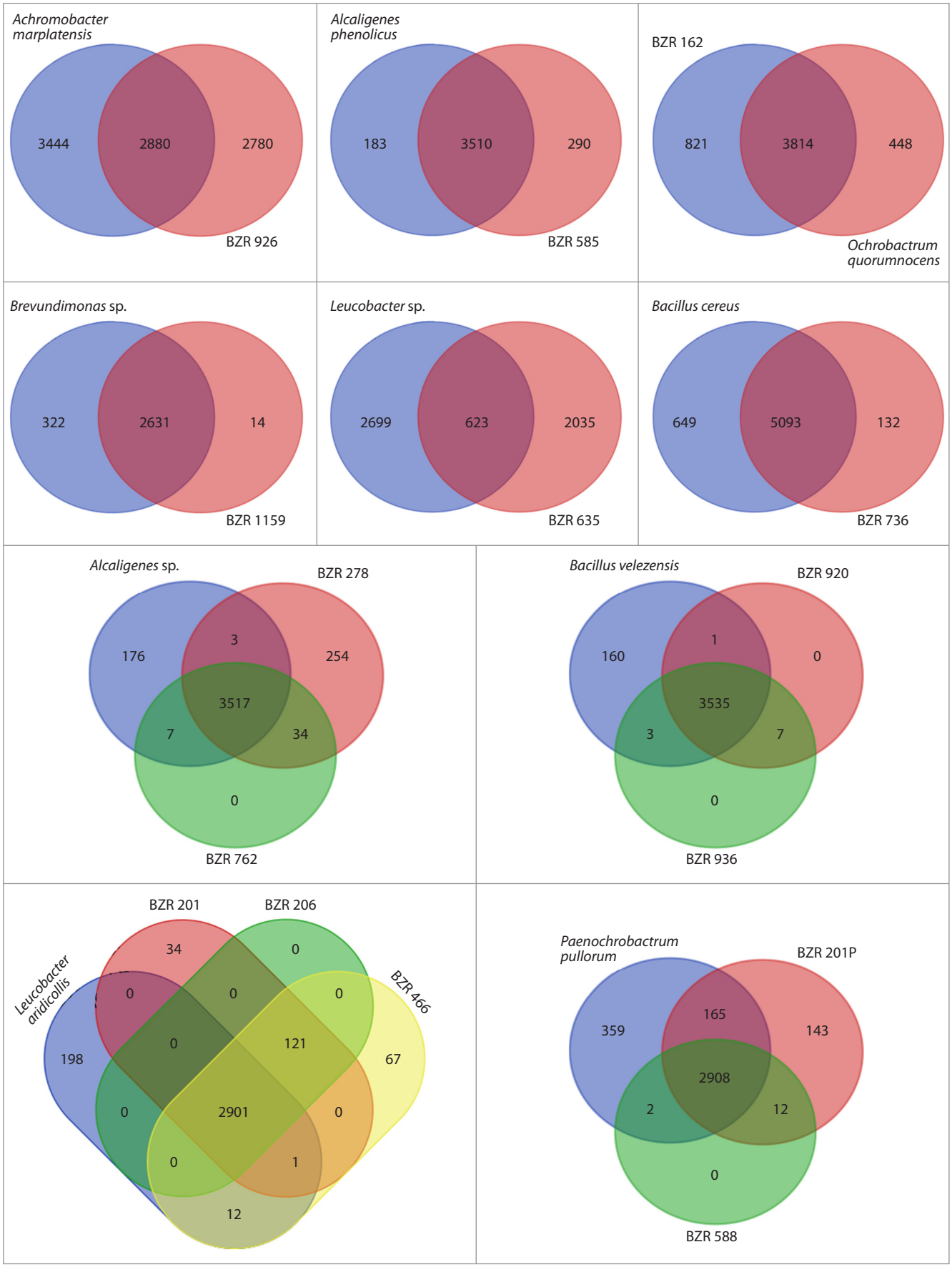


Рис. 3. Диаграммы Венна для множеств генов исследуемых штаммов, сгруппированных по видовой принадлежности, проанализированные совместно с множествами генов из соответствующих референсных геномов.

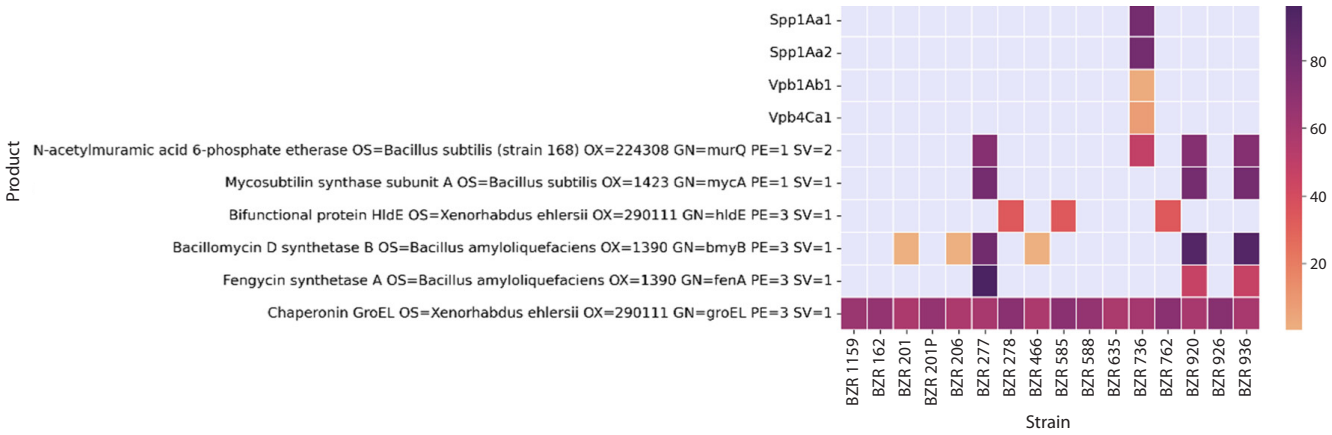


Рис. 4. Репертуар белков, отобранных в ходе попарного выравнивания транслированных геномов исследуемых штаммов на базу инсектицидных белков.

Цветовая шкала отражает параметр iScore (см. уравнение 1), т. е. чем интенсивнее цвет, тем более полно последовательность из рассматриваемого генома выравнивалась на аминокислотную последовательность белка из базы. Отсутствующие белки отмечены серым цветом. При построении тепловой карты использованы значения из Приложения 4.

дирующих инсектицидные белки. Штаммы BZR 920 и BZR 936, являющиеся представителями *B. velezensis*, демонстрируют наличие синтетаз фенгицина, микосубтилина и бацилломицина, тогда как BZR 736, относящийся к *B. cereus*, обладает генами Spp1Aa1 и Spp1Aa2, а также Vpb1Ab1 и Vpb4Ca1. При этом все проанализированные штаммы рода *Bacillus* также содержат ген, кодирующий фермент N-ацетилмурамовую кислоту 6-фосфатэстеразу (EC 4.2.1.126). Кроме того, штаммы BZR 278, BZR 585 и BZR 762, относящиеся к роду *Alcaligenes*, имеют фрагменты, гомологичные гену бифункционального белка HldE, а штаммы BZR 201, BZR 206 и BZR 466, представляющие *Leucobacter aridicollis*, содержат ряд фрагментов, гомологичных генам синтетазы бацилломицина.

Были выявлены белки с фунгицидным действием (см. Приложение 5; построение тепловой карты основано на значениях, указанных в Приложении 6) у образцов, относящихся к роду *Bacillus* (BZR 736, BZR 920, BZR 936). Можно видеть, что наиболее полные белки, совпавшие с последовательностями из базы, присутствуют у двух образцов: BZR 920 и BZR 936, относящихся к *B. velezensis*. Также эти образцы лидируют по количеству найденных белков. Поскольку большинство последовательностей в базе аминокислотных последовательностей фунгицидных белков относилось к видам *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens*, то нахождение белков у этих двух образцов является логичным. Перевес данных в собранной базе аминокислотных последовательностей, относящихся к *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens*, произошел в результате преобладания данных по итуринам, фенгицинам и сурфактинам *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* относительно других видов рода *Bacillus* в базах UniprotDB и NCBI Protein. Тем не менее гены, кодирующие итурин синтетазы, а также *YxjF* и *YxjC*, были найдены также у штамма, относящегося к *B. cereus* (BZR 736), притом что в отличие от прочих проанализированных штаммов BZR 736 не имеет гена *ScoA*, который наряду со *ScoB* присутствует во всех исследуемых штаммах. Кроме того, штаммы BZR 201, BZR 206 и BZR 466, представляющие *L. aridicollis*, содержат ряд фрагментов, гомологичных генам синтетаз итуринов и фенгицинов. Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что геномы всей клады представителей семейства Brucellaceae (штаммы BZR 162, BZR 588 и BZR 201P) не содержат генов, кодирующих фунгицидные белки, представленные в нашей базе.

Филогенетический анализ

Для построения филогенетического дерева был осуществлен поиск набора из 120 маркерных генов бактерий с помощью GTDB-Tk у всех исследуемых образцов, а также выполнено множественное выравнивание по последовательностям данных белков, которое подавалось на вход для построения дерева (рис. 5). В качестве аутгруппы использовались белки из *Gemmata obscuriglobus* (GCF_003149495.1).

Отметим, что построенное филогенетическое дерево (см. рис. 5) полностью отражает топологию приведенного ранее таксономического дерева (см. рис. 2), на относительном уровне подтверждая корректность установленной таксономической идентичности. При этом последовательности генов, по которым строится дерево, идентичны у штаммов BZR 762 и BZR 278, а также у тройки штаммов BZR 466, BZR 206, BZR 201. Это говорит о том, что первые относятся к одному виду рода *Alcaligenes*, а вторые – к *Leucobacter aridicolis*.

Обсуждение

Изучение эндофитных бактерий сельскохозяйственно значимых культурных растений представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит регулировать популяции вредителей и эффективно бороться с болезнями растений, возникающими при взаимодействии с патогенами. Поэтому особенно важно выявлять штаммы, которые обладают фунгицидным и инсектицидным потенциалом.

На сегодняшний день известны следующие антагонистические свойства бактерий-эндофитов для изученных

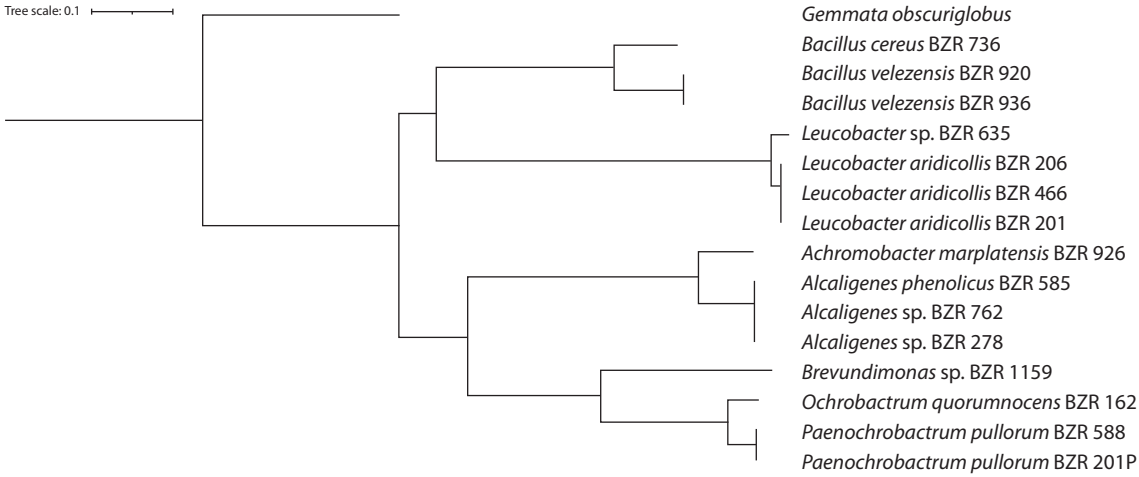


Рис. 5. Филогенетическое дерево исследуемых штаммов, построенное по найденным генам из набора 120 маркерных генов бактерий. В качестве аутгруппы выступает *Gemmata obscuriglobus*.

родов (здесь мы приводим те рода бактерий, относительно которых нами была проведена таксономическая идентификация геномов).

***Bacillus* spp.** Геномы бактерий рода *B. velezensis* содержат девять ключевых кластеров NRPS/PKS, синтезируемые липопептиды (итурин, фенгицин, сурфактин) и поликетиды (деффицидин, макролактин), способные подавлять фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Bipolaris*, *Exserohilum* и др. как *in vitro*, так и *in vivo* (Wang S. et al., 2024; Yeo et al., 2024). Сурфактин, итурин и фенгицин могут действовать как энтомо- и нематоциды. Так, отмечена высокая гибель (до 100 %) личинок комара *Aedes aegypti*, щелкунов *Agriotes lineatus*, а чистый сурфактин вызывает системные нарушения в метаболизме у гусениц азиатской хлопковой совки *Spodoptera litura* (Falqueto et al., 2021; Zhang F. et al., 2024; Knežević et al., 2025).

***Alcaligenes* spp.** У бактерий *A. faecalis* открыт бинарный белок AfIP-1A/1B, способный образовывать поры в кишечнике личинок западного кукурузного жука *Diabrotica virgifera*, в том числе у резистентных к *B. thuringiensis* популяций насекомых. Некоторые штаммы продуцируют экзопротеазу, вызывающую гибель галловой нематоды *Meloidogyne incognita* и почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*. Штамм *A. faecalis* N1-4 способен продуцировать диметилдисульфид и метилизовалерат, ингибирующий рост гриба *Aspergillus flavus* и снижающий количество микотоксинов в зерне при хранении (Ju et al., 2016; Gong et al., 2019; Pérez Ortega et al., 2021).

***Achromobacter* spp.** Почвенный штамм *A. xylosoxidans* вызывает гибель 95 % личинок и 100 % взрослых особей комнатной мухи *Musca domestica.* Летучие эфиры (S-метилтиобутират, ацетаты) снижали численность галловой нематоды *M. javanica* и на 60 % подавляли образование галлов на томате. Эндофитный штамм CTA8689 снижает на 60 % увядание дыни, вызванное *Fusarium oxysporum*/*F. solani*, в теплице благодаря сидерофорам и эстеразам (Yamaç et al., 2010; Dhaouadi et al., 2019; Deng et al., 2022; Mohamadpoor et al., 2022).

***Brevundimonas* spp.** *B. diminuta* YYC02 продуцировала 42 летучих вещества, из которых бутил-2-метилбутаноат и изоамилбутират вызывали 90–100 % гибель галловой нематоды *Meloidogyne javanica* за 48 ч, а обработка почвы снижала количество галлов на 37 % и увеличивала массу побегов огурца (Sun et al., 2023). *Brevundimonas* входит в ядро микробиома энтомопатогенных нематод (Steinernema, Meloidogyne) и активно адгезирует к кутикуле J2-личинок, повышая их смертность и снижая вылупление яиц, что косвенно подтверждает анти-PPN-активность рода (Topalović et al., 2019). Хотя классических Cry/Cyt-токсинов у *Brevundimonas* не обнаружено, у *B. diminuta* подробно изучена мембранная органофосфатгидролаза, позволяющая штамму использовать инсектициды-фосфорорганику как источник фосфора; фермент локализован в периплазме с помощью Tat-сигнала (Parthasarathy et al., 2016).

***Leucobacter* spp.** Два штамма, Verde1/Verde2, вызывают гибель нематод при помощи редкого механизма, когда липкий экзополимер склеивает хвосты нематод в «звезды», что приводит к гибели колонии. Устойчивость нематод к этим штаммам контролируется отдельными генами, что подчеркивает специализированную вирулентность рода. Штамм *L. aridicollis* SASBG215 ингибирует антракноз огурца *Colletotrichum orbiculare* и вызывает лизис гиф, предположительно с помощью неизвестных поликетидов (Hodgkin et al., 2013; Abdul Salam et al., 2022).

***Ochrobactrum* spp.** Штамм BS-206 синтезирует гликолипид охрозин, обеспечивающий 90–100 % гибель вредителей хранилищ (*Tribolium*, *Sitophilus*, *Callosobruchus*) и инсектицидное действие против кукурузной совки *Spodoptera.* Штамм *O. pseudogrignonense* NC1 продуцирует диметилдисульфид и бензальдегид, которые вызывают гибель до 100 % молодых особей *M. incognita* и снижают образование галлов томатов более чем на 60 % (Kumar et al., 2014; Yang T. et al., 2022).

Приведенный краткий обзор демонстрирует наличие широкого спектра действующих веществ, эффективных в отношении различных патогенов. Это может вносить сложность в массовый анализ, но демонстрирует перспективы для будущих исследований малоизученных эндофитов, которые могут обладать схожими свойствами.

В настоящей статье мы представили 15 геномов бактерий-эндофитов, которые были выделены из разных частей пшеницы, сои и рапса. Мы показали наличие генов, отвечающих за инсектицидное и фунгицидное действие у исследуемых штаммов, причем наибольшее количество генов, кодирующих инсектицидные и фунгицидные белки, было найдено в штаммах BZR 736, BZR 920, BZR 936 рода *Bacillus*. В то же время для штаммов BZR 162, BZR 588 и BZR 201P представителей семейства Brucellaceae не выявлены гены, кодирующие фунгицидные белки, представленные в нашей базе.

Это может говорить о нескольких факторах: бактерии рода *Bacillus* более изучаемые и публикуемые, и, соответственно, в базе существует перекос данных по инсектицидным и фунгицидным белкам по этому роду. Поэтому при интерпретации полученных результатов относительно данных по менее представленным родам мы делаем оговорку, что наличие таких белков возможно в изучаемых геномах, однако их последовательности намного отличаются от публично доступных последовательностей, которые мы смогли агрегировать в базу. Тем не менее перекос последовательностей по роду *Bacillus* не влияет на поиск белков с инсектицидными и фунгицидными свойствами. Также в литературе мало агрегируемой информации по инсектицидным и фунгицидным белкам, что подтверждает необходимость формирования баз данных по белкам, связанным с инсектицидными и фунгицидными свойствами.

Полученные в настоящем исследовании геномные данные согласуются с результатами биотестов, ранее проведенных для части изученных штаммов. Согласно первичному скринингу, из биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР были выявлены штаммы с выраженной энтомопатогенной активностью: в отношении большой восковой моли *Galleria mellonella* максимальную эффективность показали штаммы BZR 1159, BZR 588, BZR 936, BZR 206, BZR 920, BZR 926 и BZR 277 (65–95 % особей гибло на третьи сутки и 83–95 % – на пятые сутки) (Гырнец (Бондарчук), Асатурова, 2022). В отношении большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* высокую эффективность продемонстрировали штаммы BZR 201, BZR 278, BZR 1159, BZR 635, BZR 762, BZR 736 (72–98 % гибло на третьи сутки, 81–99 % – на пятые сутки). Кроме того, оценена потенциальная полифункциональность штаммов BZR 1159, BZR 936 и BZR G3, которые проявили инсектицидную активность (до 95.5 %) в отношении природной популяции яблонной плодожорки *Cydia pomonella*, а также фунгицидное действие (до 84.8 %) против возбудителей болезней яблони родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichothecium* с ингибированием мицелия (Гырнец (Бондарчук), Асатурова, 2022; Гырнец, Асатурова, 2023). Следует отметить штамм BZR 936, обладающий как инсектицидными, так и фунгицидными свойствами, что напрямую соотносится с выявленными у него генами синтетаз липопептидов (итуринов, фенгицинов, сурфактинов) и другими маркерами биоконтроля. Таким образом, сопоставление геномного состава с экспериментальными биотестами подтверждает, что наличие специфических генов инсектицидных белков и кластеров липопептидсинтетаз является надежным индикатором биоконтрольного потенциала штаммов. Это открывает перспективы для их дальнейшего включения в программы разработки биопрепаратов с целью защиты сельскохозяйственных культур.

Заключение

Представлены таксономическая идентификация, сборки и аннотации 15 геномов бактерий-эндофитов, образцы которых были получены из корней и/или листьев пшеницы, сои и рапса.

Таксономически штаммы BZR 736, BZR 920 и BZR 936 относятся к роду *Bacillus*, штаммы BZR 635, BZR 466, BZR 206 и BZR 201 – к роду *Leucobacter*, остальные штаммы – к филуму Pseudomonadota. Филогенетическое дерево, построенное по найденным генам из набора 120 маркерных генов бактерий, полностью отражает топологию приведенного нами таксономического дерева, что на относительном уровне подтверждает корректность установленной таксономической идентичности.

Сборка геномов осуществлялась в два этапа: предварительный этап первичной сборки геномов и гибридный (*de novo* + reference-guided) каскадный подход на основе множества близкородственных референсов. Аннотация геномов проведена с учетом подготовленных в рамках данного исследования баз последовательностей белков с инсектицидными, включая базу BPPRC, и фунгицидными свойствами, а также наиболее полных из известных аннотаций геномов соответствующего вида/рода.

Анализ генного репертуара показал различия между анализируемыми штаммами и использованными референсными геномами. Высокую степень соответствия между генным репертуаром исследованных штаммов и соответствующих референсных геномов продемонстрировали: BZR 585 относительно *A. phenolicus*, BZR 762 и BZR 278 относительно *Alcaligenes* sp., BZR 588 и BZR 201P относительно *P. pullorum*, штаммы BZR 920 и BZR 936 относительно *B. velezensis*, штаммы BZR 206, BZR 466 и BZR 201 относительно *L. aridicollis*. Данный показатель также может подтверждать корректность установленной таксономической идентичности. В то же время BZR 635 при сравнении с ближайшим к нему референсным геномом *Leucobacter* sp. имеет лишь незначительное число пересечений, что может быть связано как с отличной таксономической идентичностью, так и с фрагментированностью сборки генома этого штамма.

Мы показали наличие генов, кодирующих фунгицидные и инсектицидные белки, во всех штаммах, за исключением BZR 162, BZR 588 и BZR 201P. Для них не были выявлены гены, кодирующие фунгицидные белки, представленные в нашей базе. Однако полученные результаты позволяют утверждать, что исследуемые штаммы, обладающие комплексом генов липопептидсинтетаз и инсектицидных токсинов, демонстрируют экспериментально подтвержденный широкий спектр биологической активности против насекомых и фитопатогенов.

Дальнейшее прицельное изучение бактерий-эндофитов с фунгицидными и инсектицидными генами открывает перспективы для выявления кандидатов в агенты биоконтроля различных патогенов и использования бактерий в защите сельскохозяйственных растений.

Список литературы / References

Гырнец (Бондарчук) Е.Ю., Асатурова А.М. Скрининг штаммов бактерий по критерию энтомопатогенной активности в отношении *Galleria mellonella* L. и *Tenebrio molitor* L. *Достижения науки и техники АПК*. 2022;36(3):53-60. doi 10.53859/02352451_2022_36_3_53

[Gyrnets (Bondarchuk) E.Yu., Asaturova A.M. Screening of bacterial strains on the criterion of entomopathogenic activity against *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor* L. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2022;36(3):53-60. doi 10.53859/02352451_2022_36_3_53 (in Russian)]

Гырнец Е.Ю., Асатурова А.М. Изучение полифункциональных свойств перспективных бактериальных агентов в отношении фитофагов и возбудителей болезней плодового ценоза. *Достижения науки и техники АПК*. 2023;37(5):39-45. doi 10.53859/02352451_2023_37_5_39

[Gyrnets E.Yu., Asaturova A.M. Study of the polyfunctional properties of promising bacterial agents in relation to phytophages and pathogens of fruit cenosis. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2023;37(5):39-45. doi 10.53859/02352451_2023_37_5_39 (in Russian)]

Abdul Salam S., Parthiban V.K., Paranidharan V., Johnson I., Karthikeyan M., Kavitha C. *Leucobacter aridicollis* strain SASBG215: a novel biocontrol agent against *Colletotrichum orbiculare*. *Biol Forum Int J.* 2022;14(2):905-911

Ali M.A., Ahmed T., Ibrahim E., Rizwan M., Chong K.P., Yong J.W.H. A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria in biocontrol of plant pathogenic fungi and their plant growth-promoting activities. *Heliyon*. 2024;10(11):e31573. doi 10.1016/j.heliyon.2024.e31573

Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., … Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-477. doi 10.1089/cmb.2012.0021

Bateman A., Martin M.J., Orchard S., Magrane M., Agivetova R., Ahmad S., Alpi E., … Vinayaka C.R., Wang Q., Wang Y., Yeh L.S., Zhang J. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D480-D489. doi 10.1093/nar/gkaa1100

Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A.F., Murphy L., Quail M.A., Holden M.T.G., Harris D., Zaritsky A., Parkhill J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(10):5082-5095. doi 10.1128/AEM.68.10.5082-5095.2002

Blanco-Míguez A., Beghini F., Cumbo F., McIver L.J., Thompson K.N., Zolfo M., Manghi P., … Franzosa E.A., Pasolli E., Asnicar F., Huttenhower C., Segata N. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Nat Biotechnol.* 2023;41(11):1633-1644. doi 10.1038/s41587-023-01688-w

Bolotin A., Gillis A., Sanchis V., Nielsen-LeRoux C., Mahillon J., Lereclus D., Sorokin A. Comparative genomics of extrachromosomal elements in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Res Microbiol.* 2017;168(4):331-344. doi 10.1016/j.resmic.2016.10.008

Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database. *Bioinformatics*. 2022;38(23):5315-5316. doi 10.1093/bioinformatics/btac672

Chen S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta*. 2023;2(2):e107. doi 10.1002/imt2.107

Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884-i890. doi 10.1093/bioinformatics/bty560

Dai R., Zhang J., Liu F., Xu H., Qian J.-M., Cheskis S., Liu W., … de Jonge R., Pieterse C.M.J., Levy A., Schlaeppi K., Bai Y. Crop root bacterial and viral genomes reveal unexplored species and microbiome patterns. *Cell*. 2025;188(9):2521-2539.e22. doi 10.1016/j.cell.2025.02.013

Deng X., Wang X., Li G. Nematicidal effects of volatile organic compounds from microorganisms and plants on plant-parasitic nematodes. *Microorganisms*. 2022;10(6):1201. doi 10.3390/microorganisms10061201

Dhaouadi S., Rouissi W., Mougou-Hamdane A., Nasraoui B. Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* against *Fusarium* wilt of melon. *Eur J Plant Pathol.* 2019;154(2):179-188. doi 10.1007/s10658-018-01646-2

Falqueto S.A., Pitaluga B.F., de Sousa J.R., Targanski S.K., Campos M.G., de Oliveira Mendes T.A., da Silva G.F., Silva D.H.S., Soares M.A. *Bacillus* spp. metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. *J Invertebr Pathol.* 2021;179:107525. doi 10.1016/j.jip.2020.107525

Gabrielaite M., Marvig R.L. GenAPI: a tool for gene absence-presence identification in fragmented bacterial genome sequences. *BMC Bioinformatics*. 2020;21(1):320. doi 10.1186/s12859-020-03657-5

Gong A.-D., Wu N.-N., Kong X.-W., Zhang Y.-M., Hu M.-J., Gong S.-J., Dong F.-Y., Wang J.-H., Zhao Z.-Y., Liao Y.-C. Inhibitory effect of volatiles emitted from *Alcaligenes faecalis* N1-4 on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in storage. *Front Microbiol.* 2019;10:1419. doi 10.3389/fmicb.2019.01419

Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59(3):307-321. doi 10.1093/sysbio/syq010

Guizelini D., Raittz R.T., Cruz L.M., Souza E.M., Steffens M.B.R., Pedrosa F.O. GFinisher: a new strategy to refine and finish bacterial genome assemblies. *Sci Rep.* 2016;6(1):34963. doi 10.1038/srep34963

Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. doi 10.1093/bioinformatics/btt086

Guyomar C., Delage W., Legeai F., Mougel C., Simon J.-C., Lemaitre C. MinYS: mine your symbiont by targeted genome assembly in symbiotic communities. *NAR Genom Bioinform.* 2020;2(3):lqaa047. doi 10.1093/nargab/lqaa047

Hamane S., El Yemlahi A., Hassani Zerrouk M., El Galiou O., Laglaoui A., Bakkali M., Arakrak A. Plant growth promotion and biocontrol potentiality of endophytes isolated from root nodules of *Sulla flexuosa* L. plants. *Int J Agron.* 2023;2023(1):1-9. doi 10.1155/2023/2451806

Hodgkin J., Félix M.-A., Clark L.C., Stroud D., Gravato-Nobre M.J. Two *Leucobacter* strains exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star formation. *Curr Biol.* 2013;23(21):2157-2161. doi 10.1016/j.cub.2013.08.060

Horwich A.L., Fenton W.A., Chapman E., Farr G.W. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23(1):115-145. doi 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123555

Hussain H.S., Tabbasum S., Mahreen N., Yahya M., Ejaz K., Aslam Z., Imtiaz M., ul Islam E., Sajid Z.I., Yasmin S. Integrated application of drought-tolerant phosphate solubilizing bacteria and native P source improves P availability with sustainable wheat production. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2025;25(2):4723-4746. doi 10.1007/s42729-025-02425-9

Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun.* 2018;9(1):5114. doi 10.1038/s41467-018-07641-9

Ju S., Lin J., Zheng J., Wang S., Zhou H., Sun M. *Alcaligenes faecalis* ZD02, a novel nematicidal bacterium with an extracellular se-

rine protease virulence factor. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(7): 2112-2120. doi 10.1128/AEM.03444-15

Knežević M., Dervišević M., Jovković M., Jevđenović G., Maksimović J., Buntić A. Versatile role of *Bacillus velezensis*: biocontrol of *Fusarium poae* and wireworms and barley plant growth promotion. *Biol Control*. 2025;206:105789. doi 10.1016/j.biocontrol.2025.105789

Kolmogorov M., Raney B., Paten B., Pham S. Ragout – a reference-assisted assembly tool for bacterial genomes. *Bioinformatics*. 2014; 30(12):i302-i309. doi 10.1093/bioinformatics/btu280

Krzyżanowska D.M., Maciąg T., Ossowicki A., Rajewska M., Kaczyński Z., Czerwicka M., Rąbalski Ł., Czaplewska P., Jafra S. *Ochrobactrum quorumnocens* sp. nov., a quorum quenching bacterium from the potato rhizosphere, and comparative genome analysis with related type strains. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210874. doi 10.1371/journal.pone.0210874

Kumar C.G., Sujitha P., Mamidyala S.K., Usharani P., Das B., Reddy C.R. Ochrosin, a new biosurfactant produced by halophilic *Ochrobactrum* sp. strain BS-206 (MTCC 5720): purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochem.* 2014; 49(10):1708-1717. doi 10.1016/j.procbio.2014.07.004

Kupper M., Gupta S.K., Feldhaar H., Gross R. Versatile roles of the chaperonin GroEL in microorganism-insect interactions. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;353(1):1-10. doi 10.1111/1574-6968.12390

Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(W1):W78-W82. doi 10.1093/nar/gkae268

Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv*. 2013. doi 10.48550/arXiv.1303.3997

Liu Y., Yin C., Zhu M., Zhan Y., Lin M., Yan Y. Comparative genomic analysis of *Bacillus velezensis* BRI3 reveals genes potentially associated with efficient antagonism of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Genes* (*Basel*). 2024;15(12):1588. doi 10.3390/genes15121588

Mohamadpoor M., Amini J., Ashengroph M., Azizi A. Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* strain CTA8689 against common bean root rot. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2022;117:101769. doi 10.1016/j.pmpp.2021.101769

Panneerselvam S., Mishra R., Berry C., Crickmore N., Bonning B.C. BPPRC database: a web-based tool to access and analyse bacterial pesticidal proteins. *Database*. 2022;2022:baac022. doi 10.1093/database/baac022

Parthasarathy S., Parapatla H., Nandavaram A., Palmer T., Siddavattam D. Organophosphate hydrolase is a lipoprotein and interacts with P_i-specific transport system to facilitate growth of *Brevundimonas diminuta* using OP insecticide as source of phosphate. *J Biol Chem.* 2016;291(14):7774-7785. doi 10.1074/jbc.M116.715110

Pellegrinetti T.A., Monteiro G.G.T.N., Lemos L.N., dos Santos R.A.C., Barros A.G., Mendes L.W. *PGPg_finder*: a comprehensive and user-friendly pipeline for identifying plant growth-promoting genes in genomic and metagenomic data. *Rhizosphere*. 2024;30:100905. doi 10.1016/j.rhisph.2024.100905

Pérez Ortega C., Leininger C., Barry J., Poland B., Yalpani N., Altier D., Nelson M.E., Lu A.L. Coordinated binding of a two-component insecticidal protein from *Alcaligenes faecalis* to western corn rootworm midgut tissue. *J Invertebr Pathol.* 2021;183:107597. doi 10.1016/j.jip.2021.107597

Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinform.* 2020; 70(1):e102. doi 10.1002/cpbi.102

Rabbee M.F., Ali M.S., Choi J., Hwang B.S., Jeong S.C., Baek K. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. 2019;24(6):1046. doi 10.3390/molecules24061046

Richter M., Rosselló-Móra R., Oliver Glöckner F., Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016;32(6): 929-931. doi 10.1093/bioinformatics/btv681

Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-2069. doi 10.1093/bioinformatics/btu153

Shi H., Zeng H., Yang X., Zhao J., Chen M., Qiu D. An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* triggers prophenoloxidase activation and hemocyte decrease in *Galleria mellonella*. *Curr Microbiol.* 2012;64(6):604-610. doi 10.1007/s00284-012-0114-7

Sun Y., Ran Y., Yang H., Mo M., Li G. Volatile metabolites from *Brevundimonas diminuta* and nematicidal esters inhibit *Meloidogyne javanica*. *Microorganisms*. 2023;11(4):966. doi 10.3390/microorganisms11040966

Topalović O., Elhady A., Hallmann J., Richert-Pöggeler K.R., Heuer H. Bacteria isolated from the cuticle of plant-parasitic nematodes attached to and antagonized the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Sci Rep.* 2019;9(1):11477. doi 10.1038/s41598-019-47942-7

Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C.A., Zeng Q., Wortman J., Young S.K., Earl A.M. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963. doi 10.1371/journal.pone.0112963

Wang S., Jin P., Zheng Y., Kangkang W., Chen J., Liu J., Li Y. *Bacillus velezensis* B105-8, a potential and efficient biocontrol agent in control of maize stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. *Front Microbiol.* 2024;15:1462992. doi 10.3389/fmicb.2024.1462992

Wang Z., Lu K., Liu X., Zhu Y., Liu C. Comparative functional genome analysis reveals the habitat adaptation and biocontrol characteristics of plant growth-promoting bacteria in NCBI databases. *Microbiol Spectr.* 2023;11(3):e0500722. doi 10.1128/spectrum.05007-22

Wu Y.-W., Simmons B.A., Singer S.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2016;32(4):605607. doi 10.1093/bioinformatics/btv638

Yamaç M., Şahin E., Ceyhan E., Amoroso M.J., Cuozzo S.A., Pilatin S. The screening of bacterial insecticides against *Musca domestica* L. (diptera: Muscidae). *Fresenius Environ Bull.* 2010;19(5):862-870

Yang K., Dai X., Maitikadir Z., Zhang H., Hao H., Yan C. Comparative genome analysis of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* MR4: a potential biocontrol agent isolated from wild medicinal plant root tissue. *J Appl Genet.* 2024;65(4):907-923. doi 10.1007/s13353-024-00905-9

Yang T., Xin Y., Liu T., Li Z., Liu X., Wu Y., Wang M., Xiang M. Bacterial volatile-mediated suppression of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Plant Dis.* 2022;106(5):1358-1365. doi 10.1094/PDIS-06-21-1139-RE

Yeo Y.J., Park A.R., Vuong B.S., Kim J.-C. Biocontrol of *Fusarium* head blight in rice using *Bacillus velezensis* JCK-7158. *Front Microbiol.* 2024;15:1358689. doi 10.3389/fmicb.2024.1358689

Zhang F., Liu Q., Wang Y., Yin J., Meng X., Wang J., Zhao W., Liu H., Zhang L. Effects of surfactin stress on gene expression and pathological changes in *Spodoptera litura*. *Sci Rep.* 2024;14(1):30357. doi 10.1038/s41598-024-81946-2

Zhang M., Kong Z., Fu H., Shu X., Xue Q., Lai H., Guo Q. Rhizosphere microbial ecological characteristics of strawberry root rot. *Front Microbiol.* 2023;14:1286740. doi 10.3389/fmicb.2023.1286740

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 02.07.2025. После доработки 17.10.2025. Принята к публикации 18.10.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1318-1324

doi 10.18699/vjgb-25-138

Поиск генов домашнего хозяйства для анализа изменения экспрессии отдельных генов у *Macaca mulatta*

М.В. Шульская, А.Х. Алиева, И.Р. Кумаков, М.И. Шадрина, П.А. Сломинский

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия
shulskaya.m@yandex.ru

Аннотация. Макаки резус (*Macaca mulatta*) являются наиболее распространенными нечеловекообразными приматами, их используют в качестве модельных объектов, в первую очередь, из-за филогенетической и физиологической близости к человеку. В настоящее время модельные организмы широко используются для целого ряда исследований, в том числе на уровне транскриптома. При этом для анализа экспрессии отдельных генов применяется универсальный метод – полимеразная цепная реакция в реальном времени. Проведение такого рода исследований всегда требует предварительного подбора «генов домашнего хозяйства» (ГДХ) – генов, необходимых для реализации основных функций в клетке и стабильно экспрессирующихся в различных типах клеток и при разных условиях. На сегодняшний день для макак резус существуют лишь две систематизированные работы по поиску ГДХ, но эти исследования проводились лишь для тканей мозга и не учитывают такой важный критерий, как связь ГДХ с заболеваниями. В связи с этим в нашей работе были сформулированы ключевые критерии, учитываемые при подборе ГДХ. Проведены поиск и систематизация кандидатных ГДХ. В результате сформированы две панели перспективных ГДХ для *M. mulatta*: расширенная панель на 56 генов и малая панель, состоящая из восьми генов: *ARHGDIA*, *CYB5R1*, *NDUFA7*, *RRAGA*, *TTC1*, *UBA6*, *VPS72* и *YWHAH*. Обе панели соответствуют всем критериям подбора ГДХ (не имеют псевдогенов ни у макаки, ни у человека, характеризуются стабильной и достаточной экспрессией в мозге макак резус и могут быть использованы для анализа экспрессии не только в мозге, но и в периферической крови). Однако необходимо отметить, что данные экспериментально не верифицированы и требуют проверки в лабораторных условиях.

Ключевые слова: *Macaca mulatta*; экспрессионный анализ; «ген домашнего хозяйства»; ПЦР в реальном времени; экспрессия

Для цитирования: Шульская М.В., Алиева А.Х., Кумаков И.Р., Шадрина М.И., Сломинский П.А. Поиск генов домашнего хозяйства для анализа изменения экспрессии отдельных генов у *Macaca mulatta*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1318-1324. doi 10.18699/vjgb-25-138

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, соглашение № 075-15-2025-491 от 30 мая 2025 года).

A housekeeping gene search to analyze expression changes of individual genes in *Macaca mulatta*

M.V. Shulskaya, A.Kh. Alieva, I.R. Kumakov, M.I. Shadrina, P.A. Slominsky

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia
shulskaya.m@yandex.ru

Abstract. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are the most common non-human primates living in captivity. The use of rhesus macaques as model objects is determined, first of all, by their phylogenetic and physiological closeness to humans, and, as a consequence, the possibility of extrapolating the obtained results to humans. Currently, it is known that a number of biochemical changes occur under various physiological conditions, including at the transcriptomic level. The real-time polymerase chain reaction is a widely used universal method for gene expression analysis. Carrying out such studies always requires a preliminary selection of "housekeeping genes" (HKGs) – genes necessary for the implementation of basic functions in the cell and stably expressed in different cell types and under different conditions. At present, there are only two systematic studies on the search for HKGs in the rhesus macaque brain, and therefore in this work a search and systematization of HKGs for this species were carried out. As a result, two panels of promising HKGs for *M. mulatta* were formed: an extended panel, consisting of 56 genes, and a small panel, consisting of 8 genes: *ARHGDIA*, *CYB5R1*, *NDUFA7*, *RRAGA*, *TTC1*, *UBA6*, *VPS72* and *YWHAH*. Both panels of potential HKGs do not have pseudogenes in macaques or humans, are characterized by stable and sufficient expression in the brain of

© Шульская М.В., Алиева А.Х., Кумаков И.Р., Шадрина М.И., Сломинский П.А., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

rhesus macaques and can be used to analyze expression not only in the brain but also in peripheral blood. However, it should be noted that the data have not been experimentally verified and require verification in laboratory conditions.
Key words: *Macaca mulatta*; expression analysis; "housekeeping gene"; real-time PCR; expression

For citation: Shulskaya M.V., Alieva A.Kh., Kumakov I.R., Shadrina M.I., Slominsky P.A. A housekeeping gene search to analyze expression changes of individual genes in *Macaca mulatta*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1318-1324. doi 10.18699/vjgb-25-138

Введение

Макаки резус (*Macaca mulatta*) на протяжении десятилетий служат модельным объектом для изучения различных заболеваний человека. Использование макак резус в качестве модельных объектов обусловлено, в первую очередь, их филогенетической и физиологической близостью к человеку и, как следствие, возможностью переноса полученных результатов на человека. На сегодняшний день у макак резус известны генетические модели онкологических (Brammer et al., 2018; Deycmar et al., 2023), сердечно-сосудистых заболеваний (Patterson et al., 2002; Ueda et al., 2019), глазных болезней (Singh et al., 2009; Liu et al., 2015; Moshiri et al., 2019; Peterson et al., 2019, 2023), заболеваний опорно-двигательного аппарата (Colman, 2018; Paschalis et al., 2019), репродуктивной системы (Lomniczi et al., 2012; Nair et al., 2016; Abbott et al., 2019), а также широкого спектра неврологических заболеваний (McBride et al., 2018; Sherman et al., 2021). Кроме того, на макаках резус проводятся исследования с использованием токсических моделей (Kaya et al., 2023), облучения (Li et al., 2021; Majewski et al., 2021), гормонов (Noriega et al., 2010; Eghlidi, Urbanski, 2015) и т. д. Помимо изучения заболеваний, данный модельный объект может быть использован для тестирования различных фармакологических препаратов, что особенно важно для прикладных исследований.

В настоящее время известно, что в различных физиологических условиях происходит целый ряд биохимических изменений, в том числе и на уровне транскриптома. Относительные уровни транскриптов отдельных генов можно точно и воспроизводимо измерить с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Этот метод является широко распространенным универсальным методом для анализа экспрессии небольшого числа генов. ПЦР-РВ также часто применяется для подтверждения результатов, полученных с помощью полнотранскриптомного анализа экспрессии (Ramsköld et al., 2009). Однако проведение такого рода исследований всегда осложнено вариациями по количеству копий целевой мРНК из-за различий в количестве тотальной РНК между образцами, а потому требует предварительного подбора контрольных (референсных) генов, или «генов домашнего хозяйства» (ГДХ).

Под термином «ГДХ» чаще всего подразумеваются гены, необходимые для реализации основных функций в клетке и стабильно экспрессирующиеся в различных типах клеток и при разных условиях. Их часто используют в качестве референсных генов в исследованиях экспрессии генов для нормализации уровней мРНК между различными образцами.

На сегодняшний день крайне мало систематизированных данных по использованию ГДХ у макак резус (Ahn et al., 2008; Noriega et al., 2010). При этом N.C. Noriega с коллегами (2010) проводили исследование лишь на мозге, а K. Ahn с коллегами (2008) работали как с тканями мозга, так и с некоторыми другими тканями (кишечник, печень, почки, легкие и желудок). Но ни в одной из этих работ не изучалась периферическая кровь животных, довольно широко используемая для различных экспрессионных исследований. В связи с этим в настоящем обзоре проведены поиск и систематизация данных о ГДХ у макак резус, в том числе с целью дальнейшего использования их при изучении изменения экспрессии генов в различных условиях.

Современные принципы подбора ГДХ

В настоящее время подбор ГДХ проводится по следующим основным принципам. Во-первых, важным критерием при подборе ГДХ является отсутствие псевдогенов – копий генов, имеющих при этом те или иные дефекты в кодирующей области (потеря интронов и экзонов, сдвиги рамки считывания или преждевременные стоп-кодоны, а также псевдогены, образованные в результате ретротранспозиции) (Tutar, 2012). Псевдогены не участвуют в процессинге белка, но могут экспрессироваться на уровне РНК. Кроме того, известно, что количество псевдогенов нестабильно в геномах разных индивидуумов. С практической точки зрения наличие псевдогенов может требовать дополнительную обработку анализируемых образцов РНК ДНКазами, что критично для образцов с малым количеством РНК. Таким образом, наличие псевдогенов при подборе ГДХ крайне нежелательно.

Во-вторых, другим важным критерием для отбора ГДХ принято считать стабильность экспрессии, т. е. ГДХ должны иметь относительно постоянные уровни экспрессии в различных типах клеток, тканях и экспериментальных условиях (Tu et al., 2006). Однако известно, что ГДХ могут по-разному экспрессироваться в разных тканях. Например, показано, что такие хорошо известные ГДХ, как бета-актин и *GAPDH* значительно различаются по уровням экспрессии в тканях (Cai J. et al., 2014). В связи с этим важный критерий – высокий уровень экспрессии ГДХ в конкретной исследуемой ткани.

В-третьих, все чаще высказывается мнение о том, что ГДХ должны подбираться под условия конкретного эксперимента (Silver et al., 2008). Например, ген *HSPA8* человека является ГДХ, но не может быть использован в данном качестве при изучении возраст-зависимых или нейродегенеративных заболеваний, поскольку есть данные о снижении экспрессии гена *HSPA8* с возрастом, а также о связи этого гена с развитием нейродегенеративных заболеваний (Loeffler et al., 2016; Tanaka et al., 2024). Изменчивость экспрессионного профиля была также показана для ГДХ, используемых при изучении онкологических заболеваний (de Kok et al., 2005; Dheda et al., 2005). На



Рис. 1. Основные критерии генов домашнего хозяйства.

Таблица 1. Наименования поисковых запросов в базе данных PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)

Поисковый запрос	Результат (количество публикаций)
(gene expression) AND (rhesus macaque)	3017
(gene expression) AND (*Macaca mulatta*)	2743
(housekeeping genes) AND (rhesus macaque)	126
(housekeeping genes) AND (*Macaca mulatta*)	112
(reference genes) AND (rhesus macaque)	97
(reference genes) AND (*Macaca mulatta*)	86
((housekeeping genes) AND (rt-pcr)) AND (rhesus macaque)	16
((housekeeping genes) AND (rt-pcr)) AND (*Macaca mulatta*)	16
((reference genes) AND (rt-pcr)) AND (rhesus macaque)	7
((reference genes) AND (rt-pcr)) AND (*Macaca mulatta*)	7

Примечание. Дата доступа: 28.04.2025.

сегодняшний день нет таких работ, которые бы выявили универсальные ГДХ, а значит подбор ГДХ необходим для конкретной изучаемой патологии.

Таким образом, идеальный ГДХ должен не иметь псевдогенов, не быть связанным с исследуемым заболеванием или состоянием, а также стабильно экспрессироваться в конкретных экспериментальных условиях и исследуемых тканях организма (рис. 1). Наиболее оптимальный ГДХ следует тщательно подбирать для каждого конкретного эксперимента. Использование нескольких ГДХ также позволяет повысить достоверность получаемых экспрессионных данных (Vandesompele et al., 2002; Dheda et al., 2005).

Анализ литературных источников по ГДХ у макак резус

Нами проведен скрининг научных публикаций в базе данных PubMed с целью поиска работ, посвященных анализу ГДХ у макак резус. Начальный этап поиска с использованием ключевых слов (gene expression) AND (rhesus macaque) выявил 3017 публикаций. Поскольку названия “rhesus macaque” и “*Macaca mulatta*” синонимичны, оба термина были использованы при анализе поисковых запросов. В связи с довольно большим числом выдаваемых публикаций поисковый запрос был конкретизирован синонимичными терминами “housekeeping genes” и “reference genes”, что дало 126 и 97 результатов поиска соответственно. Дальнейшее сужение круга поиска путем уточнения при помощи ключевого слова “rt-pcr” выявило 16 и 7 публикаций (табл. 1).

Детальный анализ этих семи работ позволил обнаружить два наиболее актуальных на сегодняшний день систематизированных исследования, посвященных подбору ГДХ у макак резус (Ahn et al., 2008; Noriega et al., 2010). В пяти оставшихся публикациях из семи проанализированных упоминание ГДХ отсутствует, в связи с чем они не вошли в анализ.

Далее был вручную проанализирован блок из 126 публикаций, найденных Pubmed по ключевым словам (housekeeping genes) AND (rhesus macaque), находящихся в открытом доступе. Выявлено, что в 107 публикациях по тем или иным причинам отсутствуют упоминания ГДХ, а в 16 публикациях использованы гены, рекомендованные авторами двух основных работ, посвященных подбору ГДХ у макак резус (Ahn et al., 2008; Noriega et al., 2010). Эти два типа публикаций были исключены из дальнейшего анализа. В результате поиска нами была найдена только одна дополнительная публикация (Robinson et al., 2018). В табл. S1 Приложения[1] приведены данные из этих трех ключевых работ и описано 115 экспрессирующихся в мозге макак резус генов, которые могут рассматриваться в качестве ГДХ. Эти гены были взяты для дальнейшего анализа.

Вследствие периодических обновлений баз данных при составлении этого списка некоторые названия генов были актуализированы и приведены с названиями, отличными от использованных в работах (Ahn et al., 2008; Noriega et al., 2010). Также были исключены четыре последовательности, являющиеся гомологичными человеческим, но отсутствующие при этом в базе данных Ensembl для макак резус (Genome assembly: Mmul_10 (GCA_003339765.3)) (см. табл. S1) и пяти генов *M. mulatta*, для которых на сегодняшний день установлено наличие псевдогенов *LDHB*, *RPL37*, *RPS27A*, *SNRPA* и *SUI1*.

Ввиду значительно недостаточной аннотированности современных сборок генома макак резус (так, например, нами выявлено, что нуклеотидная последовательность гена *YWHAH M. mulatta* в базе данных Ensembl соответствует последовательности неаннотированного гена

[1] Табл. S1 и S2 Приложения см. по адресу: https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx53.pdf

DEPCD5 в базе NCBI) мы оценивали наличие псевдогенов не только у макак резус, но и у человека по базе данных Ensembl (www.ensembl.org). В итоге нами исключено 58 генов, человеческие ортологи которых имеют псевдогены.

Проведенная процедура позволяет выявить универсальные для человека и макаки ГДХ, а также избежать проблем, связанных с низким уровнем аннотированности сборки генома макаки резус. Так, например, ген *RPL19*, наиболее широко используемый в настоящее время в качестве ГДХ у макак резус, нежелательно использовать в качестве универсального ГДХ, так как у человека он имеет псевдогены.

Отобранные после предыдущих этапов отсева гены могут быть применены для работы с тканями мозга. Однако большой интерес представляет периферическая кровь, широко используемая при изучении человека. Периферическая кровь является перспективной для экспрессионных исследований ввиду ее доступности и малой инвазивности. Поэтому мы посчитали необходимым отобрать кандидатные ГДХ для периферической крови, для чего отобранные гены были дополнительно проанализированы на наличие приемлемого уровня экспрессии в периферической крови (табл. S2).

Поскольку для *M. mulatta* на сегодняшний день полностью отсутствуют данные об экспрессии в периферической крови, а также ввиду схожести транскриптома макаки и человека, данные из общего доступа об экспрессии мРНК были проанализированы в цельной крови и лимфобластах человека. Также мы добавили данные по экспрессии у мышей, так как эти животные – хорошо изученный модельный объект (за неимением данных для периферической крови, были взяты такие близкие по паттерну экспрессии ткани, как костный мозг, лимфоузлы и селезенка). Данные по экспрессии в мозге и селезенке у макак резус были добавлены из базы данных Ensembl (см. табл. S2).

Анализ проводили с помощью базы данных BioGPS (http://biogps.org/), где мы отбирали гены с экспрессией выше медианы в интересующих тканях. «Медианная экспрессия» представляет собой 50-й процентиль данных по экспрессии, это означает, что одна половина тканей имеет уровни экспрессии ниже медианного, а вторая половина – выше. BioGPS использует эту метрику для предоставления сводки о том, как ген экспрессируется в различных тканях, условиях или наборах данных.

В результате проведенного анализа список генов был поделен на три группы: гены с уровнем экспрессии выше медианы как у человека, так и у мыши; гены с уровнем экспрессии выше медианы лишь у одного из двух видов и гены с уровнем экспрессии ниже уровня медианы как у человека, так и у мыши (см. табл. S2, рис. 2). Гены из всех трех групп могут рассматриваться в качестве кандидатных ГДХ, но их использование будет накладывать ограничение на количество сравниваемых по экспрессионным профилям модельных объектов. Гены из первой группы при этом являются наиболее перспективными. Также необходимо отметить, что экспрессионные данные, представленные в BioGPS, нуждаются в экспериментальной проверке в лаборатории.

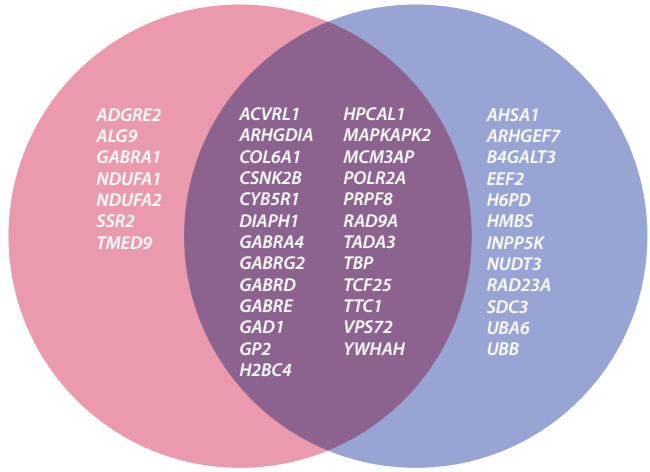


Рис. 2. Экспрессия кандидатных ГДХ в отдельных тканях человека и мыши.

На розовом фоне показаны гены, экспрессирующиеся преимущественно у человека, на фиолетовом – гены, экспрессирующиеся преимущественно у мышей. Область пересечения обозначает гены с экспрессией в отдельных тканях обоих видов.

Тем не менее важно отметить, что медианное значение – не всегда удачный показатель для отбора кандидатных генов, поскольку представленность мРНК в исследуемой ткани может быть выше медианы, но при этом абсолютные уровни экспрессии оказываются весьма низкими. В связи с этим все анализируемые гены были отранжированы в соответствии с их относительным уровнем экспрессии в анализируемых тканях. Результаты этого анализа представлены в виде тепловой карты (рис. 3). В итоге нами была сформирована группа из 25 наиболее перспективных кандидатных ГДХ (гены с высоким или средним уровнем экспрессии у человека, мыши и макаки резус).

Поскольку ГДХ могут быть использованы для изучения изменения экспрессии различных генов при тех или иных заболеваниях, потенциальные ГДХ не должны быть вовлечены в развитие исследуемого заболевания. Отобранная группа из 25 генов была проанализирована с использованием базы данных MalaCards (www.malacards.org). MalaCards представляет собой поисковую интегрированную базу знаний, содержащую всеобъемлющую информацию о человеческих заболеваниях, медицинских состояниях и расстройствах. Нами проводился поиск взаимосвязи между геном и известными на сегодняшний день моделируемыми группами заболеваний у макак резус (табл. 2). Было исключено шесть генов (*AHSA1*, *B4GALT3*, *HPCAL1*, *TBP*, *TMED9*, *SSR2*), связанных с онкологическими заболеваниями, шесть генов (*CSNK2B*, *DIAPH1*, *MAPKAPK2*, *NDUFA1*, *RAD23A*, *UBB*), связанных с неврологическими заболеваниями, а также гены, связанные с глазными (*ARL2*, *PRPF8*) и некоторыми другими (*GPX4*, *LDHA*) болезнями.

В результате на финальном этапе подбора кандидатных ГДХ нами было отобрано восемь генов, *ARHGDIA*, *CYB5R1*, *NDUFA7*, *RRAGA*, *TTC1*, *UBA6*, *VPS72* и *YWHAH* (выделены полужирным шрифтом в табл. 2), характеризующихся отсутствием псевдогенов, данных об участии

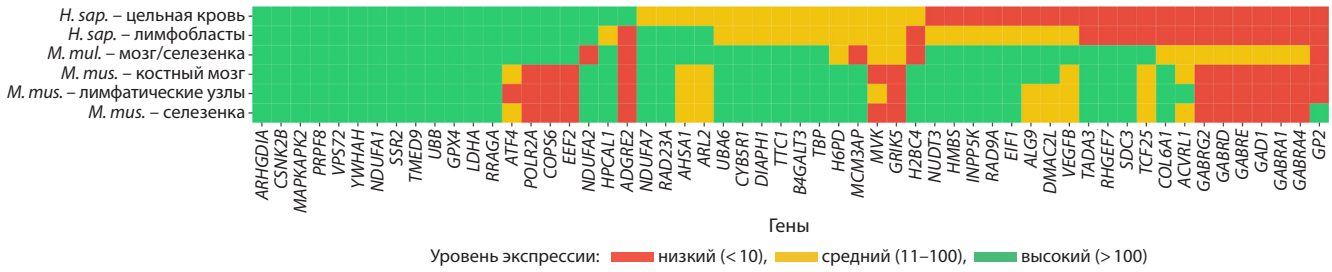


Рис. 3. Тепловая карта относительных уровней экспрессии кандидатных ГДХ.

За основу были взяты нормализованные по медиане значения для каждого гена в ресурсе BioGPS (http://biogps.org).

Таблица 2. Связь отобранных потенциальных ГДХ с высоким уровнем экспрессии с группами заболеваний, моделируемыми на макаках резус

Ген	Заболевание*	Литературный источник
AHSA1	Остеосаркома и гепатоцеллюлярная карцинома	Wei et al., 2024
ARL2	Палочко-колбочковая дистрофия, катаракта и задняя стафилома	Cai X.B. et al., 2019
ARHGDIA	–	–
B4GALT3	Онкологические заболевания	Sun et al., 2016
CSNK2B	Миоклоническая эпилепсия	Poirier et al., 2017
CYB5R1	–	–
DIAPH1	Микроцефалия	Esmaeilzadeh et al., 2024
GPX4	Спондилометафизарная дисплазия типа Седагхатиана	Smith et al., 2014
H6PD	Глиобластома	Zhang Y.B. et al., 2022
HPCAL1	Глиобластома	Zhang D. et al., 2019
LDHA	Синдром Фанкони–Бикеля	Serrano-Lorenzo et al., 2022
MAPKAPK2	Феохромоцитома, атаксия, телеангиэктазия	Liang et al., 2015
NDUFA1	Митохондриальная энцефаломиопатия	Fernandez-Moreira et al., 2007
NDUFA7	–	–
PRPF8	Пигментный ретинит, дистрофия сетчатки	Tanackovic et al., 2011; Georgiou et al., 2021
RAD23A	Болезнь Мачадо–Джозефа	Doss-Pepe et al., 2003
RRAGA	–	–
SSR2	Гепатоцеллюлярная карцинома	Chen et al., 2022
TBP	Атаксия, фенотип, ассоциированный с болезнью Гентингтона	Zühlke et al., 2001; Stevanin et al., 2003
TMED9	Онкологические заболевания	Mishra et al., 2019; Wang et al., 2024
TTC1	–	–
UBA6	–	–
UBB	Болезнь Альцгеймера	Maniv et al., 2023
VPS72	–	–
YWHAH	–	–

*В базе данных Pubmed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) отсутствуют какие-либо опубликованные данные за 2000–2025 гг.

этих генов в развитии заболеваний, моделируемых на макаках резус, а также стабильной и высокой экспрессией в проанализированных тканях – мозге, периферической крови, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге.

Заключение

Таким образом, были сформированы две панели перспективных ГДХ для *M. mulatta* – расширенная панель на 56 генов (см. табл. S2) и малая панель, состоящая из 8 генов (см. табл. 2). Обе панели потенциальных ГДХ не имеют псевдогенов ни у макаки, ни у человека и характеризуются стабильной и достаточной экспрессией в мозге макак резус. Однако более узкопрофильная панель ГДХ является более универсальной, так как подходит для подбора ГДХ при параллельных исследованиях на нескольких модельных организмах (мышь, макака, человек) или для изучения сразу нескольких различных заболеваний одной исследовательской группой. Малая панель ГДХ представляет

интерес для дальнейшей разработки рабочей панели ГДХ при исследовании изменения экспрессии различных генов при тех или иных заболеваниях на *M. mulatta*. При этом расширенная панель потенциальных ГДХ также является достаточно перспективной с прикладной точки зрения.

Список литературы / References

Abbott D.H., Rogers J., Dumesic D.A., Levine J.E. Naturally occurring and experimentally induced rhesus macaque models for polycystic ovary syndrome: translational gateways to clinical application. *Med Sci* (*Basel*). 2019;7(12):107. doi 10.3390/medsci7120107

Ahn K., Huh J.W., Park S.J., Kim D.S., Ha H.S., Kim Y.J., Lee J.R., Chang K.T., Kim H.S. Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol Biol.* 2008;9:78. doi 10.1186/1471-2199-9-78

Brammer D.W., Gillespie P.J., Tian M., Young D., Raveendran M., Williams L.E., Gagea M., … Pasqualini R., Arap W., Rogers J., Abee C.R., Gelovani J.G. MLH1-rheMac hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(11):2806-2811. doi 10.1073/pnas.1722106115

Cai J., Li T., Huang B., Cheng H., Ding H., Dong W., Xiao M., Liu L., Wang Z. The use of laser microdissection in the identification of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in human FFPE epithelial ovarian tissue samples. *PLoS One.* 2014;9(4):e95974. doi 10.1371/journal.pone.0095974

Cai X.B., Wu K.C., Zhang X., Lv J.N., Jin G.H., Xiang L., Chen J., Huang X.F., Pan D., Lu B., Lu F., Qu J., Jin Z.B. Whole-exome sequencing identified ARL2 as a novel candidate gene for MRCS (microcornea, rod-cone dystrophy, cataract, and posterior staphyloma) syndrome. *Clin Genet.* 2019;96(1):61-71. doi 10.1111/cge.13541

Chen F., Wang J., Zhang S., Chen M., Zhang X., Wu Z. Overexpression of SSR2 promotes proliferation of liver cancer cells and predicts prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med.* 2022;26(11):3169-3182. doi 10.1111/jcmm.17314

Colman R.J. Non-human primates as a model for aging. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(9):2733-2741. doi 10.1016/j.bbadis.2017.07.008

de Kok J.B., Roelofs R.W., Giesendorf B.A., Pennings J.L., Waas E.T., Feuth T., Swinkels D.W., Span P.N. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* 2005;85(1):154-159. doi 10.1038/labinvest.3700208

Deycmar S., Gomes B., Charo J., Ceppi M., Cline J.M. Spontaneous, naturally occurring cancers in non-human primates as a translational model for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2023;11(1):e005514. doi 10.1136/jitc-2022-005514

Dheda K., Huggett J.F., Chang J.S., Kim L.U., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G.A., Zumla A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem.* 2005;344(1):141-143. doi 10.1016/j.ab.2005.05.022

Doss-Pepe E.W., Stenroos E.S., Johnson W.G., Madura K. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol.* 2003;23(18):6469-6483. doi 10.1128/MCB.23.18.6469-6483.2003

Eghlidi D.H., Urbanski H.F. Effects of age and estradiol on gene expression in the rhesus macaque hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 2015;101(3):236-245. doi 10.1159/000381063

Esmaeilzadeh E., Biglari S., Mosallaei M., Khorshid H.R.K., Vahidnezhad H., Tabatabaiefar M.A. A novel homozygote pathogenic variant in the DIAPH1 gene associated with seizures, cortical blindness, and microcephaly syndrome (SCBMS): report of a family and literature review. *Mol Genet Genomic Med.* 2024;12(11):e70031. doi 10.1002/mgg3.70031

Fernandez-Moreira D., Ugalde C., Smeets R., Rodenburg R.J., Lopez-Laso E., Ruiz-Falco M.L., Briones P., Martin M.A., Smeitink J.A., Arenas J. X-linked *NDUFA1* gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Neurol.* 2007;61(1):73-83. doi 10.1002/ana.21036

Georgiou M., Ali N., Yang E., Grewal P.S., Rotsos T., Pontikos N., Robson A.G., Michaelides M. Extending the phenotypic spectrum of *PRPF8*, *PRPH2*, *RP1* and *RPGR*, and the genotypic spectrum of early-onset severe retinal dystrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16(1):128. doi 10.1186/s13023-021-01759-8

Kaya I., Nilsson A., Luptáková D., He Y., Vallianatou T., Bjärterot P., Svenningsson P., Bezard E., Andrén P.E. Spatial lipidomics reveals brain region-specific changes of sulfatides in an experimental MPTP Parkinson's disease primate model. *NPJ Parkinsons Dis.* 2023;9(1):118. doi 10.1038/s41531-023-00558-1

Li Y., Singh J., Varghese R., Zhang Y., Fatanmi O.O., Cheema A.K., Singh V.K. Transcriptome of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) exposed to total-body irradiation. *Sci Rep.* 2021;11(1):6295. doi 10.1038/s41598-021-85669-6

Liang N., Zhong R., Hou X., Zhao G., Ma S., Cheng G., Liu X. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) participates in the regulation of ionizing radiation-induced cell death *via* MAPK14 in lung cancer H1299 cells. *Cell Prolif.* 2015;48(5):561-572. doi 10.1111/cpr.12203

Liu D.X., Gilbert M.H., Wang X., Didier P.J., Shields C.L., Lackner A.A. Coats-like retinopathy in a Young Indian Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol.* 2015;44(2):108-112. doi 10.1111/jmp.12166

Loeffler D.A., Klaver A.C., Coffey M.P., Aasly J.O., LeWitt P.A. Age-related decrease in heat shock 70-kDa protein 8 in cerebrospinal fluid is associated with increased oxidative stress. *Front Aging Neurosci.* 2016;8:178. doi 10.3389/fnagi.2016.00178

Lomniczi A., Garcia-Rudaz C., Ramakrishnan R., Wilmot B., Khouangsathiene S., Ferguson B., Dissen G.A., Ojeda S.R. A single-nucleotide polymorphism in the EAP1 gene is associated with amenorrhea/oligomenorrhea in nonhuman primates. *Endocrinology.* 2012;153(1):339-349. doi 10.1210/en.2011-1540

Majewski M., Ostheim P., Gluzman-Poltorak Z., Vainstein V., Basile L., Schüle S., Haimerl M., Stroszczynski C., Port M., Abend M. Gene expression changes in male and female rhesus macaque 60 days after irradiation. *PLoS One.* 2021;16(7):e0254344. doi 10.1371/journal.pone.0254344

Maniv I., Sarji M., Bdarneh A., Feldman A., Ankawa R., Koren E., Magid-Gold I., … Michaelson D., Van Leeuwen F.W., Verheijen B.M., Fuchs Y., Glickman M.H. Altered ubiquitin signaling induces Alzheimer's disease-like hallmarks in a three-dimensional human neural cell culture model. *Nat Commun.* 2023;14(1):5922. doi 10.1038/s41467-023-41545-7

McBride J.L., Neuringer M., Ferguson B., Kohama S.G., Tagge I.J., Zweig R.C., Renner L.M., … Sherman L.S., Domire J.S., Ducore R.M., Colgin L.M., Lewis A.D. Discovery of a CLN7 model of Batten disease in non-human primates. *Neurobiol Dis.* 2018;119:65-78. doi 10.1016/j.nbd.2018.07.013

Mishra S., Bernal C., Silvano M., Anand S., Ruiz i Altaba A. The protein secretion modulator TMED9 drives CNIH4/TGFα/GLI signaling opposing TMED3-WNT-TCF to promote colon cancer metastases. *Oncogene.* 2019;38(29):5817-5837. doi 10.1038/s41388-019-0845-z

Moshiri A., Chen R., Kim S., Harris R.A., Li Y., Raveendran M., Davis S., … Gopalakrishna K.N., Boyd K., Artemyev N.O., Rogers J., Thomasy S.M. A nonhuman primate model of inherited retinal disease. *J Clin Invest.* 2019;129(2):863-874. doi 10.1172/JCI123980

Nair H.B., Baker R., Owston M.A., Escalona R., Dick E.J., Vandeberg J.L., Nickisch K.J. An efficient model of human endometriosis by induced unopposed estrogenicity in baboons. *Oncotarget.* 2016;7(10):10857-10869. doi 10.18632/oncotarget.7516

Noriega N.C., Kohama S.G., Urbanski H.F. Microarray analysis of relative gene expression stability for selection of internal reference genes in the rhesus macaque brain. *BMC Mol Biol.* 2010;11:47. doi 10.1186/1471-2199-11-47

Paschalis E.P., Gamsjaeger S., Condon K., Klaushofer K., Burr D. Estrogen depletion alters mineralization regulation mechanisms in an

ovariectomized monkey animal model. *Bone.* 2019;120:279-284. doi 10.1016/j.bone.2018.11.004

Patterson M.M., Jackson L.R., Brooks M.B., Catalfamo J.L. Type-3 von willebrand's disease in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Comp Med.* 2002;52(4):368-371

Peterson S.M., Mcgill T.J., Puthussery T., Stoddard J., Renner L., Lewis A.D., Colgin L.M.A., Gayet J., Wang X., Prongay K., Cullin C., Dozier B.L., Ferguson B., Neuringer M. Bardet-Biedl Syndrome in rhesus macaques: a nonhuman primate model of retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res.* 2019;189:107825. doi 10.1016/j.exer.2019.107825

Peterson S.M., Watowich M.M., Renner L.M., Martin S., Offenberg E., Lea A., Montague M.J., Higham J.P., Snyder-Mackler N., Neuringer M., Ferguson B. Genetic variants in melanogenesis proteins TYRP1 and TYR are associated with the golden rhesus macaque phenotype. *G3* (*Bethesda*). 2023;13(10):jkad168. doi 10.1093/g3journal/jkad168

Poirier K., Hubert L., Viot G., Rio M., Billuart P., Besmond C., Bienvenu T. *CSNK2B* splice site mutations in patients cause intellectual disability with or without myoclonic epilepsy. *Hum Mutat.* 2017;38(8):932-941. doi 10.1002/humu.23270

Ramsköld D., Wang E.T., Burge C.B., Sandberg R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(12):e1000598. doi 10.1371/journal.pcbi.1000598

Robinson A.A., Abraham C.R., Rosene D.L. Candidate molecular pathways of white matter vulnerability in the brain of normal aging rhesus monkeys. *GeroScience.* 2018;40(1):31-47. doi 10.1007/s11357-018-0006-2

Serrano-Lorenzo P., Rabasa M., Esteban J., Hidalgo Mayoral I., Domínguez-González C., Blanco-Echevarría A., Garrido-Moraga R., Lucia A., Blázquez A., Rubio J.C., Palma-Milla C., Arenas J., Martín M.A. Clinical, biochemical, and molecular characterization of two families with novel mutations in the *LDHA* gene (GSD XI). *Genes* (*Basel*). 2022;13(10):1835. doi 10.3390/genes13101835

Sherman L.S., Su W., Johnson A.L., Peterson S.M., Cullin C., Lavinder T., Ferguson B., Lewis A.D. A novel non-human primate model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurobiol Dis.* 2021;158:105465. doi 10.1016/j.nbd.2021.105465

Silver N., Cotroneo E., Proctor G., Osailan S., Paterson K.L., Carpenter G.H. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Mol Biol.* 2008;9:64. doi 10.1186/1471-2199-9-64

Singh K.K., Krawczak M., Dawson W.W., Schmidtke J. Association of *HTRA1* and *ARMS2* gene variation with drusen formation in rhesus macaques. *Exp Eye Res.* 2009;88(3):479-482. doi 10.1016/j.exer.2008.10.019

Smith A.C., Mears A.J., Bunker R., Ahmed A., Mackenzie M., Schwartzentruber J.A., Beaulieu C.L., Ferretti E., Majewski J., Bulman D.E., Celik F.C., Boycott K.M., Graham G.E. Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia. *J Med Genet.* 2014;51(7):470-474. doi 10.1136/jmedgenet-2013-102218

Stevanin G., Fujigasaki H., Lebre A.S., Camuzat A., Jeannequin C., Dode C., Takahashi J., San C., Bellance R., Brice A., Durr A. Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the *TBP* and *JPH3* genes. *Brain.* 2003;126:1599-1603. doi 10.1093/brain/awg155

Sun Y., Yang X., Liu M., Tang H. B4GALT3 up-regulation by miR-27a contributes to the oncogenic activity in human cervical cancer cells. *Cancer Lett.* 2016;375(2):284-292. doi 10.1016/j.canlet.2016.03.016

Tanackovic G., Ransijn A., Thibault P., Abou Elela S., Klinck R., Berson E.L., Chabot B., Rivolta C. PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2011;20:2116-2130. doi 10.1093/hmg/ddr094

Tanaka M., Fujikawa R., Sekiguchi T., Hernandez J., Johnson O.T., Tanaka D., Kumafuji K., … Hattori K., Mashimo T., Kuwamura M., Gestwicki J.E., Kuramoto T. A missense mutation in the *Hspa8* gene encoding heat shock cognate protein 70 causes neuroaxonal dystrophy in rats. *Front Neurosci.* 2024;18:1263724. doi 10.3389/fnins.2024.1263724

Tu Z., Wang L., Xu M., Zhou X., Chen T., Sun F. Further understanding human disease genes by comparing with housekeeping genes and other genes. *BMC Genomics.* 2006;7:31. doi 10.1186/1471-2164-7-31

Tutar Y. Pseudogenes. *Comp Funct Genomics.* 2012;2012:424526. doi 10.1155/2012/424526

Ueda Y., Slabaugh T.L., Walker A.L., Ontiveros E.S., Sosa P.M., Reader R., Roberts J.A., Stern J.A. Heart rate and heart rate variability of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) affected by left ventricular hypertrophy. *Front Vet Sci.* 2019;6:1. doi 10.3389/fvets.2019.00001

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):research0034. doi 10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Wang H., Wang Y., Tan P., Liu Y., Zhou S., Ma W. Prognostic value and anti-tumor immunity role of *TMED9* in pan-cancer: a bioinformatics study. *Transl Cancer Res.* 2024;13(10):5429-5445. doi 10.21037/tcr-24-258

Wei H., Zhang Y., Jia Y., Chen X., Niu T., Chatterjee A., He P., Hou G. Heat shock protein 90: biological functions, diseases, and therapeutic targets. *MedComm.* 2024;5(2):e470. doi 10.1002/mco2.470

Zhang D., Liu X., Xu X., Xu J., Yi Z., Shan B., Liu B. HPCAL1 promotes glioblastoma proliferation via activation of Wnt/β-catenin signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2019;23:3108-3117. doi 10.1111/jcmm.14083

Zhang Y.B., Zheng S.F., Ma L.J., Lin P., Shang-Guan H.C., Lin Y.X., Kang D.Z., Yao P.S. Elevated hexose-6-phosphate dehydrogenase regulated by OSMR-AS1/hsa-miR-516b-5p axis correlates with poor prognosis and dendritic cells infiltration of glioblastoma. *Brain Sci.* 2022;12(8):1012. doi 10.3390/brainsci12081012

Zühlke C., Hellenbroich Y., Dalski A., Kononowa N., Hagenah J., Vieregge P., Riess O., Klein C., Schwinger E. Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:160-164. doi 10.1038/sj.ejhg.5200617

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 21.07.2025. После доработки 19.10.2025. Принята к публикации 20.10.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1325-1337

doi 10.18699/vjgb-25-139

Гены, представляющие стресс-зависимую компоненту при развитии артериальной гипертонии

Д.Ю. Ощепков [1] ✉, Ю.В. Маковка [1], И.В. Чадаева [1, 2], А.Г. Богомолов [1], Л.А. Федосеева [1], А.А. Серяпина [1], М.П. Пономаренко [1], А.Л. Маркель [1, 2], О.Е. Редина [1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
✉ diman@bionet.nsc.ru

Аннотация. Гипертония считается ведущим фактором риска развития многих сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из ключевых факторов, способствующих развитию гипертонии, является хронический психоэмоциональный стресс. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития гипертонии человека проводят на животных, в том числе на специально созданных инбредных линиях крыс, моделирующих различные формы гипертонии человека. В настоящей работе использованы данные из базы данных RatDEGdb о 144 генах гипоталамуса, которые представляют общий ответ на рестрикционный стресс у гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG. Эти гены крыс были аннотированы изменениями экспрессии ортологичных им генов человека с использованием данных о 17 458 дифференциально экспрессирующихся генах (ДЭГ) пациентов с артериальной гипертензией по сравнению с нормотензивными пациентами. Для выявленных пар ортологов между ДЭГ гипоталамуса крысы после рестрикционного стресса и пациентов с артериальной гипертензией применили анализ главных компонент. Две главные компоненты, соответствующие линейной комбинации значений log2 изменений экспрессии, связанные со сходством (PC1) и различием (PC2) ответа на психоэмоциональный стресс двух линий крыс, с одной стороны, и разными формами гипертонии человека, с другой, объясняли соответственно 64 и 33 % дисперсии дифференциальной экспрессии генов. Выявленная значимая корреляция между значениями PC1 и PC2 для группы ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии указывает на существование общего молекулярного механизма между психоэмоциональным стрессом и гипертонией. Их функциональная аннотация позволила предположить, что стресс-индуцированное снижение экспрессии генов, участвующих в функционировании плазматической мембраны и одновременно во взаимодействии с межклеточным пространством, является наиболее вероятным вкладом психоэмоционального стресса в формирование гипертензивного статуса пациентов, а транскрипционный фактор SMARCA4 – наиболее вероятным участником эпигенетической модификации экспрессии генов в результате хронического стресса. Также предложены маркеры периферической крови для диагностики психоэмоционального стресса.

Ключевые слова: крыса; человек; дифференциально экспрессирующийся ген (ДЭГ); артериальная гипертония; стресс; биомедицинская модель; метод главных компонент

Для цитирования: Ощепков Д.Ю., Маковка Ю.В., Чадаева И.В., Богомолов А.Г., Федосеева Л.А., Серяпина А.А., Пономаренко М.П., Маркель А.Л., Редина О.Е. Гены, представляющие стресс-зависимую компоненту при развитии артериальной гипертонии. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(7):1325-1337. doi 10.18699/vjgb-25-139

Финансирование. Работа поддержана бюджетным проектом FWNR-2022-0020 ИЦиГ СО РАН.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования (ЦКП) «Биоинформатика» за предоставление вычислительных ресурсов и ЦКП «Генофонды лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН за разведение и содержание крыс, анализ которых использован в публикации.

Genes representing the stress-dependent component in arterial hypertension development

D.Yu. Oshchepkov [1] ✉, Yu.V. Makovka [1], I.V. Chadaeva [1, 2], A.G. Bogomolov [1], L.A. Fedoseeva [1], A.A. Seryapina [1], M.P. Ponomarenko [1], A.L. Markel [1, 2], O.E. Redina [1]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
✉ diman@bionet.nsc.ru

Abstract. Hypertension is among the major risk factors of many cardiovascular diseases. Chronic psychoemotional stress is one of its key causes. Studies of molecular mechanisms of human hypertension development are conducted in animals, including artificial rat strains that model various forms of the disease. The RatDEGdb database, used in our work, includes

© Ощепков Д.Ю., Маковка Ю.В., Чадаева И.В., Богомолов А.Г., Федосеева Л.А., Серяпина А.А., Пономаренко М.П., Маркель А.Л., Редина О.Е., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

144 hypothalamic genes that represent the common response to single short-term restraint stress in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats. These rat genes were annotated with changes in the expression of the human orthologs using data on 17,458 differentially expressed genes (DEGs) from patients with hypertension compared to normotensive subjects. We applied principal component analysis to orthologous pairs of DEGs identified in hypertensive patients and rat hypothalamic DEGs upon single short-term restraint stress. Two principal components, corresponding to a linear combination of log2 expression changes associated with the similarity (PC1) and difference (PC2) in the response to psychoemotional stress in two rat strains, on the one hand, and different forms of human hypertension, on the other, explained 64 % and 33 % of the variance in differential gene expression, respectively. The significant correlation revealed between PC1 and PC2 values for the group of DEGs with stress-induced downregulation indicates that psychoemotional stress and hypertension share a common molecular mechanism. Functional annotation suggests that stress-induced downregulation of genes involved in the plasma membrane function and, simultaneously, interactions with the extracellular matrix is the most likely contribution of psychoemotional stress to the development of the hypertensive status in patients, and the SMARCA4 transcription factor is the most likely mediator in the epigenetic modification affecting gene expression under chronic stress. Peripheral blood markers for the diagnosis of psychoemotional stress are proposed.

Key words: rat; human; differentially expressed gene (DEG); arterial hypertension; stress; biomedical model; principal component analysis

For citation: Oshchepkov D.Yu., Makovka Yu.V., Chadaeva I.V., Bogomolov A.G., Fedoseeva L.A., Seryapina A.A., Ponomarenko M.P., Markel A.L., Redina O.E. Genes representing the stress-dependent component in arterial hypertension development. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(7):1325-1337. doi 10.18699/vjgb-25-139

Введение

Артериальная гипертония (АГ) является полигенным заболеванием, развитие которого обусловлено как наследственными, так и средовыми факторами. Развитию АГ может способствовать хронический психоэмоциональный стресс, который могут вызывать профессиональное напряжение, социальная изоляция, низкий социально-экономический статус, тревожные и депрессивные состояния и другие факторы повседневной жизни человека (Liu M.Y. et al., 2017).

Под влиянием хронических стрессовых воздействий происходит гиперактивация симпатической системы, сопровождаемая нейровоспалением и митохондриальной дисфункцией. В результате в мозге могут накапливаться активные формы кислорода (reactive oxygen species, ROS), превышающие возможности нейрональной антиоксидантной защиты (Lambert A.J., Brand, 2009; Hovatta et al., 2010; Picard, McEwen, 2018). Окислительный стресс запускает каскад повреждения клеточных мембран, усиливает перекисное окисление липидов, а также нарушает нейрональную проводимость (Che et al., 2015; Montezano et al., 2015). Повреждение нейронов ведет к изменению активности нейросетей, в частности к снижению тормозной (ГАМКергической) активности и преобладанию возбуждающих (глутаматергических) сигналов в симпатических ядрах, что может усиливать передачу импульсов к сердечно-сосудистой системе и вызывать стойкое повышение артериального давления (АД) (Lambert E.A., Lambert G.W., 2011; Hering et al., 2015). Возникающий замкнутый цикл нейрогенного и окислительного стрессов способствует формированию патологического вегетативного паттерна, при котором даже слабые стрессовые воздействия вызывают выраженное повышение АД (Fontes et al., 2023).

Соответственно, у пациентов с гипертонией может быть не только генетическая предрасположенность к развитию патологии, но у некоторых из них гипертония развивается в онтогенезе по совокупности других причин. Многообразие причин, вызывающих заболевание, затрудняет понимание молекулярно-генетических процессов и определение, какие из них зависят от генетической предрасположенности организма, в том числе от повышенной реактивности к стрессу, а какие могут запускаться другими факторами, например повышенной чувствительностью к соли, или могут быть связаны с эндотелиальной или эндокринной дисфункцией. Понимание этих процессов может быть полезно для разработки подходов к патогенетической терапии гипертонической болезни. Данное исследование направлено на решение этой проблемы, в частности на выявление стресс-зависимой компоненты развития гипертонии.

Для выявления молекулярно-генетических механизмов развития гипертонии часто используются различные линии гипертензивных крыс, характеризующихся широким спектром патофизиологических изменений сердечно-сосудистой системы. Каждая генетическая модель соответствует определенной форме артериальной гипертонии. Одна из них – линия крыс НИСАГ (ISIAH, inherited stress-induced arterial hypertension) с наследуемой стресс-индуцированной артериальной гипертонией – является моделью спонтанно развивающейся гипертонии, которая характеризуется сильно выраженной реакцией (повышением АД) в условиях психоэмоционального стресса (Markel, 1992; Markel et al., 1999, 2007).

Адаптация клеток к воздействию стрессовых факторов приводит к значительной реорганизации программы экспрессирующихся генов (de Nadal et al., 2011). Однако молекулярно-генетические механизмы адаптации к воздействию стресса изучены не полностью. Ранее нами было показано, что в условиях разового краткосрочного (2 ч) рестрикционного стресса, которому крысы подвергались, находясь в тесной проволочной клетке, в гипоталамусе гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG изменяется уровень транскрипции многочисленных генов, что может влиять на большое число биологических процессов и метаболических путей (Oshchepkov et al., 2024). Ориентация на гены гипоталамуса объясняется тем, что это один из центральных органов регуляции нейроэндокринного ответа на стресс. Контролируя регуляцию секреции глюкокортикоидов, он обеспечивает интеграцию центральных и периферических звеньев, участвующих

в регуляции АД и развитии артериальной гипертензии (Carmichael, Wainford, 2015; Burford et al., 2017; Kinsman et al., 2017; Fontes et al., 2023), по сути являясь ключевым звеном между стрессом и развитием гипертонии. Использованный тип стресса приводил к значительному повышению уровня АД у крыс НИСАГ, но не у крыс WAG, при этом концентрация кортикостерона в плазме крови статистически достоверно повышалась у обеих линий крыс, что указывает на наличие реакции на стресс как у гипертензивных, так и у нормотензивных крыс (Oshchepkov et al., 2024). Соответственно, пул дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), относящихся к общему (независимому от гипертензивного генотипа) ответу гипоталамуса крыс на предъявленный рестрикционный стресс, который можно рассматривать как психоэмоциональный, выявляет гены, представляющие стресс-зависимую компоненту.

У человека в повседневной жизни множество факторов может оказывать стрессорное воздействие, приводя к активации симпатической нервной системы и развитию гипертонии и других сердечно-сосудистых заболеваний. Значимую роль в этих процессах, как отмечено выше, играет гипоталамус. Однако изучение молекулярно-генетических механизмов реакции гипоталамуса на стресс у человека затруднено, и аналогичных сведений по экспрессии генов в структурах мозга у пациентов-гипертоников не представлено. Тем не менее в PubMed имеются общедоступные независимые экспериментальные наборы данных по изменению экспрессии генов в других органах и тканях, включая периферическую кровь, для пациентов с гипертонией, а также в биомедицинских клеточных моделях гипертонии (Oshchepkov et al., 2022; Shikhevich et al., 2023). В задачу настоящего исследования входило на основе этих данных выявить гены человека, ортологичные генам крыс, ассоциированным с ответом на рестрикционный (психоэмоциональный) стресс, и выявить гены, представляющие стресс-зависимую компоненту при развитии гипертонии у человека.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперимент проводили на трехмесячных самцах гипертензивных крыс линии НИСАГ/Icgn (наследуемая индуцируемая стрессом артериальная гипертензия) и нормотензивных крыс линии WAG/GSto-Icgn (Wistar Albino Glaxo). Работа выполнена на базе конвенционального вивария Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, где животных содержали в стандартных условиях, без ограничений в воде и сбалансированном корме, при световом режиме дня 12:12.

Анализ транскриптомов гипоталамуса методом RNA-Seq проведен на четырех группах крыс по 7 животных в каждой: 1) НИСАГ_контроль; 2) WAG_контроль; 3) НИСАГ_стресс; 4) WAG_стресс. У всех крыс было измерено базальное систолическое АД методом tail-cuff (Markel et al., 2007) при легком эфирном наркотизировании, чтобы избежать эмоциональный стресс во время измерения. Для двух экспериментальных групп, НИСАГ_стресс и WAG_стресс, через 7 дней был проведен 2-часовой рестрикционный (эмоциональный) стресс. Процедура стрессирования заключалась в том, что крысу помещали в тесную проволочную клетку на 2 ч. Подробности процедуры описаны в (Oshchepkov et al., 2024).

Эксперимент выполнен в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием животных и одобрен биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия), протокол № 115 от 20 декабря 2021 г.

RNA-Seq. Выделение РНК осуществлено в Институте геномного анализа (Москва, Россия). Пробоподготовка и секвенирование транскриптомов образцов гипоталамуса в соответствии с протоколами производителя (MGI Tech Co., Ltd., China) выполнены в BGI Hongkong Tech Solution NGS Lab. Парноконцевое секвенирование библиотек кДНК проводили на платформе DNBSEQ (DNBSEQ Technology) с длиной прочтений 150 пар оснований и глубиной секвенирования более 30 млн уникально картированных прочтений. Все образцы были проанализированы как биологические повторы.

В ходе биоинформатического анализа была проведена предобработка полученных данных секвенирования – оценка качества программой FastQC версии 0.11.5 (Andrews, 2010). Общее количество нуклеотидных прочтений для библиотек после фильтрации составило 1 287 393 367, из них 1 267 436 623 нуклеотидных прочтения (98.45 %), которые были картированы на референсный геном крысы mRatBN7.2/rn7 (rn7 assembly Wellcome Sanger Institute Nov, 2020) с использованием программного пакета STAR, версия 2.7.10a (Dobin et al., 2013).

По данным картирования был проведен статистический анализ для вычисления дифференциальной экспрессии генов в среде для статистических вычислений R. Нами был применен анализ суррогатных переменных (SVA) (Leek et al., 2012) для учета нежелательных вариаций в данных, вызванных возможными случайными систематическими отклонениями в процессе пробоподготовки. Для анализа SVA данные экспрессии были нормализованы и преобразованы с использованием функции vst в DESeq2 v1.30.1 (Love et al., 2014) согласно документации. Значимые суррогатные переменные далее были включены в качестве факторов в анализ дифференциальной экспрессии в DESeq2. Анализ дифференциальной экспрессии между каждыми двумя группами сравнения проводился индивидуально.

Дифференциальная экспрессия была вычислена для всех генов, демонстрирующих достаточный уровень экспрессии выше порогового (сумма покрытий гена для всех библиотек более 10 прочтений). Порог значимости для определения дифференциально экспрессирующихся генов был выбран с учетом поправки на множественные сравнения и соответствовал adjusted p-value < 5 % и Log2 fold change ≥ |0.585| (1.5 fold). Информация о найденных ДЭГ была ранее описана в (Makovka et al., 2024; Oshchepkov et al., 2024) и размещена в базе RatDEGdb (Чадаева и др., 2023). Данные представлены как уровень транскрипции при стрессе, отнесенный к уровню транскрипции в покое.

Выбор генов человека, изменяющих уровень транскрипции при гипертонии. В работе мы использовали общедоступные независимые экспериментальные наборы данных пациентов с артериальной гипертонией, а

Таблица 1. Проанализированные ДЭГ пациентов с артериальной гипертонией и согласно биомедицинским клеточным моделям гипертонии, найденным в PubMed

№ п/п	Модель гипертонии	Модель нормы	Ткань	N_{DEG}	Литературный источник
1	Эссенциальная гипертония	Норма	Кора почек (♂,♀)	46	Marques et al., 2011
2			Кора почек (♂)	6	
3			Кора почек (♀)	10	
4	Легочная артериальная гипертония (PAH)	Норма	Биопсия легкого	5685	Yao et al., 2021
5			Биопсия легкого	49	Qiu et al., 2021
6	Фиброз легких, вызванный гипертонией	Норма	Биопсия легкого	6936	Yao et al., 2021
7	Трансплантация легкого при легочной артериальной гипертонии (PAH)	Норма	Легкое	5	Mura et al., 2019
8	Нефросклероз, вызванный гипертонией	Норма	Биопсия почки	16	Neusser et al., 2010
9	Почечно-мозговая гипертензия	Норма	Мозговое вещество почки	13	Wu et al., 2013
10	Преэклампсия	Норма	Венозная кровь	64	Textoris et al., 2013
11			Децидуальная оболочка	372	Yong et al., 2015
12			Плодные воды	10	Jung et al., 2019
13			Плацента	1228	Saei et al., 2021
14	Сердечная недостаточность, связанная с гипертонией	Норма	Периферическая кровь	248	Maciejak et al., 2015
15	Инфаркт миокарда, связанный с гипертонией	Норма	Периферическая кровь	75	Maciejak et al., 2015
16	Ишемическая болезнь сердца, вызванная гипертонией	Норма	Периферическая кровь	1524	Zheng, He, 2021
17	Фибрилляция предсердий, вызванная гипертонией	Норма	Биопсия аорты	300	Zheng, He, 2021
18	Преинвазивный плоскоклеточный рак легких, связанный с гипертонией	Норма	Клетки плоскоклеточного рака легкого	119	Koper et al., 2017
19	Малоподвижные подростки с ожирением и гипертонией	Спортсмены	Общая кровь	250	Plaza-Florido et al., 2021
20	Избыток mir-201 как модель преэклампсии	Норма клеток Swan71	Линия клеток трофобластов человека Swan71	19	Ahn et al., 2017
21	*BMPR2* нокдаун как модель легочной артериальной гипертонии (PAH)	Норма клеток эндотелия	Эндотелий легочной артерии человека	483	Awad et al., 2016
Σ	15 моделей гипертонии	4 варианта нормы	16 тканей	17458	16 статей

Примечание. N_{DEG} – количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ); Σ – итого.

также данные по биомедицинским клеточным моделям гипертонии, найденным в PubMed (Lu, 2011). В выборку вошли только статистически значимые согласно Z-критерию Фишера с поправкой на множественные сравнения ($P_{ADJ} < 0.05$) данные, как опубликовано их авторами. В результате было собрано 16 публикаций, из которых получены данные по 17458 генам, дифференциально экспрессирующимся в тканях/клетках гипертензивных и нормотензивных людей. Этот список ДЭГ отражает результаты исследования 16 тканей и 15 моделей гипертонии (табл. 1). Далее был применен порог на значение изменения уровня транскрипции (более чем в 1.5 раза). Данные представлены как уровень транскрипции у пациентов-гипертоников, отнесенный к уровню транскрипции у людей с нормальным уровнем артериального давления.

Биоинформатические подходы к анализу ортологичных генов крысы и человека. Поиск ортологов осуществляли с помощью сервиса GOLF: Gene and Ortholog Location Finder ресурса Rat Genome database (https://rgd.mcw.edu/rgdweb/ortholog/start.html) (Vedi et al., 2023). Попарные комбинации log2 изменений экспрессии генов-ортологов (два значения соответствовали log2 изменениям экспрессии для крыс НИСАГ и WAG и одно значение для гена-ортолога человека) анализировали методом главных компонент с использованием стандартного статистического приложения Past v.4.04 (Hammer et al., 2001). В этом же приложении были рассчитаны значения факторных нагрузок и статистическая достоверность объясненной доли дисперсии компонент при 1000 испытаниях бутстреп (Efron et al., 1996). Корреляционный анализ Пирсона про-

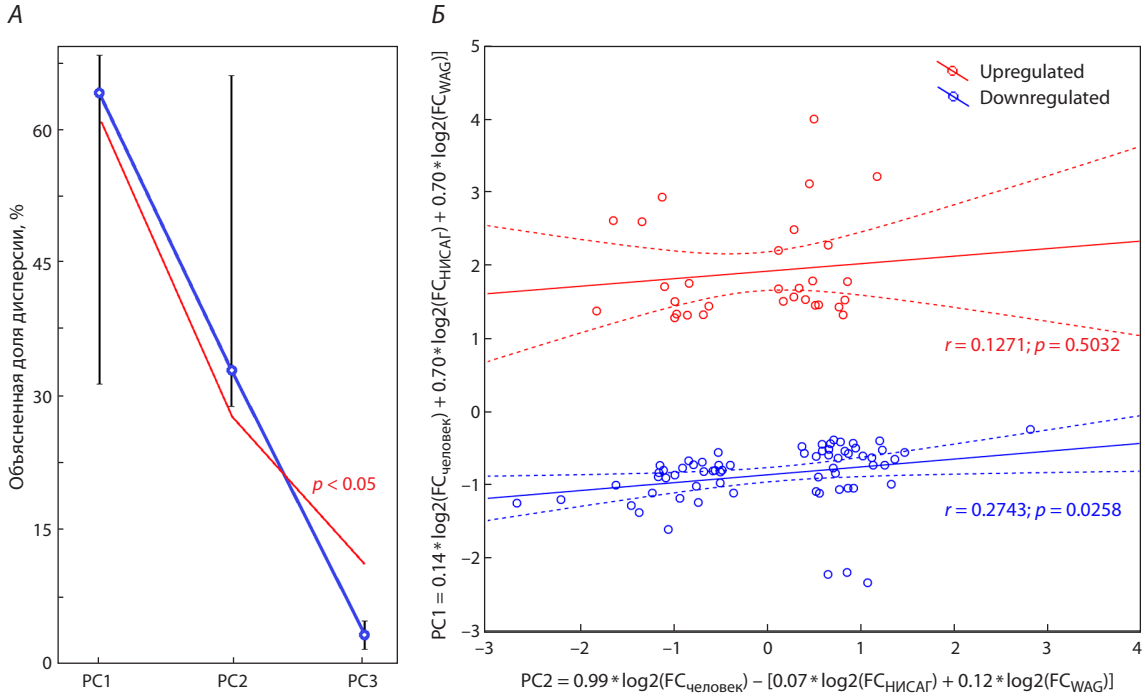


Рис. 1. Результат факторного анализа дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) гипертензивных пациентов (см. табл. 1) и стрессированных крыс.

А – выбор статистически достоверных ($p < 0.05$) первой (PC1) и второй (PC2) главных компонент факторного анализа ДЭГ гипертензивных пациентов и стрессированных крыс методом главных компонент. Обозначения: o, I – среднее арифметическое (Mean) и его стандартная ошибка (SEM); красная линия – нижняя граница 95 % доверительного интервала статистической значимости объясненной доли дисперсии. *Б* – результаты анализа методом главных компонент и регрессионного анализа. Обозначения: PC1 и PC2 – первая и вторая главные компоненты как соответствующая линейная комбинация исходных переменных с учетом рассчитанных факторных нагрузок; "Upregulated" – группа ДЭГ со стресс-индуцированным повышением экспрессии (выделена красным цветом); "Downregulated" – группа ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии (выделена синим цветом) согласно оценке PC1; штриховые линии – границы 95 % доверительного интервала для линии регрессии (непрерывная); *r* и *p* – коэффициенты линейной корреляции и уровни их статистической значимости соответственно, оцененные с использованием стандартного пакета Statistica (Statsoft™, США).

водили с использованием двустороннего теста. Группы пар генов, для которых главная компонента PC1 оказалась выше 0, и группы пар генов, для которых главная компонента PC1 оказалась ниже 0, анализировали отдельно.

Функциональная аннотация ДЭГ. Функциональные сети обогащения были построены с помощью базы данных STRING (Szklarczyk et al., 2023). Функциональная аннотация ДЭГ проведена с использованием ресурса Enrichr-KG (Evangelista et al., 2023), анализ обогащения областей промоторов ДЭГ сайтами связывания факторов транскрипции – с использованием ресурса Enrichr (Xie et al., 2021).

Результаты

В анализ были взяты гены, которые в условиях разового краткосрочного (2 ч) рестрикционного стресса изменяют уровень транскрипции более чем в 1.5 раза в гипоталамусе гипертензивных крыс НИСАГ (257 ДЭГ) и нормотензивных крыс WAG (229 ДЭГ). Среди этих ДЭГ 144 гена представляют общий ответ, 113 ДЭГ характеризуются статистически достоверным изменением экспрессии только в гипоталамусе крыс НИСАГ, а 85 ДЭГ – статистически достоверным изменением экспрессии только в гипоталамусе крыс WAG (Oshchepkov et al., 2024). Для выявления генов, которые могут представлять стресс-чувствительное звено при развитии гипертонии у человека, была проведена работа по выявлению ортологичных генов человека, демонстрирующих различный уровень экспрессии у гипертоников и людей с нормальным уровнем артериального давления.

Анализ общего ответа

В результате поиска ортологов 144 ДЭГ крысы с помощью сервиса GOLF БД RGD и сопоставления их со списком ДЭГ человека, найденных нами в PubMed (как описано в Материалах и методах), было выявлено 96 пар генов-ортологов. В этот список генов вошли данные по шести тканям девяти моделей гипертонии, относящиеся к семи публикациям (табл. S1 Приложения)[1].

Следуя нашим предыдущим статьям о факторном анализе ДЭГ (Chadaeva et al., 2021; Shikhevich et al., 2023), в настоящей работе мы обработали данные по изменению экспрессии генов крыс при стрессе независимо от гипертензивного генотипа и ортологичным генам пациентов с гипертонией (см. табл. S1) с помощью метода главных компонент (рис. 1). Как можно видеть на рис. 1, *А*, исследуемые 96 пар генов человека и ортологичных им генов крыс характеризуются двумя главными компонентами PC1

[1] Табл. S1 Приложения см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx54.xlsx

и PC2, которые объясняют 64 и 33 % вариансы и каждая из которых является статистически достоверной согласно 1000 бутстреп-испытаний (Efron et al., 1996).

Результаты анализа главных компонент представлены на рис. 1, *Б*. Первая главная компонента PC1, отложенная по оси *Y*, пропорциональна линейной комбинации исходных переменных с учетом рассчитанных факторных нагрузок, суммирующей значения log2 изменений, измеренных в независимых экспериментах для пациентов с гипертонией, и значения log2 изменений для крыс двух линий, подвергнутых однократному рестрикционному стрессу. Таким образом, эта компонента может характеризовать сходство ответа на психоэмоциональный стресс двух линий крыс, с одной стороны, и с разными формами гипертонии человека, с другой.

Вторая главная компонента PC2, отложенная по оси *X*, пропорциональна линейной комбинации исходных переменных с учетом рассчитанных факторных нагрузок, соответствующей положительному вкладу значений, полученных в независимых экспериментах для человека, и отрицательным вкладом значений стресс-ответа для крыс двух линий, что может характеризовать различия между исследуемыми видами, а также особенности отдельных патологий пациентов с артериальной гипертензией. Отчетливо видно разделение всех исследуемых ДЭГ на две не пересекающиеся группы по значению PC1 = 0 (см. рис. 1, *Б*): красным и синим цветом выделены гены, экспрессия которых в ответ на стресс соответственно увеличилась (Upregulated) и уменьшилась (Downregulated). Проведенный регрессионный анализ показал наличие значимой корреляции ($p < 0.05$) между значениями PC1 и PC2 для группы из 66 пар для 52 ДЭГ кластера “Downregulated” (синий цвет на рис. 1, *Б*). Это может свидетельствовать о существовании общего молекулярного механизма подавления экспрессии генов при формировании ответа на стресс у крысы и аналогичного процесса у человека при патогенезе, приводящем к развитию гипертонии.

В то же время аналогичный анализ для группы ДЭГ со стресс-индуцированным повышением экспрессии (кластер “Upregulated”) показал отсутствие значимой корреляции. Это может означать различие механизмов активации этой группы генов, например, в зависимости от ткани и типа патологии.

Функциональная аннотация ДЭГ, ассоциированных со стресс-индуцированным снижением экспрессии

Для выявления возможного общего молекулярно-генетического механизма подавления экспрессии генов при формировании ответа на стресс у человека и крысы была проведена функциональная аннотация 52 ДЭГ, ассоциированных со стресс-индуцированным снижением экспрессии (кластер “Downregulated” на рис. 1, *Б*). Среди 52 генов в кластере “Downregulated” нашлось восемь генов, ассоциированных с гипертонией (*ALOX12*, *ATP2B4*, *CX3CR1*, *GRK3*, *KDR*, *NOS1*, *RASGRP3*, *SMAD9*). Из них пять ДЭГ (*ALOX12*, *GRK3*, *KDR*, *NOS1*, *RASGRP3*) во всех случаях имели совпадающие направления изменения у крыс и человека (см. табл. S1).

Анализ обогащения ДЭГ в БД String. Анализ обогащения группы из 52 ДЭГ в БД STRING показал, что значимо обогащенными являются термины Postsynapse, Cell periphery и Plasma membrane (рис. 2). Таким образом, процесс, объединяющий эту группу ДЭГ, связан с межклеточным пространством и мембраной, непосредственно участвующей в его взаимодействии с клеткой.

Анализ с использованием ресурса Enrichr-KG. Анализ биологических процессов и метаболических путей был проведен с использованием ресурса Enrichr-KG (табл. 2). Наиболее обогащенным термином, включившим 17 ДЭГ, является Signal Transduction. В эту группу вошли несколько генов, ассоциированных с гипертонией. К наиболее обогащенным метаболическим путям отнесены Adrenergic signaling in cardiomyocytes, Salivary secretion, Aldosterone synthesis and secretion, Glucagon signaling pathway, Insulin resistance, Differentiation of white and brown adipocyte, Constitutive Androstane Receptor Pathway, Neovascularisation processes. К этим метаболическим путям отнесено несколько анализируемых ДЭГ, ассоциированных с гипертонией (см. табл. 2). Некоторые из ДЭГ, ассоциированных с перечисленными в табл. 2 биологическими процессами и метаболическими путями, были выявлены в периферической крови.

ДЭГ периферической крови в кластере “Downregulated”

Всего в кластере “Downregulated” найдено 14 ДЭГ периферической крови пациентов (табл. 3). Эти ДЭГ можно рассматривать как потенциальные периферические маркеры, ассоциированные с наличием психоэмоционального стресса.

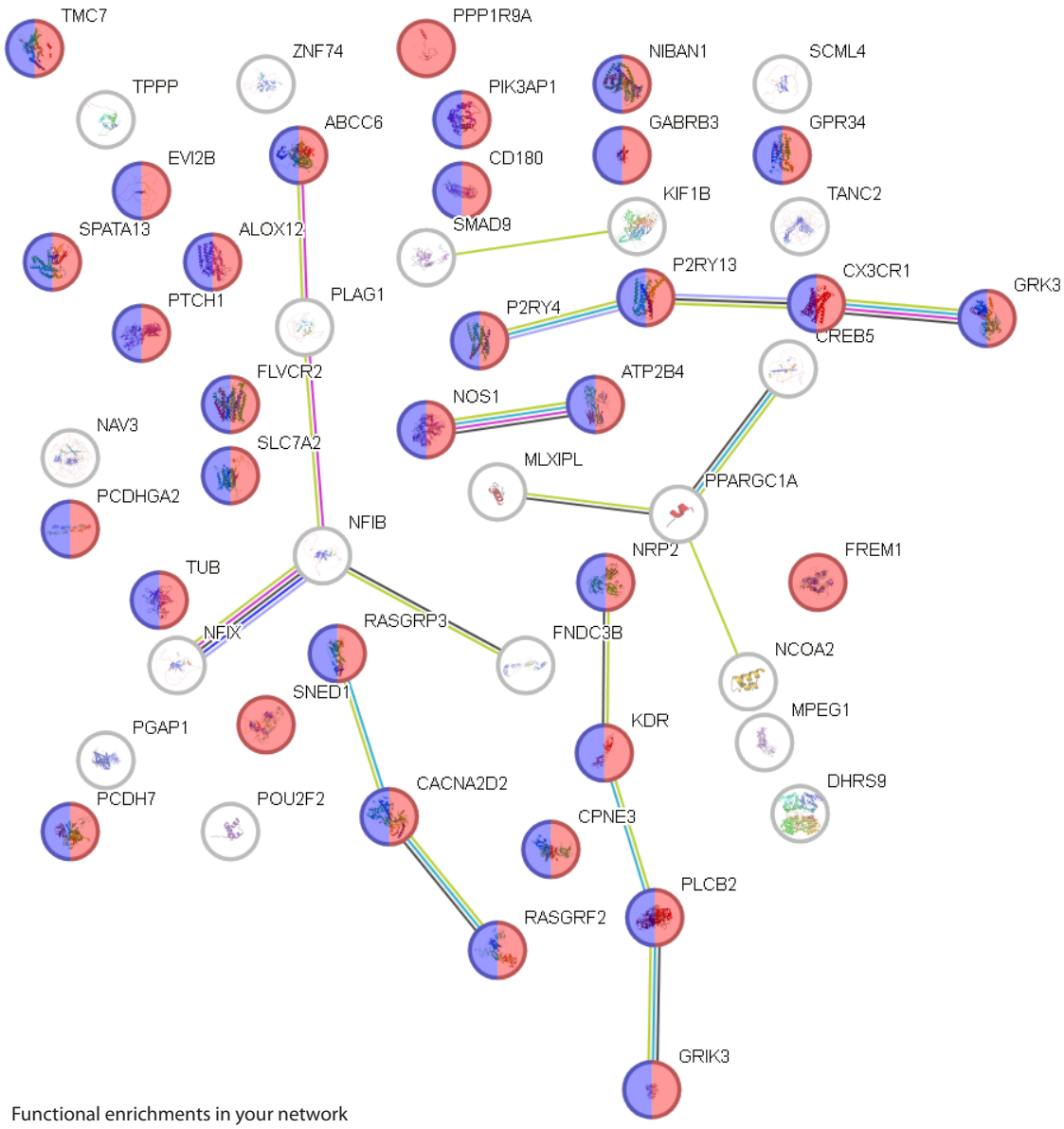
Анализ транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию ДЭГ кластера “Downregulated”

Анализ ДЭГ кластера “Downregulated”, проведенный с использованием ресурса Enrichr, позволил выявить транскрипционные факторы, которые могут быть вовлечены в регуляцию этих ДЭГ как в гипоталамусе крыс, так и в тканях пациентов с гипертонией (табл. 4). Наиболее значимо обогащенные термины библиотеки ChEA_2022 ассоциированы с транскрипционными факторами SMARCA4 (SWI/SNF related BAF chromatin remodeling complex subunit ATPase 4) и глюкокортикоидным рецептором NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1). NR3C1 и еще шесть транскрипционных факторов (PPARG, ESR1, AR, NFE2L2, BRD4, STAT3), представленные в табл. 4, ассоциированы с гипертонией.

Обсуждение

Гипотеза о наличии связи между хроническим психосоциальным стрессом и гипертонией высказывается давно (Spruill, 2010) и подтверждена исследованиями ряда авторов (Liu M.Y. et al., 2017; Bautista et al., 2019). Однако молекулярно-генетические механизмы этой связи остаются до настоящего времени малоизученными.

Поскольку в настоящем исследовании мы взяли в рассмотрение 144 гена общего ответа на стресс в гипоталамусе гипертензивных и нормотензивных крыс и сравнивали этот ответ на стресс с изменениями в уровне транскрипции генов в разных органах/тканях у пациентов с гипертонией разной этиологии, то можно предполагать, что описанные нами транскрипционные изменения могут



Functional enrichments in your network

Cellular Component (Gene Ontology)						
GO-term	*description*	*count in network*	*strenght*	*signal*	*false discovery rate*	
GO:0098794	Postsynapse	9 of 621	0.74	0.42	0.0238	
GO:0071944	Cell periphery	33 of 6015	0.32	0.37	0.0021	
GO:0005886	Plasma membrane	30 of 5544	0.31	0.33	0.0083	

Рис. 2. Скриншот результатов аннотации кластера “Downregulated” на рис. 1, *Б* с использованием базы данных STRING (Szklarczyk et al., 2023).
Обозначения даны согласно аннотации STRING.

указывать на некоторые общие звенья реорганизации программы экспрессирующихся генов, отражающие вклад воздействия психоэмоционального стресса в проявление гипертензивного статуса пациентов.

В работе выявлены ДЭГ человека, ортологичные 144 генам гипоталамуса крыс, изменяющим уровень транскрипции в условиях разового краткосрочного рестрикционного стресса в гипоталамусе гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных крыс WAG. С помощью метода главных компонент было найдено два кластера ДЭГ и показано наличие значимой корреляции между значениями PC1 и PC2 для кластера ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии. Полученный результат позволяет предполагать существование общего молекулярно-генетического механизма подавления экспрессии генов при формировании ответа на стресс у человека и крысы и хорошо согласуется с представлениями о том, что при адаптации организма к воздействию стресса наблюдается ремоделирование функционального транскриптома и репрессия трансляционных процессов (Advani, Ivanov, 2019; Baymiller, Moon, 2023). Следует заметить, что повышение либо понижение уровня транскрипции при стрессе может

Таблица 2. Анализ биологических процессов и метаболических путей кластера "Downregulated"

Библиотека	Термин	q-value	Гены
Reactome 2022	Signal Transduction R-HSA-162582	0.0206	*GABRB3*, *CX3CR1*#, *NCOA2*, *P2RY13*, *NRP2*, *PTCH1**, *RASGRF2**, *PCDH7*, *SMAD9*#, *RASGRP3*#, *GRK3*#, *P2RY4*, *DHRS9*, *SPATA13*, *KDR*#, *PIK3AP1**, *PLCB2*
	P2Y Receptors R-HSA-417957	0.0295	*P2RY13*, *P2RY4*
	Transmission Across Chemical Synapses R-HSA-112315	0.0295	*GABRB3*, *RASGRF2**, *GRIK3*, *CACNA2D2*, *PLCB2*
	Neurotransmitter Receptors And Postsynaptic Signal Transmission R-HSA-112314	0.0428	*GABRB3*, *RASGRF2**, *GRIK3*, *PLCB2*
KEGG 2021 Human	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.0510	*ATP2B4*#, *CACNA2D2*, *PLCB2*, *CREB5*
	Salivary secretion	0.0510	*ATP2B4*#, *NOS1*#, *PLCB2*
	Aldosterone synthesis and secretion	0.0510	*ATP2B4*#, *PLCB2*, *CREB5*
	Glucagon signaling pathway	0.0510	*PPARGC1A*, *PLCB2*, *CREB5*
	Insulin resistance	0.0510	*MLXIPL**, *PPARGC1A*, *CREB5*
WikiPathway 2021 Human	Differentiation of white and brown adipocyte WP2895	0.0877	*SMAD9*#, *PPARGC1A*
	Constitutive Androstane Receptor Pathway WP2875	0.0877	*NCOA2*, *PPARGC1A*
	Neovascularisation processes WP4331	0.0877	*KDR*#, *SMAD9*#
GO Biological Process 2021	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0045944)	0.1140	*NCOA2*, *MLXIPL**, *NFIX**, *NFIB*, *PLAG1**, *SMAD9*#, *NOS1*#, *POU2F2**, *PPARGC1A*
	Lipid oxidation (GO:0034440)	0.1140	*ALOX12*#, *PPARGC1A*
	Positive regulation of purine nucleotide biosynthetic process (GO:1900373)	0.1140	*NOS1*#, *PPARGC1A*
	Cellular response to growth factor stimulus (GO:0071363)	0.1140	*KDR*#, *SMAD9*#, *CPNE3*, *NOS1*#
	Positive regulation of fatty acid metabolic process (GO:0045923)	0.1140	*MLXIPL**, *PPARGC1A*

* ДЭГ, найденные в периферической крови; # ДЭГ, ассоциированные с гипертонией.

Таблица 3. Маркеры периферической крови в кластере ДЭГ "Downregulated"

Модель гипертонии	HUMAN ген	HUMAN log2FC HT/norm	Rat ortholog	log2FC Стресс/покой		Название гена	Литературный источник
				НИСАГ	WAG		
ИБС	*DHRS9*	1.35	*Dhrs9*	–1.60	–1.40	Dehydrogenase/reductase 9	Zheng, He, 2021
	MLXIPL	1.39	*Mlxipl*	–0.46	–0.61	MLX interacting protein like	
	NFIX	1.20	*Nfix*	–0.60	–0.25	Nuclear factor I X	
	NRP2	1.08	*Nrp2*	–0.59	–0.40	Neuropilin 2	
	PGAP1	–1.41	*Pgap1*	–0.62	–0.31	Post-GPI attachment to proteins 1	
	PIK3AP1	1.27	*Pik3ap1*	–0.63	–0.95	Phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	
	PLAG1	–1.70	*Plag1*	–0.62	–0.49	PLAG1 zinc finger	
	POU2F2	–1.36	*Pou2f2*	–1.00	–0.56	POU class 2 homeobox 2	
	PTCH1	–1.70	*Ptch1*	–0.64	–0.82	Patched 1	
	RASGRF2	–1.33	*Rasgrf2*	–0.72	–0.28	Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 2	
	SCML4	–1.20	*Scml4*	–0.36	–0.61	Sex comb on midleg-like 4 (Drosophila)	
ИМ	*GPR34*	1.355	*Gpr34*	–0.56	–1.03	G protein-coupled receptor 34	Maciejak et al., 2015
СН	*FLVCR2*	1.797	*Flvcr2*	–0.70	–0.59	Feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family, member	
	GPR34	2.026	*Gpr34*	–0.56	–1.03	G protein-coupled receptor 34	

Примечание. ИБС – ишемическая болезнь сердца, вызванная гипертонией; ИМ – инфаркт миокарда, связанный с гипертонией; СН – сердечная недостаточность, связанная с гипертонией; HT/norm – уровень транскрипции у пациентов-гипертоников, отнесенный к уровню транскрипции у людей с нормальным уровнем артериального давления.

Таблица 4. Анализ транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию ДЭГ кластера "Downregulated"

Термин ChEA_2022	ТФ	Число ДЭГ	Adjusted *p*-value	ДЭГ кластера "Downregulated"
SMARCA4 23332759 ChIP-Seq OLIGODENDROCYTES Mouse	SMARCA4	20	0.000068	*CX3CR1, NCOA2, NRP2, PGAP1, PCDH7, CD180, PPP1R9A, TANC2, SLC7A2, RASGRP3, NAV3, NFIB, SPATA13, FLVCR2, KIF1B, TPPP, PIK3AP1, FREM1, PPARGC1A, CREB5*
NR3C1 27076634 ChIP-Seq BEAS2B Human Lung Inflammation	NR3C1#	21	0.00165	*NRP2, NFIX, PCDH7, CD180, FNDC3B, ATP2B4, CACNA2D2, PPP1R9A, POU2F2, TANC2, SLC7A2, NAV3, DHRS9, NFIB, KDR, FLVCR2, KIF1B, TPPP, PIK3AP1, PPARGC1A, CREB5*
OLIG2 23332759 ChIP-Seq OLIGODENDROCYTES Mouse	OLIG2	15	0.00172	*NCOA2, PGAP1, PCDH7, PTCH1, CD180, FNDC3B, PPP1R9A, TANC2, RASGRP3, NAV3, SPATA13, KIF1B, PIK3AP1, FREM1, CREB5*
SOX2 21211035 ChIP-Seq LN229 Gbm	SOX2	19	0.00205	*CX3CR1, TUB, NCOA2, NRP2, PGAP1, RASGRF2, PCDH7, CD180, ABCC6, GRIK3, FNDC3B, ATP2B4, PPP1R9A, SLC7A2, RASGRP3, NAV3, NFIB, PPARGC1A, CREB5*
MTF2 20144788 ChIP-Seq MESCs Mouse	MTF2	18	0.00213	*TUB, SNED1, NRP2, NFIX, RASGRF2, PCDH7, PTCH1, GRIK3, FNDC3B, CACNA2D2, SMAD9, TMC7, SLC7A2, MLXIPL, NFIB, KDR, TPPP, PIK3AP1*
PPARG 20176806 ChIP-Seq 3T3-L1 Mouse	PPARG#	13	0.00213	*NRP2, PGAP1, CD180, ATP2B4, MPEG1, NAV3, NFIB, KIF1B, NOS1, TPPP, PIK3AP1, PPARGC1A, CREB5*
TCF4 22108803 ChIP-Seq LS180 Human	TCF4	14	0.00213	*SNED1, NCOA2, P2RY13, NFIX, PTCH1, ATP2B4, ALOX12, TANC2, MLXIPL, NAV3, NFIB, NOS1, TPPP, CREB5*
YAP1 20516196 ChIP-Seq MESCs Mouse	YAP1	15	0.00242	*NCOA2, NFIX, RASGRF2, PTCH1, CD180, ABCC6, GRIK3, PPP1R9A, TANC2, SLC7A2, NAV3, NFIB, FLVCR2, NOS1, PPARGC1A*
IRF8 27001747 Chip-Seq BMDM Mouse	IRF8	13	0.00377	*CX3CR1, P2RY13, NRP2, PGAP1, GPR34, CD180, MPEG1, SCML4, DHRS9, PIK3AP1, EVI2B, PLCB2, CREB5*
BACH1 22875853 ChIP-PCR HELA AND SCP4 Human	BACH1	11	0.00488	*TUB, SNED1, NCOA2, PGAP1, PCDH7, ABCC6, KDR, ATP2B4, KIF1B, PLCB2, CREB5*
TCF4 23295773 ChIP-Seq U87 Human	TCF4	19	0.00872	*NCOA2, NRP2, PGAP1, NFIX, RASGRF2, PCDH7, ABCC6, GRIK3, ATP2B4, CACNA2D2, ALOX12, PPP1R9A, TANC2, RASGRP3, FLVCR2, KIF1B, FREM1, PPARGC1A, CREB5*
CEBPD 21427703 ChIP-Seq 3T3-L1 Mouse	CEBPD	11	0.0177	*CX3CR1, SNED1, NRP2, PGAP1, NFIX, NFIB, PCDH7, CD180, FNDC3B, TANC2, CREB5*
MYCN 21190229 ChIP-Seq SHEP-21N Human	MYCN	5	0.0190	*PCDH7, PIK3AP1, MPEG1, SLC7A2, CREB5*
ESR1 22446102 ChIP-Seq UTERUS Mouse	ESR1#	10	0.0220	*SNED1, NCOA2, SCML4, NAV3, CD180, KDR, FNDC3B, ATP2B4, FLVCR2, CACNA2D2*
RUNX2 22187159 ChIP-Seq PCA Human	RUNX2	16	0.0277	*SNED1, PGAP1, PCDH7, PTCH1, GRIK3, FNDC3B, CACNA2D2, TMC7, PPP1R9A, RASGRP3, NFIB, SPATA13, KDR, TPPP, PPARGC1A, CREB5*
AR 27270436 ChIP-Seq LNCaP Human Prostate Carcinoma	AR#	4	0.0317	*GABRB3, NFIB, FNDC3B, PIK3AP1*
FOXA2 19822575 ChIP-Seq HepG2 Human	FOXA2	15	0.0347	*SNED1, NCOA2, NRP2, NFIX, PTCH1, ABCC6, FNDC3B, CACNA2D2, TMC7, PPP1R9A, MLXIPL, SPATA13, KIF1B, PIK3AP1, PPARGC1A*
ISL1 27105846 Chip-Seq CPCs Mouse	ISL1	10	0.0347	*NRP2, NAV3, NFIB, PCDH7, PTCH1, CD180, KDR, FNDC3B, FREM1, RASGRP3*
NFE2L2 20460467 ChIP-Seq MEFs Mouse	NFE2L2#	8	0.0347	*PGAP1, SCML4, PCDH7, KIF1B, TMC7, MPEG1, TANC2, RASGRP3*
LEF1 29337183 ChIP-Seq mESC Mouse Stem	LEF1	14	0.0396	*NCOA2, NRP2, PLAG1, PCDH7, PTCH1, GRIK3, CACNA2D2, ALOX12, SLC7A2, SCML4, NFIB, SPATA13, FREM1, CREB5*
BRD4 27068464 Chip-Seq AML-cells Mouse	BRD4#	11	0.0411	*NCOA2, P2RY13, NRP2, SCML4, DHRS9, PTCH1, PIK3AP1, EVI2B, MPEG1, TANC2, RASGRP3*
STAT1 17558387 ChIP-Seq HELA Human	STAT1	10	0.0411	*CX3CR1, SCML4, GPR34, DHRS9, SPATA13, PPP1R9A, POU2F2, MPEG1, SLC7A2, RASGRP3*

Окончание табл. 4

Термин ChEA_2022	ТФ	Число ДЭГ	Adjusted *p*-value	ДЭГ кластера "Downregulated"
STAT3 23295773 ChIP-Seq U87 Human	STAT3[#]	15	0.0411	*GABRB3*, *SNED1*, *NRP2*, *CD180*, *GRIK3*, *FNDC3B*, *CACNA2D2*, *TMC7*, *ALOX12*, *TANC2*, *RASGRP3*, *MLXIPL*, *KIF1B*, *FREM1*, *CREB5*
KDM2B 26808549 Chip-Seq REH Human	KDM2B	10	0.0449	*TUB*, *PGAP1*, *NFIB*, *PCDH7*, *CD180*, *SPATA13*, *KIF1B*, *PPP1R9A*, *CREB5*, *RASGRP3*
TCF4 18268006 ChIP-ChIP LS174T Human	TCF4	5	0.0449	*NRP2*, *PGAP1*, *DHRS9*, *ATP2B4*, *RASGRP3*
EZH2 27294783 Chip-Seq ESCs Mouse	EZH2	11	0.0474	*GABRB3*, *SNED1*, *NRP2*, *NFIX*, *SCML4*, *PTCH1*, *CACNA2D2*, *ALOX12*, *TPPP*, *PPP1R9A*, *PPARGC1A*

[#] Транскрипционные факторы, кодируемые генами, ассоциированными с гипертонией. ТФ – транскрипционный фактор.

играть как компенсаторную, так и патогенетическую роль, что становится понятным при проведении функционального анализа конкретного гена. Снижение экспрессии генов способствует многим процессам, ассоциированным с активацией симпатической нервной системы, увеличением окислительного стресса в тканях и нейропротекторным действием, что обсуждалось нами ранее для некоторых ДЭГ (Makovka et al., 2024; Oshchepkov et al., 2024).

Обнаруженное для группы со стресс-индуцированным снижением экспрессии обогащение связанными терминами Plasma membrane и Cell periphery, объединяющее соответственно 30 и 33 гена из 52, хорошо согласуется с представлениями о том, что наиболее общим в модели хронического стресса, характерного для людей, является изменение состава межклеточного пространства, связанное с высвобождением кортикостерона и катехоламинов в результате активации оси гипоталамус–гипофиз–надпочечники и симпатической нервной системы соответственно, что запускает различные сигнальные пути, в том числе генерацию свободных радикалов, апоптоз, повышенное синаптическое высвобождение глутамата и синтез/выброс цитотоксических цитокинов (Bali et al., 2013). Эти межклеточные сигналы, в свою очередь, могут оказывать влияние на экспрессию генов, ведущую к структурным и функциональным изменениям плазматических мембран (Bali et al., 2013), включая изменение липидного состава мембран тромбоцитов (Bikulciene et al., 2024), а также изменения возбудимости нейронов за счет изменения структуры и состава мембраны (Rosenkranz et al., 2010; Matovic et al., 2020), в том числе постсинаптической мембраны, на что в нашем исследовании указывает обогащение термина "Postsynapse". Анализ биологических процессов и метаболических путей кластера ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии также подчеркнул роль сигнальной трансдукции и постсинаптической сигнальной трансмиссии (см. табл. 2). Стресс также может вызывать нарушения экспрессии белков маркеров аутофагии и изменять концентрацию лизосомальных белков и ферментов (Ulecia-Moron et al., 2025). В целом значительное число общих для различных органов и тканей генов, снижающих экспрессию в ответ на стресс, говорит о масштабах изменений, затрагивающих плазматическую мембрану в ответ на стресс-индуцированное высвобождение в межклеточное пространство множества активных сигнальных молекул.

В кластере ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии выявлены восемь генов, ассоциированных с гипертонией, изменения экспрессии которых могут вносить вклад в биологические процессы и метаболические пути, участвующие в регуляции уровня артериального давления: Adrenergic signaling in cardiomyocytes (Maltsev et al., 2019), Aldosterone synthesis and secretion (Ferreira et al., 2021), Lipid oxidation (Leong, 2021).

Проведенный нами анализ позволил выявить гены, кодирующие транскрипционные факторы, которые могут быть вовлечены в регуляцию экспрессии генов в кластере ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии. Данный анализ подчеркивает, что наиболее значимую роль в происходящих процессах могут играть SMARCA4 (SWI/SNF related BAF chromatin remodeling complex subunit ATPase 4) и NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1), кодирующий глюкокортикоидный рецептор.

SMARCA4 относится к семейству белков, обладающих хеликазной и АТФазной активностью и играющих ключевую роль в организации конформации хроматина, что имеет решающее значение для регуляции экспрессии генов. Участие комплекса SWI/SNF (BRG1 комплекс) показано в эпигенетической и транскрипционной регуляции в гладкомышечных клетках сосудов, что связывает его с развитием сердечно-сосудистых патологий (Liu H. et al., 2024). Генетические полиморфизмы в гене *SMARCA4* ассоциированы с риском развития гипертонии (Ma et al., 2019). Показано, что комплекс SWI/SNF может быть напрямую рекрутирован глюкокортикоидным рецептором NR3C1 для ремоделирования хроматина при глюкокортикоид-зависимой активации генов, впоследствии потенцируя действие глюкокортикоидного рецептора (Fryer, Archer, 1998; Wallberg et al., 2000). В связи с этим логично выглядят результаты о том, что SMARCA4 может играть роль ключевого регулятора при индуцированном глюкокортикоидами повышении внутриглазного давления (рассматривается авторами как глазная гипертония (ocular hypertension)), что может приводить ко вторичной глаукоме (Patel et al., 2025).

NR3C1 (глюкокортикоидный рецептор) ассоциирован с гипертонией. Он активируется стероидными гормонами и функционирует как фактор транскрипции (Timmermans et al., 2019). Ранее нами было показано снижение экспрессии *Nr3c1* при воздействии стресса в гипоталамусе

крыс обеих линий (у НИСАГ log2FC = −0.133 и у WAG log2FC = −0.113). Снижение активности глюкокортикоидных рецепторов после повышения уровня глюкокортикоидов при стрессе можно интерпретировать как процесс регуляции гомеостаза глюкокортикоидных рецепторов (Burnstein et al., 1991). Результаты настоящей работы позволяют предполагать участие NR3C1 в регуляции 21 гена, ассоциированного с кластером ДЭГ со стресс-индуцированным снижением экспрессии. Тот факт, что списки генов-мишеней NR3C1 и SMARCA4 значительно пересекаются (в табл. 4 представлено 14 общих мишеней, *p*-value = 0.0007), соответствует процитированным выше данным о том, что регуляция этими транскрипционными факторами взаимосвязана, и, соответственно, многие найденные нами гены могут претерпевать эпигенетические модификации через действие SMARCA4 вследствие стресса, основным сигналом которого является активация NR3C1.

Использованный в нашем исследовании подход к анализу данных позволил выявить 14 ДЭГ периферической крови (см. табл. 3). Эти гены в настоящее время не ассоциированы с гипертонией, однако подход, который мы применили, позволяет предположить, что они могут быть полезны как потенциальные периферические маркеры, ассоциированные с наличием психоэмоционального стресса у пациентов с гипертонией. Полученные нами результаты не позволяют с достоверностью определить, какие маркеры периферической крови окажутся наиболее актуальными в клинике. Для ответа на этот вопрос необходимы специальные исследования, направленные на подтверждение роли выявленных маркеров в крови пациентов с хронической гипертонией. Такие работы также будут способствовать определению их возможных референсных значений для использования в клинике.

Заключение

Выявленное в нашем исследовании стресс-индуцированное снижение экспрессии генов, участвующих в функционировании плазматической мембраны и одновременно во взаимодействии с межклеточным пространством, в качестве общего компонента, отражающего наиболее значимый вклад воздействия психоэмоционального стресса в формирование гипертензивного статуса пациентов, представляется одним из фундаментальных процессов, связывающих хронический стресс и гипертонию, в первую очередь, для гипоталамуса – ключевого звена этой связи, находящегося в фокусе проведенного анализа. Значительное число опубликованных результатов подтверждает воздействие стресса на плазматическую мембрану, причем этот процесс оказывается универсальным даже при сравнении ответа на стресс крысы и дрозофилы (Подколодная и др., 2025). Одновременно, согласно мембранной концепции патогенеза артериальной гипертензии (Орлов, 2019), изменение структуры и проницаемости мембран является одним из основных процессов, лежащих в основе нарушений, приводящих к развитию гипертонической болезни. Выявленное значительное количество генов-мишеней транскрипционного фактора SMARCA4, вероятно, участвующего в их эпигенетической регуляции, можно рассматривать как наиболее вероятный общий фактор, приводящий к долгосрочному изменению паттерна экспрессии генов в результате хронического стресса, что определяет перспективы его дальнейших исследований. Результаты выполненного анализа позволили предложить маркеры периферической крови, которые потенциально могут быть использованы в клинике для диагностики наличия психоэмоционального стресса.

Список литературы /References

Орлов С.Н. Мембранная теория патогенеза артериальной гипертензии: что мы знаем об этом полвека спустя? *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):234-247. doi 10.20538/1682-0363-2019-2-234-247
[Orlov S.N. Membrane theory of the pathogenesis of arterial hypertension: what do we know about this, half a century later? *Bulletin of Siberian Medicine.* 2019;18(2):234-247. doi 10.20538/1682-0363-2019-2-234-247 (in Russian)]

Подколодная О.А., Дерюженко М.А., Твердохлеб Н.Н., Золотарева К.А., Маковка Ю.В., Подколодный Н.Л., Суслов В.В., … Кондратюк Е.Ю., Редина О.Е., Маркель А.Л., Грунтенко Н.Е., Пономаренко М.П. База знаний FlyDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам *Drosophila melanogaster* – модельного объекта биомедицины. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(7):952-962. doi 10.18699/vjgb-25-101
[Podkolodnaya O.A., Deryuzhenko M.A., Tverdokhleb N.N., Zolotareva K.A., Makovka Yu.V., Podkolodny N.L., Suslov V.V., … Kondratyuk E.Yu., Redina O.E., Markel A.L., Gruntenko N.E., Ponomarenko M.P. FlyDEGdb knowledge base on differentially expressed genes of *Drosophila melanogaster*, a model object in biomedicine. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2025;29(7):952-962. doi 10.18699/vjgb-25-101]

Чадаева И.В., Филонов С.В., Золотарева К.А., Хандаев Б.М., Ершов Н.И., Подколодный Н.Л., Кожемякина Р.В., … Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Маркель А.Л., Пономаренко М.П., Ощепков Д.Ю. База знаний RatDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам крысы как модельного объекта биомедицинских исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):794-806. doi 10.18699/VJGB-23-92
[Chadaeva I.V., Filonov S.V., Zolotareva K.A., Khandaev B.M., Ershov N.I., Podkolodnyy N.L., Kozhemyakina R.V., … Stefanova N.A., Kolosova N.G., Markel A.L., Ponomarenko M.P., Oshchepkov D.Y. RatDEGdb: a knowledge base of differentially expressed genes in the rat as a model object in biomedical research. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):794-806. doi 10.18699/VJGB-23-92]

Advani V.M., Ivanov P. Translational control under stress: reshaping the translatome. *BioEssays.* 2019;41(5):e1900009. doi 10.1002/bies.201900009

Ahn S., Jeong E., Min J.W., Kim E., Choi S.S., Kim C.J., Lee D.C. Identification of genes dysregulated by elevation of microRNA-210 levels in human trophoblasts cell line, Swan 71. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(5):e12722. doi 10.1111/aji.12722

Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Awad K.S., Elinoff J.M., Wang S., Gairhe S., Ferreyra G.A., Cai R., Sun J., Solomon M.A., Danner R.L. Raf/ERK drives the proliferative and invasive phenotype of BMPR2-silenced pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(2):L187-L201. doi 10.1152/ajplung.00303.2015

Bali A., Gupta S., Singh N., Jaggi A.S. Implicating the role of plasma membrane localized calcium channels and exchangers in stress-induced deleterious effects. *Eur J Pharmacol*. 2013;714(1-3):229-238. doi 10.1016/j.ejphar.2013.06.010

Bautista L.E., Bajwa P.K., Shafer M.M., Malecki K.M.C., McWilliams C.A., Palloni A. The relationship between chronic stress, hair cortisol and hypertension. *Int J Cardiol Hypertens*. 2019;2:100012. doi 10.1016/j.ijchy.2019.100012

Baymiller M., Moon S.L. Stress granules as causes and consequences of translation suppression. *Antioxid Redox Signal*. 2023;39(4-6): 390-409. doi 10.1089/ars.2022.0164

Bikulciene I., Baleisis J., Mazgelyte E., Rudys R., Vosyliute R., Simkunaite-Rizgeliene R., Kaminskas A., Karciauskaite D. Impact of chronic psychological stress on platelet membrane fatty acid composition in a rat model of type 1 diabetes Mellitus. *Lipids Health Dis*. 2024;23(1):69. doi 10.1186/s12944-024-02067-3

Burford N.G., Webster N.A., Cruz-Topete D. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2150. doi 10.3390/ijms18102150

Burnstein K.L., Bellingham D.L., Jewell C.M., Powell-Oliver F.E., Cidlowski J.A. Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids*. 1991;56(2):52-58. doi 10.1016/0039-128x(91)90124-e

Carmichael C.Y., Wainford R.D. Hypothalamic signaling mechanisms in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17(5):39. doi 10.1007/s11906-015-0550-4

Chadaeva I., Ponomarenko P., Kozhemyakina R., Suslov V., Bogomolov A., Klimova N., Shikhevich S., Savinkova L., Oshchepkov D., Kolchanov N.A., Markel A., Ponomarenko M. Domestication explains two-thirds of differential-gene-expression variance between domestic and wild animals; the remaining one-third reflects intraspecific and interspecific variation. *Animals* (*Basel*). 2021;11(9):2667. doi 10.3390/ani11092667

Che Y., Zhou Z., Shu Y., Zhai C., Zhu Y., Gong S., Cui Y., Wang J.F. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett*. 2015;584:208-213. doi 10.1016/j.neulet.2014.10.031

de Nadal E., Ammerer G., Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):833-845. doi 10.1038/nrg3055

Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. doi 10.1093/bioinformatics/bts635

Efron B., Halloran E., Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(23):13429-13434. doi 10.1073/pnas.93.23.13429

Evangelista J.E., Xie Z., Marino G.B., Nguyen N., Clarke D.J.B., Ma'ayan A. Enrichr-KG: bridging enrichment analysis across multiple libraries. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(W1):W168-W179. doi 10.1093/nar/gkad393

Ferreira N.S., Tostes R.C., Paradis P., Schiffrin E.L. Aldosterone, inflammation, immune system, and hypertension. *Am J Hypertens*. 2021;34(1):15-27. doi 10.1093/ajh/hpaa137

Fontes M.A.P., Marins F.R., Patel T.A., de Paula C.A., Dos Santos Machado L.R., de Sousa Lima E.B., Ventris-Godoy A.C., Viana A.C.R., Linhares I.C.S., Xavier C.H., Filosa J.A., Patel K.P. Neurogenic background for emotional stress-associated hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2023;25(7):107-116. doi 10.1007/s11906-023-01235-7

Fryer C.J., Archer T.K. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*. 1998;393(6680): 88-91. doi 10.1038/30032

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: PAleontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica*. 2001;4(1):1-9

Hering D., Lachowska K., Schlaich M. Role of the sympathetic nervous system in stress-mediated cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17(10):80. doi 10.1007/s11906-015-0594-5

Hovatta I., Juhila J., Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res*. 2010;68(4):261-275. doi 10.1016/j.neures.2010.08.007

Jung Y.W., Shim J.I., Shim S.H., Shin Y.J., Shim S.H., Chang S.W., Cha D.H. Global gene expression analysis of cell-free RNA in amniotic fluid from women destined to develop preeclampsia. *Medicine* (*Baltimore*). 2019;98(3):e13971. doi 10.1097/MD.0000000000013971

Kinsman B.J., Nation H.N., Stocker S.D. Hypothalamic signaling in body fluid homeostasis and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19(6):50. doi 10.1007/s11906-017-0749-7

Koper A., Zeef L.A., Joseph L., Kerr K., Gosney J., Lindsay M.A., Booton R. Whole transcriptome analysis of pre-invasive and invasive early squamous lung carcinoma in archival laser microdissected samples. *Respir Res.* 2017;18(1):12. doi 10.1186/s12931-016-0496-3

Lambert A.J., Brand M.D. Reactive oxygen species production by mitochondria. In: Stuart J.A. (Ed.) Mitochondrial DNA. Methods in Molecular Biology™. Vol. 554. Humana Press, 2009;165-181. doi 10.1007/978-1-59745-521-3_11

Lambert E.A., Lambert G.W. Stress and its role in sympathetic nervous system activation in hypertension and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13(3):244-248. doi 10.1007/s11906-011-0186-y

Leek J.T., Johnson W.E., Parker H.S., Jaffe A.E., Storey J.D. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(6):882-883. doi 10.1093/bioinformatics/bts034

Leong X.F. Lipid oxidation products on inflammation-mediated hypertension and atherosclerosis: a mini review. *Front Nutr*. 2021;8: 717740. doi 10.3389/fnut.2021.717740

Liu H., Zhao Y., Zhao G., Deng Y., Chen Y.E., Zhang J. SWI/SNF complex in vascular smooth muscle cells and its implications in cardiovascular pathologies. *Cells.* 2024;13(2):168. doi 10.3390/cells13020168

Liu M.Y., Li N., Li W.A., Khan H. Association between psychosocial stress and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Res*. 2017;39(6):573-580. doi 10.1080/01616412.2017.1317904

Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. doi 10.1186/s13059-014-0550-8

Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. *Database* (*Oxford*). 2011;baq036. doi 10.1093/database/baq036

Ma H., He Y., Bai M., Zhu L., He X., Wang L., Jin T. The genetic polymorphisms of *ZC3HC1* and *SMARCA4* are associated with hypertension risk. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(11):e942. doi 10.1002/mgg3.942

Maciejak A., Kiliszek M., Michalak M., Tulacz D., Opolski G., Matlak K., Dobrzycki S., Segiet A., Gora M., Burzynska B. Gene expression profiling reveals potential prognostic biomarkers associated with the progression of heart failure. *Genome Med.* 2015;7(1):26. doi 10.1186/s13073-015-0149-z

Makovka Y.V., Oshchepkov D.Y., Fedoseeva L.A., Markel A.L., Redina O.E. Effect of short-term restraint stress on the expression of genes associated with the response to oxidative stress in the hypothalamus of hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats. *Antioxidants* (*Basel*). 2024;13(11):1302. doi 10.3390/antiox13111302

Maltsev A.V., Evdokimovskii E.V., Kokoz Y.M. α2-Adrenoceptor signaling in cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats starts to impair already at early age. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;512(4):908-913. doi 10.1016/j.bbrc.2019.03.117

Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: Sassard J. (Ed.) Genetic Hypertension. London: John Libbey Eurotext Ltd., 1992;218:405-407

Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Mahanova N.A., Jacobson G.S. Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats. In: McCarty R., Blizard D.A., Chevalier R.L. (Eds) Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies. In the series Handbook of Hypertension. Amsterdam: Elsevier, 1999;493-526

Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Y.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J Endocrinol*. 2007;195(3):439-450. doi 10.1677/JOE-07-0254

Marques F.Z., Campain A.E., Tomaszewski M., Zukowska-Szczechowska E., Yang Y.H., Charchar F.J., Morris B.J. Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. *Hypertension.* 2011;58(6): 1093-1098. doi 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180729

Matovic S., Ichiyama A., Igarashi H., Salter E.W., Sunstrum J.K., Wang X.F., Henry M., Kuebler E.S., Vernoux N., Martinez-Trujillo J., Tremblay M.E., Inoue W. Neuronal hypertrophy dampens neuronal intrinsic excitability and stress responsiveness during chronic stress. *J Physiol.* 2020;598(13):2757-2773. doi 10.1113/JP279666

Montezano A.C., Dulak-Lis M., Tsiropoulou S., Harvey A., Briones A.M., Touyz R.M. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol*. 2015;31(5):631-641. doi 10.1016/j.cjca.2015.02.008

Mura M., Cecchini M.J., Joseph M., Granton J.T. Osteopontin lung gene expression is a marker of disease severity in pulmonary arterial hypertension. *Respirology*. 2019;24(11):1104-1110. doi 10.1111/resp.13557

Neusser M.A., Lindenmeyer M.T., Moll A.G., Segerer S., Edenhofer I., Sen K., Stiehl D.P., Kretzler M., Grone H.J., Schlondorff D., Cohen C.D. Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy. *Am J Pathol*. 2010;176(2):594-607. doi 10.2353/ajpath.2010.090268

Oshchepkov D., Chadaeva I., Kozhemyakina R., Zolotareva K., Khandaev B., Sharypova E., Ponomarenko P., … Kolosova N.G., Nazarenko M., Kolchanov N.A., Markel A., Ponomarenko M. Stress reactivity, susceptibility to hypertension, and differential expression of genes in hypertensive compared to normotensive patients. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2835. doi 10.3390/ijms23052835

Oshchepkov D.Y., Makovka Y.V., Fedoseeva L.A., Seryapina A.A., Markel A.L., Redina O.E. Effect of short-term restraint stress on the hypothalamic transcriptome profiles of rats with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension (ISIAH) and normotensive Wistar Albino Glaxo (WAG) rats. *Int J Mol Sci*. 2024;25(12):6680. doi 10.3390/ijms25126680

Patel P.D., Patel G.C., Millar J.C., Feris S., Curry S., Geisert E.E., Clark A.F. Mechanistic insights into glucocorticoid-induced ocular hypertension using differences in mouse strain responsiveness. *bioRxiv.* 2025. doi 10.1101/2025.07.02.662542

Picard M., McEwen B.S. Psychological stress and mitochondria: a systematic review. *Psychosom Med.* 2018;80(2):141-153. doi 10.1097/PSY.0000000000000545

Plaza-Florido A., Altmae S., Esteban F.J., Lof M., Radom-Aizik S., Ortega F.B. Cardiorespiratory fitness in children with overweight/obesity: insights into the molecular mechanisms. *Scand J Med Sci Sports*. 2021;31(11):2083-2091. doi 10.1111/sms.14028

Qiu X., Lin J., Liang B., Chen Y., Liu G., Zheng J. Identification of hub genes and microRNAs associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension by integrated bioinformatics analyses. *Front Genet*. 2021;12:667406. doi 10.3389/fgene.2021.636934

Rosenkranz J.A., Venheim E.R., Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biol Psychiatry*. 2010;67(12): 1128-1136. doi 10.1016/j.biopsych.2010.02.008

Saei H., Govahi A., Abiri A., Eghbali M., Abiri M. Comprehensive transcriptome mining identified the gene expression signature and differentially regulated pathways of the late-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2021;25:91-102. doi 10.1016/j.preghy.2021.05.007

Shikhevich S., Chadaeva I., Khandaev B., Kozhemyakina R., Zolotareva K., Kazachek A., Oshchepkov D., … Markel A., Savinkova L., Kolchanov N.A., Kozlov V., Ponomarenko M. Differentially expressed genes and molecular susceptibility to human age-related diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3996. doi 10.3390/ijms24043996

Spruill T.M. Chronic psychosocial stress and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12(1):10-16. doi 10.1007/s11906-009-0084-8

Szklarczyk D., Kirsch R., Koutrouli M., Nastou K., Mehryary F., Hachilif R., Gable A.L., Fang T., Doncheva N.T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D638-D646. doi 10.1093/nar/gkac1000

Textoris J., Ivorra D., Ben Amara A., Sabatier F., Menard J.P., Heckenroth H., Bretelle F., Mege J.L. Evaluation of current and new biomarkers in severe preeclampsia: a microarray approach reveals the *VSIG4* gene as a potential blood biomarker. *PLoS One*. 2013; 8(12):e82638. doi 10.1371/journal.pone.0082638

Timmermans S., Souffriau J., Libert C. A general introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol.* 2019;10:1545. doi 10.3389/fimmu.2019.01545

Ulecia-Moron C., Bris A.G., MacDowell K.S., Cervero-Garcia P., Madrigal J.L.M., Garcia-Bueno B., Pereira M.P., Leza J.C., Caso J.R. Chronic mild stress dysregulates autophagy, membrane dynamics, and lysosomal status in frontal cortex and hippocampus of rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2025;94:24-35. doi 10.1016/j.euroneuro.2025.02.005

Vedi M., Smith J.R., Thomas Hayman G., Tutaj M., Brodie K.C., De Pons J.L., Demos W.M., … Tutaj M.A., Wang S.J., Zacher S., Dwinel M.R., Kwitek A.E. 2022 updates to the Rat Genome Database: a Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable (FAIR) resource. *Genetics*. 2023;224(1):iyad042. doi 10.1093/genetics/iyad042

Wallberg A.E., Neely K.E., Hassan A.H., Gustafsson J.A., Workman J.L., Wright A.P. Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor τ1 activation domain. *Mol Cell Biol*. 2000;20(6): 2004-2013. doi 10.1128/MCB.20.6.2004-2013.2000

Wu Y.B., Zang W.D., Yao W.Z., Luo Y., Hu B., Wang L., Liang Y.L. Analysis of FOS, BTG2, and NR4A in the function of renal medullary hypertension. *Genet Mol Res*. 2013;12(3):3735-3741. doi 10.4238/2013.September.19.4

Xie Z., Bailey A., Kuleshov M.V., Clarke D.J.B., Evangelista J.E., Jenkins S.L., Lachmann A., Wojciechowicz M.L., Kropiwnicki E., Jagodnik K.M., Jeon M., Ma'ayan A. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Curr Protoc*. 2021;1(3):e90. doi 10.1002/cpz1.90

Yao X., Jing T., Wang T., Gu C., Chen X., Chen F., Feng H., Zhao H., Chen D., Ma W. Molecular characterization and elucidation of pathways to identify novel therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Front Physiol*. 2021;12:694702. doi 10.3389/fphys.2021.694702

Yong H.E., Melton P.E., Johnson M.P., Freed K.A., Kalionis B., Murthi P., Brennecke S.P., Keogh R.J., Moses E.K. Genome-wide transcriptome directed pathway analysis of maternal pre-eclampsia susceptibility genes. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128230. doi 10.1371/journal.pone.0128230

Zheng Y., He J.Q. Common differentially expressed genes and pathways correlating both coronary artery disease and atrial fibrillation. *EXCLI J.* 2021;20:126-141. doi 10.17179/excli2020-3262

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 07.10.2025. После доработки 24.10.2025. Принята к публикации 28.10.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1338-1347

doi 10.18699/vjgb-25-140

Overcoming the problem of heterologous proteins folding to improve the efficiency of yeast bioproducers

N.V. Dorogova, S.A. Fedorova

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

Abstract. In the last few decades, yeasts have been successfully engineered to be an excellent microbial cell factory for producing recombinant proteins with desired properties. This was due to their cost-effective characteristics and the successful application of genomic modification technologies. In addition, yeasts have a conserved post-translational modification pathway among eukaryotic organisms, which ensures the correct folding of recombinant proteins. However, the folding machinery cannot always cope with the load caused by the overexpression of recombinant genes, leading to the accumulation of misfolded proteins, the formation of aggregates and low production. Therefore, the protein-folding capacity of the endoplasmic reticulum (ER) remains one of the main limitations for heterologous protein production in yeast host organisms. However, thanks to many years of effective research of the fundamental mechanisms of protein folding, these limitations have been largely overcome. The study of folding in both model organisms and bioproducers has allowed to identify the molecular factors and cellular mechanisms that determine how a nascent polypeptide chain acquires its three-dimensional functional structure. This knowledge has become the basis for developing new effective techniques for engineering highly productive yeast strains. In this review, we examined the main cellular mechanisms associated with protein folding, such as ER transition, chaperone binding, oxidative folding, glycosylation, protein quality control. We discuss the effectiveness of applying this knowledge to the development of various engineering techniques aimed at overcoming bottlenecks in the protein folding system. In particular, selection of optimal signal peptides, co-expression with chaperones and foldases, modification of protein quality control, inhibition of proteolysis, and other techniques have allowed to enhance the ability of yeast bioproducers to effectively secrete heterologous proteins.

Key words: yeast bioproducers; protein folding; endoplasmic reticulum; molecular chaperones; recombinant proteins

For citation: Dorogova N.V., Fedorova S.A. Overcoming the problem of heterologous proteins folding to improve the efficiency of yeast bioproducers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1338-1347. doi 10.18699/vjgb-25-140

Funding. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project No. FWNR-2025-0031.

Решения проблем фолдинга белков для повышения эффективности дрожжевых биопродуцентов

Н.В. Дорогова, С.А. Федорова

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

Аннотация. За последние несколько десятилетий дрожжи стали наиболее эффективными биопродуцентами рекомбинантных белков с различными потребительскими свойствами. Это стало возможным благодаря их экономически выгодным характеристикам и успешному применению генно-инженерных технологий. Кроме того, дрожжи обладают консервативным для эукариотических организмов механизмом посттрансляционной модификации белков, который обеспечивает их корректный фолдинг, необходимый для дальнейшей секреции и функциональной активности. Однако аппарат фолдинга не всегда справляется с нагрузкой, вызванной сверхэкспрессией рекомбинантных генов, что приводит к накоплению неправильно свернутых белков, образованию агрегатов и низкой продуктивности дрожжевых штаммов. Таким образом, способность к фолдингу белков в эндоплазматическом ретикулуме по-прежнему остается одним из основных ограничений при синтезе рекомбинатных белков в дрожжевых клетках. Эти ограничения были в значительной степени преодолены благодаря многолетним эффективным исследованиям фундаментальных механизмов белкового фолдинга. Изучение фолдинга как у модельных организмов, так и у биопродуцентов позволило выявить молекулярные факторы и клеточные механизмы, определяющие формирование трехмерной функциональной структуры растущей пептидной цепи. Полученные знания легли в основу разработки новых эффективных методов конструирования высокопродуктивных штаммов дрожжей. В данном обзоре мы рассмотрели основные клеточные механизмы, связанные с фолдингом белков, такие как транспорт через эндоплазматический

© Dorogova N.V., Fedorova S.A., 2025
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

ретикулум, взаимодействие с шаперонами, окислительный фолдинг, гликозилирование и контроль качества белков. Мы обсудили эффективность применения этих знаний при разработке различных инженерных методов, направленных на преодоление узких мест в системе белкового фолдинга. В частности, подбор оптимальных сигнальных пептидов, коэкспрессия с шаперонами и фолдазами, модификация клеточных механизмов контроля качества белков, ингибирование протеолиза и некоторые другие приемы позволили повысить возможности использования дрожжей-продуцентов в качестве эффективной производительной платформы для экспрессии и секреции рекомбинантных белков.

Ключевые слова: дрожжи-продуценты; фолдинг белков; эндоплазматический ретикулум; молекулярные шапероны; рекомбинантные белки

Introduction

Yeast expression systems are excellent for the production of valuable recombinant proteins and peptides widely used as biopharmaceuticals and industrial enzymes. They are commercially viable bioproducers due to their high growth rate, resistance to harmful microbiota, ability to assimilate many food sources, and fairly easy to cultivate in industrial conditions (Thak et al., 2020; Madhavan et al., 2021; De Brabander et al., 2023). The development of genetic and metabolic engineering has increased the efficiency of yeast strains, mainly due to the use of genomic technologies: strong promoters, new vector elements with improved inducers and enhancers, targeted mutagenesis, signaling molecules, high-performance devices for cloning, screening and fermentation (De Brabander et al., 2023; Tsuda, Nonaka, 2024). However, expression at the transcriptional and translational levels often does not correlate with the level of secretion of heterologous proteins, which is due to the insufficient efficiency of the folding mechanism (Ishiwata-Kimata, Kimata, 2023; Zahrl et al., 2023). Therefore, the search for new technological methods for optimizing the synthesis and increasing the yield of heterologous proteins in yeast cells remains an urgent task. A significant direction for its solution is overcoming the problem of folding target proteins into the correct three-dimensional structure.

Proper folding is necessary for the functional activity of synthesized proteins, their intracellular transport and further secretion. Recombinant proteins are secretory and go through a secretory pathway, beginning with folding in the ER and ending with release into the extracellular environment (culture media) (Raschmanová et al., 2021). Proteins are translocated to the ER in an unfolded state and then undergo modification and folding involving ER-resident chaperones, folding enzymes, and glycosylation (Hartl et al., 2011; Saibil, 2013). Disruptions in this machinery result in the accumulation of misfolded proteins in the cytoplasm, where they are recognized by the Protein Quality Control (PQC) system that regulates cellular homeostasis (Korennykh, Walter, 2012). This system includes the Unfolded Protein Response (UPR) signaling pathway, which can trigger refolding of misfolded proteins or initiate their proteolysis.

In some cases, misfolded proteins clump together to form aggregates or Inclusion Bodies (IBs), which can cause cell damage (Yamaguchi, Miyazaki, 2014). Such IBs often contain potentially active proteins with a normal secondary structure, which can be recovered from these aggregates under appropriate conditions (Burgess, 2009; Yamaguchi, Miyazaki, 2014; Singhvi et al., 2021). However, their isolation and refolding procedures are complex, expensive, and inefficient (Singhvi et al., 2021). It is therefore clear that the solution to the folding problem of heterologous proteins must be directly linked to their production process: protein folding engineering and quality control in yeast host strains. In this article, we review various cellular mechanisms and signaling pathways that influence heterologous protein folding and discuss the latest updates to biotechnological strategy allowing to address this issue in order to maximize the yield of recombinant proteins.

Post-translational modifications and folding

Preparation for folding

In yeast, as in other eukaryotes, a newly synthesized peptide must undergo post-translational modification and folding in the endoplasmic reticulum to form the correct spatial conformation. A stable 3D structure determines the functional activity of the protein and its subsequent traffic through the secretory pathway (Schwarz, Blower, 2016).

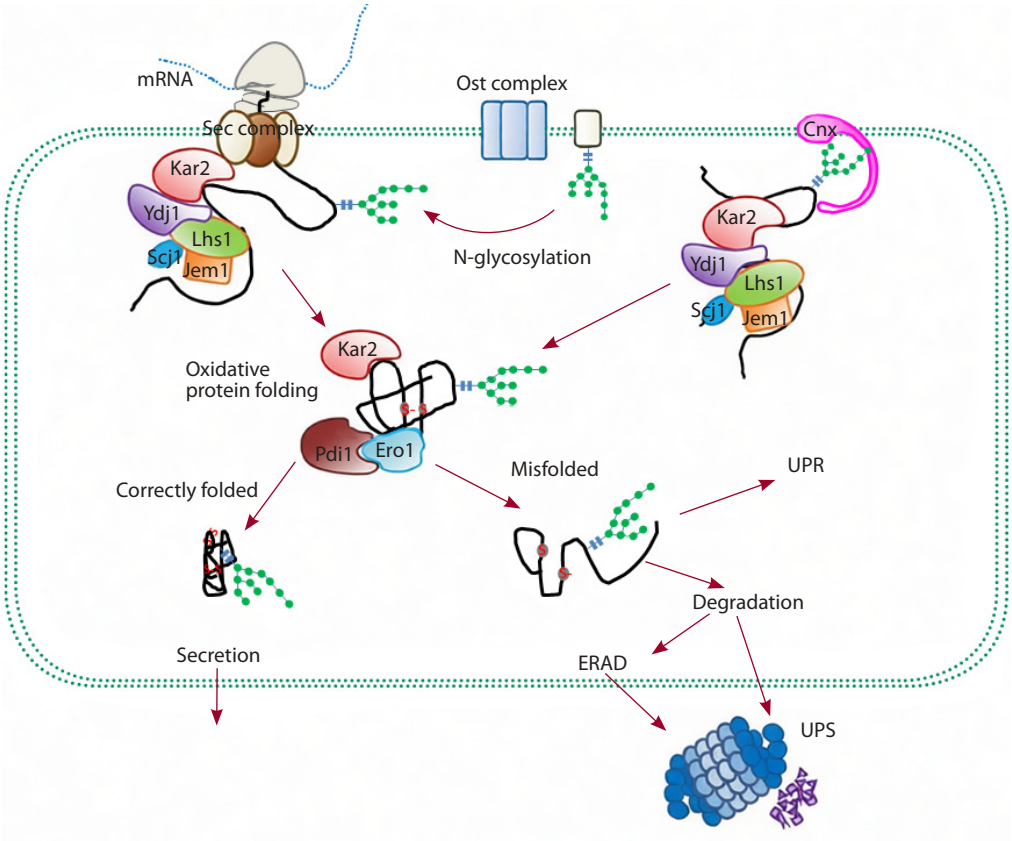
Translation of secretory proteins occurs on cytosolic ribosomes and they are then co-translationally or post-translationally directed to the ER by a specific protein-RNA complex – Signal Recognition Particle (SRP). SRP binds to the N-terminal sequence of a precursor protein, which is called the signal peptide (SP). Transfer across the ER membrane occurs in an unfolded state of the nascent protein and is dependent on the Sec water channel, a multiprotein complex that spans the membrane (Berner et al., 2018; O'Keefe et al., 2022) (see the Figure).

When the unfolded nascent chain appears in the ER lumen, its hydrophobic sequence elements are recognized by ER-resident HSP chaperones: Kar2 (yeast Hsp70) and Ydj1 (yeast Hsp40) (Braakman, Hebert, 2013; Hendershot et al., 2024). They bind to the hydrophobic amino acid side chains exposed by the unfolded proteins. There is evidence that Kar2 assists in the folding of nascent proteins as they enter the ER and remains bound until folding is complete. The Ydj1 chaperone forms transient complexes with Kar2, facilitating its binding to non-native polypeptides (see the Figure). Thus, chaperones prevent premature misfolding of the immature polypeptide chain and protect it from aggregation (Omkar et al., 2024; Ruger-Herreros et al., 2024).

According to some data, the chaperone function of Kar2 in these events also depends on members of the DnaJ-like protein family, such as Jem1 and Scj1, and the nucleotide exchange factor Lhs1 (see the Figure). These co-chaperones promote the ATPase cycle and thus maintain Kar2 activity (Schlenstedt et al., 1995; Steel et al., 2004; de Keyzer et al., 2009).

Oxidative protein folding

3D structure formation begins with the process called Oxidative Protein Folding (OPF), which results in the formation of disulfide bonds due to the oxidation of thiol groups of cysteine



Nascent secretory protein is transferred co-translationally into the ER lumen through the Sec multiprotein complex that spans the ER membrane. At the ER membrane, the protein undergoes N-glycosylation involving the OST complex. The N-glycan-modified peptide chain binds to calnexin (Cnx). When the unfolded nascent chain appears in the ER lumen, it interacts with Kar2 and Ydj1. Jem1, Scj1 and Lhs1 assist in this process. In the ER lumen, the nascent peptide undergoes an OPF process involving Pdi and Ero, which results in disulfide bonds. Accumulation of misfolded proteins in the cytoplasm induces the UPR response which can trigger refolding of misfolded proteins or initiate ERAD.

(Hatahet, Ruddock, 2009; Palma et al., 2023). OPF is carried out by Protein disulfide isomerase (Pdi) (see the Figure). Pdi not only is responsible for the formation of the disulfide bonds in unfolded eukaryotic proteins, but also catalyzes the rearrangement of incorrect disulfide bonds (isomerase activity) (Gross et al., 2006). The OPF pathway, like Pdi, is conserved across eukaryotic organisms. Yeast Pdi1 protein is encoded by the *pdi1* gene, and *pdi1*-deleted yeast strains have low viability and accumulate secretory proteins within the ER lamellae (Mizunaga et al., 1990; Frand, Kaiser, 1998).

The transition of Pdi to the active form is catalyzed by ER sulfhydryl oxidase 1 (Ero1). Ero1 is an oxidoreductase that oxidizes Pdi1 via direct thiol-disulfide exchange (conversion of cystine to cysteine) (Gross et al., 2006; Sevier, Kaiser, 2006). Yeast contains a single *ero1* gene that encodes the Ero1 protein. The loss of *ero1* is lethal for yeast (Niu et al., 2016). Thus, Pdi and Ero act synergistically; for the correct catalysis of disulfide bonds in proteins, a balance of these two factors is necessary (Niu et al., 2016; Wang L., Wang C.C., 2023). The need to maintain such a balance is also due to the fact that the activation of Pdi and Ero occurs via the oxidation–reduction type and the high rate of disulfide bond formation in cells and tissues should create dangerous levels of oxidative stress (Gasser et al., 2008).

Role of glycosylation in promoting protein folding

Proper folding of most proteins requires post-translational modification known as glycosylation. In yeast, secretory proteins are glycoproteins and they contain covalently linked oligosaccharides, which are mainly mannose residues (see the Figure). Predominantly, yeast polypeptides are N-glycosylated, i. e. mannose is N-glycosidically linked to the β-amido group of asparagine. This reaction is catalyzed by the Oligosaccharyltransferase Enzyme Complex (OST) (Kelleher, Gilmore, 2006) and occurs on ER membranes. OST transfers Glc3Man9GlcNAc2-oligosaccharide (where Glc is glucose, Man is mannose, and GlcNAc is N-acetylglucosamine) from the lipid-pyrophosphate donor, dolichol diphosphate, to asparagine residues of nascent polypeptide chains. The protein-linked oligosaccharide is called N-glycan. This glycan has maintained a well-conserved structure throughout evolution and is characteristic of all eukaryotes (Qi et al., 2020). Glycans undergo further processing in the ER by glycosidases. In *Saccharomyces cerevisiae*, the following glycosidases have been described: alpha-glucosidase I encoded by CWH41, alpha-glucosidase II encoded by ROT2, alpha1,2-mannosidase encoded by MNS1. Glycosidases partially deglycosylate and shorten the N-glycan (Herscovics, 1999; Lehle et al., 2006).

Glycosylation promotes folding by enhancing the solubility and stability of the proteins in the ER and the Golgi. Oligosaccharide residues are a marker for interactions with certain chaperones, also assisting in the folding of glycoproteins (Parodi, 2000; Xu C., Ng, 2015).

The N-glycan-modified polypeptide chain is recognized by lectin chaperones (Ware et al., 1995; Caramelo, Parodi, 2015). In mammalian cells, two related ER lectin chaperones, calnexin (Cnx) and calreticulin (Crt), are important for the proper folding of newly synthesized glycoproteins. Calnexin is an integral membrane protein, and calreticulin is a soluble protein found in the ER lumen (see the Figure). They retain glycoproteins in the ER during translation by inhibiting their aggregation and formation of non-canonical disulfide bridges, and also promote their association with other chaperones. In yeast (*S. cerevisiae*), only the calnexin homologue Cne1 has been identified. Cne1 is structurally similar to mammalian calnexin except that it lacks a cytoplasmic tail and does not bind calcium (Parlati et al., 1995). Yeast calnexin has been shown to function as a molecular chaperone similar to mammalian calnexin (Xu X. et al., 2004). A calnexin-like transmembrane protein has also been identified in *S. pombe* (Núñez et al., 2015). However, genes encoding a calreticulin homologue have not yet been identified in the yeast genome.

Protein Quality Control

All eukaryotes have conserved mechanisms that control cellular proteostasis and protect the cell from stress. These are the three main pathways that comprise the quality control system: UPR, ERAD (ER-associated degradation), and autophagy. There are essentially two alternative cellular responses to the accumulation of abnormal proteins. UPR promotes their refolding repair through additional activation of ER chaperones and folding enzymes, while ERAD and autophagy target them for degradation (see the Figure).

Unfolded protein response

In eukaryotes, UPR includes ER-localized molecular chaperones that participate in sensing misfolded proteins, activating downstream signaling cascades, and mitigating proteotoxic ER stress: Inositol-requiring enzyme 1 (Ire1), Activating transcription factor 6 (Atf6), and Protein kinase R-like ER kinase (PERK). However, only Ire1 is highly conserved and has been found in unicellular eukaryotes, including yeast (Schroder et al., 2003; Mori K., 2022). Presumably, through its luminal domain, Ire1 enables direct interaction with exposed hydrophobic groups of misfolded proteins in the ER. This reaction results in the activation of Ire1, and as a result, its C-terminal RNase domain mediates splicing of the Hac1 gene mRNA removing a 252-nucleotide intron near the 3′ end. Then Rlg1, a tRNA ligase, ligates the *hac1* transcript cleaved by Ire1p. Its spliced and unspliced forms are termed Hac1i and Hac1u, respectively ("i" and "u" for induced and uninduced) (Schroder et al., 2003; Xia, 2019). Hac1i mRNA is translated into the transcription factor Hac1. It is then transported into the nucleus where it induces transcription of a large number of genes involved in the UPR mechanism (Hernández-Elvira et al., 2018) including those encoding ER-located molecular chaperones and protein modification enzymes such as *kar2*, *pdi1*, *ero1*, *ecj1*, *lhs1*, *jem1*. Additionally, the Ire1/Hac1 pathway is essential for activating genes that carry out ERAD functions promoting selective removal of terminally damaged proteins (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000).

Hac1 orthologs have been identified in various yeast species, such as *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans*, and *Candida parapsilosis*. All of these species share the Ire1-dependent mechanism of splicing the Hac1 transcripts in response to ER stress (Hernández-Elvira et al., 2018; Fauzee et al., 2020; Ishiwata-Kimata, Kimata, 2023).

However, it has been reported that *S. pombe* probably does not contain a Hac1 ortholog. Its Ire1 triggers a process called Regulated Ire-dependent decay (Kimmig et al., 2012). In *S. pombe*, stress-activated IRE1 cleaves mRNAs located in the ER, leading to their exonuclease-mediated degradation (Hernández-Elvira et al., 2018).

ER-associated degradation

Proteins that have not achieved their native conformation after repeated folding remain in the ER, bound to ER chaperones that prevent their aggregation. If a protein remains unfolded in the ER for too long, it is identified as potentially harmful and eliminated via ER-associated degradation. The process involves several steps: the recognition of substrates in the lumen and membrane of the ER, their translocation into the cytosol, ubiquitination and degradation in the 26S proteasome. Thus, ERAD is associated with the highly conserved ubiquitin proteasome system (UPS) (Ruggiano et al., 2014; Krshnan et al., 2022). In all eukaryotes, it includes the following main components: ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), ubiquitin ligase (E3), and 26S proteasome (Pickart, 2001). If a misfolded glycoprotein stays in the ER for a critically long time, its N-linked glycans are trimmed by yeast 1,2-mannosidase1 – Htm1. This trimmed N-glycan is recognized by a lectin chaperone known as Yos9. At the same time, the Hrd3 protein (HMG-CoA reductase degradation protein 3) associates with hydrophobic amino acid residues exposed on the surface of misfolded glycoproteins (Thibault, Ng, 2012; Berner et al., 2018). After recognition and binding to Hrd3 and Yos9, the substrate protein is transferred to the E3 ubiquitin ligases complex responsible for ubiquitination – Hrd1 (HMG-CoA reductase degradation protein 1). Hrd1 is embedded in the ER membrane and is in conjunction with Der1 (Degradation in the endoplasmic reticulum protein 1) and Usa 1 (U1 SNP1-associating protein 1), which mediates retrotranslocation of misfolded proteins through the ER membrane from the lumen side of the cytosolic membrane. The Hrd1 E3 ubiquitin ligase contains a RING domain that accepts ubiquitin from the membrane-associated protein Ubc7 (E2 ubiquitin-conjugating ligase). Finally, Hrd1 transfers ubiquitin to the substrate protein. Proteins covalently linked to one or more ubiquitin molecules are recognized by proteasome (Preston, Brodsky, 2017; Berner et al., 2018; Krshnan et al., 2022).

Ways to solve the protein folding problem in yeast synthetic biology

Selection of ER-targeting signal peptides

ER-targeting signal peptides (SPs) are critical components for the secretion of heterologous proteins because they are required for their correct transport and localization to the ER,

where modification and folding occur (Zha et al., 2023). SPs are short sequences, 15 to 30 amino acids in length, mostly located at the N-terminus of the secreted proteins. SPs typically consist of a series of hydrophobic amino acids (core region) that embed into membranes, positively charged residues at the N-terminus (necessary for proper topology of the polypeptide), and a cleavage site at the C-terminus. When an SP is cleaved by a signal peptidase, it releases the secreted protein into the ER lumen (Zha et al., 2023).

Recent research has revealed that the secretion efficiency of heterologous proteins is strongly dependent on their successful combination with SPs. Therefore, various bioinformatic and experimental studies have been carried out to elucidate the optimal SP sequence, allowing to maximize the efficiency of protein secretion.

A wide range of signal sequences, both from native genes (including those from different organisms) and synthetic molecules, are used to improve heterologous expression in yeast. For example, in *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*), a widespread host microorganism, the most commonly used secretion signal is the mating pheromone of the α-factor (MFα1) from *S. cerevisiae* (Eskandari et al., 2023). Although this SP has proven its effectiveness in increasing the yield of heterologous proteins, work continues on its modification and the search for more productive variants. In particular, it was shown that some single amino acid substitutions of the MFα signal sequences provided a significant increase in the production of secreted proteins (Ito et al., 2022). An improved secretion signal was also obtained by creating a chimeric construct combining the MFα1 leader region and the Ost1 signal sequence. This hybrid variant turned out to be more effective compared to the original MFα1 SP (Barrero et al., 2018). The emergence of new improved modifications of MFα1 SPs was facilitated by the analysis of mutations accumulated in MFα signal sequences during yeast evolution. This allowed to identify specific motifs as well as their combinations (mutation synergism) that are important for enhancing yeast enzyme secretion (Aza et al., 2021). Promising results were obtained by combining bioinformatic prediction of the efficiency of certain signal sequences and subsequent experimental validation. For example, Duan and colleagues (2019) discovered four new endogenous signal peptides, including Dan4, Gas1, Msb2, and Fre2, according to the reported secretome and genome of *P. pastoris*. Their properties were investigated experimentally using three reporter proteins, and these SPs were shown to be superior to α-MFs in the production of heterologous proteins (Duan et al., 2019).

The SignalP databases (www.signalpeptide.de) can be used as a resource for selecting suitable SPs. Mori and colleagues (2015) created a library of 60 *S. cerevisiae* SPs that were identified in SignalP 3.0 using SOSUI software. The authors experimentally showed that six those SPs can maximize secretion of heterologous proteins (Mori A. et al., 2015).

While some progress has been made in bioinformatically predicting the efficiency of particular signal peptides for recombinant proteins, their potential has only been explored in laboratory settings. There is no reliable information yet on their successful application in biotech platforms, and it is unclear how they will function in specific yeast strains and in combination with specific target proteins.

Increased activity of the ER folding network

Positive effects of chaperone addition

Traditionally (since the 90s), yeast strain engineering has used the method of simultaneous expression (co-expression) of genes encoding heterologous proteins and genes encoding chaperones and folding enzymes. It has been shown for a variety of heterologous proteins that the introduction of extra copies of these genes into yeast host cells increases the secretion and decreases the aggregation of recombinant proteins. For example, Robinson et al. (1994) demonstrated that overexpression of Pdi in *S. cerevisiae* led to a four- to tenfold increase in secretion yields of human protein. Shusta and coauthors (1998) reported 2–6-fold increased secretion titers for single-chain antibody fragments upon co-overexpression of the Kar2 chaperone or Pdi. Simultaneous overexpression of Pdi and Kar2 resulted in a synergistic up to eightfold increase (Shusta et al., 1998).

The addition of Pdi and Kar2, both together and separately, increased the yield of recombinant proteins used for medical purposes: antithrombotic factor, hirudin (Kim et al., 2003); mammalian peptide recognition proteins (Yang et., 2016); *Necator americanus* secretory protein (Inan et al., 2007); fragment of single-chain antibody A33 (Damasceno et al., 2007); hydrophobins (Sallada et al., 2019), virus glycoprotein, RABV-G (Ben Azoun et al., 2016).

In some cases, chaperone activity is enhanced by their co-expression with molecular partners and cofactors. For example, Kar2 functionality depends on the ATPase cycle, which is promoted by the Jem1 co-chaperone and the Lhs1p nucleotide exchange factor (Steel et al., 2004). Joint expression of genes encoding these factors has been shown to stimulate Kar2 activity and increase production of recombinant human proteins (Payne et al., 2008).

As we wrote above, yeast strains overexpressing Pdi are the most frequently used in the production of correctly folded and functionally secreted recombinant proteins. However, in the oxidative protein folding pathway, Pdi acts in partnership with Ero1-oxidase. Therefore, co-overexpression of these genes can improve the efficiency of protein folding and secretion. Beal and colleagues (2019) developed a new methodology enabling the quantitative assessment of the interaction of Pdi1 and Ero1, and based on it provided a platform for the design of more efficient heterologous protein expression systems in yeast. The high efficiency of co-expression of Pdi and its molecular partner Ero1 was also shown by other authors (Ben Azoun et al., 2016; Sallada et al., 2019).

Thus, addition of known ER network folding factors to enhance heterologous expression has become a basic approach. However, this is not a universal solution; there is no guarantee that chaperones are always able to improve the secretion of recombinant proteins. In particular, a combination of different chaperones does not always lead to a synergistic effect.

Limitations of the approach

Recent investigations suggest that the efficiency of chaperones depends on the dose of the gene encoding the recombinant protein. For example, overexpression of Pdi1 or Ero1 caused a statistically significant increase in recombinant hydrophobin in *P. pastoris*, but only in the 3-copy gene strain, and

not in the 1- and 2-copy strains (Sallada et al., 2019). In the same experiment, it was shown that hydrophobin production increased with co-expression of Kar2 14-fold for the 1-copy strain, 9.8-fold for the 2-copy and 22-fold for the 3-copy ones (Sallada et al., 2019).

A correlation between chaperone activity and the copy number of the recombinant gene has been found in other experiments as well. In lipase-producing *P. pastoris*, overexpression of Pdi1 led to enhanced productivity in the strain carrying four copies of the lipase gene, whereas in the two-copy strain, it remained unchanged (Huang J. et al., 2020). Efficient expression of mammalian peptidoglycan recognition proteins in *P. pastoris* also depended on the combination of recombinant gene copy number and folding enzymes (Yang et al., 2016). Thus, these experiments support the need for empirical selection of optimal combinations of recombinant protein-encoding genes and folding factor-encoding genes.

Recently, an increasing number of published data have demonstrated that the activity of the folding factors described above is selective for certain substrates and does not improve the expression of some important recombinant proteins. In particular, it was shown that Pdi1, Ero1, Kar2 did not have a beneficial effect on the secretion of antibodies in *S. cerevisiae* (de Ruijter et al., 2016). Similar conclusions were also drawn from other experiments (Smith et al., 2004; Payne et al., 2008). These findings demonstrate that there is no single suitable strategy that provides optimal conditions for the secretion of all recombinant proteins, and very often a separate productivity enhancement program must be set up for each protein.

Forced activation of the UPR system

An effective way to solve the folding problem is the activation of the ER chaperone network by overexpression of the Hac1 transcription factor, which is the main regulating UPR pathway. Theoretically, an artificial increase in the level of Hac1 can be achieved in two ways. The first is the intensification of Hac1 mRNA splicing by overexpression of Ire1. The second way is overexpression of genetic sequences encoding Hac1.

The first approach is associated with additional expression of Ire1, which should lead to an increase in the number of events associated with Hac1 mRNA splicing and, as a consequence, promote transcription of genes encoding ER chaperones and folding catalysts (see above "Unfolded protein response"). However, at present, the effectiveness of this approach is confirmed by only one experiment. Only one study convincingly showed that overexpression of Ire1 improved the capabilities of the yeast expression system, which in particular led to an increase in hepatitis B small antigen (HBsAg) production in *S. cerevisiae* (Sheng et al., 2017). The lack of positive results may be due to the complex mechanism of Hac1 activation, which involves many molecular factors.

The second approach aimed at using Hac1 overexpression is the most preferable in yeast biotechnology. As we wrote above, adding Hac1 to yeast host strains leads to up-regulation of a large number of its target genes that mainly function for the protein secretory machinery, and in particular, almost all these genes are required for protein folding (see above "Unfolded protein response"). For heterologous protein secretion, both the active (spliced) form and the inactive (unspliced) form of Hac1 can be used. However, activation of the unspliced form of Hac1 mRNA requires additional cellular resources, in particular, molecular factors involved in its processing. The genes encoding these factors must be added to the yeast strains. The engineered strains with such a modification increased protein secretion significantly and showed better performance than strains with only overexpression of Hac1 (Lin et al., 2023).

Most strains used in biotechnological practice contain an insertion of the Hac1 gene with a previously removed 3′ end intron, i. e. encoding the active form of the transcript. For such strains, a high level of transcriptional activity of Hac1 target genes involved in the UPR pathway and responsible for correct protein folding was shown. In *P. pastoris* strains overexpressing Hac1, electron microscopy revealed an expansion of the intracellular membranes (Guerfal et al., 2010), which probably indicates an increase in the folding capacity of the ER and may contribute to the alleviation of ER stress (Schuck et al., 2009).

To date, a large number of research groups have reported an increase in the productivity of secretory proteins due to artificial and high-level expression of the Hac1 protein (Raschmanová et al., 2021; Lin et al., 2023; Khlebodarova et al., 2024). Hac1 overexpression successfully increased the yield of recombinant proteins: phytase (a product of the *Phy* gene from *C. amalonaticus*) in *P. pastoris* (Li C. et al., 2015); α-amylase (Valkonen et al., 2003; Lin et al., 2023); chitosanase (from *Bacillus subtilis*) (Han et al., 2021); kringle fragment of human apolipoprotein (which inhibits endothelial cell migration) in *S. cerevisiae* (Lee et al., 2012); xylanase (a microbial hydrolase used to hydrolyze xylan) in *S. cerevisiae* (Li C. et al., 2015; Bao et al., 2020).

However, to achieve efficient heterologous expression in Hac-modified cells, it is important to select the optimal combination of the copy number of Hac-encoding genes and genes encoding recombinant proteins (Valkonen et al., 2003; Guerfal et al., 2010; Huang M. et al., 2017; Huang J. et al., 2020). Some studies have found that increasing Hac1 doses also leads to increased ER stress (Gasser et al., 2006; Guerfal et al., 2010; Li C. et al., 2015). It is also necessary to take into account that Hac1 is a positive regulator of the ERAD pathway (see above "ER-associated degradation") and its overactivation can promote protein degradation.

Thus, the addition of Hac allows the yeast strain to be adapted to large-scale protein expression caused by an excessive dose of transgenic constructs. However, many researchers note that the effectiveness of this approach must be assessed in each specific case when designing a specific producer strain.

An additional advantage in strain engineering may be gained by using Hac orthologs from other yeasts, and even phylogenetically more distant eukaryotes. In particular, Valkonen et al. (2003) reported that the secretion of α-amylase was increased by overexpressing *Trichoderma reesei*-derived Hac1 in *S. cerevisiae*. Bankefa and colleagues (2018) showed that for *P. pastoris*, Hac1 orthologs of other species and even mammalian ones may be more effective than the native one. They investigate the effects of overexpressing Hac1 orthologs from *S. cerevisiae* (ScHac1p), *Trichoderma reesei* (TrHac1p) and *Homo sapiens* (HsXbp1) on the secretory expression levels of three reporter proteins, b-galactosidase, b-mannanase and glucose oxidase. The authors reported diverse effects of

these orthologs on heterologous expression levels, but HsXbp1 remarkably improved the enzyme production levels, both in shake flask and fermenter culture, both in single- and four-copy strains, which demonstrated its great application potential (Bankefa et al., 2018).

Thus, artificial activation of the UPR pathway by overexpression of the Hac1 transcription factor has demonstrated an obvious positive effect on improving the secretory protein productivity. It allowed to remove bottlenecks in the engineered yeast strain, arising due to abnormal accumulation of unfolded/misfolded proteins in the endoplasmic reticulum. However, this positive experience cannot be extrapolated to all recombinant proteins. Therefore, the real effect for each product must be assessed in experiments, often based on trial and error.

Prevention of ERAD pathway activation

As we wrote above, the UPR system is in crosstalk with the ERAD pathway. ERAD is activated when ER chaperones and folding enzymes are unable to form tertiary or quaternary structures of proteins. Sometimes ERAD is excessively activated during heterologous expression, so depletion of some components of this system can contribute to an increase in the yield of recombinant proteins.

De Ruijter and Frey (2015) analyzed the effect of deletions of genes involved in ERAD on the production of human IgG in *S. cerevisiae*. It was shown that deletion of only one gene, HTM1, contributed to a slight improvement in heterologous secretion, whereas deletions of the *yos9*, *hrd1*, *hrd3*, and *ubc7* genes either did not affect or negatively affected the recombinant protein yield (de Ruijter, Frey , 2015).

In *P. pastoris*, excessive activation of ERAD enhanced intracellular degradation of recombinant antibody fragment Fab. In the work of Pfeffer et al., it was shown that most of the newly synthesized Fab is not secreted but undergoes intracellular degradation via the ubiquitin-proteasome system (Pfeffer et al., 2012; Zahrl et al., 2019). The yield of the recombinant protein was increased by inhibiting proteasome components (Pfeffer et al., 2012). However, subsequent work aimed at reducing proteolysis through ERAD gene disruptions did not yield significant increases in Fab secretion (Zahrl et al., 2019).

Thus, the reduction of ERAD activity can be considered as a potential strategy for improving the secretion of recombinant proteins. However, the current level of research in this area does not yet allow for the transition to engineering producer strains protected from the proteolysis system.

Search for new solutions

The potential of the ER folding network can be enhanced by factors that are not directly involved in it, but create favorable conditions for its active functioning.

Zahrl et al. (2023) proposed to combine the transcriptional programs induced by Hac1 and Msn4 in one strain. Msn4 is a transcriptional factor involved in the response to various forms of stress (heat, oxidative, osmotic, etc.). Co-expression of Hac1 and Msn4 (both native and synthetic) revealed synergistic effects resulting in increased titers of recombinant proteins. This strategy was tested for scFv and VHH antibody fragments expressed in *P. pastoris* (Zahrl et al., 2023).

In another work, the same research group identified the most relevant chaperones of the Hsp70 network, both cytosolic and ER-localized, and investigated the impact of their combined overexpression on recombinant protein secretion (Zahrl et al., 2022). In their work , they implemented a principle they called the push-and-pull strategy. The addition of cytosolic chaperones allowed to increase the translocation competency of the recombinant protein and its targeting to the ER membrane (= push). At the same time resident ER chaperones improved the folding process (= pull). This allowed to successfully engineer strains and improve protein secretion up to 5-fold for the antibody Fab fragment and scFv (Zahrl et al., 2022).

The screening of new molecules involved in the folding system may improve yeast expression systems and expand the range of heterologous proteins. In particular, analysis of the reported *P. pastoris* secretome and genome predicted novel folding factors: Mpd1 and Pdi2 (members of the Pdi family), as well as Sil1 (nucleotide exchange factor for Kar2) (Duan et al., 2019). Subsequent experimental studies showed that all of the novel folding factors enhanced total production of reporter proteins, with Sil1 showing the highest efficiency (Duan et al., 2019). This work is an example of a successful combination of the achievements of yeast omics technologies and metabolic engineering, but this experience has not yet been widely applied.

Conclusion

One of the main limitations of heterologous protein production in yeast hosts is the ability of proteins to fold in the endoplasmic reticulum. The folding system is subject to unbalanced stress due to overexpression of recombinant genes, leading to the accumulation of misfolded proteins, aggregate formation, and low productivity. However, thanks to years of effective research into the fundamental mechanisms of protein folding, these limitations have been largely overcome. Studying folding in both model organisms and bioproducers has enabled the identification of molecular factors and cellular mechanisms that determine how a nascent polypeptide chain acquires its three-dimensional functional structure. This knowledge has formed the basis for the development of new, efficient methods for constructing highly productive yeast strains. Many problems arising from insufficient folding systems have been overcome by selecting optimal signal peptides, coexpressing with chaperones and foldases, modifying the ubiquitin-proteasome system (UPS), and preventing the ERAD pathway. Modern engineering solutions utilize combinations of these factors, but for each protein of interest, the expression strain is typically developed individually. In practice, optimized folding conditions for one protein often do not work for another. Therefore, no general strategy for overcoming protein folding bottlenecks that would be applicable to a wide range of proteins has yet been proposed.

In the future, some problems can be minimized by analyzing data obtained using omics technologies and modeling the secretion pathway *in silico*. An example of such a development is the pcSecYeast model designed for *S. cerevisiae* (Li F. et al., 2022). Such models allow choosing a combination of factors, both known and unknown, to generate new engineering strategies in designing strains with high protein yields.

References

Aza P., Molpeceres G., de Salas F., Camarero S. Design of an improved universal signal peptide based on the α-factor mating secretion signal for enzyme production in yeast. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(7): 3691-3707. doi 10.1007/s00018-021-03793-y

Bankefa O.E., Wang M., Zhu T., Li Y. Hac1p homologues from higher eukaryotes can improve the secretion of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 2018;40(7):1149-1156. doi 10.1007/s10529-018-2571-y

Bao C., Li J., Chen H., Sun Y., Wang G., Chen G., Zhang S. Expression and function of an *Hac1*-regulated multi-copy xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* 2020;10(1):11686. doi 10.1038/s41598-020-68570-6

Barrero J.J., Casler J.C., Valero F., Ferrer P., Glick B.S. An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):161. doi 10.1186/s12934-018-1009-5

Beal D.M., Bastow E.L., Staniforth G.L., von der Haar T., Freedman R.B., Tuite M.F. Quantitative analyses of the yeast oxidative protein folding pathway *in vitro* and *in vivo*. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(4):261-274. doi 10.1089/ars.2018.7615

Ben Azoun S., Belhaj A.E., Göngrich R., Gasser B., Kallel H. Molecular optimization of rabies virus glycoprotein expression in *Pichia pastoris. Microb Biotechnol*. 2016;9(3):355-368. doi 10.1111/1751-7915.12350

Berner N., Reutter K.R., Wolf D.H. Protein quality control of the endoplasmic reticulum and ubiquitin-proteasome-triggered degradation of aberrant proteins: yeast pioneers the path. *Annu Rev Biochem.* 2018;20(87):751-782. doi 10.1146/annurev-biochem-062917-012749

Braakman I., Hebert D.N. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a013201. doi 10.1101/cshperspect.a013201

Burgess R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol*. 2009;463:259-282. doi 10.1016/S0076-6879(09)63017-2

Caramelo J.J., Parodi A.J. A sweet code for glycoprotein folding. *FEBS Lett*. 2015;589(22):3379-3387. doi 10.1016/j.febslet.2015.07.021

Damasceno L.M., Anderson K.A., Ritter G., Cregg J.M., Old L.J., Batt C.A. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris. Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(2):381-389. doi 10.1007/s00253-006-0652-7

De Brabander P., Uitterhaegen E., Delmulle T., De Winter K., Soetaert W. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: a review. *Biotechnol Adv*. 2023;64: 108121. doi 10.1016/j.biotechadv.2023.108121

de Keyzer J., Steel G.J., Hale S.J., Humphries D., Stirling C.J. Nucleotide binding by Lhs1p is essential for its nucleotide exchange activity and for function *in vivo*. *J Biol Chem.* 2009;284(46):31564-31571. doi 10.1074/jbc.M109.055160

de Ruijter J.C., Frey A.D. Analysis of antibody production in *Saccharomyces cerevisiae*: effects of ER protein quality control disruption. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99:9061-9071. doi 10.1007/s00253-015-6807-7

de Ruijter J.C., Koskela E.V., Frey A.D. Enhancing antibody folding and secretion by tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Microb Cell Fact.* 2016;23(15):87. doi 10.1186/s12934-016-0488-5

Duan G., Ding L., Wei D., Zhou H., Chu J., Zhang S., Qian J. Screening endogenous signal peptides and protein folding factors to promote the secretory expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*. 2019;306:193-202. doi 10.1016/j.jbiotec.2019.06.297

Eskandari A., Nezhad N.G., Leow T.C., Rahman M.B.A., Oslan S.N. Current achievements, strategies, obstacles, and overcoming the challenges of the protein engineering in *Pichia pastoris* expression system. *World J Microbiol Biotechnol*. 2023;40(1):39. doi 10.1007/s11274-023-03851-6

Fauzee Y.N.B.M., Taniguchi N., Ishiwata-Kimata Y., Takagi H., Kimata Y. The unfolded protein response in *Pichia pastoris* without external stressing stimuli. *FEMS Yeast Res*. 2020;20(7):foaa053. doi 10.1093/femsyr/foaa053

Frand A.R., Kaiser C.A. The *Ero1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 1998;1(2):161-170. doi 10.1016/s1097-2765(00)80017-9

Friedlander R., Jarosch E., Urban J., Volkwein C., Sommer T. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2(7):379-384. doi 10.1038/35017001

Gasser B., Maurer M., Gach J., Kunert R., Mattanovich D. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol Bioeng.* 2006;94(2):353-361. doi 10.1002/bit.20851

Gasser B., Saloheimo M., Rinas U., Dragosits M., Rodríguez-Carmona E., Baumann K., Giuliani M., … Porro D., Ferrer P., Tutino M.L., Mattanovich D., Villaverde A. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb Cell Fact*. 2008;4(7):11. doi 10.1186/1475-2859-7-11

Gross E., Sevier C.S., Heldman N., Vitu E., Bentzur M., Kaiser C.A., Thorpe C., Fass D. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(2):299-304. doi 10.1073/pnas.0506448103

Guerfal M., Ryckaert S., Jacobs P.P., Ameloot P., Van Craenenbroeck K., Derycke R., Callewaert N. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb Cell Fact.* 2010;9:49-60. doi 10.1186/1475-2859-9-49

Han M., Wang W., Gong X., Zhou J., Xu C., Li Y. Increased expression of recombinant chitosanase by co-expression of Hac1p in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Pept Lett.* 2021;28(12):1434-1441. doi 10.2174/0929866528666211105111155

Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324-332. doi 10.1038/nature10317

Hatahet F., Ruddock L.W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(11):2807-2850. doi 10.1089/ars.2009.2466

Hendershot L.M., Buck T.M., Brodsky J.L. The essential functions of molecular chaperones and folding enzymes in maintaining endoplasmic reticulum homeostasis. *J Mol Biol.* 2024;436(14):168418. doi 10.1016/j.jmb.2023.168418

Hernández-Elvira M., Torres-Quiroz F., Escamilla-Ayala A., Domínguez-Martin E., Escalante R., Kawasaki L., Ongay-Larios L., Coria R. The unfolded protein response pathway in the yeast *Kluyveromyces lactis*. A comparative view among yeast species. *Cells.* 2018;7(8):106. doi 10.3390/cells7080106

Herscovics A. Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1426(2):275-285. doi 10.1016/s0304-4165(98)00129-9

Huang J., Zhao Q., Chen L., Zhang C., Bu W., Zhang X., Zhang K., Yang Z. Improved production of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase by coexpressing protein folding chaperones in *Pichia pastoris*, which triggered ER stress. *Bioengineered*. 2020;11(1):375-385. doi 10.1080/21655979.2020.1738127

Huang M., Gao Y., Zhou X., Zhang Y., Cai M. Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing α-amylase in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017;40(3):341-350. doi 10.1007/s00449-016-1701-y

Inan M., Fanders S.A., Zhang W., Hotez P.J., Zhan B., Meagher M.M. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). In: Cregg J.M. (Ed.) Pichia Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 389. Humana Press, 2007;65-76. doi 10.1007/978-1-59745-456-8_5

Ishiwata-Kimata Y., Kimata Y. Fundamental and applicative aspects of the unfolded protein response in yeasts. *J Fungi* (*Basel*). 2023; 9(10):989. doi 10.3390/jof9100989

Ito Y., Ishigami M., Hashiba N., Nakamura Y., Terai G., Hasunuma T., Ishii J., Kondo A. Avoiding entry into intracellular protein degradation pathways by signal mutations increases protein secretion in *Pichia pastoris*. *Microb Biotechnol*. 2022;15(9):2364-2378. doi 10.1111/1751-7915.14061

Kelleher D.J., Gilmore R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*. 2006;16(4):47R-62R. doi 10.1093/glycob/cwj066

Khlebodarova T.M., Bogacheva N.V., Zadorozhny A.V., Bryanskaya A.V., Vasilieva A.R., Chesnokov D.O., Pavlova E.I., Peltek S.E. *Komagataella phaffii* as a platform for heterologous expression of enzymes used for industry. *Microorganisms.* 2024;12(2):346. doi 10.3390/microorganisms12020346

Kim M.D., Han K.C., Kang H.A., Rhee S.K., Seo J.H. Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae. J Biotechnol.* 2003;101(1):81-87. doi 10.1016/s0168-1656(02)00288-2

Kimmig P., Diaz M., Zheng J., Williams C.C., Lang A., Aragón T., Li H., Walter P. The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *eLife.* 2012;1:e00048. doi 10.7554/eLife.00048

Korennykh A., Walter P. Structural basis of the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:251-277. doi 10.1146/annurev-cellbio-101011-155826

Krshnan L., van de Weijer M.L., Carvalho P. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(12):a041247. doi 10.1101/cshperspect.a041247

Lee T.H., Bae Y.H., Kim M.D., Seo J.H. Overexpression of Hac1 gene increased levels of both intracellular and secreted human kringle fragment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*. 2012;47(12):2300-2305. doi 10.1016/j.procbio.2012.09.006

Lehle L., Strahl S., Tanner W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006;45(41):6802-6818. doi 10.1002/anie.200601645

Li C., Lin Y., Zheng X., Pang N., Liao X., Liu X., Huang Y., Liang S. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol*. 2015;15:88. doi 10.1186/s12896-015-0204-2

Li F., Chen Y., Qi Q., Wang Y., Yuan L., Huang M., Elsemman I.E., Feizi A., Kerkhoven E.J., Nielsen J. Improving recombinant protein production by yeast through genome-scale modeling using proteome constraints. *Nat Commun.* 2022;13(1):2969. doi 10.1038/s41467-022-30689-7

Lin Y., Feng Y., Zheng L., Zhao M., Huang M. Improved protein production in yeast using cell engineering with genes related to a key factor in the unfolded protein response. *Metab Eng*. 2023;77:152-161. doi 10.1016/j.ymben.2023.04.004

Madhavan A., Arun K.B., Sindhu R., Krishnamoorthy J., Reshmy R., Sirohi R., Pugazhendi A., Awasthi M.K., Szakacs G., Binod P. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):124. doi 10.1186/s12934-021-01617-z

Mizunaga T., Katakura Y., Miura T., Maruyama Y. Purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase. *J Biochem.* 1990;108(5):846-851. doi 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123291

Mori A., Hara S., Sugahara T., Kojima T., Iwasaki Y., Kawarasaki Y., Sahara T., Ohgiya S., Nakano H. Signal peptide optimization tool for the secretion of recombinant protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. 2015;120(5):518-525. doi 10.1016/j.jbiosc.2015.03.003

Mori K. Evolutionary aspects of the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(12):a041262. doi 10.1101/cshperspect.a041262

Niu Y., Zhang L., Yu J., Wang C.C., Wang L. Novel roles of the non-catalytic elements of yeast protein-disulfide isomerase in its interplay with endoplasmic reticulum oxidoreductin 1. *J Biol Chem.* 2016;291(15):8283-8294. doi 10.1074/jbc.M115.694257

Núñez A., Dulude D., Jbel M., Rokeach L.A. Calnexin is essential for survival under nitrogen starvation and stationary phase in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121059. doi 10.1371/journal.pone.0121059

O'Keefe S., Pool M.R., High S. Membrane protein biogenesis at the ER: the highways and byways. *FEBS J*. 2022;289(22):6835-6862. doi 10.1111/febs.15905

Omkar S., Mitchem M.M., Hoskins J.R., Shrader C., Kline J.T., Nitika, Fornelli L., Wickner S., Truman A.W. Acetylation of the yeast Hsp40 chaperone protein Ydj1 fine-tunes proteostasis and translational fidelity. *PLoS Genet*. 2024;20(12):e1011338. doi 10.1371/journal.pgen.1011338

Palma A., Rettenbacher L.A., Moilanen A., Saaranen M., Pacheco-Martinez C., Gasser B., Ruddock L. Biochemical analysis of *Komagataella phaffii* oxidative folding proposes novel regulatory mechanisms of disulfide bond formation in yeast. *Sci Rep.* 2023;13(1):14298. doi 10.1038/s41598-023-41375-z

Parlati F., Dominguez M., Bergeron J.J., Thomas D.Y. Saccharomyces cerevisiae CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem.* 1995;270(1):244-253. doi 10.1074/jbc.270.1.244

Parodi A.J. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:69-93. doi 10.1146/annurev.biochem.69.1.69

Payne T., Finnis C., Evans L.R., Mead D.J., Avery S.V., Archer D.B., Sleep D. Modulation of chaperone gene expression in mutagenized *Saccharomyces cerevisiae* strains developed for recombinant human albumin production results in increased production of multiple heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(24):7759-7766. doi 10.1128/AEM.01178-08

Pfeffer M., Maurer M., Stadlmann J., Grass J., Delic M., Altmann F., Mattanovich D. Intracellular interactome of secreted antibody Fab fragment in *Pichia pastoris* reveals its routes of secretion and degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(6):2503-2512. doi 10.1007/s00253-012-3933-3

Pickart C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:503-533. doi 10.1146/annurev.biochem.70.1.503

Preston G.M., Brodsky J.L. The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem J.* 2017;474(4):445-469. doi 10.1042/BCJ20160582

Qi Q., Li F., Yu R., Engqvist M.K.M., Siewers V., Fuchs J., Nielsen J. Different routes of protein folding contribute to improved protein production in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio.* 2020;11(6):e02743-20. doi 10.1128/mBio.02743-20

Raschmanová H., Weninger A., Knejzlík Z., Melzoch K., Kovar K. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(11):4397-4414. doi 10.1007/s00253-021-11336-5

Robinson A.S., Hines V., Wittrup K.D. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*. 1994;12(4):381-384. doi 10.1038/nbt0494-381

Ruger-Herreros C., Svoboda L., Mogk A., Bukau B. Role of J-domain proteins in yeast physiology and protein quality control. *J Mol Biol.* 2024;436(14):168484. doi 10.1016/j.jmb.2024.168484

Ruggiano A., Foresti O., Carvalho P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol.* 2014;204(6):869-879. doi 10.1083/jcb.201312042

Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(10):630-642. doi 10.1038/nrm3658

Sallada N.D., Harkins L.E., Berger B.W. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris. Biotechnol Bioeng.* 2019;116(8):2029-2040. doi 10.1002/bit.26982

Schlenstedt G., Harris S., Risse B., Lill R., Silver P.A. A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with

BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol.* 1995;129(4):979-988. doi 10.1083/jcb.129.4.979

Schroder M., Clark R., Kaufman R.J. *IRE1*- and *HAC1*-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast. *Mol Microbiol.* 2003;49(3):591-606. doi 10.1046/j.1365-2958.2003.03585.x

Schuck S., Prinz W.A., Thorn K.S., Voss C., Walter P. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol.* 2009;187(4):525-536. doi 10.1083/jcb.200907074

Schwarz D.S., Blower M.D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79-94. doi 10.1007/s00018-015-2052-6

Sevier C.S., Kaiser C.A. Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol Biol Cell.* 2006;17(5):2256-2266. doi 10.1091/mbc.e05-05-0417

Sheng J., Flick H., Feng X. Systematic optimization of protein secretory pathways in *Saccharomyces cerevisiae* to increase expression of hepatitis B small antigen. *Front Microbiol.* 2017;8:875. doi 10.3389/fmicb.2017.00875

Shusta E.V., Raines R.T., Plückthun A., Wittrup K.D. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol.* 1998;16(8):773-777. doi 10.1038/nbt0898-773

Singhvi P., Saneja A., Ahuja R., Panda A.K. Solubilization and refolding of variety of inclusion body proteins using a novel formulation. *Int J Biol Macromol*. 2021;193(Pt.B):2352-2364. doi 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.068

Smith J.D., Tang B.C., Robinson A.S. Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast. *Biotechnol Bioeng.* 2004;85(3):340-350. doi 10.1002/bit.10853

Steel G.J., Fullerton D.M., Tyson J.R., Stirling C.J. Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science.* 2004;303(5654):98-101. doi 10.1126/science.1092287

Thak E.J., Yoo S.J., Moon H.Y., Kang H.A. Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. *FEMS Yeast Res.* 2020;20(2):foaa009. doi 10.1093/femsyr/foaa009

Thibault G., Ng D.T.W. The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12):a013193. doi 10.1101/cshperspect.a013193

Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S., Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 2000;101(3):249-258. doi 10.1016/s0092-8674(00)80835-1

Tsuda M., Nonaka K. Recent progress on heterologous protein production in methylotrophic yeast systems. *World J Microbiol Biotechnol.* 2024;40(7):200. doi 10.1007/s11274-024-04008-9

Valkonen M., Penttila M., Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2065-2072. doi 10.1128/aem.69.4.2065-2072.2003

Wang L., Wang C.C. Oxidative protein folding fidelity and redoxtasis in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 2023;48(1):40-52. doi 10.1016/j.tibs.2022.06.011

Ware F.E., Vassilakos A., Peterson P.A., Jackson M.R., Lehrman M.A., Williams D.B. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem.* 1995;270(9):4697-4704. doi 10.1074/jbc.270.9.4697

Xia X. Translation control of *HAC1* by regulation of splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2860. doi 10.3390/ijms20122860

Xu C., Ng D.T.W. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:742-752. doi 10.1038/nrm4073

Xu X., Kanbara K., Azakam H., Kato A. Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue. *J Biochem.* 2004;135(5):615-618. doi 10.1093/jb/mvh074

Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules.* 2014;4(1):235-251. doi 10.3390/biom4010235

Yang J., Lu Z., Chen J., Chu P., Cheng Q., Liu J., Ming F., Huang C., Xiao A., Cai H., Zhang L. Effect of cooperation of chaperones and gene dosage on the expression of porcine PGLYRP-1 in *Pichia pastoris. Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(12):5453-5465. doi 10.1007/s00253-016-7372-4

Zahrl R.J., Gasser B., Mattanovich D., Ferrer P. Detection and elimination of cellular bottlenecks in protein-producing yeasts. In: Gasser B., Mattanovich D. (Eds) Recombinant Protein Production in Yeast. Methods in Molecular Biology. Vol. 1923. Humana Press, 2019;75-95. doi 10.1007/978-1-4939-9024-5_2

Zahrl R.J., Prielhofer R., Ata Ö., Baumann K., Mattanovich D., Gasser B. Pushing and pulling proteins into the yeast secretory pathway enhances recombinant protein secretion. *Metab Eng.* 2022;74:36-48. doi 10.1016/j.ymben.2022.08.010

Zahrl R.J., Prielhofer R., Burgard J., Mattanovich D., Gasser B. Synthetic activation of yeast stress response improves secretion of recombinant proteins. *N Biotechnol.* 2023;73:19-28. doi 10.1016/j.nbt.2023.01.001

Zha J., Liu D., Ren J., Liu Z., Wu X. Advances in metabolic engineering of *Pichia pastoris* strains as powerful cell factories. *J Fungi* (*Basel*). 2023;9(10):1027. doi 10.3390/jof9101027

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

Received September 2, 2025. Revised November 25, 2025. Accepted November 25, 2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1348-1360

doi 10.18699/vjgb-25-141

Целлюлаза: основные свойства, природные источники и применение в промышленности

А.В. Задорожный, Н.М. Слынько, С.В. Банникова, Н.В. Богачева, В.Н. Шляхтун, А.Р. Васильева, Е.Ю. Букатич, В.С. Ушаков, Ю.Е. Уварова, А.В. Коржук, А.А. Шипова, Д.В. Бочков, Е.Ю. Павлова, Д.О. Чесноков, С.Е. Пельтек

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

Аннотация. В последние годы целлюлаза привлекает огромное внимание как промышленно важный фермент с широким спектром применения. Целлюлазы представляют собой сложную группу ферментов, которые секретируются многообразием микроорганизмов, включая грибы и бактерии. Они относятся к подклассу ферментов гидролаз, субстратом которых является полисахарид целлюлоза. Целлюлазы имеют огромное практическое значение, поскольку содержащие целлюлозу материалы используются во множестве отраслей народного хозяйства. В этом обзоре приведены сведения об основных свойствах и структуре целлюлаз. Но основное внимание уделено применению этих ферментов в промышленности, а прочие аспекты, так или иначе, рассматриваются с учетом этого. Исследованы имеющие наибольшее практическое значение бактериальные и грибные целлюлазы, их основные преимущества и отличия. Отдельно рассмотрены экстремофильные (а именно термо-, психро- и галофильные) целлюлазы как обладающие свойствами, нужными в условиях современных технологических процессов. Поскольку для практического применения необходимы массовая продукция и оптимальное сочетание свойств ферментов, внимание также уделено получению эффективных продуцентов и модификации свойств, производимых целлюлаз. Наконец, обозначены ключевые тенденции в подходах к производству целлюлаз и перспективы практического применения.

Ключевые слова: целлюлаза; грибные и бактериальные целлюлазы; экстремофильные целлюлазы; структура и основные свойства целлюлаз; целлюлазный комплекс; биотехнология; генная инженерия

Для цитирования: Задорожный А.В., Слынько Н.М., Банникова С.В., Богачева Н.В., Шляхтун В.Н., Васильева А.Р., Букатич Е.Ю., Ушаков В.С., Уварова Ю.Е., Коржук А.В., Шипова А.А., Бочков Д.В., Павлова Е.Ю., Чесноков Д.О., Пельтек С.Е. Целлюлаза: основные свойства, природные источники и применение в промышленности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1348-1360. doi 10.18699/vjgb-25-141

Финансирование. Работа выполнена при поддержке проекта № FWNR-2025-0029 «Разработка технологий масштабирования производства кормовых ферментов, секретируемых *Komagataella phaffii*, и получения ферментных препаратов на их основе».

Cellulases: key properties, natural sources, and industrial applications

A.V. Zadorozhny, N.M. Slynko, S.V. Bannikova, N.V. Bogacheva, V.N. Shlyakhtun, A.R. Vasilieva, E.Yu. Bukatich, V.S. Ushakov, Yu.E. Uvarova, A.V. Korzhuk, A.A. Shipova, D.V. Bochkov, E.Y. Pavlova, D.O. Chesnokov, S.E. Peltek

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

Abstract. This review focuses on cellulases, a subclass of hydrolases that catalyse the breakdown of the polysaccharide cellulose. Cellulases are of immense practical significance, given that cellulose-containing materials are utilised across a multitude of industrial sectors. An overview of the fundamental properties and structure of cellulases is provided. However, primary attention is paid to the industrial application of these enzymes, with other aspects discussed within this context. The most practically significant bacterial and fungal cellulases are analysed, with their key benefits and differences being emphasised. Particular attention is paid to extremophilic (specifically thermo-, psychro-, and halophilic) cellulases, as they possess properties essential for modern technological processes. Given that practical application necessitates mass production and an optimal combination of enzymatic characteristics, the creation of effective producers and the modification of cellulase properties are also assessed. Finally, key trends in cellulase production approaches and their future application potential are summarised.

Key words: celulase; fungal and bacterial cellulases; extremophilic cellulases; cellulase structure and essential properties; cellulase complex; biotechnology; genetic engineering

For citation: Zadorozhny A.V., Slynko N.M., Bannikova S.V., Bogacheva N.V., Shlyakhtun V.N., Vasilieva A.R., Bukatich E.Yu., Ushakov V.S., Uvarova Yu.E., Korzhuk A.V., Shipova A.A., Bochkov D.V., Pavlova E.Y., Chesnokov D.O., Peltek S.E. Cellulases: key properties, natural sources, and industrial applications. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1348-1360. doi 10.18699/vjgb-25-141

© Задорожный А.В., Слынько Н.М., Банникова С.В., Богачева Н.В., Шляхтун В.Н., Васильева А.Р., Букатич Е.Ю., Ушаков В.С., Уварова Ю.Е., Коржук А.В., Шипова А.А., Бочков Д.В., Павлова Е.Ю., Чесноков Д.О., Пельтек С.Е., 2025

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Введение

В связи с нарастающими экологическими проблемами и достижениями в области биотехнологий многие химические процессы в различных отраслях промышленности, таких как текстильная, кожевенная, целлюлозно-бумажная, переработка фруктов и овощей, пищевая, кормопроизводство, заменяются ферментативными биокатализаторами (Wackett, 2019). Ферменты могут быть выделены из различных источников: тканей животных, растений и клеток микробов. Микробные белки часто более стабильны, чем ферменты аналогичной специфичности, полученные из растительных или животных источников, и часто могут храниться в менее чем идеальных условиях в течение длительного времени без значительной потери биологической активности (Singhania et al., 2010). Большинство коммерческих ферментов получают из микроорганизмов, и такие свойства их, как термостабильность, стабильность в широких диапазонах pH и многофункциональность, делают эти ферменты потенциальными кандидатами для эффективных биотехнологических процессов в различных физико-химических условиях.

Целлюлазы являются вторым по представленности на рынке промышленным ферментом, и использование их продолжает нарастать с увеличением спроса со стороны целого ряда направлений: пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной, фармацевтической промышленности, производства моющих средств, комбикормов, биотоплива, переработки отходов (Ranjan et al., 2023).

Как и другие ферменты, целлюлазы получают из растений, микроорганизмов и животных. Однако при производстве этих ферментов чаще всего используются грибы и бактерии из-за таких свойств, как значительный выход продукции и снижение затрат. Исторически сложилось, что основными продуцентами целлюлаз были природные штаммы грибов, продуктивность которых была повышена методами селекции и/или мутагенеза. Однако, благодаря появлению и развитию технологии рекомбинантных ДНК, генной инженерии, белковой инженерии, направленной эволюции белков, методов «омикс-технологий» и высокопроизводительного секвенирования, были открыты новые микробы и их ферменты для промышленных приложений (Patel et al., 1994; Kirk et al., 2002; Rubin-Pitel, Zhao, 2006) и разработаны многочисленные рекомбинантные микробные целлюлазы. Эти ферменты представляют огромный интерес из-за их особых характеристик, таких как низкая стоимость, низкое энергопотребление каталитических процессов, экологическая безопасность, или нетоксичность, и высокая эффективность.

Во многих ситуациях желательно использование целлюлаз со свойствами, экстремальными в той или иной мере, – это стабильность и эффективность при высоких или низких значениях температуры, pH или давления, в присутствии органических растворителей или детергентов, при высокой ионной силе рабочих сред. Ферменты с такими свойствами регулярно обнаруживают при изучении микроорганизмов, обитающих в соответствующих условиях, хотя ферменты с необычными свойствами встречаются и у мезофильных организмов. В ответ на спрос выбор целлюлаз с самыми разнообразными свойствами постепенно растет. Подходы, основанные на использовании ферментов, устойчивых к экстремальным условиям, позволят максимизировать эффект при сниженном расходе ферментов.

Целлюлазы: основные свойства и структура

Для производства широкого спектра целлюлаз активно используются как грибы, так и бактерии. Основное внимание на протяжении длительного времени было уделено грибам в силу их способности выделять наружу значительные количества ферментов. В последнее время эта тенденция смещается в сторону бактерий, что связано с их более высокими темпами роста, наличием ферментов с несколькими активностями и присутствием бактерий в самых разнообразных экологических нишах. Бактерии не только способны выжить в суровых условиях, но и часто вырабатывают стабильные ферменты, которые могут увеличить скорость катализируемого процесса по сравнению с грибными аналогами.

Субстратом для целлюлазы служит природный полимер целлюлоза. Целлюлазы – это ферментные системы, которые гидролизуют β-1,4-гликозидные связи в целлюлозном полимере. Целлюлаза способна гидролизовать гликозидные связи целлюлозы и производных целлюлозы в растворимые олигосахариды и глюкозу. Целлюлаза расщепляет β-1,4-гликозидные связи целлюлозы или ее производных, таких как целлоолигосахарид, до мономеров глюкозы (Nishida et al., 2007). Биохимическое превращение молекулы целлюлозы при биодеградации микроорганизмами катализируется внеклеточной ферментативной системой целлюлаз, включающей в себя три компонента (Bhat M.K., Bhat S., 1997): 1) β-1,4 глюкан глюканогидролаза (эндоглюканаза), которая расщепляет длинную целлюлозную цепь на более короткие фрагменты (EC 3.2.1.4); 2) β-1,4 глюкан целлобиогидролаза (экзоглюканаза), действующая с конца целлюлозной цепи, не обладающего восстановительной активностью (EC 3.2.1.91); 3) β-1,4 глюкозидаза разрушает глюкозидную связь целлобиозы и целлодекстринов, производя молекулы глюкозы, которые могут легко проникать в клетку (EC 3.2.1.21).

В природе для полного гидролиза полимера целлюлозы до единиц глюкозы необходимо синергичное действие всех трех ферментов (Uhlig, 1998). Целлюлазный комплекс имеет сложную пространственную структуру, позволяющую позиционировать волокно целлюлозы около активных центров ферментов. Существует два типа систем целлюлазы: один тип представлен внеклеточными целлюлазами мицелиальных грибов и аэробных бактерий, действующих синергически, чтобы разлагать целлюлозу, а другой тип – это фермент анаэробных клостридий, закрепленный на поверхности бактериальной клетки, так называемая, «целлюлосома».

Большинство целлюлаз имеет специфическую двухдоменную структуру: каталитический домен и целлюлозосвязывающий домен или углеводосвязывающий модуль, который обычно соединяется через пептидный линкер. Каталитический домен содержит каталитический сайт, в то время как целлюлозосвязывающий домен обеспечивает позиционирование целлюлозного волокна (Mathew et al., 2008).

Разлагающие целлюлозу аэробные грибы, например *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), вырабатывают комплекс ферментов, действующий синергично и проявляющий все три основных активности – эндоглюканазную, экзоглюканазную и β-глюкозидазную (Dashtban et al., 2011; Mukherjee et al., 2012). Сначала эндоглюканазы расщепляют целлюлозные волокона в более аморфных участках, после чего экзоглюканазы получают возможность отщеплять молекулы целлобиозы от более кристаллизованных участков волокна, ранее не подверженных их действию. Наконец, β-глюкозидазы гидролизуют целлобиозу.

У большинства анаэробных микроорганизмов целлюлозолитическая система организована иначе: целый комплекс различных целлюлаз и гемицеллюлаз через посредство некаталитического белка скаффолдина организован в мультибелковый комплекс – целлюлосому, закрепленную на внешней стороне клетки. Молекулярный вес целлюлосом составляет до нескольких тысяч кДа (Pinheiro et al., 2009). На поверхности одной клетки *Clostridium thermocellum* (наиболее изученная бактерия-целлюлозолитик, способная очень быстро расти на целлюлозных субстратах) располагается несколько целлюлосом, чем обеспечивается надежная фиксация микроорганизма на волокне целлюлозы, а взаимное расположение различных ферментов в целлюлосоме облегчает им доступ к субстрату. Кроме того, клостридии вырабатывают также и свободные, не ассоциированные с целлюлосомами, целлюлазы. Неясно, действуют ли они с целлюлосомами синергично (Doi, Tamaru, 2001).

Благодаря такой системе организации целлюлозолитической системы простые сахара образуются в непосредственной близости к микрорганизму, что значительно облегчает ему доступ к питательным веществам. В ряде случаев анаэробные бактерии приобрели способность регулировать связывание целлюлосом на поверхности клетки, и в этих культурах можно обнаружить свободные целлюлосомы, а также изменять продукцию различных компонентов целлюлосомы в зависимости от условий роста (Mohand-Oussaid et al., 1999).

В состав целлюлосомы, помимо комплекса целлюлазных ферментов, входят углеводные фибриллы, которые могут составлять до 90 % молекулярной массы целлюлосомы. Они способствуют сорбции фермента на субстрате и скольжению фермента в фибриллярных структурах целлюлозы. Также углеводная часть целлюлаз защищает белок от действия денатурирующих агентов и протеаз.

Способность разных целлюлазных комплексов гидролизовать целлюлозу различается при высокой степени кристалличности субстрата. Многие комплексы теряют большую часть своей активности при возрастании степени кристалличности до 60–70 % и гидролизуют только аморфную часть субстрата. Способность таких комплексов к гидролизу целлюлозы с высокой степенью кристалличности зависит от наличия в них эндоглюканаз, которые могут прочно на ней сорбироваться, а скорость гидролиза кристаллической целлюлозы прямо зависит от количества сорбированной эндоглюканазы.

Промышленное применение целлюлаз

Целлюлазы весьма востребованы в целом ряде отраслей промышленности. Так, в пищевой промышленности целлюлаза традиционно используется для экстракции и осветления соков (Azman et al., 2021; Ozyilmaz, Gunay, 2023); она также активно применяется для улучшения диетических свойств бурого риса. Q. Zhang с коллегами (2019) в своей работе показали, что циклическая обработка целлюлазой и проращивание являются эффективным методом повышения уровня гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в буром рисе и улучшения его кулинарных и вкусовых качеств.

Целлюлаза также используется для улучшения качества теста (Hu X. et al., 2022). Добавление картофеля к пшеничной муке повышает пищевую ценность хлеба, однако неблагоприятные эффекты, обусловленные высоким содержанием пищевых волокон в картофельной муке, могут повлиять на формирование глютеновой матрицы. Добавление целлюлазы и/или пектиназы способствует пышности и мягкости хлеба.

Перспективно применение целлюлазы для экстракции масел в пищевой и косметической промышленности. В статье D. Yu с коллегами (2022) приведен метод экстракции масла из рисовых отрубей с использованием магнитно-иммобилизованной целлюлазы в сочетании с магнитно-иммобилизованной щелочной протеазой. В работе M.O. Chiwetalu с коллегами (2022) представлен метод экстракции для получения жира из семян *Pycnanthus angolensis* посредством предварительной обработки ферментом штамма *Aspergillus niger* BC23.

В последнее время существенно продвинулась вперед технология биопереработки лигноцеллюлозы для производства биохимикатов и биотоплива с использованием фермента целлюлазы в качестве неотъемлемого компонента (Sharma et al., 2023).

A. Shankar с коллегами (2024) предварительно обрабатывали рисовую солому, рисовые отруби, пшеничную солому, древесную щепу, жом сорго и стебли хлопка базидиальным грибом *Ganoderma lucidum*. Гриб, благодаря своей лакказной активности, в значительной степени разрушает лигнин, присутствующий в биомассе. Сахарообразование предварительно обработанной биомассы консорциумами целлюлаз, выделенными из *Aspergillus flavus* MDU-5 и *Trichoderma citrinoviride* MDU-1, повышает выход сахаридов примерно на 70 % и этанола на 89 %. H. Sha с коллегами (2023) разработали новый подход к анаэробному сбраживанию кукурузной соломы с использованием магнитной целлюлазы, покрытой никелем и графитом. Разработанная система увеличила образование метана примерно на 74 % по сравнению с системой без покрытия. Эта система увеличивает общую популяцию электроактивных микробов *Bacteroidota* и *Methanomicrobiales*, а также коэффициент преобразования энергии до 57 %.

E. Zanuso с коллегами (2022) показали эффективность использования иммобилизованной на магнитных наночастицах целлюлазы для гидролиза биомассы кукурузных початков. Более того, магнитные свойства носителя делают этот метод перспективным для обеспечения не-

прерывной работы, что в конечном итоге способствует снижению стоимости процесса.

Целлюлаза используется в целлюлозно-бумажной промышленности в переработке макулатуры, предварительной обработке древесного сырья для удаления смолы (Chutani, Sharma, 2016; Lehr et al., 2021; Singh A. et al., 2021), что снижает воздействие целлюлозно-бумажной промышленности на окружающую среду.

В фармацевтической промышленности целлюлаза применяется для извлечения биологически активных соединений из растительного сырья (Puri et al., 2012; Cao et al., 2019; Hu Y. et al., 2021). Также целлюлаза широко используется в производстве таблетированных ферментных смесей для переваривания богатой клетчаткой растительной пищи. Например, VeganZyme, помимо улучшения пищеварения, также применяется в лечении нарушений обмена веществ (Ranjan et al., 2023). Целлюлаза и папаин используются для лечения фитобезоаров (Iwamuro et al., 2014).

Химическое разложение и сжигание являются наиболее распространенными методами очистки от загрязнений окружающей среды. Однако использование для очистки ферментов микроорганизмов проще и экологичнее (Okino-Delgado et al., 2019). *Bacillus cereus* и *B. subtilis* способны очищать отходы от сточных вод заводов по производству пальмового масла, поскольку обе бактерии вырабатывают целлюлазу и липазу для эффективной биодеградации отходов (Ranjan et al., 2023).

В исследовании J. Luo с коллегами (2021) целлюлаза использовалась при одновременной ферментации осадка сточных вод и бумажных отходов для получения летучих жирных кислот. Все эти исследования предполагают применение целлюлазы для очистки сточных вод и в производстве продукции с добавленной стоимостью.

Целлюлаза широко используется в производстве кормов для сельскохозяйственных животных. Целлюлаза и гемицеллюлаза способствуют гидролизу низкобелковых кормов и β-глюкана, тем самым повышая питательные свойства корма. Применение целлюлазы также приводит к снижению дуоденальной вязкости и улучшает пластичность корма, соответственно и улучшает переваривание и усвоение кормов животными (Azzaz et al., 2021; Selzer et al., 2021). В птицеводстве использование фермента целлюлазы является целесообразной стратегией, поскольку он способен разрушать целлюлозные связи, высвобождая питательные вещества, такие как глюкоза, увеличивая энергетическую ценность рациона и, таким образом, улучшая продуктивные показатели птиц (Perim et al., 2024).

В текстильной промышленности целлюлаза используется для повышения качества отделки изделий из ткани путем модификации выступающих волокон. Обработка целлюлазой уменьшает шероховатость ткани, увеличивает гладкость, глянцевитость и цветовую яркость (Karmakar, Ray, 2011; Sajith et al., 2016).

Наряду с протеазами и липазами целлюлаза добавляется в моющие средства для повышения эффективности стирки. Она сохраняет форму и цвет выстиранной одежды, уменьшая образование пуха и катышков. Фермент также помогает в удалении грязи и пятен, избирательно воздействуя на целлюлозные волокна изнутри, разрушая связи между целлюлозой и частицами загрязнений, меняя структуру поверхности волокон и способствуя таким образом удалению грязи другими моющими ингредиентами. В настоящее время в моющие средства добавляют целлюлазы, как активные в широком диапазоне температур (30–60 °C), так и мезофильные (Kasana, Gulati, 2011). Целлюлазные ферменты используются в композициях моющих средств для обеспечения очищения, мягкости и сохранения окраски. Однако применение большинства целлюлаз было ограничено из-за негативного воздействия, которое они могут оказывать на прочность волокон ткани вследствие гидролиза кристаллической целлюлозы. В последнее время были разработаны целлюлазы с высокой специфичностью по отношению к аморфной целлюлозе для использования их чистящего потенциала без нежелательной потери прочности.

Грибные целлюлазы

Целлюлолитические грибы рода *Trichoderma* долго считались лучшим источником целлюлаз (Reese, Mandels, 1963). Основное узкое место целлюлаз *Trichoderma* – очень низкая активность β-глюкозидазы в супернатантах культуры и ингибирование этого фермента продуктом (Pérez et al., 2002). Целлюлаза, продуцируемая термофильными грибами *Sporotrichum thermophile* и *Talaromyces emersonii*, имеет активность, сравнимую с таковой мезофильного гриба *H. jecorina* (Coutts, Smith, 1976; Folan, Coughlan, 1978).

Humicola insolens является отличным производителем pH-нейтральных активных термостабильных целлюлаз, которые находят множество вариантов промышленного применения (Xu X. et al., 2016).

В исследовании (Chellapandi, Jani, 2008) изучена активность эндоглюканазы 26 штаммов *Streptomyces*, выделенных из садовой почвы. Два лучших, отобранных на основе потенциальной целлюлолитической активности на агаровой среде Беннетта, изолята были испытаны в различных условиях, включая источники углерода и азота, а также условия роста. Максимальная активность эндоглюканазы (11.25–11.90 Ед/мл) достигнута за 72–88 ч в ферментационной среде, содержащей детергент Tween-80, с последующим использованием фосфатных источников. Оба целлюлолитических изолята *Streptomyces* давали почти одинаковое количество фермента во всех испытаниях, однако влияние ингредиентов среды на индукцию эндоглюканазы в некоторой степени расходилось между штаммами. Подобно мезофильным грибам, термофильные грибы продуцируют все компоненты целлюлазного комплекса, синергически разрушая целлюлозу и гемицеллюлозу (Mathew et al., 2008).

Грибы являются продуцентами важных внеклеточных ферментов для промышленного использования. Особенно в этом смысле известны представители родов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Aspergillus* (Zhao C.H. et al., 2018). Грибы весьма популярны для производства промышленных целлюлаз благодаря желательным свойствам, например внеклеточной секреции фермента в огромных количествах с экономически эффективными субстратами (Niyonzima, 2021). Для получения ферментов могут быть использованы субстраты на основе сельскохозяйственных отходов. Так, например, стебли кукурузы и багасса

сахарного тростника были использованы для получения детергентно-совместимых целлюлаз грибами *Aspergillus* (Imran et al., 2018; El-Baroty et al., 2019). В работе (Dave et al., 2012) задействовали легкодоступный дешевый жмых семян *Jatropha* для получения целлюлазы из *Thermoascus aurantiacus* RBB-1. В целом было обнаружено, что кристаллическая целлюлоза является лучшим источником углерода для производства целлюлазы в термофильных грибах, чем ее аморфные или смешанные формы (Fracheboud, Canevascini, 1989).

Гены грибных ферментов легко клонируются в бактериальные штаммы для производства целлюлаз, поскольку грибные ферменты менее сложны по структуре по сравнению с бактериальными (Maki et al., 2009; Acharya, Chaudhary, 2012). Однако основное преимущество их в том, что целлюлазы могут быть получены из грибов довольно простыми методами, а сами грибы способны вырабатывать целлюлазы при выращивании на дешевых субстратах. К тому же, поскольку они производят полный спектр целлюлаз, нитчатые грибы остаются наиболее популярными для промышленного производства целлюлаз (Ilić et al., 2023).

Бактериальные целлюлазы

Рядом исследователей обнаружено значительное преимущество бактериальных целлюлаз перед грибными в специфической активности и стабильности (Ejaz et al., 2021). Бактерии обладают высокой скоростью роста, адаптированы ко всем экологическим нишам, легко поддаются генетическим манипуляциям (Nyathi et al., 2023). Существует большое количество целлюлозолитических бактериальных штаммов, производящих специфические, устойчивые к экстремальным условиям ферменты (Bhati et al., 2021). Исследования бактериальных целлюлаз быстро развиваются и обнаруживают большее генетическое разнообразие, чем грибные, которые пока шире представлены на коммерческой основе (Ilić et al., 2023).

Наиболее распространенными целлюлолитическими бактериями являются *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp., *Clostridium* spp., *Erwinia chrysanthemi*, *Thermobispora bispara*, *Ruminococcus albus*, *Streptomyces* spp., *Thermonospora* spp. и *Thermobifida* (Sadhu, Maiti, 2013). Тем не менее в настоящее время возрастает интерес к поиску новых штаммов целлюлозолитических бактерий. Как результат описано множество новых видов целлюлозолитических бактерий: *Streptomyces abietis* (Fujii et al., 2013), *Kallotenue papyrolyticum* (Cole et al., 2013), *Ornatilinea apprima* (Podosokorskaya et al., 2013), *Bacteroides luti* (Hatamoto et al., 2014), *Alicyclobacillus cellulosilyticus* (Kusube et al., 2014), *Anaerobacterium chartisolvens* (Horino et al., 2014), *Caldicellulosiruptor changbaiensis* (Bing et al., 2015), *Herbinix hemicellulosilytica* (Koeck et al., 2015), *Pseudomonas coleopterorum* (Menendez et al., 2015), *Siphonobacter aquaeclarae*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Paracoccus sulfuroxidans*, *Ochrobactrum cytisi*, *O. haematophilum*, *Kaistia adipata*, *Devosia riboflavina*, *Labrys neptinae* и *Citrobacter freundii* (Huang et al., 2012), *Thermotoga naphthophila* (Akram, Haq, 2020), *Nocardiopsis dassonvillei* (Sivasankar et al., 2022).

Аэробные свободноживущие бактерии секретируют внеклеточные ферменты со связывающими модулями для различных конформаций целлюлозы. Синергизм действий ферментов обеспечивает эффективный гидролиз целлюлозосодержащего субстрата. Анаэробные бактерии, часто обитатели желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) питающихся растительной пищей животных, обладают таким внеклеточным мультиферментным комплексом, как целлюлосома. В целлюлосоме различные целлюлолитические ферменты выстраиваются на белке-скаффолде, что обеспечивает надежное прикрепление клеток к целлюлозе, высокую локальную концентрацию, а также правильное соотношение и порядок компонентов. Первой была изучена целлюлосома термофильной бактерии *C. thermocellum*, однако в настоящее время исследованы и целлюлосомы мезофильных клостридий, руминококков и других анаэробов (Schwarz, 2001).

Кроме целлюлосомных комплексов, у анаэробов, в частности у клостридий, представлены и секретируемые целлюлазы и гемицеллюлазы. А в ферментных системах *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, к примеру, не найдены целлобиогидролазы (их функция, видимо, не сводится к трофической, а заключается в облегчении проникновения фитопатогена в клетку хозяина) (Rabinovich et al., 2002).

Целлюлазы термофильных микроорганизмов

Целлюлазы обычно стабильны при относительно высоких температурах (Azadian et al., 2016). Ферменты термостабильных микроорганизмов имеют оптимум активности при температурах между 60 и 80 °C. В ферментативном гидролизе целлюлозы термостабильные целлюлазы обычно играют значительную роль, поскольку могут быть использованы непосредственно после этапа прогрева без предварительного охлаждения, что снижает длительность производственных циклов и повышает эффективность процесса (Liu D. et al., 2011).

Термофильные микроорганизмы продуцируют специализированные белки – шапероны, которые помогают вернуть белки в их естественную форму и восстановить их функции (Laksanalamai, Robb, 2004; Singh S.P. et al., 2010). У архей *Sulfolobus solfataricus* небольшой ДНК-связывающий белок Sso7d поддерживает стабильность агрегированных с ними белков (Ciaramella et al., 2002). Однако наличие подобных механизмов предполагает, что не обязательно ферменты термофильных организмов будут обладать собственной высокой термостабильностью, особенно вне организма-хозяина.

Белки термофильных бактерий, актиномицетов и архей переносят высокие температуры за счет повышенных электростатических, дисульфидных и гидрофобных взаимодействий в пространственной структуре (Ladenstein, Ren, 2006; Pedone et al., 2008). Некоторые термофильные ферменты стабилизируются ионами металлов и неорганических солей (Vieille, Zeikus, 2001). Целлюлолитическая активность некоторых термофильных грибов (*Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum thermophile* и *T. aurantiacus*) в два-три раза больше, чем у *Trichoderma viridae* (Tansey, 1971).

Дополнительный фактор, который может влиять на термостабильность, – гликозилирование (Kahn et al., 2020;

Ramakrishnan et al., 2023). Это явление может приводить к повышению термостабильности фермента при клонировании бактериального гена в организм, способный к гликозилированию производимых белков, к примеру грибы.

Многие термофильные бактерии производят термостабильные целлюлозолитические ферменты, например, представители родов *Bacillus*, *Geobacillus*, *Caldibacillus*, *Acidothermus*, *Caldocellum* и *Clostridium* (Ghosh et al., 2020). Гипертермофильная бактерия *Dictyoglomus turgidum* несет ген (*Dtur_0671*), кодирующий β-глюкозидазу и экспрессированный в *Escherichia coli*. Этот фермент имеет максимальную активность при температуре 80 °C и pH 5.4, он чрезвычайно стабилен в диапазоне pH 5–8 и сохраняет 70 % своей активности через 2 ч при 70 °C. Показана его пригодность для промышленного производства биоэтанола, поскольку фермент проявил высокую устойчивость к глюкозе и этанолу (Fusco et al., 2018).

Ген целлюлозолитического фермента из *Thermotoga naphthophila* RKU-10T также был получен и экспрессирован в *E. coli*. Очищенный фермент TnCel12B показал максимальную активность при pH 6.0 и температуре 90 °C. Он сохранял 100 % активности после инкубации в течение 8 ч при 85 °C, а также в диапазоне pH 5.0–9.0 (Akram, Haq, 2020). Ген гипертермофильной археи *Sulfolobus shibatae*, кодирующий эндо-1,4-β-d-глюканазу, после клонирования и суперэкспрессии в *E. coli* продемонстрировал максимальную активность при 95–100 °C. Этот фермент показал отличную устойчивость к высоким температурам: сохранял полную активность после часовой инкубации при температурах до 85 °C; 98, 90 и 84 % исходной активности наблюдалось после 2 ч инкубации при 75, 80 и 85 °C соответственно (Boyce, Walsh, 2018).

Целлюлазы подразделяются на две группы в зависимости от их предпочтительных диапазонов pH: термоацидофильные целлюлазы (такие как целлюлазы видов *Alicyclobacillus*, *Geobacillus* и *T. aurantiacus*) процветают в кислых условиях, в то время как термоалкалифильные целлюлазы (видов *Bacillus*, *Halobacillus*) и археи предпочитают основные условия. Обе группы ферментов могут эффективно работать при высоких температурах, но их применение может варьировать в зависимости от конкретных потребностей различных отраслей промышленности (Arya et al., 2024).

Целлюлазы психрофильных микроорганизмов

Применение холодоактивных ферментов, работающих при щелочном pH, может, например, оказаться востребованным в моющих средствах, так как позволяет сохранить качество тканей без использования горячей воды. Для выделения ферментов, активных в диапазоне низких температур, используются психрофильные микроорганизмы. Психрофильные микроорганизмы составляют большую группу сапрофитных обитателей почвы, морей, пресных водоемов, сточных вод.

Метаболически активные бактерии, выживающие при температуре –5…–15 °C, были выделены из арктической вечной мерзлоты (Bakermans, Skidmore, 2011; Mykytczuk et al., 2013). Эти психрофилы могут выжить при низкой температуре, при этом внутриклеточные биохимические процессы осуществляются холодоактивными ферментами. В дополнение к этому их внеклеточные ферменты также помогают разложить сложные материалы, присутствующие в окружающей среде. В мезофильных организмах влияние пониженных температур на активность ферментов более существенно, поскольку молекулы их ферментов имеют меньше структурных адаптаций к функционированию в таких условиях, что приводит к низкой активности фермента (Karan et al., 2012). Психрофилы, растущие в холодных условиях, обладают холодоустойчивыми ферментами с высокой каталитической активностью и стабильностью.

За последние полтора десятилетия были описаны психротрофные микроорганизмы, принадлежащие к различным группам. Первую низкотемпературную целлюлазу выделили в 1996 г. из гриба *Acremonium alcalophilum*. Эта целлюлаза имела максимальную активность при температуре 40 °C и pH 7.0, фермент сохранял более 20 % активности даже при 0 °C (Hayashi et al., 1996). Впоследствии целлюлазы были выделены и охарактеризованы и из других психрофильных микроорганизмов. Оптимальная температура для их активности обычно колеблется от 20 до 40 °C (см. таблицу), но иногда сообщается о более высоких температурах.

Адаптированные к холоду штаммы микроорганизмов были выделены в основном из антарктических и полярных регионов, которые представляют собой постоянно холодные среды. Другими потенциальными источниками холодоактивных целлюлаз являются грязевые и глубоководные осадочные микроорганизмы. Штамм *Clostridium*, выделенный из навозного биогаза, был способен расти при температурах от 5 до 50 °C, продуцируя спектр ксилано- и целлюлолитических ферментов, наиболее активных при 20 °C (Akila, Chandra, 2003); целлюлаза, продуцируемая грибом *A. alcalophilum*, была активна даже при 0 °C (Hayashi et al., 1996).

Новая холодоустойчивая целлюлаза, принадлежащая к семейству GH5, названная CelE1, была извлечена из метагеномной библиотеки почвы с поля сахарного тростника. Для выделения целлюлолитических клонов был проведен функциональный скрининг этой библиотеки (Alvarez et al., 2013). Эндоглюканаза CelE1, выделенная таким способом, продемонстрировала высокую активность в широком диапазоне температур и в щелочных условиях.

В работе (Souza et al., 2015) исследовано влияние pH на вторичную и третичную структуры, заряд и активность CelE1. Хотя изменение pH оказывало небольшое влияние на структуру фермента, активность снижалась в кислых условиях. Оптимальная активность была достигнута при pH 8. Для того чтобы оценить пригодность CelE1 в качестве добавки в моющие и чистящие средства, активность CelE1 оценивали в присутствии поверхностно-активных веществ. T.V. Souza с коллегами не выявили значительного ингибирующего эффекта со стороны поверхностно-активных веществ на активность эндоглюканазы CelE1. Они также провели термодинамический анализ, основанный на структурной стабильности и химическом процессе разворачивания/рефолдинга CelE1. Результаты показали, что химическое разложение протекает как обратимый двухфазный процесс. Данные термодинамического анализа полезны для предсказания стабильности фермента.

Целлюлазы психрофильных микроорганизмов

Микроорганизм	Фермент	Оптимум температуры, °C	Оптимум pH	Активатор	Репрессор	Литературный источник
Acremonium alcalophilum	Целлюлаза	40	7.0	Глюкоза	–	Hayashi et al., 1996
Arthrobacter sp.	β-глюкозидаза	35	–	–	–	Benešová et al., 2005
Clostridium sp.	Эндоглюканаза, β-глюкозидаза	20	5–6	–	–	Akila, Chandra, 2003
Fibrobacter succinogenes	Эндоглюканаза	25	5.5	–	–	Iyo, Forsberg, 1999
Paenibacillus sp. strain C7	β-глюкозидаза	30–35	7–8	–	–	Shipkowski, Brenchley, 2005
Paenibacillus sp. BME-14	Эндоглюканаза	35	6.5	Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, дитиотреитол, β-меркаптоэтанол	Cu^{2+}, EDTA	Fu et al., 2010
Pseudoalteromonas sp. DY3	Эндоглюканаза	40	6–7			Zeng et al., 2006
Rhodotorula glutinis	Эндоглюканаза	50	4.5	Fe^{3+}, Mn^{2+}	Al^{3+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, EDTA, EGTA	Oikawa et al., 1998
Shewanella sp. G5	β-глюкозидаза	37	8	–	–	Cristóbal et al., 2008
Pseudoalteromonas sp. MB-1	Эндоглюканаза	35	7.2	–	–	You, Wang, 2005

Психрофильная актинобактерия *Nocardiopsis dassonvillei* PSY13 производит высокоактивную холодоактивную целлюлазу с оптимумами 10 °C и pH 7.5 (Sivasankar et al., 2022). Компания “Novozymes” разработала холодоактивную целлюлазу (Celluzyme®), активную при 15 °C, из адаптированных к холоду грибов *H. insolens* и выпустила на рынок в составе смеси целлюлаз под торговым названием Celluclean®.

Целлюлазы галофильных микроорганизмов

Универсальное применение целлюлаз требует продолжения поиска новых источников ферментов. Ферменты морского происхождения в последнее время привлекают большое внимание, особенно для промышленного применения. Специализированные среды в морской экосистеме, включая эстуарии и мангровые заросли, богаты лигноцеллюлозной биомассой и, следовательно, обеспечивают питательную среду для перерабатывающих целлюлозу организмов. В этом контексте морские организмы являются перспективными кандидатами для многих промышленных процессов из-за их способности процветать в ограниченной питательными веществами окружающей среде и неблагоприятных условиях (Dalmaso et al., 2015; Barzkar, 2018). Благодаря высокой солености (3 %), в морской экосистеме эволюционировали более разнообразные целлюлолитические микроорганизмы, чем в наземной среде (Jahromi, Barzkar, 2018).

Исследования деградации целлюлозы в солевых условиях открыли новые метаболические пути и ферменты с целлюлолитической активностью. Разлагающие целлюлозу организмы, населяющие морские экосистемы, играют исключительную роль в минерализации органического вещества и тем самым повышают продуктивность этих экосистем (Milici et al., 2017). Способность к разложению целлюлозы обнаруживается у многих групп морских обитателей, включая бактерии (Harshvardhan et al., 2013), дрожжи (Rong et al., 2015), плесневые грибы (Liu J. et al., 2012; Batista-García et al., 2017), протистов (Bremer, Talbot, 1995), коловраток (Chun et al., 1997), криля (Tsuji et al., 2012) и иглокожих (Sakamoto et al., 2007).

Галотолерантная эндоглюканаза с молекулярной массой 39 кДа выделена из плесневого гриба *Botrytis ricini* URM 5627 (Silva et al., 2018). Оптимальные условия работы фермента – 50 °C и pH 5. Фермент был стабилен при температуре 39–60 °C в течение 60 мин и pH 4–6. Ферментативная активность увеличивалась в присутствии Na^{+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} и Zn^{2+} и уменьшалась в присутствии Ca^{2+}, Cu^{2+} и Fe^{2+}. Эндоглюканаза обнаружила галотолерантный профиль: ее активность возрастала пропорционально увеличению концентрации NaCl. Максимальная активность была достигнута при 2 M NaCl с увеличением активности на 75 %.

Выбор продуцентов, наиболее подходящих для наработки ферментов

E. coli и *Bacillus* sp. широко используются в качестве бактериальных систем для экспрессии рекомбинантных белков. Кроме того, в качестве платформ применяются и другие бактерии, в том числе *Z. mobilis* и *Streptomyces lividans*. *E. coli* представляет собой наиболее частую систему экспрессии целлюлаз в промышленности и имеет ряд преимуществ, таких как хорошо охарактеризованный геном, доступность в коммерческих формах и наборах, простота модификации. Однако имеются некоторые недостатки, которые необходимо учитывать, – ограниченная секреция (толстая внешняя мембрана, затрудненная транспортировка через мембрану), деградация линкерных последовательностей, снижение целлюлолитической активности, возможность образования телец включения. *Zymomonas mobilis* зарекомендовала себя как альтернатива использованию дрожжей из-за своей универсальности (она ферментирует широкий спектр сахаров), а

также в качестве альтернативы *E. coli*, так как способна экспрессировать рекомбинантные белки внутри- и внеклеточно.

Разработанные для *C. thermocellum* генетические методы отстают от таковых для модельных организмов, таких как *E. coli*. Работ по введению однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) не очень много. *C. thermocellum* – облигатная термофильная и анаэробная грамположительная бактерия, которая естественным образом ферментирует лигноцеллюлозу до этанола и органических кислот (Lynd et al., 2005; Olson et al., 2012; Xu Q. et al., 2016; Tian et al., 2019).

Существует две основные стратегии улучшения целлюлаз или компонентов целлюлазного комплекса путем генетических модификаций: 1) рациональный дизайн и 2) направленная эволюция (Acharya, Chaudhary, 2012). Преимущества и модификации (классический, случайный мутагенез или генетическая модификация) каждого из способов проверяются и используются различными специалистами для получения максимального выхода и эффективности целлюлазы. Для максимального выхода целлюлазы был выполнен (Sadhu et al., 2014) случайный мутагенез в целлюлолитическом штамме, принадлежащем к роду *Bacillus*, с использованием N-метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидина (NTG), что приводит к переходным мутациям между нуклеотидами AT и GC. Разработан мутантный штамм с повышенной активностью карбоксиметилцеллюлазы. Подобные результаты были получены на *Cellulomonas* sp. также с использованием NTG (Sangkharak et al., 2012), но характеристика этих мутантов до сих пор не опубликована.

Производство рекомбинантных ферментов включает разработку технологии, сочетающей в себе направленную эволюцию и рациональный дизайн (Zhao H. et al., 2002; Cherry, Fidantsef, 2003). Однако ограниченность знаний о субстратах целлюлаз, их взаимодействии с ферментами, взаимосвязях и регуляции активности целлюлазы все еще представляет серьезные помехи для рационального дизайна, что делает использование направленной эволюции более эффективным (Zhang Y.H.P. et al., 2006).

Тем не менее известны и примеры успешного применения метода рационального дизайна. Так, был проведен направленный мутагенез эндоглюканазы-II (Cel5A) из *H. jecorina* (Akbarzadeh et al., 2018). В структуре этого фермента имеется четыре дисульфидные связи, и он нестабилен при высоких температурах. Аминокислотные остатки цистеина в 99 и 323 положениях были заменены на валин и гистидин соответственно. В результате этого фермент утратил две дисульфидные связи и стал демонстрировать более высокую активность и термостабильность. Активность целлюлазы из *Gloeophyllum trabeum* (GtCel5) была повышена с помощью направленного мутагенеза петли 6 (Zheng et al., 2018). A.S. Dotsenko с коллегами (2020) продемонстрировали, что с помощью рационального дизайна можно повысить термостабильность целлобиогидролазы путем замены пролина. Получившийся белок (G415P) имел в 3.5 раза большее время полужизни при 60 °C, чем белок дикого типа. Несколько исследователей рассмотрели и сравнили системы экспрессии рекомбинантных целлюлаз (Garvey et al., 2013; Hasunuma et al., 2013; Sadhu, Maiti, 2013; Juturu, Wu, 2014; Lambertz et al., 2014).

Некоторые исследователи сообщают о применении методов направленной эволюции в сочетании с рациональным дизайном сверхэкспрессии целлюлаз в их собственном бактериальном источнике. Такие виды, как *B. subtilis* и *C. thermocellum*, были использованы в качестве системы продуцирования гомологичных целлюлаз из-за простоты их генетической модификации и других характерных особенностей.

Однако использование этих бактерий имеет и свои недостатки, такие как низкий выход белка, высокие производственные затраты или необходимость наращивания культуры в обогащенной среде (Lambertz et al., 2014). В работе (Munjal et al., 2015) описано использование штамма *E. coli* для экспрессии β-1,4-эндоглюканазы и β-1,4-глюкозидазы из другого штамма *E. coli* под конститутивным промотором с возможностью ферментации гидролизатов биомассы.

D. Chung с коллегами (2014) сконструировали *Caldicellulosiruptor bescii*, бактерию, способную самостоятельно разлагать лигноцеллюлозную биомассу. Они клонировали и выполнили гомологичную экспрессию мультимодульной целлюлазы, называемой CelA, которая содержит домены GH9 и GH48.

Немалое количество работ также посвящено применению классического метода избыточного производства целевого белка или фермента путем клонирования его кодирующих генов в плазмиде с большим числом копий. Например, в статье (Robledo et al., 2011) описано применение этого метода для получения гомологичной сверхэкспрессии целлюлазы CelC2 из *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, которая увеличивала его целлюлолитическую активность в 3 раза.

X. Xu с коллегами (2016) разработали эффективную систему трансформации для *H. insolens*, опосредуемую *Agrobacterium tumefaciens*. Они трансформировали плазмиды, несущие промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *H. insolens*, управляющего транскрипцией генов, кодирующих неомицинфосфотрансферазу, гигромицин B-фосфотрансферазу и усиленный зеленый флуоресцентный белок. Инсерционный мутагенез Т-ДНК был применен для создания мутантной библиотеки *H. insolens*. В результате был выделен трансформант под названием «T4» с повышенной целлюлазной и гемицеллюлазной активностью. Активность фосфолипазы, эндоглюканазы, целлобиогидролазы, β-глюкозидазы и ксиланазы T4, измеренная в конце ферментации, составила 60, 440, 320, 41 % соответственно и была на 81 % выше, чем у штамма дикого типа.

Стратегии, основанные на гетерологичной экспрессии, сосредоточены на использовании нецеллюлолитических микроорганизмов, имеющих высокий коэффициент продукции для экспрессии микробных целлюлаз (Bhattacharya et al., 2015). Бактерии, такие как *E. coli*, различные виды родов *Bacillus*, *P. fluorescens*, *Ralstonia eutropha* и *Z. mobilis*; дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, и мицелиальные грибы из родов *Aspergil-*

lus и *Trichoderma* наиболее широко используются в исследованиях и в промышленности. Кроме того, для экспрессии белков используются культуры клеток млекопитающих, растений или насекомых, а также трансгенных растений и/или животных (Demain, Vaishnav, 2009).

Заключение

Промышленный спрос на ферменты целлюлазы в последние годы возрос благодаря их разнообразному применению в биокаталитических процессах расщепления целлюлозы. Широкая применимость и экологичность процессов, опосредованных целлюлазами, продолжают стимулировать исследования, направленные на поиск эффективных и экономически выгодных ферментов.

Традиционно для производства целлюлаз, как правило, используются культуры мицелиальных грибов. Однако большинство мицелиальных грибов, полученных путем естественной селекции, обладает низкой секреторной способностью к продукции целлюлазы, что не соответствует требованиям промышленного производства.

Эффективным методом увеличения продукции грибных ферментов является случайный мутагенез в сочетании со стратегией адаптивной лабораторной эволюции (Peng et al., 2021). Но в последние годы фокус внимания смещается в сторону бактериальных целлюлаз, поскольку эти ферменты отличаются большим разнообразием свойств, более высокой стабильностью, возможностью сочетания одновременно нескольких активностей в одном ферменте.

Экстремофильные микроорганизмы обладают разнообразием молекулярных стратегий выживания в экстремальных условиях. Их ферменты отличаются свойствами солеустойчивости, термостабильности, холодовой адаптивности. За последние годы были выделены термофильные, пьезофильные, ацидофильные и галофильные ферменты. Применение методов генной инженерии позволяет экспрессировать эти гены в других организмах, для которых уже существует богатый набор методов работы.

Значительное внимание привлекают технологии иммобилизации целлюлаз, в особенности использование комбинации полимерных носителей с наноматериалами. Такие иммобилизованные целлюлазы могут демонстрировать повышенные активность, стабильность, пригодность к повторному использованию и переработке. Сочетание наноматериалов и технологий биокатализа с применением иммобилизованных целлюлаз на сегодняшний день считается передовым полем исследований и разработки в ферментных технологиях (Ranjan et al., 2023).

Особенностью целлюлазы является ее комплексность. Для полноценной работы фермента необходимы все три составляющих комплекса (Bhat M.K., Bhat S., 1997). Такой комплекс сложен для клонирования в гетерологичные системы, поэтому значительные усилия мирового сообщества сосредоточены на поиске природных продуцентов и разработке стратегий улучшения свойств путем генетической модификации выделенного организма. Клонирование же и экспрессию в стандартных продуцентах современной биотехнологии осуществляют для отдельных компонентов комплекса.

Список литературы / References

Acharya S., Chaudhary A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Braz J Microbiol.* 2012;43(3):844-856. doi 10.1590/S1517-83822012000300001

Akbarzadeh A., Pourzardosht N., Dehnavi E., Ranaei Siadat S.O., Zamani M.R., Motallebi M., Nikzad Jamnani F., Aghaeepoor M., Barshan Tashnizi M. Disulfide bonds elimination of endoglucanase II from *Trichoderma reesei* by site-directed mutagenesis to improve enzyme activity and thermal stability: an experimental and theoretical approach. *Int J Biol Macromol*. 2018;120(Pt. B):1572-1580. doi 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.164

Akila G., Chandra T.S. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 219(1):63-67. doi 10.1016/S0378-1097(02)01196-5

Akram F., Haq I.U. Overexpression and characterization of TnCel12B, a hyperthermophilic GH12 endo-1,4-β-glucanase cloned from *Thermotoga naphthophila* RKU-10^{T}. *Anal Biochem*. 2020;599:113741. doi 10.1016/j.ab.2020.113741

Alvarez T.M., Paiva J.H., Ruiz D.M., Cairo J.P., Pereira I.O., Paixão D.A., de Almeida R.F., Tonoli C.C., Ruller R., Santos C.R., Squina F.M., Murakami M.T. Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome. *PLoS One*. 2013;8(12): e83635. doi 10.1371/journal.pone.0083635

Arya M., Chauhan G., Fatima T., Verma D., Sharma M. Statistical modelling of thermostable cellulase production conditions of thermophilic *Geobacillus* sp. TP-1 isolated from Tapovan hot springs of the Garhwal Himalayan mountain ranges, India. *Indian J Microbiol*. 2024;64(3):1132-1143. doi 10.1007/s12088-024-01258-x

Azadian F., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Hassanshahian M. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Mol Biol Res Commun*. 2016;5(3):143-155. doi 10.22099/mbrc.2016.3743

Azman N.A., Fuzi S.F.Z.M., Talip B.A., Abdullah S. Enzymatic clarification of soursop juice by pectinase/cellulase enzymes ratio. *Enhanced Knowledge Sci Technol*. 2021;1(2):234-243. doi 10.30880/ekst.2021.01.02.028

Azzaz H.H., Abd A.M., Tawab E., Khattab M.S.A., Szumacher-Strabel M., Cieślak A.C., Murad H.A., Kiełbowicz M., El-Sherbiny M. Effect of cellulase enzyme produced from *Penicilliumchrysogenum* on the milk production, composition, amino acid, and fatty acid profiles of egyptian buffaloes fed a high-forage diet. *Animals.* 2021; 11(11):3066. doi 10.3390/ANI11113066

Bakermans C., Skidmore M.L. Microbial metabolism in ice and brine at –5 °C. *Environ Microbiol.* 2011;13(8):2269-2278. doi 10.1111/j.1462-2920.2011.02485.x

Barzkar N., Homaei A., Hemmati R., Patel S. Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles*. 2018;22(3):335-346. doi 10.1007/s00792-018-1009-8

Batista-García R.A., Sutton T., Jackson S.A., Tovar-Herrera O.E., Balcázar-López E., Sánchez-Carbente M.D., Sánchez-Reyes A., Dobson A.D., Folch-Mallol J.L. Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173750. doi 10.1371/journal.pone.0173750

Benešová E., Marková M., Králová B. α-Glucosidase and β-glucosidase from psychrotrophic strain *arthrobacter* sp. C2-2. *Czech J Food Sci*. 2005;23(3):116-120. doi 10.17221/3380-CJFS

Bhat M.K., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv.* 1997;15(3-4):583-620. doi 10.1016/s0734-9750(97)00006-2

Bhati N., Shreya, Sharma A.K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *J Food Process Eng*. 2021;44(2):e13623. doi 10.1111/jfpe.13623

Bhattacharya A.S., Bhattacharya A., Pletschke B.I. Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective

for enhanced bio-ethanol production. *Biotechnol Lett*. 2015;37(6): 1117-1129. doi 10.1007/s10529-015-1779-3

Bing W., Wang H., Zheng B., Zhang F., Zhu G., Feng Y., Zhang Z. *Caldicellulosiruptor changbaiensis* sp. nov., a cellulolytic and hydrogen-producing bacterium from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(Pt. 1):293-297. doi 10.1099/ijs.0.065441-0

Boyce A., Walsh G. Expression and characterisation of a thermophilic endo-1,4-β-glucanase from *Sulfolobus shibatae* of potential industrial application. *Mol Biol Rep*. 2018;45(6):2201-2211. doi 10.1007/s11033-018-4381-7

Bremer G.B., Talbot G. Cellulolytic enzyme activity in the marine protist *Schizochytrium aggregatum*. *Bot Mar.* 1995;38(1-6):37-42. doi 10.1515/botm.1995.38.1-6.37

Cao L., Yu M., Wang C., Bao Y., Zhang M., He P., Zhang Y., Yang T., Li L., Li G., Gong Y. Cellulase-assisted extraction, characterization, and bioactivity against rheumatoid arthritis of *Astragalus* polysaccharides. *Int J Polym Sci.* 2019;2:8514247. doi 10.1155/2019/8514247

Chellapandi P., Jani H.M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Braz J Microbiol.* 2008;39(1):122-127. doi 10.1590/S1517-83822008000 1000026

Cherry J.R., Fidantsef A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14(4):438-443. doi 10.1016/s0958-1669(03)00099-5

Chiwetalu M.O., Ossai E.C., Enechi O.C., Ugwu C.N., Ozogwu V.E., Okpala C.O.R., Njoku O.U. An enhanced fat extraction from *Pycnanthus angolensis* (African nutmeg) seeds using cellulase from *Aspergillus niger* strain BC23. *Qual Assur Saf Crops Foods.* 2022; 14(3):165-175. doi 10.15586/qas.v14i3.997

Chun C.Z., Hur S.B., Kim Y.T. Purification and characterization of an endoglucanase from the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;43(2):241-249. doi 10.1080/15216549700 204021

Chung D., Cha M., Guss A.M., Westpheling J. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(24):8931-8936. doi 10.1073/pnas.1402210111

Chutani P., Sharma K.K. Concomitant production of xylanases and cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* MDU-6 selected for the deinking of paper waste. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016;39(5): 747-758. doi 10.1007/s00449-016-1555-3

Ciaramella M., Pisani F.M., Rossi M. Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic *archaeon Sulfolobus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;81(1-4):85-97. doi 10.1023/a:1020577510469

Cole J.K., Gieler B.A., Heisler D.L., Palisoc M.M., Williams A.J., Dohnalkova A.C., Ming H., Yu T.T., Dodsworth J.A., Li W.-J., Hedlund B.P. *Kallotenue papyrolyticum* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic and filamentous thermophile that represents a novel lineage (*Kallotenuales* ord. nov., *Kallotenuaceae* fam. nov.) within the class *Chloroflexia*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(12):4675-4682. doi 10.1099/ijs.0.053348-0

Coutts A.D., Smith R.E. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Appl Environ Microbiol.* 1976; 31(6):819-825. doi 10.1128/aem.31.6.819-825.1976

Cristóbal H.A., Breccia J.D., Abate C.M. Isolation and molecular characterization of *Shewanella* sp. G5, a producer of cold-active beta-D-glucosidases. *J Basic Microbiol*. 2008;48(1):16-24. doi 10.1002/jobm.200700146

Dalmaso G.Z., Ferreira D., Vermelho A.B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs*. 2015;13(4):1925-1965. doi 10.3390/md13041925

Dashtban M., Buchkowski R., Qin W. Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *Int J Biochem Mol Biol.* 2011;2(3):274-286

Dave B.R., Sudhir A.P., Pansuriya M., Raykundaliya D.P., Subramanian R.B. Utilization of Jatropha deoiled seed cake for production of cellulases under solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012;35(8):1343-1353. doi 10.1007/s00449-012-0723-3

Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. 2009;27(3):297-306. doi 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Doi R.H., Tamaru Y. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem Rec*. 2001;1(1):24-32. doi 10.1002/1528-0691(2001)1:1<24::AID-TCR5>3.0.CO;2-W

Dotsenko A.S., Dotsenko G.S., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyn A.P. Rational design and structure insights for thermostability improvement of *Penicillium verruculosum* Cel7A cellobiohydrolase. *Biochimie*. 2020;176:103-109. doi 10.1016/j.biochi.2020.06.007

Ejaz U., Sohail M., Ghanemi A. Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*. 2021;6(3):44. doi 10.3390/biomimetics6030044

El-Baroty G., Abou Elella F., Moawad H., El Sebai T., Abdulaziz F., Khattab A.A. Optimization and characterization of extracellular cellulase produced by native Egyptian fungal strain. *Notulae Botanicae.* 2019;47(3):743-750. doi 10.15835/nbha47311500

Folan M.A., Coughlan M.P. The cellulase complex in the culture filtrate of the thermophyllic fungus, *Talaromyces emersonii*. *Int J Biochem.* 1978;9(10):717-722. doi 10.1016/0020-711x(78)90038-1

Fracheboud D., Canevascini G. Isolation, purification, and properties of the exocellulase from *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) *thermophile*. *Enzyme Microb Technol*. 1989;11(4):220-229. doi 10.1016/0141-0229(89)90096-3

Fu X., Liu P., Lin L., Hong Y., Huang X., Meng X., Liu Z. A novel endoglucanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(6):1627-1636. doi 10.1007/s12010-009-8648-2

Fujii K., Satomi M., Fukui Y., Matsunobu S., Morifuku Y., Enokida Y. *Streptomyces abietis* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from soil of a pine forest. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(Pt. 12): 4754-4759. doi 10.1099/ijs.0.053025-0

Fusco F.A., Ronca R., Fiorentino G., Pedone E., Contursi P., Bartolucci S., Limauro D. Biochemical characterization of a thermostable endomannanase/endoglucanase from *Dictyoglomus turgidum*. *Extremophiles*. 2018;22(1):131-140. doi 10.1007/s00792-017-0983-6

Garvey M., Klose H., Fischer R., Lambertz C., Commandeur U. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends Biotechnol*. 2013;31(10):581-593. doi 10.1016/j.tibtech.2013.06.006

Ghosh S., Lepcha K., Basak A., Mahanty A.K. Thermophiles and thermophilic hydrolases. In: Salwan R., Sharma V. (Eds) Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. Academic Press, 2020;219-236. doi 10.1016/B978-0-12-818322-9.00016-2

Harshvardhan K., Mishra A., Jha B. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: a potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;93:51-56. doi 10.1016/j.molcatb.2013.04.009

Hasunuma T., Okazaki F., Okai N., Hara K.Y., Ishii J., Kondo A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour Technol*. 2013;135:513-522. doi 10.1016/j.biortech.2012.10.047

Hatamoto M., Kaneshige M., Nakamura A., Yamaguchi T. *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt. 5):1770-1774. doi 10.1099/ijs.0.056630-0

Hayashi K., Nimura Y., Ohara N., Uchimura T., Suzuki H., Komacata K., Kozaki M. Low-temperature-active cellulase produced by *Acremonium alcalophilum*-JCM 7366. *J Ferment Bioeng*. 1996; 74(1):7-10

Horino H., Fujita T., Tonouchi A. Description of *Anaerobacterium chartisolvens* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from *Clostridium* rRNA cluster III isolated from soil of a Japanese rice field, and reclassification of *Bacteroides cellulosolvens*

Murray et al. 1984 as *Pseudobacteroides cellulosolvens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt. 4):1296-1303. doi 10.1099/ijs.0.059378-0

Hu X., Cheng L., Hong Y., Li Z., Li C., Gu Z. Impact of celluloses and pectins restrictions on gluten development and water distribution in potato-wheat flour dough. *Int J Biol Macromol*. 2022;206:534-542. doi 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.150

Hu Y., Kang G., Wang L., Gao M., Wang P., Yang D., Huang H. Current status of mining, modification, and application of cellulases in bioactive substance extraction. *Curr Issues Mol.* 2021;43(2):687-703. doi 10.3390/cimb43020050

Huang S., Sheng P., Zhang H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):2563-2577. doi 10.3390/ijms13032563

Ilić N., Milić M., Beluhan S., Dimitrijević-Branković S. Cellulases: from lignocellulosic biomass to improved production. *Energies*. 2023;16(8):3598. doi 10.3390/en16083598

Imran M., Anwar Z., Zafar M., Ali A., Arif M. Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* IMMIS1 after screening fungal species. *Pak J Bot.* 2018; 50(4):1563-1570

Iwamuro M., Kawai Y., Shiraha H., Takaki A., Okada H., Yamamoto K. In vitro analysis of gastric phytobezoar dissolubility by Coca-Cola, Coca-Cola Zero, cellulase, and papain. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(2):190-191. doi 10.1097/MCG.0b013e3182a39116

Iyo A.H., Forsberg C.W. A cold-active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):995-998. doi 10.1128/aem.65.3.995-998.1999

Jahromi S.T., Barzkar N. Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; 102(16):6847-6863. doi 10.1007/s00253-018-9156-5

Juturu V., Wu J.C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 2014;33:188-203. doi 10.1016/j.rser.2014.01.077

Kahn A., Moraïs S., Chung D., Sarai N.S., Hengge N.N., Kahn A., Himmel M.E., Bayer E.A., Bomble Y.J. Glycosylation of hyperthermostable designer cellulosome components yields enhanced stability and cellulose hydrolysis. *FEBS J*. 2020;287(20):4370-4388. doi 10.1111/febs.15251

Karan R., Capes M.D., Dassarma S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat Biosyst*. 2012; 8(1):4. doi 10.1186/2046-9063-8-4

Karmakar M., Ray R.R. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res J Microbiol*. 2011;6(1):41-53. doi 10.3923/jm.2011.41.53

Kasana R.C., Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *J Basic Microbiol*. 2011;51(6):572-579. doi 10.1002/jobm.201000385

Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):345-351. doi 10.1016/s0958-1669(02)00328-2

Koeck D.E., Ludwig W., Wanner G., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. *Herbinix hemicellulosilytica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(8):2365-2371. doi 10.1099/ijs.0.000264

Kusube M., Sugihara A., Moriwaki Y., Ueoka T., Shimane Y., Minegishi H. *Alicyclobacillus cellulosilyticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips from a lumbermill. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(7):2257-2263. doi 10.1099/ijs.0.061440-0

Ladenstein R., Ren B. Protein disulfides and protein disulfide oxidoreductases in hyperthermophiles. *FEBS J*. 2006;273(18):4170-4185. doi 10.1111/j.1742-4658.2006.05421.x

Laksanalamai P., Robb F.T. Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*. 2004;8(1):1-11. doi 10.1007/s00792-003-0362-3

Lambertz C., Garvey M., Klinger J., Heesel D., Klose H., Fischer R., Commandeur U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):135. doi 10.1016/j.rser.2014.01.077

Lehr M., Miltner M., Friedl A. Removal of wood extractives as pulp (pre-)treatment: a technological review. *SN Appl Sci.* 2021;3:886. doi 10.1007/s42452-021-04873-1

Liu D., Zhang R., Yang X., Xu Y., Tang Z., Tian W., Shen Q. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expr Purif*. 2011; 79(2):176-186. doi 10.1016/j.pep.2011.06.008

Liu J., Xue D., He K., Yao S. Cellulase production in solid-state fermentation by marine *Aspergillus* sp. ZJUBE-1 and its enzymological properties. *Adv Sci Lett.* 2012;16(1):381-386. doi 10.1166/asl.2012.3304

Luo J., Li Y., Li Y., Li H., Fang X., Li Y., Huang W., Cao J., Wu Y. Waste-to-energy: cellulase induced waste activated sludge and paper waste co-fermentation for efficient volatile fatty acids production and underlying mechanisms. *Bioresour Technol*. 2021;341:125771. doi 10.1016/j.biortech.2021.125771

Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(5):577-583. doi 10.1016/j.copbio.2005.08.009

Maki M., Leung K.T., Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*. 2009;5(5):500-516. doi 10.7150/ijbs.5.500

Mathew G.M., Sukumaran R.K., Singhania R.R., Pandey A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *J Sci Ind Res.* 2008;67(11):898-907

Menendez E., Ramírez-Bahena M.H., Fabryová A., Igual J.M., Benada O., Mateos P.F., Peix A., Kolařík M., García-Fraile P. *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(9):2852-2858. doi 10.1099/ijs.0.000344

Milici M., Vital M., Tomasch J., Badewien T.H., Giebel H.-A., Plumeier I., Wang H., Pieper D.H., Wagner-Döbler I., Simon M. Diversity and community composition of particle-associated and free-living bacteria in mesopelagic and bathypelagic Southern Ocean water masses: evidence of dispersal limitation in the Bransfield Strait. *Limnol Oceanogr*. 2017;62(3):1080-1095. doi 10.1002/lno.10487

Mohand-Oussaid O., Payot S., Guedon E., Gelhaye E., Youyou A., Petitdemange H. The extracellular xylan degradative system in *Clostridium cellulolyticum* cultivated on xylan: evidence for cell-free cellulosome production. *J Bacteriol.* 1999;181(13):4035-4040. doi 10.1128/jb.181.13.4035-4040.1999

Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Kenerley C.M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology*. 2012; 158(Pt. 1):35-45. doi 10.1099/mic.0.053629-0

Munjal N., Jawed K., Wajid S., Yazdani S.S. A constitutive expression system for cellulase secretion in *Escherichia coli* and its use in bioethanol production. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119917. doi 10.1371/journal.pone.0119917

Mykytczuk N.C.S., Foote S.J., Omelon C.R., Southam G., Greer C.W., Whyteet L.G. Bacterial growth at −15 °C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J.* 2013;7(6):1211-1226. doi 10.1038/ismej.2013.8

Nishida Y., Suzuki K., Kumagai Y., Tanaka H., Inoue A., Ojima T. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie.* 2007;89(8):1002-1011. doi 10.1016/j.biochi.2007.03.015

Niyonzima F.N. Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiol*. 2021;66(1):25-40. doi 10.1007/s12223-020-00838-w

Nyathi M., Dhlamini Z., Ncube T. Bioprospecting for cellulase-producing bacteria from Victoria falls rainforest decaying logs. *Am J Microbiol Res*. 2023;11(3):73-78. doi 10.12691/ajmr-11-3-2

Oikawa T., Tsukagawa Y., Soda K. Endo-β-glucanase secreted by a psychrotrophic yeast: purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998;62(9):1751-1756. doi 10.1271/bbb.62.1751

Okino-Delgado C.H., Zanutto-Elgui M.R., do Prado D.Z., Pereira M.S., Fleuri L.F. Enzymatic bioremediation: current status, challenges of obtaining process, and applications. In: Arora P. (Ed.) Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. Microorganisms for Sustainability. Vol. 10. Springer, 2019;79-101. doi 10.1007/978-981-13-7462-3_4

Olson D.G., McBride J.E., Shaw A.J., Lynd L.R. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23(3):396-405. doi 10.1016/j.copbio.2011.11.026

Ozyilmaz G., Gunay E. Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulose. *Food Chem*. 2023;398:133900. doi 10.1016/j.foodchem.2022.133900

Patel R.N., Banerjee A., Ko R.Y., Howell J.M., Li W.S., Comezoglu F.T., Partyka R.A., Szarka F.T. Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone: a taxol side-chain synthon. *Biotechnol Appl Biochem*. 1994;20(1):23-33. doi 10.1111/j.1470-8744.1994.tb00304.x

Pedone E., Limauro D., Bartolucci S. The machinery for oxidative protein folding in thermophiles. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(1):157-169. doi 10.1089/ars.2007.1855

Peng Z.Q., Li C., Lin Y., Wu S.S., Gan L.H., Liu J., Yang S.L., Zeng X.H., Lin L. Cellulase production and efficient saccharification of biomass by a new mutant *Trichoderma afroharzianum* MEA-12. *Biotechnol Biofuels*. 2021;14(1):219. doi 10.1186/s13068-021-02072-z

Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 2002;5(2):53-63. doi 10.1007/s10123-002-0062-3

Perim F.D.S., da Silva W.J., de Souza D.O., Ulhoa C.J., Rezende C.F., Dos Santos L.F., Dos Santos F.R., Silva F.G., Minafra C.S. Effects of the addition of *Trichoderma reesei* cellulase to broiler chicken diets for a 21-day period. *Animals* (*Basel*). 2024;14(10):1467. doi 10.3390/ani14101467

Pinheiro B.A., Gilbert H.J., Sakka K., Sakka K., Fernandes V.O., Prates J.A., Alves V.D., Bolam D.N., Ferreira L.M., Fontes C.M. Functional insights into the role of novel type I cohesin and dockerin domains from *Clostridium thermocellum*. *J Biochem.* 2009;424(3):375-384. doi 10.1042/BJ20091152

Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Novikov A.A., Kolganova T.V., Kublanov I.V. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(Pt. 1):86-92. doi 10.1099/ijs.0.041012-0

Puri M., Sharma D., Barrow C.J., Tiwary A.K. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem*. 2012;132(3):1113-1120. doi 10.1016/j.foodchem.2011.11.063

Rabinovich M.L., Melnick M.S., Bolobova A.V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry* (*Mosc*). 2002;67(8):850-871. doi 10.1023/a:1019958419032

Ramakrishnan K., Johnson R.L., Winter S.D., Worthy H.L., Thomas C., Humer D.C., Spadiut O., Hindson S.H., Wells S., Barratt A.H., Menzies G.E., Pudney C.R., Jones D.D. Glycosylation increases active site rigidity leading to improved enzyme stability and turnover. *FEBS J*. 2023;290(15):3812-3827. doi 10.1111/febs.16783

Ranjan R., Rai R., Bhatt S.B., Dhar P. Technological road map of Cellulase: a comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. *Biochem Eng J.* 2023;198:109020. doi 10.1016/j.bej.2023.109020

Reese E.T., Mandels M. Enzymic hydrolysis of cellulose and its derivatives. *Methods Carbohydr Chem*. 1963;3:139-143

Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Soto M.J., Velázquez E., Dazzo F., Martínez-Molina E., Mateos P.F. Development of functional symbiotic white clover root hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011;24(7):798-807. doi 10.1094/MPMI-10-10-0249

Rong Y., Zhang L., Chi Z., Wang X. A carboxymethyl cellulase from a marine yeast (*Aureobasidium pullulans* 98): its purification, characterization, gene cloning and carboxymethyl cellulose digestion. *J Ocean Univ China.* 2015;14:913-921. doi 10.1007/s11802-015-2574-4

Rubin-Pitel S.B., Zhao H. Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2006;9(4):247-257. doi 10.2174/138620706776843183

Sadhu S., Maiti T.K. Cellulase production by bacteria: a review. *Br Microbiol Res J.* 2013;3(3):235-258. doi 10.9734/BMRJ/2013/2367

Sadhu S., Ghosh P.K., Aditya G., Maiti T.K. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. *J King Saud Univ Sci.* 2014;26(4):323-332. doi 10.1016/j.jksus.2014.06.001

Sajith S., Priji P., Sreedevi S., Benjamin S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci*. 2016;6(1):461. doi 10.4172/2155-9600.1000461

Sakamoto K., Touhata K., Yamashita M., Kasai A., Toyohara H. Cellulose digestion by common Japanese freshwater clam *Corbicula japonica*. *Fish Sci.* 2007;73(3):675-683. doi 10.1111/j.1444-2906.2007.01381.x

Sangkharak K., Vangsirikul P., Janthachat S. Strain improvement and optimization for enhanced production of cellulase in *Cellulomonas* sp. TSU-03. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(5):1079-1084. doi 10.5897/AJMR11.1550

Schwarz W.H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56:634-649. doi 10.1007/s002530100710

Selzer K., Hassen A., Akanmu A.M., Salem A.Z.M. Digestibility and rumen fermentation of a high forage diet pre-treated with a mixture of cellulase and xylanase enzymes. *South Afr J Anim Sci.* 2021;51(3):399-406. doi 10.4314/sajas.v51i3.14

Sha H., Zhao B., Yang Y., Zhang Y., Zheng P., Cao S., Wang Q., Wang G. Enhanced anaerobic digestion of corn stover using magnetized cellulase combined with Ni-graphite coating. *Energy*. 2023;262(B):125532. doi 10.1016/j.energy.2022.125532

Shankar A., Saini S., Sharma K.K. Fungal-integrated second-generation lignocellulosic biorefinery: utilization of agricultural biomass for co-production of lignocellulolytic enzymes, mushroom, fungal polysaccharides, and bioethanol. *Biomass Convers Biorefin.* 2024;14(1):1117-1131. doi 10.1007/s13399-022-02969-1

Sharma V., Tsai M.L., Nargotra P., Chen C.W., Sun P.P., Singhania R.R., Patel A.K., Dong C.D. Journey of lignin from a roadblock to bridge for lignocellulose biorefineries: a comprehensive review. *Sci Total Environ.* 2023;861:160560. doi 10.1016/j.scitotenv.2022.160560

Shipkowski S., Brenchley J.E. Characterization of an unusual cold-active beta-glucosidase belonging to family 3 of the glycoside hydrolases from the psychrophilic isolate *Paenibacillus* sp. strain C7. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(8):4225-4232. doi 10.1128/AEM.71.8.4225-4232.2005

Silva T.P., de Albuquerque F.S., Dos Santos C.W.V., Franco M., Caetano L.C., Pereira H.J.V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresour Technol*. 2018;270:263-269. doi 10.1016/j.biortech.2018.09.022

Singh A., Bajar S., Devi A., Pant D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresour Technol Rep*. 2021;14:100652. doi 10.1016/j.biteb.2021.100652

Singh S.P., Purohit M.K., Aoyagi C., Kitaoka M., Hayashi K. Effect of growth temperature, induction, and molecular chaperones on the solubilization of over-expressed cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus* under *in vivo* conditions. *Biotechnol Bioproc E.* 2010;15(2):273-276. doi 10.1007/s12257-009-0023-1

Singhania R.R., Patel A.K., Pandey A. The industrial production of enzymes. In: Soetaert W., Vandamme E.J. (Eds) Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010;207-225

Sivasankar P., Poongodi S., Sivakumar K., Al-Qahtani W.H., Arokiyaraj S., Jothiramalingam R. Exogenous production of cold-active cellulase from polar *Nocardiopsis* sp. with increased cellulose hydrolysis efficiency. *Arch Microbiol*. 2022;204(4):218. doi 10.1007/s00203-022-02830-z

Souza T.V., Araujo J.N., da Silva V.M., Liberato M.V., Pimentel A.C., Alvarez T.M., Squina F.M., Garcia W. Chemical stability of a cold-active cellulase with high tolerance toward surfactants and chaotropic agent. *Biotechnol Rep* (*Amst*). 2015;9:1-8. doi 10.1016/j.btre.2015.11.001

Tansey M.R. Agar-diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Arch Mikrobiol*. 1971;77(1):1-11. doi 10.1007/BF00407983

Tian L., Conway P.M., Cervenka N.D., Cui J., Maloney M., Olson D.G., Lynd L.R. Metabolic engineering of *Clostridium thermocellum* for *n*-butanol production from cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2019;12:186. doi 10.1186/s13068-019-1524-6

Tsuji A., Sato S., Kondo A., Tominaga K., Yuasa K. Purification and characterization of cellulase from North Pacific krill (*Euphausia pacifica*). Analysis of cleavage specificity of the enzyme. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2012;163(3-4):324-333. doi 10.1016/j.cbpb.2012.08.005

Uhlig H. (Ed.) Industrial Enzymes and Their Applications. John Wiley & Sons, 1998

Vieille C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(1):1-43. doi 10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001

Wackett L.P. Microbial industrial enzymes: an annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in microbial biotechnology. *Microb Biotechnol*. 2019;12(2):405-406. doi 10.1111/1751-7915.13389

Xu Q., Resch M.G., Podkaminer K., Yang S., Baker J.O., Donohoe B.S., Wilson C., … Brown S.D., Lynd L.R., Bayer E.A., Himmel M.E., Bomble Y.J. Dramatic performance of *Clostridium thermocellum* explained by its wide range of cellulase modalities. *Sci Adv*. 2016;2(2):e1501254. doi 10.1126/sciadv.1501254

Xu X., Li J., Shi P., Ji W., Liu B., Zhang Y., Yao B., Fan Y., Zhang W. The use of T-DNA insertional mutagenesis to improve cellulase production by the thermophilic fungus *Humicola insolens* Y1. *Sci Rep.* 2016;6:31108. doi 10.1038/srep31108

You Y.W., Wang T.H. Cloning and expression of endoglucanase of marine cold-adapted bacteria *Pseudoalteromonas* sp. MB-1. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2005;45(1):142-144 (in Chinese)

Yu D., Ma X., Huang Y., Jiang L., Wang L., Han C., Yang F. Immobilization of cellulase on magnetic nanoparticles for rice bran oil extraction in a magnetic fluidized bed. *Int J Food Eng.* 2022;18(1):15-26. doi 10.1515/ijfe-2021-0111

Zanuso E., Ruiz H.A., Domingues L., Teixeira J.A. Magnetic nanoparticles as support for cellulase immobilization strategy for enzymatic hydrolysis using hydrothermally pretreated corn cob biomass. *BioEnergy Res*. 2022;15(4):1946-1957. doi 10.1007/s12155-021-10384-z

Zeng R., Xiong P., Wen J. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3. *Extremophiles*. 2006;10(1):79-82. doi 10.1007/s00792-005-0475-y

Zhang Q., Liu N., Wang S., Liu Y., Lan H. Effects of cyclic cellulase conditioning and germination treatment on the γ-aminobutyric acid content and the cooking and taste qualities of germinated brown rice. *Food Chem.* 2019;289:232-239. doi 10.1016/j.foodchem.2019.03.034

Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 2006;24(5):452-481. doi 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003

Zhao C.H., Liu X., Zhan T., He J. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from pretreated straw and furfural residues. *RSC Advances.* 2018;8(63):36233-36238. doi 10.1039/C8RA05936E

Zhao H., Chockalingam K., Chen Z. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(2):104-110. doi 10.1016/s0958-1669(02)00291-4

Zheng F., Tu T., Wang X., Wang Y., Ma R., Su X., Xie X., Yao B., Luo H. Enhancing the catalytic activity of a novel GH5 cellulase *Gt*Cel5 from *Gloeophyllum trabeum* CBS 900.73 by site-directed mutagenesis on loop 6. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11:76. doi 10.1186/s13068-018-1080-5

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.11.2025. После доработки 02.12.2025. Принята к публикации 05.12.2025.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(8):1361-1368

doi 10.18699/vjgb-25-142

Селекция на отсутствие проантоцианидинов в зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.): молекулярно-генетический и технологический аспекты

К.А. Молобекова, И.В. Тоцкий, Н.В. Трубачеева, О.Ю. Шоева

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

Аннотация. Фенольные соединения составляют значимую группу вторичных метаболитов зерна ячменя и оказывают влияние на его технологические качества при использовании в пивоварении, производстве кормов и пищевых продуктов. Особую роль среди них играют проантоцианидины – полимерные флавоноиды, локализованные в семенной оболочке. Эти соединения обусловливают ряд производственных проблем, таких как коллоидное помутнение пива, а также потемнение крупы после термообработки. Хотя проантоцианидины обладают полезными для здоровья человека свойствами, основанными на их антиоксидантной активности, они могут выступать как антипитательные факторы из-за своей способности связывать белки. В связи с этим была инициирована селекция сортов ячменя, полностью лишенных проантоцианидинов в зерне, в первую очередь для использования в пивоваренной промышленности. Первоначально предполагалось, что их отсутствие не критично для растения, поскольку у пшеницы, кукурузы и риса были выявлены образцы, не содержащие проантоцианидинов в зерне. Однако накопленные данные свидетельствуют, что проантоцианидины выполняют важные физиологические функции: участвуют в поддержании покоя семян, обеспечивают защиту от грибных и бактериальных патогенов и вредителей, и их отсутствие негативно сказывается на агрономических характеристиках. Так, у беспроантоцианидиновых мутантов ячменя, полученных методами индуцированного мутагенеза, отмечено снижение продуктивности и устойчивости к патогенам, повышение риска прорастания зерна на корню и ухудшение ряда технологически важных свойств. Тем не менее мутантные линии активно используются в селекционных программах для создания сортов различного назначения. Цель данного обзора – систематизировать и проанализировать мировой опыт селекции беспроантоцианидиновых сортов ячменя, описать достигнутые результаты для выявления наиболее успешных подходов и определения направлений дальнейших исследований. В работе рассматриваются проблемы, с которыми столкнулись селекционеры при использовании мутантных линий, а также стратегии, позволившие минимизировать негативные побочные эффекты. Показано, что за счет целенаправленного скрещивания и оптимального подбора мутантных аллелей удалось создать конкурентоспособные сорта, сочетающие требуемые технологические качества с удовлетворительными агрономическими характеристиками и отвечающие запросам как пивоваренной, так и пищевой промышленности.

Ключевые слова: ячмень; зерно; проантоцианидины; коллоидное помутнение; беспроантоцианидиновый; пивоварение

Для цитирования: Молобекова К.А., Тоцкий И.В., Трубачеева Н.В., Шоева О.Ю. Селекция на отсутствие проантоцианидинов в зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.): молекулярно-генетический и технологический аспекты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1361-1368. doi 10.18699/vjgb-25-142

Финансирование. Работа выполнена по соглашению № 075-15-2025-580 от 25 июля 2025 г. между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и ИЦиГ СО РАН.

Breeding for the absence of proanthocyanidins in grain of barley (*Hordeum vulgare* L.): molecular genetic and technological aspects

C.A. Molobekova, I.V. Totsky, N.V. Trubacheeva, O.Yu. Shoeva

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

Abstract. Phenolic compounds constitute a significant group of secondary metabolites in barley grain and influence its technological qualities when used in brewing, feed production, and food manufacturing. Proanthocyanidins – polymeric flavonoids localized in the seed coat – play a particularly important role among them. These compounds are responsible for several production issues, such as colloidal haze in beer and browning of groats after heat treatment. Although proanthocyanidins possess health-beneficial properties based on their antioxidant activity, they can act as

© Молобекова К.А., Тоцкий И.В., Трубачеева Н.В., Шоева О.Ю., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

antinutritional factors due to their ability to bind proteins. In this regard, the breeding of barley varieties completely lacking proanthocyanidins in the grain was initiated, primarily for use in the brewing industry. Initially, it was assumed that their absence would not be critical for the plant, since wheat, corn, and rice varieties lacking proanthocyanidins in the grain had been identified. However, accumulated evidence indicates that proanthocyanidins perform important physiological functions: they contribute to the maintenance of seed dormancy, provide protection against fungal and bacterial pathogens and pests, and their absence negatively affects agronomic traits. For instance, proanthocyanidin-free barley mutants obtained through induced mutagenesis exhibit reduced productivity and pathogen resistance, an increased risk of pre-harvest sprouting, and deterioration of several technologically important properties. Nevertheless, these mutant lines are actively used in breeding programs to develop varieties for various purposes. This review aims to systematize and analyze global experience in breeding proanthocyanidin-free barley varieties, describing achieved results to identify the most successful approaches and define future research directions. The work examines challenges faced by breeders when using mutant lines, as well as strategies that have helped minimize negative side effects. It is demonstrated that through targeted crossing and optimal selection of mutant alleles, competitive varieties have been developed that combine the required technological qualities with satisfactory agronomic performance, meeting the demands of both the brewing and food industries.

Key words: barley; grain; proanthocyanidins; beer haze; proanthocyanidin-free; brewing

For citation: Molobekova C.A., Totsky I.V., Trubacheeva N.V., Shoeva O.Yu. Breeding for the absence of proanthocyanidins in grain of barley (*Hordeum vulgare* L.): molecular genetic and technological aspects. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1361-1368. doi 10.18699/vjgb-25-142

Введение

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – важная сельскохозяйственная культура, широко используемая в пивоварении, кормопроизводстве и пищевой промышленности. Качество его зерна определяется не только содержанием белка и крахмала, но и вторичными метаболитами, в частности фенольными соединениями, которые накапливаются в наружных оболочках зерна (Van Hung, 2016). Среди них особый интерес представляют проантоцианидины (ПА), которые играют существенную роль в физиологии растений. Отложение ПА в семенной кожуре связывают с их участием в поддержании покоя семян (Debeaujon et al., 2000) и защите развивающегося семени от различных факторов, в том числе от грибных и бактериальных патогенов, насекомых-вредителей и воздействия тяжелых металлов (Dixon et al., 2005).

Пищевая и кормовая ценность ПА неоднозначна. С одной стороны, накоплено большое число работ, описывающих их потенциально полезные для человека свойства (Santos-Buelga, Scalbert, 2000). В животноводстве данные соединения изучаются в качестве кормовой добавки, альтернативной антибиотикам (Kumar K. et al., 2022). У жвачных животных умеренное количество ПА в корме (2–4 %) может оказывать благоприятное воздействие, снижая неэффективное расщепление белка в рубце. С другой стороны, ПА выступают как антипитательные факторы при кормлении моногастричных животных, так как их пищеварительная система не способна эффективно расщеплять комплексы ПА с белками (Dixon et al., 2005). При приготовлении каш из зерна ячменя ПА вызывают нежелательное потемнение и тем самым негативно влияют на потребительские качества продукта (Kohyama et al., 2009).

В пивоваренной промышленности ПА являются основной причиной коллоидного помутнения, возникающего при охлаждении пива и ухудшающего его стабильность (Delcour et al., 1984). Для решения данной проблемы используют протеазы и селективные абсорбенты, однако эти методы недостаточно специфичны и могут влиять на вкус и качество пива (Wang, Ye, 2021). Более эффективным подходом является создание сортов ячменя со сниженным уровнем белка или ПА в зерне, что способствует предотвращению помутнения без применения стабилизаторов. Поскольку уменьшение белковой фракции зерна может оказывать более пагубное влияние на растение, приоритетным направлением считается выведение беспроантоцианидиновых (бесПА) сортов (Erdal, 1986; von Wettstein, 2007). Реализация этой задачи стала возможной благодаря получению индуцированных мутантов ячменя с нарушенным синтезом флавоноидов, которые послужили донорами целевого признака в селекционных программах (Jende-Strid, 1993).

В настоящем обзоре обсуждаются проблемы и перспективы, связанные с селекцией бесПА сортов ячменя. Поскольку ПА участвуют в регуляции покоя семян и защите от стресса, их отсутствие может сопровождаться изменениями в скорости прорастания зерен, устойчивости растений к патогенам, модификации солода и других важных качеств. Понимание этих взаимосвязей имеет важное значение при создании коммерческих сортов ячменя, сочетающих отсутствие ПА с высокими агрономическими и техническими характеристиками.

Молекулярно-генетические основы синтеза проантоцианидинов ячменя

Синтез флавоноидов начинается с образования халкона путем конденсации трех молекул малонил-КоА с одной молекулой 4-кумароил-КоА. 4-Кумароил-КоА, помимо этого, служит предшественником не только флавоноидов, но и лигнанов, алломеланинов и лигнина, которые тоже обнаруживаются в зерне ячменя (Bartłomiej et al., 2012; Shoeva et al., 2020; Yu et al., 2023). Флавоноидный путь синтеза ведет к образованию лейкоантоцианидинов, которые являются общими предшественниками ПА и антоцианов (см. рисунок). На этом этапе путь разветвляется: лейкоантоцианидин-редуктаза (LAR) катализирует синтез флаван-3-олов, мономеров ПА, тогда как конкурентный фермент антоцианидин-синтаза (ANS) окисляет лейкоантоцианидины до антоцианидинов (Saito et al., 1999; Tanner et al., 2003). Последующее гликозилирование антоцианидинов приводит к образованию антоцианов. Анто-

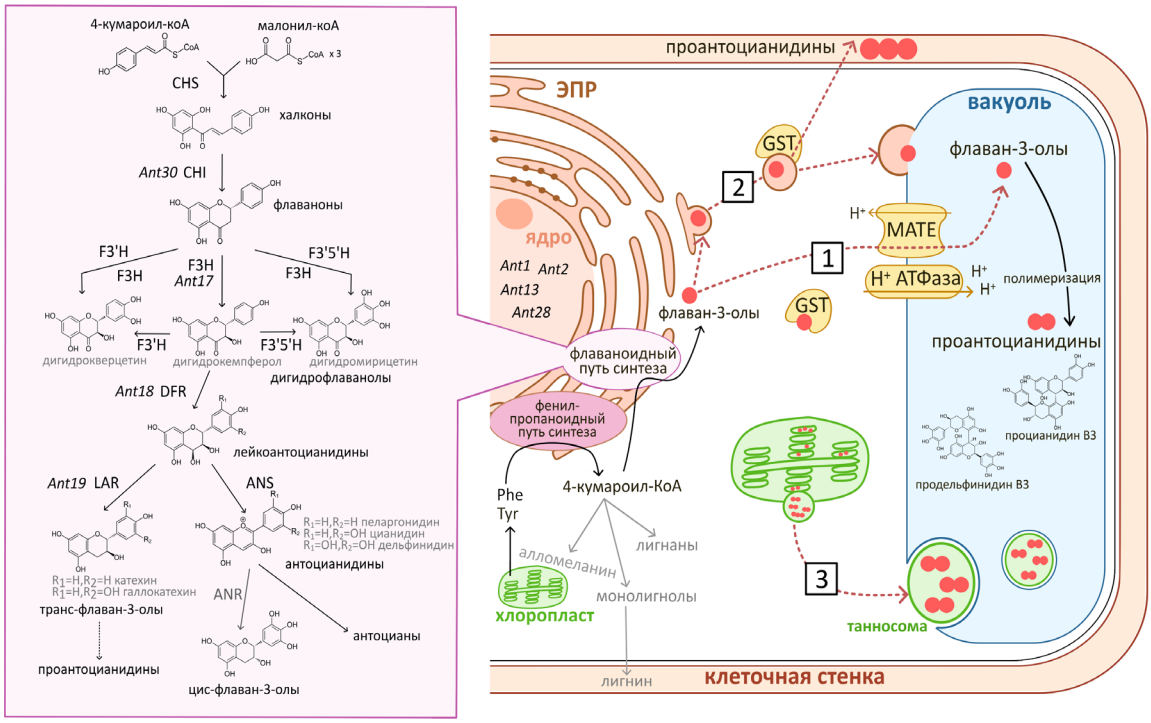


Схема синтеза и внутриклеточного транспорта проантоцианидинов.

Фенилаланин (Phe) и тирозин (Tyr) служат субстратами для синтеза 4-кумароил-КоА в фенилпропаноидном пути. Из 4-кумароил-КоА с участием ферментов флавоноидного пути синтеза идет образование флаван-3-олов. Транспорт флаван-3-олов в вакуоль возможен тремя потенциальными механизмами: 1) посредством транспортеров семейства MATE; 2) путем везикулярного транспорта; 3) в составе специализированных органелл – танносом, где может происходить их полимеризация. Белки семейства GST при этом могут связывать флаван-3-олы и облегчать их транспорт в везикулы или вакуоль. Полимеризация флаван-3-олов в ПА в вакуоли может происходить самопроизвольно благодаря кислой среде либо при участии неизвестного фермента. Ферменты флавоноидного пути синтеза: ANR – антоцианидин-редуктаза; ANS – антоцианидин-синтаза; CHI – халкон-флаванон-изомераза (*Ant30*); CHS – халкон-синтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза (*Ant18*); F3H – флаванон-3-гидроксилаза (*Ant17*); F3′H – флавоноид-3′-гидроксилаза; F3′5′H – флавоноид-3′,5′-гидроксилаза; LAR – лейкоантоцианидин-редуктаза (*Ant19*). Активность ферментов флавоноидного пути контролируется регуляторными генами *Ant1*, *Ant2*, *Ant13*, *Ant28*.

цианидины также могут быть восстановлены до флаван-3-олов с помощью антоцианидин-редуктазы (ANR), таким образом формируя альтернативный путь синтеза ПА (Xie et al., 2003).

Полимеризация флаван-3-олов с образованием ПА происходит, вероятно, неферментативно, хотя ранее предполагалось участие неизвестного флаванол-конденсирующего фермента (Jende-Strid, 1993; He et al., 2008; Yu et al., 2023). В качестве стартовых единиц полимеризации предлагаются флаван-3-олы, тогда как удлиняющими считаются лейкоантоцианидины и их производные. Другим важным аспектом биосинтеза ПА является их внутриклеточный транспорт (см. рисунок). Синтез флаван-3-олов идет в цитозоле, в то время как конечное место накопления ПА – вакуоль (Winkel, 2004). Транспорт флаван-3-олов в вакуоль опосредован белками семейства MATE, функционирование которых зависит от протонного градиента на вакуолярной мембране, создаваемого H^+-АТФазами (Yu et al., 2023). Помимо этого, в транспорте флавоноидов, в том числе ПА, участвуют белки семейства глутатион-S-трансфераз (GST), которые предположительно выполняют функцию связывания и доставки флавоноидов к вакуолярным транспортерам (Pérez-Díaz et al., 2016). Была также предложена модель, согласно которой полимеризация ПА происходит в специализированных органеллах – танносомах, образующихся из тилакоидов хлоропластов (Brillouet et al., 2013).

Биосинтез ПА находится под сложным транскрипционным контролем. Ключевым регуляторным модулем является комплекс MBW, состоящий из транскрипционных факторов семейств MYB, bHLH и WD40 (Bulanov et al., 2025). Этот комплекс активирует экспрессию структурных генов пути биосинтеза флавоноидов, обеспечивая их пространственно-временную регуляцию. У ячменя охарактеризован MYB-фактор, кодируемый геном *HvMyb10* (или *Ant28*), который специфично контролирует синтез ПА за счет регуляции экспрессии генов *Dfr* и *Lar* (Jende-Strid, 1993; Himi et al., 2011). Кроме MBW-комплекса, в регуляции синтеза ПА принимают участие факторы транскрипции семейств WRKY, MADS и WIP (He et al., 2008).

Многие гены, участвующие в синтезе флавоноидов ячменя, были идентифицированы благодаря анализу мутантной коллекции *Anthocyanin-less* (*Ant*). Данная коллекция была создана в 1970-х годах путем индуцированного мутагенеза различных сортов и линий из Европы, Америки и Японии и насчитывает около 900 мутантов с нарушенным синтезом флавоноидов. По результатам тестов на аллелизм на основе 566 мутантов было описано 30 локусов *Ant* (Jende-Strid, 1993). К настоящему времени установлены молекулярные функции лишь для семи из

них (см. рисунок). Особый интерес представляют мутации в локусах *Ant19* и *Ant25–Ant29*, которые специфически подавляют синтез ПА. Хотя молекулярные функции для многих локусов до сих пор не установлены, для некоторых из них была предложена вероятная функция на основе биохимического анализа мутантов. Например, локусы *Ant25*, *Ant27* и *Ant29*, предположительно, кодируют регуляторные факторы, поскольку в соответствующих мутантах нарушена активность сразу нескольких ферментов пути биосинтеза. Тогда как *Ant26*, вероятно, является структурным геном и контролирует конечные этапы синтеза, поскольку в зернах мутантов *ant26* накапливаются мономерные флаван-3-олы при отсутствии ПА (Jende-Strid, 1993).

Мутантные линии не только стали важным инструментом для изучения генов синтеза ПА, но и легли в основу создания бесПА сортов пивоваренного назначения. Первой такой линией стала *ant13.13*, полученная на основе сорта Foma. Несмотря сниженную урожайность *ant13.13* по сравнению с исходным сортом, пиво, полученное из зерна этой линии, демонстрировало превосходную коллоидную стабильность (von Wettstein et al., 1977). Кроме того, с использованием бесПА мутантов удалось показать, что отсутствие ПА в пиве не влияет на его органолептические характеристики (von Wettstein et al., 1977; Delcour et al., 1984). Эти результаты подтвердили перспективность подобного подхода и стимулировали дальнейшие селекционные работы по созданию бесПА сортов ячменя, которые помимо содержания ПА должны учитывать общие требования к сортам пивоваренного назначения.

Качественные показатели пивоваренных сортов ячменя

К пивоваренному ячменю предъявляются довольно жесткие требования (ГОСТ 5060–2021), которые необходимо учитывать при селекции. Ключевым критерием качества зерна считается содержание белка, которое не должно превышать 11.5–12.0 % в пересчете на сухое вещество. Избыток белка препятствует расщеплению крахмала и снижает экстрактивность, тогда как недостаток ограничивает питание дрожжей. Не менее важно достаточное содержание крахмала, который под действием ферментов превращается в сбраживаемые сахара. Для пивоваренного ячменя данный показатель должен составлять не менее 60–65 % сухого вещества (Головин и др., 2008).

Натура зерна (масса 1 л) пивоваренного ячменя, характеризующая его выполненность, должна быть не ниже 660 г/л. Масса 1000 зерен зависит от размера зерен и оптимальна в пределах 40–50 г, так как слишком крупное зерно солодится недостаточно быстро. Крупность, определяемая долей зерен, прошедших через сито 2.5×20 мм, для пивоваренного ячменя первого класса должна составлять не менее 85 %, поскольку крупное зерно содержит больше крахмала и имеет более высокую экстрактивность. Пленчатость, или процентное содержание цветочных пленок от общей массы зерна, не должна превышать 9 %, так как избыток пленок снижает долю крахмала и экстрактивность, а также ухудшает вкус пива, хотя умеренное их количество необходимо для формирования фильтрующего слоя (Хоконова, 2015). Влажность необработанного зерна не должна превышать 12 % для предотвращения развития плесени и накопления микотоксинов при хранении (Chi et al., 2003). Энергия прорастания и способность к прорастанию критически важны для равномерного солодоращения, так как в непроросших зернах крахмал расщепляется не полностью, что снижает экстрактивность и выход пива. Зерно хорошего качества должно иметь способность к прорастанию более 95 %.

Важнейшим этапом при производстве пива является солодоращение, в процессе которого формируется комплекс гидролитических ферментов (протеаз и амилаз), обеспечивающих гидролиз запасных веществ зерна. Полученный солод служит не только субстратом для брожения, но и источником красящих и ароматических компонентов пива (Bamforth, 2009). Основной качественный показатель солода – экстрактивность (доля сухих веществ, переходящих в сусло), которая для качественного зерна составляет не менее 79 %. Диастатическая сила, измеряемая в единицах Виндеша–Кольбаха (WK) и характеризующая активность амилолитических ферментов, для ярового ячменя должна быть выше 220 ед. WK, а для озимого – 350 ед. WK. Индекс Кольбаха служит показателем степени расщепления белков и выражается отношением растворимого азота к общему содержанию азота в солоде. Его отклонение от оптимальных значений в 35–49 % ведет к проблемам с фильтрацией или ухудшению вкуса (Kumar V. et al., 2023). Для нормального метаболизма дрожжей в процессе брожения необходимо наличие свободного аминного азота, его оптимальная концентрация 140–180 мг/л. Содержание β-глюкана в солоде не должно превышать 200 мг/100 г, поскольку его избыток увеличивает вязкость сусла, что ухудшает фильтрацию и снижает качество пива. Перечисленные показатели являются количественными признаками и контролируются полигенно (Trubacheeva, Pershina, 2021), что существенно затрудняет селекцию ячменя для пивоваренных нужд.

Достижения в селекции беспроантоцианидиновых сортов ячменя

Создание бесПА сортов ячменя, отвечающих жестким пивоваренным стандартам, было сопряжено со значительными трудностями, так как исходные бесПА мутанты демонстрировали целый ряд недостатков: низкую полноту зерна, сниженную урожайность и уменьшенную массу 1000 зерен (Figueroa et al., 1989; Bregitzer et al., 1995; Wu, 1995). Поскольку ПА участвуют в поддержании покоя семени, у мутантов наблюдалось снижение покоя зерен (Himi et al., 2011). Хотя ускоренное и равномерное прорастание может быть преимуществом при солодоращении, сниженный покой увеличивает риск прорастания на корню, особенно в условиях повышенной влажности.

Особое значение имели и технологические ограничения. Для пивоваренных сортов желательно низкое содержание белка, однако у бесПА мутантов отмечалась тенденция к его повышению по сравнению с исходными сортами (von Wettstein et al., 1977; Øverland et al., 1994; Wu, 1995). Солод, полученный из зерна мутантов, обладал сниженными экстрактивностью, диастатической силой и степенью сбраживания (Bregitzer et al., 1995). Несмотря на эти ограничения, мутантные линии активно

Зарегистрированные беспроантоцианидиновые сорта ячменя

Название сорта	Родословная	Год создания	Страна	Организация	Литературный источник
Galant	*ant17.148* (Triumph)	1985	Дания	Carlsberg Laboratory (Копенгаген)	Erdal, 1986
NFC8808	*ant27.488* (Zenit) × Sewa × Fergie	1994		Seet Plantbreeding (Хорсенс)	Wettstein, 1995
Caminant	*ant28.484* (Grit) × Blenheim	1994			
Clarity	–	1993	Великобритания	CRISP Malting Group (Норфолк)	Clarity. Proantho-cyanidin-free malt *
Radiant	*ant29.667* (Harrington) × Baronesse	2003	США	Washington State University Agricultural Research Center (Вашингтон)	von Wettstein et al., 2004
Fritz	*ant-499* (Apex) × Alexis × Baronesse × Cellar	2014			Rustgi et al., 2020
Yeongbaekchal	Radiant (*ant29.667*) × Saechalssal	2013	Корея	National Institute of Crop Science, RDA (Ванджу)	Lee et al., 2016
Tochinoibuki	*ant28.494* (Catrin) × Tochikei216 × Tochikei253	2007	Япония	Tochigi Prefectural Agricultural Experimental Station (Тотиги)	Takayama et al., 2011
Shiratae Nijo	*ant28.494* × Nishinohoshi	2009		National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region (Кумамото), National Institute of Crop Science (Цукуба)	Tonooka et al., 2010
Kirari-mochi	Tochinoibuki (*ant28.494*) × Yumesakiboshi × Shikoku-hadaka	2009		National Agriculture Research Center for the Western Region (Фукуяма)	Yanagisawa et al., 2011
Mochikinuka	Daikei RF0831 (*ant28.494*) × Daikei LM1 × Sachiho Golden × Daikei HL9-2-6	2017		Tochigi Prefectural Agricultural Experimental Station (Тотиги)	Yamaguchi et al., 2019
Fukumi Fiber	Yon R kei 3755 / Yon kei 9814 (*ant28.2131* (Alexis))	2018		National Agriculture Research Center for the Western Region (Фукуяма)	Takahashi et al., 2025

* Clarity. Proanthocyanidin-free malt. 1999. CRISP Malting Group. Доступно: https://www.yumpu.com/en/document/read/4110511/

использовались в селекции бесПА сортов, которые были зарегистрированы и возделывались в странах Европы, США, Японии и Республике Корея (см. таблицу).

В Дании на основе мутанта *ant17.148* был выведен сорт Galant. В испытаниях 1982–1983 гг. в 13 европейских регионах Galant показал урожайность, уступающую стандарту лишь на 1–7 % (Erdal, 1986). Однако по сравнению с исходным сортом у Galant был снижен синтез ферментов, расщепляющих полисахариды клеточных стенок и крахмал, что приводило к уменьшению доли ферментируемых сахаров и повышению вязкости сусла (Palmer, 1988). Относительно успешной оказалась японская линия Mokkei 92-130, полученная на основе мутанта *ant13.347*, которая демонстрировала высокую экстрактивность и диастатическую силу. Но приготовленное из нее пиво характеризовалось ускоренным ухудшением органолептических свойств (Fukuda et al., 1999), что, вероятно, было связано с отсутствием фенольных соединений, которые обычно обеспечивают окислительную стабильность пива. В США на основе мутанта *ant-517* было создано более 40 перспективных бесПА линий (Wesenberg et al., 1989). Многие из полученных линий были сравнимы или превосходили стандартный сорт Klages по большинству показателей качества соложения, но уступали по урожайности, процентному содержанию солодового экстракта и имели избыточное количество белка (Wesenberg et al., 1989). Также в США на основе линии *ant13.582* и сортов Azure, Glenn и Hazen были созданы бесПА линии с улучшенными признаками: более ранним колошением, повышенной округлостью зерен и увеличенным содержанием растворимого белка. Однако из-за негативного влияния мутантного аллеля *ant13* на качество солода и другие признаки авторы сочли линию *ant13.582* малопригодной для дальнейшей селекции (Horsley et al., 1991).

Таким образом, практика показала, что мутации, блокирующие начальные этапы биосинтеза ПА, как правило, непригодны для создания сортов из-за их плейотропного влияния на урожайность или пивоваренные качества. Более перспективно использование мутантов с нарушением синтеза ПА на завершающих стадиях, так как это позволяет минимизировать побочное влияние мутаций. Например, мутанты по локусу *Ant26*, у которых нарушено образование ПА на конечных этапах, демонстрируют продуктивность на уровне исходного сорта Grit (Тоцкий и др., 2024). В Дании на основе мутантов *ant27.488* и *ant28.484* были созданы сорта NFC8808 и Caminant соответственно. Сорт Caminant превосходил стандарт по урожайности на 4 %, в том числе в условиях отсутствия фунгицидной за-

щиты (Wettstein, 1995). По ключевым показателям, таким как индекс прорастания, экстрактивность, диастатическая сила, содержание азота и β-глюканов, он соответствовал европейскому стандарту Alexis. В 1999 г. в Великобритании был зарегистрирован сорт Clarity, обладающий высокой коллоидной стабильностью и урожайность (см. таблицу). Авторы не сообщали о родословной сорта, но наличие антоциановой пигментации в вегетативных органах Clarity указывает на то, что нарушение синтеза произошло на конечных этапах.

Следует отметить, что помимо сортов пивоваренного назначения активно развивается селекция фуражных и продовольственных бесПА сортов. В 2003 г. в США был официально утвержден сорт Radiant, созданный на основе мутанта *ant29.667.* Благодаря термостабильной β-амилазе Radiant обладал высокой диастатической силой (von Wettstein et al., 2004). Также он демонстрировал высокую урожайность, устойчивость к ряду патогенов и улучшенные пищевые характеристики, что делало его пригодным для использования не только в пивоваренной, но и в пищевой промышленности. Корейские селекционеры на основе сорта Radiant вывели сорт пищевого назначения Yeongbaekchal (Lee et al., 2016). Каши, приготовленные из зерна Yeongbaekchal, не темнели после термической обработки, что делает продукт более привлекательным для потребителя. Сорт устойчив к вирусу желтой мозаики ячменя (BaYMV), а его урожайность лишь на 5 % ниже контроля.

В США на основе мутанта *ant-499* был получен сорт Fritz, характеризующийся отличной всхожестью и высокой устойчивостью к желтой и листовой ржавчине и мучнистой росе (Rustgi et al., 2020). У исходного мутанта *ant-499* не определен локус, несущий мутацию, однако наличие антоцианов в стебле Fritz говорит о нарушении биосинтеза ПА именно на поздних этапах. Хотя Fritz зарегистрирован как кормовой сорт благодаря высокому содержанию белка и β-глюканов, он также показал хорошие пивоваренные качества, что позволяет рассматривать его как потенциальный сорт двойного назначения.

Японские исследователи на основе мутанта *ant28.494* вывели двурядный сорт Shiratae Nijo (Tonooka et al., 2010). Мутант *ant28.494* изначально восприимчив к BaYMV и отличается поздней спелостью, тем не менее с его использованием удалось получить сорт, не уступающий исходному Nishinohoshi по урожайности и устойчивости к BaYMV и мучнистой росе. Примечательно, что, несмотря на снижение уровня флаван-3-олов и ПА – соединений с противогрибковой активностью, восприимчивость Shiratae Nijo к фузариозу колоса не превышала показатель исходного сорта. На основе того же мутанта *ant28.494* был создан сорт Tochinoibuki (Takayama et al., 2011), сходный со стандартом Sukai Golden по срокам колошения и созревания и массе 1000 зерен. В дальнейшем с использованием сорта Tochinoibuki был выведен голозерный восковой сорт Kirari-mochi, лишенный ПА и амилозы (Yanagisawa et al., 2011). Перловая крупа из зерна Kirari-mochi содержала в 1.5 раза больше β-глюканов по сравнению со стандартным сортом Ichibanboshi, что особо ценно для производства функциональных продуктов питания. На основе Tochinoibuki также был получен восковой бесПА сорт Mochikinuka. Особенность сорта заключалась в отсутствии фермента липоксигеназы-1, катализирующей окисление липидов, благодаря чему крупа обладала более приятным привкусом и ароматом (Yamaguchi et al., 2019). Недавним достижением японской селекции стал шестирядный голозерный сорт Fukumi Fiber, сочетающий мутантные аллели *wax* и *amo1*, контролирующие содержание β-глюканов, и *ant28* (Takahashi et al., 2025). Благодаря этому содержание β-глюканов в крупе Fukumi Fiber достигло 13.2 %, что втрое выше, чем у стандарта Ichibanboshi, и вдвое выше, чем у воскового Kirari-mochi.

Таким образом, несмотря на значительные недостатки, изначально присущие бесПА мутантам, целенаправленная селекционная работа доказала возможность создания на их основе конкурентоспособных сортов ячменя.

Заключение

Селекция пивоваренных сортов ячменя, не накапливающих ПА в зерне, была сопряжена с рядом сложностей, связанных со снижением урожайности и качества зерна. Однако мировой опыт создания бесПА сортов позволяет заключить, что выбор мутантной линии в качестве донора признака в значительной степени определяет успех селекции. Показано, что мутации в генах, специфически контролирующих ветвь синтеза ПА, оказывают наименьшее негативное влияние на агрономические признаки, поскольку сохраняется синтез других физиологически важных флавоноидов. Исходя из селекционного опыта и сравнительных морфологических исследований, сегодня наиболее перспективными донорами для селекции бесПА сортов являются мутанты по генам *Ant26*, *Ant28*, *Ant29*. Несмотря на высокий селекционный потенциал мутантов по этим генам, молекулярные функции известны лишь для одного из них – *Ant28*. Отсутствие данных о функциях остальных генов делает невозможным разработку ДНК-маркеров для отбора, эффективно используемых в селекции по гену *Ant28*. Это подчеркивает необходимость проведения фундаментальных исследований молекулярно-генетических механизмов биосинтеза ПА, поскольку именно глубокое понимание этих основ является залогом создания конкурентоспособных коммерческих сортов.

Список литературы / References

Головин В.В., Левакова О.В., Артемьева Е.А. Инновационная технология выращивания ярового ячменя на пивоваренные цели с использованием современных и перспективных сортов. Рязань, 2008
[Golovin V.V., Levakova O.V., Artem'eva E.A. Innovative Technology of Spring Barley Cultivation for Brewing Purposes Using Modern and Promising Varieties. Ryazan', 2008 (in Russian)]

ГОСТ 5060–2021. Межгосударственный стандарт. Ячмень пивоваренный. Технические условия (введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 06.12.2021 № 1714-ст).
[GOST 5060–2021. Regional standard. Malting Barley: Specification. Promulgated by the RF Federal Agency for Technical Regulation and Measurement, Directive No. 1714-st of December 6, 2021. (in Russian)]

Тоцкий И.В., Ли Ж., Шоева О.Ю. Влияние локусов *Ant25*, *Ant26*, *Ant27*, контролирующих синтез проантоцианидинов в зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.), на рост и развитие растений. *Труды*

по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2024;185(2):138-146. doi 10.30901/2227-8834-2024-2-138-146
[Totsky I.V., Li R., Shoeva O.Yu. The effect of the *Ant25*, *Ant26* and *Ant27* loci controlling proanthocyanidin synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) grain on plant growth and development. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(2): 138-146. doi 10.30901/2227-8834-2024-2-138-146 (in Russian)]

Хоконова М.Б. Влияние способа уборки ячменя на урожайность и пивоваренные качества зерна. *Инновационная наука*. 2015;(8-2):87-88
[Khokonova M. Influence of barley harvesting method on grain yield and brewing qualities. *Innovation Science*. 2015;(8-2):87-88 (in Russian)]

Bamforth C. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J Cereal Sci*. 2009;50(3):353-357. doi 10.1016/j.jcs.2009.03.001

Bartłomiej S., Justyna R.-K., Ewa N. Bioactive compounds in cereal grains – occurrence, structure, technological significance and nutritional benefits – a review. *Food Sci Technol Int*. 2012;18(6):559-568. doi 10.1177/1082013211433079

Bregitzer P., Wesenberg D.M., Jones B.L. Effect of the ANT-13 locus (proanthocyanidin-free) on the malting quality and agronomic performance of barley. *J Am Soc Brew Chem*. 1995;53(4):191-193. doi 10.1094/ASBCJ-53-0191

Brillouet J.-M., Romieu C., Schoefs B., Solymosi K., Cheynier V., Fulcrand H., Verdeil J.-L., Conéjéro G. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Ann Bot*. 2013;112(6):1003-1014. doi 10.1093/aob/mct168

Bulanov A.N., Andreeva E.A., Tsvetkova N.V., Zykin P.A. Regulation of flavonoid biosynthesis by the MYB-bHLH-WDR (MBW) complex in plants and its specific features in cereals. *Int J Mol Sci*. 2025;26(2):734. doi 10.3390/ijms26020734

Ci X.-F., Wu D.-X., Lou X.-Y., Xia Y., Shu Q. Comparative studies on the starch gelatinization characteristics of five cereal crops. *Acta Agron Sin*. 2003;29(2):300-304

Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2000;122(2):403-413. doi 10.1104/pp.122.2.403

Delcour J.A., Schoeters M.M., Meysman E.W., Dondeyne P., Moerman E. The intrinsic influence of catechins and procyanidins on beer haze formation. *J Inst Brew*. 1984;90(6):381-384. doi 10.1002/j.2050-0416.1984.tb04293.x

Dixon R.A., Xie D.-Y., Sharma S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol*. 2005;165(1):9-28. doi 10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x

Erdal K. Proanthocyanidin-free barley – malting and brewing. *J Inst Brew*. 1986;92(3):220-224. doi 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04404.x

Figueroa J.D.C., Madson M.A., D'Appolonia B.L. The malting and brewing quality of crosses of barley anthocyanogen-free mutants. *J Am Soc Brew Chem*. 1989;47(2):44-48. doi 10.1094/ASBCJ-47-0044

Fukuda K., Saito W., Arai S., Aida Y. Production of a novel proanthocyanidin-free barley line with high quality. *J Inst Brew*. 1999; 105(3):179-184. doi 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00017.x

He F., Pan Q.-H., Shi Y., Duan C.-Q. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules*. 2008;13(10):2674-2703. doi 10.3390/molecules13102674

Himi E., Yamashita Y., Haruyama N., Yanagisawa T., Maekawa M., Taketa S. *Ant28* gene for proanthocyanidin synthesis encoding the R2R3 MYB domain protein (Hvmyb10) highly affects grain dormancy in barley. *Euphytica*. 2011;188(1):141-151. doi 10.1007/s10681-011-0552-5

Horsley R.D., Schwarz P.B., Foster A.E. Effects of gene *ant13* on agronomic and malt quality traits of barley. *Crop Sci*. 1991;31(3): 593-598. doi 10.2135/cropsci1991.0011183X003100030009x

Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas*. 1993;119(2):187-204. doi 10.1111/j.1601-5223.1993.00187.x

Kohyama N., Fujita M., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Matsunaka H., Takayama T., Murata M. Effects of phenolic compounds on the browning of cooked barley. *J Agric Food Chem*. 2009;57(14): 6402-6407. doi 10.1021/jf901944m

Kumar K., Sinha R.R.K., Kumar S., Nirala R.K., Kumari S., Sahu S.P. Significance of tannins as an alternative to antibiotic growth promoters in poultry production. *Pharma Innovation J*. 2022;11(11S): 1435-1440

Kumar V., Chaturvedi S., Singh G. Brief review of malting quality and frontier areas in barley. *Cereal Res Commun*. 2023;51(1):45-59. doi 10.1007/s42976-022-00292-z

Lee M.J., Kim Y.-K., Kim K.-H., Seo W.-D., Kang H.-J., Park J.-C., Hyun J.-N., Park K.-H. Quality characteristics and development of naked waxy barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar "Yeongbaekchal" without discoloration of cooked barley. *Korean J Breed Sci*. 2016; 48(4):529-534. doi 10.9787/KJBS.2016.48.4.529

Øverland M., Heintzman K.B., Newman C.W., Newman R.K., Ullrich S.E. Chemical composition and physical characteristics of proanthocyanidin-free and normal barley isotypes. *J Cereal Sci*. 1994; 20(1):85-91. doi 10.1006/jcrs.1994.1048

Palmer G. Enzyme development in the aleurone and embryos of Galant and Triumph barleys. *J Inst Brew.* 1988;94(2):61-63. doi 10.1002/j.2050-0416.1988.tb04557.x

Pérez-Díaz R., Madrid-Espinoza J., Salinas-Cornejo J., González-Villanueva E., Ruiz-Lara S. Differential roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera*. *Front Plant Sci.* 2016;7:1166. doi 10.3389/fpls.2016.01166

Rustgi S., Brouwer B., von Wettstein D., Reisenauer P.E., Lyon S., Ankrah N., Jones S., Guy S.O., Chen X. Registration of 'Fritz', a two-row spring barley. *J Plant Regist*. 2020;14(3):242-249. doi 10.1002/plr2.20046

Saito K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y., Yamazaki M. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *Plant J Cell Mol Biol.* 1999;17(2):181-189. doi 10.1046/j.1365-313x.1999.00365.x

Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*. 2000;80(7):1094-1117. doi 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1094::AID-JSFA569%3E3.0.CO;2-1

Shoeva O.Yu., Mursalimov S.R., Gracheva N.V., Glagoleva A.Yu., Börner A., Khlestkina E.K. Melanin formation in barley grain occurs within plastids of pericarp and husk cells. *Sci Rep.* 2020; 10(1):179. doi 10.1038/s41598-019-56982-y

Takahashi A., Yoshioka T., Yanagisawa T., Nagamine T., Sugita T. Breeding of Fukumi Fiber, a new six-rowed waxy hull-less barley cultivar containing high levels of β-glucan with a proanthocyanidin-free gene. *Breed Sci.* 2025;75(3):236-243. doi 10.1270/jsbbs.24080

Takayama T., Sotome T., Oozeki M., Haruyama N., Yamaguchi M., Okiyama T., Nagamine T., Kato T., Watanabe H., Oono K. Breeding of a new two-rowed pearling barley cultivar "Tochinoibuki". *Bull Tochigi Agric Exp Station.* 2011;66:53-66

Tanner G.J., Francki K.T., Abrahams S., Watson J.M., Larkin P.J., Ashton A.R. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31647-31656. doi 10.1074/jbc.M302783200

Tonooka T., Kawada N., Yoshida M., Yoshioka T., Oda S., Hatta K., Hatano T., Fujita M., Kubo K. Breeding of a new food barley cultivar "Shiratae Nijo" exhibiting no after-cooking discoloration. *Breed Sci*. 2010;60(2):172-176

Trubacheeva N.V., Pershina L.A. Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2021;25(2):171-177. doi 10.18699/VJ21.021

Van Hung P. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(1):25-35. doi 10.1080/10408398.2012.708909

von Wettstein D. Breeding of value added barley by mutation and protein engineering. In: Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement: Proceedings of an international symposium. Vienna, 1995;67-76

Von Wettstein D. From analysis of mutants to genetic engineering. *Annu Rev Plant Biol.* 2007;58:1-19. doi 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104003

von Wettstein D., Jende-Strid B., Ahrenst-Larsen B., Sørensen J.A. Biochemical mutant in barley renders chemical stabilization of beer superfluous. *Carlsberg Res Commun*. 1977;42(5):341-351. doi 10.1007/BF02906119

von Wettstein D., Cochran J., Ullrich S., Kannangara C., Jitkov V., Burns J., Reisenauer P., Chen X., Jones B. Registration of 'Radiant' barley. *Crop Sci*. 2004;44(5):1859-1861. doi 10.2135/cropsci2004.1859

Wang Y., Ye L. Haze in beer: its formation and alleviating strategies, from a protein–polyphenol complex angle. *Foods*. 2021;10(12):3114. doi 10.3390/foods10123114

Wesenberg D.M., Jones B.L., Robbins G.S., Cochran J. Malting quality and agronomic characteristics of selected proanthocyanidin-free barleys. *J Am Soc Brew Chem*. 1989;47(3):82-86. doi 10.1094/ASBCJ-47-0082

Winkel B.S.J. Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:85-107. doi 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141714

Wu G. Associations between three proanthocyanidin-free genes and some important characteristics in barley (*Hordeum vulgare* L.). PhD thesis. Univ. of Saskatchewan, 1995

Xie D.-Y., Sharma S.B., Paiva N.L., Ferreira D., Dixon R.A. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science*. 2003;299(5605):396-399. doi 10.1126/science.1078540

Yamaguchi M., Oozeki M., Sotome T., Oyama M., Kato T., Sekiwa T., Mochizuki T., Okiyama T., Haruyama N., Takayama T. "Mochikinuka", a new two-rowed waxy hulled barley cultivar with superior characteristics of food quality. *Bull Tochigi Prefect Agric Exp Stn Jpn*. 2019;79:1-22

Yanagisawa T., Nagamine T., Takahashi A., Takayama T., Doi Y., Matsunaka H., Fujita M. Breeding of Kirari-mochi: a new two-rowed waxy hull-less barley cultivar with superior quality characteristics. *Breed Sci*. 2011;61(3):307-310. doi 10.1270/jsbbs.61.307

Yu K., Song Y., Lin J., Dixon R.A. The complexities of proanthocyanidin biosynthesis and its regulation in plants. *Plant Commun*. 2023;4(2):100498. doi 10.1016/j.xplc.2022.100498

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.10.2025. После доработки 22.12.2025. Принята к публикации 22.12.2025.

Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2025 г.

Абдукаримов Ш.С. 8, 1184
Абдурахманова М.М. 2, 175
Августинович Д.Ф. 1, 92
Авзалов Д.Р. 4, 608
Адамов Д.С. 5, 711
Адамовская А.В. 7, 963,1020; 8, 1221
Адонина И.Г. 6, 779
Адрианова И.Ю. 5, 722
Азнабаева Ю.Г. 6, 828
Акбердин И.Р. 7, 1031
Алексеева А.Е. 7, 1009
Алексеева В.В. 8, 1176
Алиева А.Х. 8, 1318
Альмерекова Ш.С. 6, 883
Амшокова А.Х. 6, 798
Андреева Е.Н. 3, 401
Андреева Т.В. 3, 423; 5, 722
Андрианов Б.В. 2, 219
Антоненко О.В. 3, 414
Антонова М.М. 5, 652
Антропов Д.Н. 6, 737
Антропова Е.А. 7, 990; 8, 1221
Апарина В.А. 6, 789
Аракелян Н.А. 4, 496
Арутюнян А.Ф. 7, 1097
Арчимаева Т.П. 4, 568
Асатурова А.М. 8, 1304
Атабеков Т.А. 5, 676
Афанасенко О.С. 8, 1235
Афанасьев С.А. 5, 676
Афонников Д.А. 2, 320; 4, 608; 7, 1145; 8, 1295
Афонникова С.Д. 2, 320
Ахмадишина Л.З. 6, 828
Ахтемова Г.А. 2, 248

Бабовская А.А. 5, 693
Бабушкина Н.П. 1, 135; 5, 676
Бадаева Е.Д. 6, 753
Бадалян О.А. 4, 549
Бажан Н.М. 6, 812
Базаров Л.Д. 4, 568
Базовкина Д.В. 1, 92
Байдакова Г.В. 6, 819
Бакулина Е.М. 5, 685
Балакирев Е.С. 2, 259
Балантаева М.Н. 3, 414
Банзаракцаева Т.Г. 2, 268
Банкин М.П. 3, 380, 458
Банникова С.В. 8, 1348
Баранова О.А. 6, 779
Бари Г.Т. 4, 559
Баталов Р.Е. 5, 676
Баттулин Н.Р. 1, 26
Башарова К.С. 6, 819
Бега А.Г. 2, 219
Безрукова А.И. 6, 819
Бейркдар А. 3, 448
Бекенева Л.В. 5, 644
Беличенко В.М. 6, 812
Белькова Н.Л. 4, 594
Бердюгин А.А. 7, 1073
Бессонова Л.А. 5, 629
Блинков А.О. 6, 896
Блинов А.Г. 8, 1277
Блохина Н.В. 1, 113
Бобохужаев Ш.У. 8, 1184
Богачев С.С. 4, 479
Богачева Н.В. 8, 1348
Богомолов А.Г. 1, 153; 4, 479; 7, 940, 952, 1009; 8, 1325
Бондарева Л.Л. 4, 517
Бондаренко А.М. 7, 978
Борис К.В. 3, 370
Борисенко Н.В. 8, 1161
Бочарникова М.Е. 2, 320
Бочаров Г.А. 7, 1041
Бочков Д.В. 8, 1348
Бужилова А.П. 5, 722
Букатич Е.Ю. 8, 1348
Булгакова В.С. 6, 868
Бухарина Т.А. 7, 911, 978
Быков Р.А. 1, 108

Валеев Е.С. 1, 26
Валиахметов Н.Р. 5, 676
Валихова Л.В. 5, 711
Василевская Е. 4, 496
Васильев Г.В. 8, 1304
Васильев С.А. 2, 301; 3, 440; 5, 666
Васильева А.Р. 8, 1348
Васильева Н.С. 2, 175
Васильева О.Ю. 2, 210, 301; 3, 440; 5, 636
Ватолина Т.Ю. 7, 925
Вензель А.С. 7, 1097; 8, 1221
Вергунов Е.Г. 1, 162; 7, 1000
Виниченко Н.А. 6, 789
Витт К.Н. 5, 676
Вишнякова М.А. 1, 35
Водясова Е.А. 3, 358
Возилова А.В. 5, 658
Волкова Г.В. 8, 1195
Вольчик В.В. 3, 433
Волянская А.Р. 8, 1221
Вычик П.В. 4, 549
Вяткин Ю.В. 1, 15

Гараева А.Ф. 5, 685
Гарганеева А.А. 5, 676
Гвоздева М.С. 8, 1195

Геращенков Г.А. 8, 1161
Гербек Ю.Э. 6, 847
Гладких Д.В. 6, 737
Глазырина Е.А. 5, 621
Глотов О.С. 5, 636
Голубева Т.С. 8, 1169
Голубенко М.В. 5, 676
Голышев В.М. 6, 737; 7, 1073
Гончаров Н.П. 8, 1277
Гончарова Н.В. 6, 812
Горбунова А.О. 1, 72
Гордон М.Л. 2, 248
Горенкова А.И. 1, 72; 2, 238
Горошко О.А. 4, 568
Горячева И.И. 2, 219
Гохман В.Е. 1, 108
Гребенников Д.С. 7, 1041
Григорьева Е.В. 1, 15
Грин И.Р. 7, 913
Грунтенко Н.Е. 1, 79; 7, 952
Гудова М.С. 6, 798
Гулевич Р.Г. 6, 847
Гуринова Е.Е. 5, 644
Гырнец Е.Ю. 8, 1304

Давлетгильдеева А.Т. 7, 1062
Давыдова Ю.Д. 6, 838
Дамбаев В.Б. 2, 268
Данильченко В.Ю. 1, 144
Девятериков А.П. 7, 1051
Дегтярёв Е.А. 8, 1176
Дегтярёва В.И. 8, 1176
Дедова Л.В. 3, 370
Деев С.М. 7, 1097
Деменков П.С. 7, 963, 990, 1009, 1020, 1084; 8, 1221
Дементьева Е.В. 3, 349
Денисова Г.А. 5, 704
Деревянчук Е.Г. 3, 433
Дерюженко М.А. 7, 952
Джантасов С.К. 4, 559
Джантасова А.С. 4, 559
Дивашук М.Г. 6, 896
Долбня А.Д. 1, 135
Долгов С.В. 8, 1176
Долгова Е.В. 4, 479
Домблидес А.С. 4, 517
Домблидес Е.А. 4, 517
Доме А.С. 6, 737
Доржиев Ц.З. 4, 568
Дорогина О.В. 2, 210
Дорогова Н.В. 8, 1338
Дружин А.Е. 6, 779
Дубовец Н.И. 8, 1255
Дук М.А. 1, 61; 3, 380; 8, 1267
Дырхеева Н.С. 7, 1097

Евсеенко В.И. 1, 92
Евтеев А.А. 5, 722
Егорова Г.П. 1, 35
Елисафенко Е.А. 2, 189
Емелина Д.А. 5, 636
Ерболатов Д.Е. 6, 883
Ермагамбетова М.М. 6, 883
Ерохин М.М. 6, 744
Ефимов В.М. 8, 1277
Ефремов Я.Р. 4, 479
Ефремова Т.Т. 3, 392

Жарков Д.О. 7, 913
Жданова О.Л. 7, 1109
Жернаков А.И. 2, 248
Жигалина Д.И. 2, 279
Жидкин Р.Р. 6, 856
Жилкина М.А. 5, 666
Жимулев И.Ф. 3, 414
Жирнов И.В. 8, 1169
Жмудь Е.В. 2, 210
Жузе А.Л. 7, 1097
Жуков В.А. 2, 248
Журбенко П.М. 6, 856

Загидуллин Н.Ш. 6, 828
Задесенец К.С. 3, 335
Задорожный А.В. 8, 1348
Зайцев Б.Н. 4, 600
Закиян С.М. 1, 15; 2, 189; 3, 349
Зарубин А.А. 5, 676, 711
Захаренко А.Л. 7, 1097
Захарова Е.Ю. 6, 819
Захарова И.С. 2, 189
Зевуде Д. 8, 1246
Землянская Е.В. 7, 940
Зенин М.С. 7, 1051
Зиганшин Р.Х. 6, 744
Золотарева К.А. 1, 153; 7, 952
Зорин Е.А. 2, 248
Зорина К.А. 7, 1129
Зубкович А.А. 8, 1235
Зугеева Р.Е. 4, 594
Зуев Е.В. 6, 753
Зуева А.С. 2, 189
Зуева Г.А. 2, 210
Зыцарь М.В. 1, 144

Иванисенко В.А. 7, 963, 990, 1000, 1020, 1084, 1097; 8, 1221
Иванисенко Т.В. 7, 963, 990, 1020, 1084; 8, 1221
Иванов А.А. 8, 1169
Иванов Е.А. 5, 658
Иванов Р.А. 7, 1009
Иванощук Д.Е. 3, 448
Игнатьева Е.В. 7, 1009
Игошин А.В. 1, 122
Измайлова С.М. 6, 828
Илинский Ю.Ю. 1, 108
Ильяшенко В.Ю. 4, 568
Ильяшенко Е.И. 4, 568
Ишмуратова М.Ю. 6, 883

Казанцев Ф.В. 8, 1288
Казанцева А.В. 6, 838

Казанцева А.Ю. 6, 812
Казимиров П.А. 4, 568
Казнина Н.М. 8, 1255
Канапин А.А. 1, 61; 3, 380; 8, 1267
Канбекова О.Р. 5, 685
Канканам Патиранаге М.Б. 2, 301; 3, 440
Карамышева Т.В. 4, 479
Каретников Д.И. 2, 320
Каржаев Д.С. 8, 1246
Каримова А.Н. 4, 559
Карлов Г.И. 6, 896
Карманов В.С. 7, 1129
Карпенко Л.И. 4, 600
Касьянов Е.Д. 5, 636
Кашеварова А.А. 5, 644
Каштанова Е.В. 3, 448
Кизименко А.В. 1, 92
Кильчевский А.В. 8, 1255
Киреева Т.Н. 2, 279
Кирикович С.С. 4, 479
Киселёва А.А. 6, 769
Киселева Е.В. 1, 7
Клещев М.А. 7, 963, 1020, 1084; 8, 1221
Клименко А.И. 8, 1304
Клименко Е.С. 4, 594
Кнауб В.В. 4, 539
Коваленко Л.В. 1, 15
Ковнер А.В. 1, 92
Кожемякина Р.В. 6, 847
Козельчук Н.Я. 6, 744
Козлов К.Н. 3, 458
Колесникова Т.Д. 3, 414
Колмыков С.К. 7, 1137
Колубако А.В. 4, 549
Колчанов Н.А. 2, 320; 4, 479; 7, 911
Комышев Е.Г. 4, 608
Кондракова К.Д. 4, 568
Кондратюк Е.Ю. 1, 153; 7, 952
Коненков В.И. 1, 128
Копытова А.Э. 5, 636
Кораблев А.Н. 1, 26
Корепанов В.А. 5, 676
Коржук А.В. 8, 1348
Короленко Т.А. 6, 812
Корытина Г.Ф. 6, 828
Костерин О.Э. 6, 868
Косульников Ю.В. 1, 72
Косяева Е.А. 3, 392
Кочетов А.В. 8, 1169
Кочетова О.В. 6, 828
Кочешкова А.А. 6, 896
Кочиева Е.З. 1, 55; 2, 200; 8, 1213
Кочкина Д.Б. 5, 644
Кривецкий А.А. 7, 1129
Криолло Дельгадо Л. 8, 1246
Крюков А.А. 1, 72; 2, 238
Крюков А.П. 4, 578
Кубан И.Н. 2, 210
Кудинова О.А. 8, 1195
Кудрявцев А.М. 3, 370
Кудряшова Т.Р. 1, 72; 2, 238
Кузнецов Н.А. 7, 1062
Кузьмина Д.О. 2, 248
Куксин А.Н. 4, 568
Кулаева О.А. 2, 248
Кулаков М.П. 7, 1109
Кулигина Е.В. 2, 175
Кумаков И.Р. 8, 1318
Кунижева С.С. 3, 423
Кутузов М.М. 7, 1097
Кырова Е.И. 8, 1235

Лаврентьева Е.В. 2, 268
Лавреха В.В. 7, 940
Лаврик О.И. 7, 1097
Ладыгина Е.А. 5, 685
Лактионов Ю.В. 1, 72
Ларкин Д.М. 1, 122
Лахова Т.Н. 8, 1304
Лашин С.А. 7, 1009; 8, 1288, 1304
Лашина Н.М. 8, 1235
Лебедев И.Н. 2, 301; 3, 440; 5, 619, 636, 644
Леванова Н.М. 7, 1000
Левитес Е.В. 4, 479
Левицкий В.Г. 7, 925
Леонова И.Н. 6, 769, 789
Леонтьева А.А. 2, 175
Леплина О.Ю. 4, 479
Летягина А.Е. 3, 401
Литвинов А.Н. 5, 704
Лобанов А.Д. 3, 440; 5, 636
Ломзов А.А. 7, 1073
Лухтанов В.А. 2, 230
Львова М.Н. 1, 92

Мазо Г.Э. 5, 636
Макаров И.В. 5, 636
Макарова А.А. 1, 162
Макеева О.А. 5, 676
Маковка Ю.В. 7, 952; 8, 1325
Максимова Н.Р. 5, 644
Малахова А.А. 1, 15
Малышев Л.Л. 1, 35
Малькеева Д. 1, 7
Мальцева А.В. 8, 1221
Мальчиков П.Н. 3, 370; 6, 789
Малюгин Е.В. 7, 1145
Малярчук А.Б. 5, 722
Малярчук Б.А. 5, 704
Мамаев А.Л. 4, 479
Манахов А.Д. 3, 423; 4, 496
Маркелов В.А. 6, 828
Маркель А.Л. 7, 952; 8, 1325
Марков О.В. 6, 737
Маркова Ж.Г. 5, 629, 652
Маслов М.А. 6, 737
Масычева А.С. 5, 621
Матвеева А.М. 6, 737
Матвеева К.С. 7, 1137
Матвеева Т.В. 6, 856

Матушкин Ю.Г. 8, 1288
Машкина Е.В. 3, 433
Мглинец А.В. 6, 868
Медведев С.П. 1, 15; 2, 189
Мельченко Н.И. 7, 1031
Мещанинова М.И. 4, 479
Милошевич Н. 1, 44
Милошевич Т. 1, 44
Милько Л.В. 8, 1255
Милюхина И.В. 6, 819
Минайчева Л.И. 5, 685
Минейкина А.И. 4, 517
Минина Ю.М. 1, 15; 3, 349
Минькова Я.В. 6, 896
Мироненко Н.В. 8, 1235
Мирошникова В.В. 5, 636
Мирошниченко Д.Н. 8, 1176
Михайлова А.Д. 7, 1009
Мищенко Е.Л. 7, 1020
Молобекова К.А. 8, 1361
Москаев А.В. 2, 219
Москвитин Г.Д. 5, 644
Мудрик Е.А. 4, 568
Музлаева Е.С. 3, 433
Мукебенова П.К. 7, 940
Муравьёва А.А. 1, 26
Мустафин Р.Н. 2, 290
Мутерко А.Ф. 6, 753
Мясникова М.Г. 6, 789

Нагамова В.М. 6, 896
Назаренко М.С. 2, 189; 5, 676
Налетова Н.И. 5, 658
Например ов В.А. 1, 92
Насибуллин Т.Р. 6, 828
Науменко К.Н. 7, 1097
Немченко У.М. 4, 594
Николаева А.М. 1, 135
Николаева Е.И. 1, 162
Николаева Т.А. 3, 467
Николайчик Е.А. 4, 549
Никольская Ю.С. 8, 1235
Никонов С.Д. 4, 479
Нуштаева А.А. 2, 175

Огиенко А.А. 3, 401
Омелина Е.С. 3, 401
Омельянчук Н.А. 7, 940
Орищенко К.Е. 1, 144
Орловская О.А. 8, 1255
Осипова С.В. 4, 530
Останин А.А. 4, 479
Ошихмина С.Г. 4, 479
Ощепков Д.Ю. 1, 153; 7, 952; 8, 1325

Павлова Е.Ю. 8, 1348
Павлова С.В. 3, 349
Паженкова Е.А. 2, 230
Пальянов А.Ю. 7, 1051
Панин В.М. 8, 1161
Панина Е.А. 1, 144
Панченко В.В. 6, 896
Пежемский Д.В. 3, 423
Пельтек С.Е. 8, 1348
Пермяков А.В. 4, 530
Пиголев А.В. 8, 1176
Пиндюрин А.В. 3, 401
Пискарев В.В. 6, 789
Плотникова Л.Я. 4, 539
Побединская А.И. 5, 658
Подвысоцкая В.С. 1, 15
Подколодная О.А. 1, 153; 7, 952
Подколодный Н.Л. 1, 153; 7, 952
Полев Д.Е. 8, 1246
Политов Д.В. 4, 568
Полонская Я.В. 3, 448
Пономаренко М.П. 1, 153; 7, 952; 8, 1325
Пономарёв Д.В. 1, 92
Попов В.С. 1, 35
Порошина А.А. 3, 467
Постельных К.А. 4, 568
Посух О.Л. 1, 144
Потокина Е.К. 4, 508; 8, 1246
Похолкова Г.В. 3, 414
Прокофьев В.Ф. 1, 128
Пронозин А.Ю. 2, 320; 8, 1295
Проскурина А.С. 4, 479
Пузырёв В.П. 5, 676
Пупышев А.Б. 6, 812
Пучков П.А. 6, 737
Пушин А.С. 8, 1176
Пушкарев В.П. 5, 621, 658
Пчелина С.Н. 5, 636; 6, 819
Пшеничникова Т.А. 4, 530

Рагино Ю.И. 3, 448
Радзениеце С. 6, 896
Радица В.В. 7, 925
Разуваева А.В. 8, 1203
Рассказов Д.А. 1, 153
Редина О.Е. 7, 952; 8, 1325
Рзаев Дж.А. 1, 15
Риттер Г.С. 4, 479
Рогаев Е.И. 3, 423; 4, 496; 5, 722
Родионов А.В. 6, 856
Рождественских Е.В. 5, 722
Рожмина Т.А. 8, 1267
Розанова И.В. 3, 358; 8, 1235
Романюк Д.А. 2, 248
Рубцов Н.Б. 3, 335
Руденко В.Д. 8, 1195
Рудиковская Е.Г. 4, 530
Рудиковский А.В. 4, 530
Рудометов А.П. 4, 600
Рудометова Н.Б. 4, 600
Рузанова В.С. 4, 479
Рустамов А.Б. 8, 1184
Рыбаков А.В. 6, 819
Рычкова Л.В. 2, 301; 3, 440
Рябинин А.С. 1, 108

Рябов В.В. 1, 135
Рябов Ю.А. 7, 940

Сабитова А.С. 5, 658
Савилов Е.Д. 4, 594
Савостьянов А.Н. 1, 162; 7, 1000, 1129
Савостьянов В.А. 1, 162
Савченко Т.В. 8, 1176
Сагиндыков Т.С. 4, 559
Саженова Е.А. 2, 301; 3, 440
Саликова А.В. 1, 35
Салимов Д.Р. 7, 1137
Салина Е.А. 6, 753, 769
Саматов А.Т. 4, 559
Самбялова А.Ю. 2, 301; 3, 440
Самсонова А.А. 1, 61; 3, 380; 8, 1267
Самсонова М.Г. 1, 61; 3, 380, 458; 8, 1267
Санамьян М.Ф. 8, 1184
Сарсенова С.Х. 8, 1161
Свистунова Н.Ю. 6, 896
Сеитова Г.Н. 5, 685
Семенова Е.А. 3, 458
Сенкевич К.А. 6, 819
Серебреникова Т.Е. 5, 621
Середин Т.М. 2, 200
Серикбаева Г.А. 4, 559
Серова И.А. 1, 26
Серяпина А.А. 7, 952; 8, 1325
Сибикеев С.Н. 6, 779
Сидоров С.В. 4, 479
Симороз Е.В. 4, 496
Синьков В.В. 4, 594
Склеймова М.М. 5, 685
Сколотнева Е.С. 4, 539; 8, 1203
Скрябин Н.А. 2, 279
Слепцов А.А. 2, 189
Слепцов Н.Н. 6, 896
Сломинский П.А. 8, 1318
Слынько Н.М. 8, 1348
Смирнов А.В. 1, 26
Смурова Н.Е. 4, 594
Соболев К.В. 3, 392
Соколова Т.С. 7, 1137
Соловьёва Е.В. 5, 685
Сошкина А.Д. 3, 423
Станин В.А. 1, 61; 8, 1267
Стасюк А.И. 6, 769
Стебницкая К.С. 4, 517
Степанов В.А. 5, 693, 711
Степанов Г.А. 6, 737
Сулима А.С. 2, 248
Суркова С.Ю. 1, 61
Суслов В.В. 7, 952
Сухомясова А.Л. 5, 644
Сущенко А.С. 4, 508

Таранов О.С. 4, 479
Тарасова А.С. 5, 658
Татарский В.В. 6, 744
Твердохлеб Н.Н. 1, 153; 7, 952
Темботова Ф.А. 6, 798
Тимофеева А.А. 6, 819
Титов И.И. 7, 1122
Тихонова М.А. 6, 812
Тихонович И.А. 2, 248
Тмоян Н.А. 2, 189
Тойшиманов М.Р. 4, 559
Толмачева Е.Н. 5, 636, 666
Топтыгина А.П. 7, 1041
Тоцкий И.В. 8, 1361
Трифонова А.А. 3, 370
Трифонова Е.А. 5, 693
Трубачеева Н.В. 8, 1361
Трунов А.Н. 1, 128
Тузовская О.В. 3, 448
Туруспеков Е.К. 6, 883
Тюгашев Т.Е. 7, 1062

Уварова Ю.Е. 8, 1348
Ульзетуева И.Д. 2, 268
Уралов Ж.С. 8, 1184
Усенко Т.С. 5, 636; 6, 819
Ушаков В.С. 8, 1348

Фандо А.А. 4, 600
Федорова С.А. 1, 7; 8, 1338
Федосеева Л.А. 7, 952; 8, 1325
Федотов Д.А. 3, 440; 5, 644
Филипенко Е.А. 8, 1169
Филонов С.В. 1, 153
Филюшин М.А. 1, 55; 2, 200; 8, 1213
Фитилева З.Е. 6, 779
Фоменко В.В. 4, 539; 8, 1203
Фомичева М.Г. 4, 517
Фонова Е.А. 2, 301; 5, 636
Фрейманс А.В. 6, 896
Фрисман Е.Я. 7, 1109
Фурман Д.П. 7, 978

Хабарова Е.А. 1, 15
Харьков В.Н. 5, 711
Хафизова Г.В. 6, 856
Хахинов В.В. 2, 268
Хитринская И.Ю. 5, 711
Ходырева Д.С. 5, 722
Храброва Л.А. 1, 113
Храмова Е.Е. 2, 301; 3, 440
Хуснутдинова Н.Н. 6, 828
Хуснутдинова Э.К. 6, 838

Чадаева И.В. 1, 92, 153; 7, 952; 8, 1325
Чао Х. 8, 1221
Чахеева Т.В. 6, 789
Чен М. 8, 1221
Чепурнов Г.Ю. 8, 1277
Черенко В.А. 8, 1169
Черных В.Б. 5, 621
Черных В.В. 1, 128
Черных Е.Р. 4, 479
Черноок А.Г. 6, 896

Чернышова И.А. 7, 1097
Чесноков Д.О. 8, 1348
Четверина Д.А. 6, 744
Чешкова А.Ф. 2, 310
Чжао М. 7, 1062
Чуманова Е.В. 3, 392
Чэнь Ч. 8, 1277

Шаврак В.Е. 1, 135
Шадрина М.И. 8, 1318
Шапошников А.Д. 6, 856
Шатохина А.В. 4, 568
Шахтшнейдер Е.В. 3, 448
Шевченко А.В. 1, 128
Шевченко А.И. 2, 189
Шевырев Д.В. 7, 1137
Шеленга Т.В. 1, 35
Шилова Н.В. 5, 629, 652, 658
Шипова А.А. 8, 1348
Широкова Н.С. 3, 448
Шихевич С.Г. 6, 847
Шишкина О.Д. 1, 79
Шляхтун В.Н. 8, 1348
Шмаков Н.А. 2, 320
Шмендель Е.В. 6, 737
Шоева О.Ю. 8, 1361
Шойбекова А.Ж. 4, 559
Шруб Е.В. 4, 549
Штарк О.Ю. 2, 248
Шульгина А.Е. 3, 349
Шульская М.В. 8, 1318
Шуркина В.В. 4, 568

Щенникова А.В. 1, 55; 2, 200; 8, 1213
Щербаков Д.Н. 4, 600
Щербаков Д.Ю. 3, 467
Щербань А.Б. 4, 539; 8, 1203

Эльконин Л.А. 8, 1161

Юдин Н.С. 1, 122; 7, 1009
Юнусова А.М. 1, 26
Юрков А.П. 1, 72; 2, 238
Юрченко Д.А. 5, 652
Юшкова А.А. 3, 401

Яковлева А.С. 5, 629
Яковлева Д.В. 6, 838
Яковлева Т.В. 6, 812
Янь Ц. 8, 1295
Яцевич К.К. 8, 1255
Яцык И.В. 7, 963, 990, 1000, 1020; 8, 1221

Прием статей через электронную редакцию на сайте http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/ "The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists".

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМИ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте https://vavilovj-icg.ru/
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.
Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.
Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.
Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Дата выхода в свет 26.12.2025. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 28.5