



Характеристика полиморфизма в новых SSR-локусах, ассоциированных с признаком скрещиваемости пшеницы с рожью, контролируемым генами *SKr* и *Kr1*

И. В. Поротников, О. Ю. Антонова, О. П. Митрофанова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Игорь Вадимович Поротников, i.v.porotnikov@gmail.com

Актуальность. Поиск с помощью ДНК-маркеров генотипов с аллелями генов, определяющих высокую скрещиваемость мягкой пшеницы (МП) с рожью, а также их контролируемая передача в другие генотипы остаются пока нерешенными проблемами. Задачи данного исследования: 1) идентификация *in silico* новых SSR-локусов с мотивами в 3-4 пн, расположенных в участках локализации генов *SKr* и *Kr1*, контролирующих скрещиваемость МП с рожью, разработка и апробация специфичных праймеров для амплификации последовательностей в этих локусах; 2) характеристика варибельности фрагментов ДНК в SSR-локусах в выборке из образцов гексаплоидной пшеницы; 3) определение диагностической эффективности аллелей SSR-локусов в выявлении генотипов МП с высокой/низкой скрещиваемостью с рожью, а также уточнение характера полиморфизма участков ДНК, ассоциированных с генами *SKr* и *Kr1*. **Материалы и методы.** Основой для исследования послужил референсный геном МП сорта 'Chinese Spring'. Поиск SSR-локусов проводили *in silico*. Апробацию разработанных или взятых из литературы праймеров для выявления полиморфизма в SSR-локусах осуществляли с использованием тестовой выборки из 16 образцов МП разного географического происхождения. Для генотипирования выборки суммарно использовали 16 пар праймеров. Характеристика SSR-локусов дана на основе анализа 69 линий МП и девяти линий синтетической гексаплоидной пшеницы, из которых 51 была с высокой (25-100%) и 27 с низкой (0-9%) скрещиваемостью с рожью. **Результаты.** Разработаны специфичные праймеры для амплификации последовательностей 14 SSR-локусов с мотивами в 3-4 пн, находящихся в участках генома CS, в которых локализованы гены *SKr* и *Kr1*. Полиморфными оказались два локуса, ассоциированные с геном *SKr*, и четыре – с *Kr1*. Диагностической эффективностью в идентификации генотипов МП с высокой/низкой скрещиваемостью с рожью обладали аллели SSR-локуса *Xvir1* ($Ef=82,3\%$) – маркера гена *SKr*, а также SSR-локусов *Xvir9* ($Ef=66,7\%$) и *Xvir10* ($Ef=72,5\%$), ассоциированных с геном *Kr1*. Совместное использование аллелей локусов позволило точнее описать полиморфизм участков локализации генов *SKr* и *Kr1*, а также дифференцировать линии МП с учетом их географического происхождения и скрещиваемости с рожью. **Заключение.** Выявленные *in silico* новые полиморфные SSR-локусы с повторяющимися мотивами в 3-4 пн, расположенные на участках локализации генов *SKr* и *Kr1*, могут быть ценным инструментом для дальнейшего позиционного клонирования этих генов. Их можно также использовать при подборе пар для скрещиваний и в контроле передачи аллелей, сопряженных с «высокой скрещиваемостью с рожью» в другие генотипы мягкой пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., SSR-маркеры, диагностическая эффективность, анализ *in silico*

Благодарности: Работа выполнена в рамках Государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № FGEM-2022-0008: «Использование комплекса современных методов ДНК-генотипирования и молекулярного скрининга для изучения генетических ресурсов культурных растений, их диких сородичей и форм собственной селекции»

Для цитирования: Поротников И.В., Антонова О.Ю., Митрофанова О.П. Характеристика полиморфизма в новых SSR-локусах, ассоциированных с признаком скрещиваемости пшеницы с рожью, контролируемым генами *SKr* и *Kr1*. Биотехнология и селекция растений. 2026;9(3):. DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-08

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-o8

Characterization of polymorphism in new SSR loci associated with the wheat-rye crossability trait controlled by the *SKr* and *Kr1* genes

Igor V. Porotnikov, Olga Yu. Antonova, Olga P. Mitrofanova

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Igor V. Porotnikov, i.v.porotnikov@gmail.com

Background. The DNA-marker assisted identification of bread wheat (BW) genotypes carrying alleles for high crossability with rye, along with the controlled transfer of these alleles into new genetic backgrounds remains a significant challenge. The objectives of the present study were: (1) to identify *in silico* new SSR loci with 3-4 bp motifs within the *SKr* and *Kr1* genomic regions; to develop and test specific primers for amplifying sequences at these loci; (2) to characterize variability of DNA fragments in SSR loci using samples of hexaploid wheat accessions; and (3) to evaluate the diagnostic efficiency of alleles of SSR loci for identifying BW genotypes with high/low crossability with rye, as well as to clarify the nature of DNA polymorphism in the *SKr* and *Kr1* regions. **Materials and Methods.** The reference genome of the BW cv. 'Chinese Spring' served as the basis for the study. SSR loci were identified *in silico*. The primers developed or taken from the literature for detecting polymorphic SSR loci were tested on a panel of 16 BW accessions of different geographic origin. A total of 16 primer pairs were used for genotyping. SSR loci were characterized based on the analysis of 69 BW lines and nine synthetic hexaploid wheat lines, of which 51 had high (25-100%) and 27 had low (0-9%) crossability with rye. **Results.** Specific primers were developed for amplifying sequences of 14 SSR loci with 3-4 bp motifs within the CS genomic regions containing the *SKr* and *Kr1* genes. Among these, two SSR loci associated with *SKr* and four associated with *Kr1* were polymorphic. The alleles of the SSR locus *Xvir1* ($E_f=82.3\%$) of the *SKr* gene, as well as SSR loci *Xvir9* ($E_f=66.7\%$) and *Xvir10* ($E_f=72.5\%$) associated with the *Kr1* gene, demonstrated diagnostic efficiency in identifying BW genotypes with high/low crossability with rye. The combined use of these alleles of SSR loci allowed for a more precise description of polymorphism in the *SKr* and *Kr1* regions and differentiation of BW lines based on their geographic origin and crossability with rye. **Conclusion.** The new polymorphic SSR loci with repeating 3-4 bp motifs, identified *in silico* within the *SKr* and *Kr1* genomic regions, represent a valuable tool for the positional cloning of these genes. Furthermore, they can be used in selecting parental pairs for crossing and in monitoring the transfer of «high crossability with rye» alleles to other BW genotypes.

Keywords: *Triticum aestivum* L., SSR-markers, diagnostic efficiency, analysis *in silico*

Acknowledgements: The research was performed within the framework of the State Assignment according to the Theme Plan of VIR, on the topic No. FGEM-2022-0008: "The use of a complex of modern methods of DNA-genotyping and molecular screening to study the genetic resources of cultivated plants, their wild relatives and forms of own breeding".

For citation: Porotnikov I.V., Antonova O.Yu., Mitrofanova O.P. Characterization of polymorphism in new SSR loci associated with the wheat-rye crossability trait controlled by the *SKr* and *Kr1* genes. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2026;9(3):. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-o8

Financial transparency: the authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Porotnikov I.V., Antonova O.Yu., Mitrofanova O.P., 2026

Введение

В настоящее время для изучения внутривидового разнообразия растений и генотипирования широко используют маркеры, микросателлиты, которые представлены полиморфными участками ДНК с короткими tandemными повторами (Simple Sequence Repeats, SSRs), имеющими мотивы размером от 1 до 6 пн. Число tandemных повторов мотива в SSR-локусах может достигать до нескольких десятков (Tautz, Renz, 1984; Li et al., 2002). При этом даже у представителей одного вида эта величина может сильно варьировать, что напрямую связано с происхождением генотипов, их адаптацией к различным эколого-географическим условиям (Roussel et al., 2004; Mitrofanova et al., 2009; Samarina et al., 2024). В зависимости от длины, то есть суммарного числа нуклеотидов в tandemно повторяющихся мотивах, микросателлиты относят к классу I (≥ 20 пн) или классу II (≤ 19 пн). Высоким полиморфизмом обладают в основном микросателлиты класса I, частота мутаций которых значительно превышает ожидаемый уровень спонтанного мутирования (Temnykh et al., 2001; Thuillet et al., 2002).

Необходимо отметить, что SSR-анализ, позволяющий выявлять вариабельность микросателлитов, имеет свою методическую особенность. В процессе амплификации микросателлитных последовательностей за счет «проскальзывания» ДНК полимеразы могут возникать статтеры – ампликоны, отличающиеся от целевого пика на один или несколько повторяющихся мотивов (Tautz, Renz, 1984; Daunay et al., 2019). При этом в случае микросателлитов с мотивами в 3–6 пн таких статтеров образуется существенно меньше, чем в случае с моно- и динуклеотидными мотивами. Как следствие, точность интерпретации результатов при анализе SSR-маркеров с повторяющимся мотивом в 1–2 пн ниже, чем с мотивами в 3–6 пн, а трудоемкость выше (Pompanon et al., 2005; Daunay et al., 2019).

Маркеры, разработанные на основе микросателлитов, или SSR-маркеры, успешно используют для молекулярно-генетических исследований многих культурных растений, в том числе мягкой пшеницы (МП) *Triticum aestivum* L. (Leonova, 2013). Именно SSR-маркеры наряду с RFLP-маркерами (Restriction Fragment Length Polymorphism) были основным инструментом для создания молекулярно-генетических карт МП и локализации на них генов хозяйственно ценных признаков, включая гены, контролируемые скрещиваемость пшеницы с рожью (Röder et al., 1998; Tixier et al., 1998).

Известно, что основной вклад в контроль признака скрещиваемости пшеницы с рожью вносят гены *SKr* и *Kr1* (Lein, 1943; Tixier et al., 1998; Bertin et al., 2009). Доминантные аллели этих генов, являющиеся функциональными, ингибируют рост пыльцевых трубок ржи в завязи пестика пшеницы. Присутствие рецессивных аллелей, нефункциональных, сопряжено с высокой скрещиваемостью: завязываемость гибридных зерновок

составляет более 30% (Lein, 1943; Lange, Wojciechowska, 1976). Для выявления таких генотипов МП мы решили методом анализа *in silico* провести поиск микросателлитных повторов, расположенных в участках локализации генов *SKr* и *Kr1*, и разработать праймеры для амплификации этих последовательностей. Наш выбор SSR-маркеров обусловлен тем, что, с одной стороны, с их помощью можно точнее охарактеризовать изменчивость участков ДНК в местах расположения генов *Kr1* и *SKr*, а с другой стороны, выявить аллели SSR-маркеров (SSR-локусов), ассоциированные с проявлением признака скрещиваемости пшеницы с рожью.

Известно, что ген *SKr* расположен в коротком плече хромосомы 5B МП и фланкирован маркерами GBR0233 и *genel3* (Alfares et al., 2009; Bouguennec et al., 2018). Другой ген, *Kr1*, локализован в длинном плече этой же хромосомы между EST-SSR локусами *Xw5145* и *DR740708* (Bertin et al., 2009). Для гена *SKr* описаны сцепленные SSR-локусы *cfb341* и *cfb306*, аллели которых успешно применяют при контроле передачи признака «высокая скрещиваемость с рожью» (Alfares et al., 2009; Bouguennec et al., 2018). Из них аллели SSR-локуса *cfb341*, содержащие повторяющийся мотив в 6 пн, используют как диагностические для выявления совместимых с рожью форм (Bouguennec et al., 2018; Porotnikov et al., 2022; 2025). На сегодняшний день для гена *Kr1* известен только один ассоциированный с ним SSR-локус *Xgwm213* (Bertin et al., 2009). Следует отметить, что SSR-локусы *cfb306* и *Xgwm213* представлены динуклеотидными повторами, что, как было отмечено выше, методически осложняет анализ при проведении генотипирования с их помощью. Гены *SKr* и *Kr1* не клонированы, нет данных об их взаимодействии. Идентификация SSR-локусов и разработка праймеров для амплификации их последовательностей позволит насытить участки локализации генов *SKr* и *Kr1* новыми маркерами и тем самым заложит основы для их позиционного клонирования.

Задачи работы: 1) провести поиск *in silico* SSR-локусов с повторяющимися мотивами в 3–6 пн для участков локализации генов *SKr* и *Kr1*, разработать и апробировать специфичные праймеры для амплификации выявленных микросателлитных последовательностей; 2) охарактеризовать SSR-локусы на репрезентативной выборке образцов гексаплоидной пшеницы из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), различающихся по уровню скрещиваемости с рожью; 3) в случае ассоциации определенных аллелей SSR-локусов с высоким/низким уровнем скрещиваемости, определить их диагностическую эффективность, а также уточнить характер полиморфизма участков ДНК, ассоциированных с генами *SKr* и *Kr1*.

Материалы и методы

Растительный материал. Для апробации праймеров для SSR-локусов, в том числе разработанных нами,

использовали тестовую выборку из 16 образцов МП разного географического происхождения и уровня скрещиваемости с рожью (Rigin, 1976; Zeven, 1987; Rui et al., 1995; Pyukkenen, 2007; Porotnikov et al., 2022; 2025), полученных из коллекции генетических ресурсов растений ВИР. Восемь образцов из Афганистана (1), Китая (3), Монголии (1), Пакистана (1), России (1) и Японии (1) характеризовались высокой завязываемостью гибридных зерновок. Остальные образцы имели низкую скрещиваемость, они происходили из Болгарии (1), Великобритании (1), Пакистана (2), России (2), США (1) и Франции (1). Материалом для исследования послужили 69 линий, заложенных от отдельных растений 64 образцов МП коллекции ВИР, фенотипированных по способности скрещиваться с рожью и имеющих различное географическое происхождение (Приложение/ Supplement¹). При этом для пяти образцов (к-29045, к-38587, к-52950, к-69059, к-69062), гетерогенных по морфологическим признакам растений или по уровню скрещиваемости с рожью, было отобрано по две линии. Кроме того, в анализ были включены девять линий синтетической гексаплоидной пшеницы, СГП ($\times$ *Aegilotriticum* P. Fourn). Образцы СГП созданы в International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT, Мексика) путем скрещивания образцов твердой пшеницы *T. durum* Desf. с различными представителями дикорастущего диплоидного эгилопса *Aegilops tauschii* L. и удвоения числа хромосом у гибридных форм. Они имеют тот же геномный состав и число хромосом, что и мягкая пшеница ($2n=6x=42$, AABBDD), хорошо с ней скрещиваются, но отличаются от нее по аллелям многих генов. Родословные использованных образцов СГП приведены в каталоге (Khakimova et al., 2019). Условно линии были объединены в две группы (см. Приложение/ see the Supplement): 51 линия с высокой (25-100%) и 27 с низкой (0-9%) скрещиваемостью с рожью. Данное свойство линий было определено нами, а ранее другими исследователями (Pisarev, 1960; Rigin, 1976; Surikov, Kissel, 1980; Rekhmetulin, 1987; Zeven, 1987; Rui et al., 1995; Pyukkenen, 2007; Alfares et al., 2009; Bertin et al., 2009; Porotnikov et al., 2022; 2025).

Фенотипирование по признаку скрещиваемости с рожью. Гибридизацию МП и СГП с рожью проводили в поле НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» в июне-июле 2020-2023 годов. Растения МП и СГП использовали как материнские формы. Опылителями служили сорта озимой диплоидной ржи 'Ильмень' (к-11000) и 'Сударушка' (к-11891) и ярового сорта 'Prolific' (к-9369). Опыление кастрированных колосьев проводили твел-методом ("twirl method") согласно методическим указаниям А.Ф. Мережко с соавторами (Merezhko et al., 1973). Уровень скрещиваемости с рожью определяли, как процент завязавшихся гибридных зерновок от общего числа

кастрированных, а затем опыленных цветков в колосе.

Под «высокой» скрещиваемостью понимали завязываемость 25-100%, «низкой» – 0-10%. Разбиение на эти два класса базируется на данных, полученных А. Lein (Lein, 1943), по завязываемости зерновок при опылении рожью растений F_2 , различающихся по доминантным и рецессивным аллелям двух генов скрещиваемости ($Kr1Kr1Kr2Kr2$ – до 10%, $Kr1Kr1kr2kr2$ – 10-30%, $kr1kr1Kr2Kr2$ – 30-50%, $kr1kr1kr2kr2$ – более 50%). Мы преднамеренно из дальнейшего анализа исключали линии со скрещиваемостью от 11 до 24%, чтобы четко разграничить выделяемые нами два фенотипических класса. Следует отметить, что и в других работах по анализу сцепления ДНК-маркеров с генами *SKr* и *Kr1* также выделяли альтернативные группы (Tixier et al., 1998; Bertin et al., 2009; Bouguennec et al., 2018).

Анализ *in silico*. Основой для исследования послужил референсный геном мягкой пшеницы сорта 'Chinese Spring' (IWGSC CS, 2021). Сорт 'Chinese Spring' (CS) характеризуется высокой скрещиваемостью с рожью (Rigin, 1976). Немаловажным был тот факт, что именно с участием CS были картированы SSR-локусы, ответственные за скрещиваемость МП с рожью, в том числе и гены *SKr* и *Kr1* (Alfares et al., 2009; Bertin et al., 2009).

Поиск SSR-локусов осуществляли с помощью программы Unipro UGENE v.50.0 (Okonechnikov et al., 2012). Разработку праймеров для амплификации последовательностей SSR-локусов выполняли при помощи инструмента Primer-BLAST (Ye et al., 2012), позволяющего учитывать специфичность отжига праймеров в геноме CS. Качество праймеров контролировали, используя ресурс OligoAnalyzer™ Tool, доступный на онлайн-платформе Integrated DNA Technologies (IDT, США, 2025). Подбор праймеров проводили таким образом, чтобы размер ПЦР-продукта был не более 350 пн.

Дополнительно из литературы были взяты праймеры для амплификации последовательностей SSR-локусов *Xgwm213* и *cfb382* (динуклеотидные повторы), сцепленных с генами *Kr1* и *SKr*, соответственно (табл. 1). Кроме того, в анализ были привлечены праймеры для других маркеров, ассоциированных с геном *SKr*: SSR-локуса *cfb341* (F: TAAAGCGGATGGGTCTTGTT, R: ATAAGATTACCTCGGGTGAA), участков геномной ДНК *gene12* (F: CCGTCCAGAAATTAAGTGTGCG, R: TGAAATTCAGTTGCCACTTC) и (Insertion Site-Based Polymorphism) и *TGlc2* (F: TGATTGCTCCACAAAAGTGC, R: GCTGCATCTCTCCAGTTCC) (Bouguennec et al., 2018), аллели которых мы использовали для определения их связи с высокой/низкой скрещиваемостью МП с рожью.

Физические карты участков короткого и длинного плеч хромосом 5BS и 5BL конструировали в программе

¹ Приложения доступны в онлайн версии статьи/ The supplements are available in the online version of the paper: DOI: 10.30901/2658-6266-2026-3-оХ

MapChart 2.32 (Voorrips, 2002). Карты строили на основе расположения последовательностей маркерных локусов генов *Krl* и *SKr* в полногеномной сборке сорта CS (IWGSC CS, 2021).

Таблица 1. Праймеры для амплификации SSR-локусов, использованных для генотипирования выборки из 78 линий пшеницы
Table 1. Primers for amplification of SSR loci used for genotyping a set of 78 wheat lines

№	SSR-локус специфичная ДНК ¹ / SSR locus specific DNA ¹	Мотив ² / Motif ²	Последовательность праймера (5'→3') ³ / Primer sequence (5'→3') ³	Ожидаемый размер ПЦР-продукта (пн)/ Expected size of PCR product (bp) ²	Tm, °C	Локализация в хромосоме 5B/ Location on the chromosome 5B
Хромосома 5BS/ Chromosome 5BS						
1	<i>Xvir1</i>	(AAT) ₈	F: TTTGTTTGCATCAGTTGGTGTT R: CTCCGCTGTAACTCTGGGTTT	200	60	1403124-1403323
2	<i>Xvir2</i>	(GGA) ₈	F: TCCAGATTGAGCAGGAGGTC R: TGCTAGAGGAAGCGTCAGTT	286	60	2548903-2549188
3	<i>Xvir3</i>	(CATA) ₁₁	F: TGTAACACACAACGTTTCCA R: TAGCTAGATAGCTGACCATGA	263	56	2608942-2609204
4	<i>Xvir4</i>	(GAG) ₁₀	F: TGCAACCGCAGCATGGAACCC R: CTGTAGCCGCGCATGGGAAT	241	63	2884273-2884513
5	<i>Xvir5</i>	(CTT) ₉	F: ACATGCAATGAACGAGCATCT R: GGTGAGCAGAAAGCGAAACA	202	60	3603629-3603830
6	<i>Xcfb382</i>	(CT) ₁₅ (GT) ₁₂	F: CTGCAGTCTCATCCGCTGCTT R: ATGGCTTGATACTGGCAACC	196	55	5045716-5045911
7	<i>Xvir6</i>	(GTT) ₇	F: CAGCTCCCTTCCAATCTTGC R: GCCTTGATGTAGTTGCTCGTT	177	60	5838016-5838192
Хромосома 5BL/ Chromosome 5BL						
8	<i>Xvir7</i>	(TCT) ₇	F: ACCAATGCACCACCAAGAAA R: TTTGCTCTTTGTCAACGGCG	124	59	412458475-412458598
9	<i>Xvir8</i>	(CAA) ₇	F: CATCAGCATTGGTCGTCCTC R: GAACGCTTGCAAGAGGGATT	236	60	413068061-413068296
10	<i>Xvir9</i>	(ATGT) ₇	F: AGGCCCAACACGAGTCTAAA R: TGTGATCACTCGGTAGCTGA	203	59	414820519-414820721
11	<i>Xvir10</i>	(GGT) ₇	F: CGATCAACCCTTGAATCTTGA R: CTTCCACACCACGAACGA	299	58	417438317-417438615
14	<i>Xvir11</i>	(CCT) ₇	F: TCATCAGGCCAGTAGGCAAA R: GAGAGCAATATCAACGACCCA	116	56	418114490-418114605
12	<i>Xgwm213</i>	(GA) ₃₅	F: TGCCTGGCTCGTTCTATCTC R: CTAGCTTAGCACTGTCGCCC	184	65	418808253-418808436
13	<i>Xvir12</i>	(AAT) ₂₁	F: ACTTTGACCAAGTTTCGGAGG R: GCTTTGTTGCGATGTTGATGT	287	60	419649442-419649728
15	<i>Xvir13</i>	(AGA) ₁₁	F: CATCGGATCGCTGGAGTAGAT R: AACTCGTACTCAATGTACCGC	186	59	419931581-419931766
16	<i>Xvir14</i>	(TAA) ₁₇	F: GATCTCGTAGACGTGAATTT R: TTA CTCTCAAGATCAGAGGC	248	57	421988445-421988692

Примечания: 1 – полужирным начертанием текста выделены SSR-локусы, в которых выявлен полиморфизм ДНК в результате апробации; 2 – число повторов мотива, а также размер ПЦР-продукта дан для сорта ‘Chinese Spring’ МП; 3 – каждый прямой праймер удлинен с 5'-конца на последовательность, прямого праймера M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC).
 Notes: 1 – SSR loci highlighted in bold are those that demonstrated DNA polymorphism as the result of testing; 2 – the number of motif repeats, as well as the size of the PCR product, is given for the BW cv. ‘Chinese Spring’; 3 – each forward primer is extended from the 5'-end by the sequence of the forward primer M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC).

Выделение ДНК. Экстракцию геномной ДНК осуществляли из листьев индивидуальных растений, фенотипированных по признаку «скрещиваемость с рожью». Материал отбирали на стадии выхода растения в трубку, что увеличивало шанс для проведения его дальнейшего фенотипирования. Каждая из 78 линий была представлена одним препаратом ДНК, выделенным из индивидуального растения. Для выделения ДНК использовали метод SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)-экстракции (Dorokhov, Klocke, 1997). Качество и концентрацию полученных ДНК-препаратов определяли при помощи нанофотометра Implen N60 (Implen GmbH, Германия), а также электрофорезом в 0,8% агарозном геле.

Молекулярный скрининг. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли с привлечением 14 пар праймеров, разработанных в настоящем исследовании, и пяти пар праймеров, отобранных в литературе (см. табл. 1) (Röder et al., 1998; Alfares et al., 2009; Bertin et al., 2009; Bouguennec et al., 2018).

Реакционная смесь объемом 14 мкл содержала: 10 нг геномной ДНК, 1 × реакционный буфер, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,3 мМ каждого из dNTP's, 0,04 мМ прямого праймера и 0,16 мМ обратного праймера и 0,75 ед. Taq-полимеразы. Дополнительно смесь включала прямой праймер M13 (caccacgttgtaaacgac) в концентрации 0,16 мМ, маркированный одним из флуоресцентных красителей: IRD700 и IRD800 (LI-COR, Inc., США), а также FAM, ROX, R6G, TAMRA (Синтол, Россия). При этом прямой праймер на 5'-конце тоже имел последовательность M13, в результате чего в последующих циклах образовывались флуоресцентно меченные ПЦР-продукты. Пониженная концентрация прямого праймера обеспечивала лучший отжиг праймера M13 (Barkley et al., 2007).

ПЦР с использованием разработанных нами праймеров проводили по следующей схеме: 94°C – 3 мин 30 сек; 10 циклов [94°C – 45 сек, Tm°C – 1 мин 30 сек; 72°C – 1 мин]; 25 циклов [94°C – 45 сек, 55°C – 45 сек; 72°C – 1 мин] и в заключение 72°C – 10 мин. Понижение температуры отжига до 55°C способствовало лучшему отжигу флуоресцентно меченного праймера M13 и увеличивало выход маркированных ПЦР-продуктов. Для остальных праймеров программы соответствовали рекомендуемым авторами (Röder et al., 1998; Alfares et al., 2009).

Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов осуществляли в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) с применением двух различных систем:

- электрофорез в проточном 8% полиакриламидном геле на установке LI-COR 4300S (LI-COR, Inc., США) с лазерной детекцией фрагментов, меченных IRD700 или IRD800. В качестве стандартов молекулярного веса использовали маркеры 50-700 bp (LI-COR, Inc., США);
- капиллярный электрофорез на установке Нанофор 05 (Синтол, Россия) с лазерной детекцией фрагментов (Alekseev et al., 2012), меченных FAM, ROX, R6G или TAMRA. В качестве стандарта длин применяли маркер СД-450 (Синтол, Россия).

Такой подход позволял наглядно сопоставить результаты классического гель-электрофореза и капиллярного электрофореза.

Статистическая обработка данных. Для оценки полиморфизма в SSR-локусе использовали величину (меру), информационного полиморфизма – PIC (polymorphic information content), которая показывает их дискриминационную способность. Вычисляли значение по формуле $PIC = 1 - \sum(p_i^2)$, где p_i – частота i аллеля, выявленного в данной выборке (Nei, 1973). Кроме того, рассчитывали число эффективных аллелей – N_e , эквивалентное числу аллелей, характеризующих реальную генетическую вариабельность в SSR-локусе. Расчёты проводили в программе GenAlEx v. 6.503 (Peakall, Smouse, 2012).

Диагностическую эффективность аллелей SSR-локусов в идентификации генотипов с высокой или низкой скрещиваемостью (E_f) определяли как соотношение (в %) числа генотипов с правильной ассоциацией аллель-признак к общему числу генотипов (Totsky et al., 2021). Достоверность ассоциации оценивали при помощи критерия χ^2 с поправкой Йейтса, позволяющего снизить вероятность ложноположительных результатов при небольших объемах выборок (ожидаемые частоты <10%). Корреляцию аллелей SSR-локусов с уровнем скрещиваемости с рожью (r) рассчитывали с помощью коэффициента корреляции Спирмена, рассчитанного с помощью программы Statistica v.12 (StatSoft, Inc., США).

При расчете диагностической эффективности аллелей SSR-локусов, критерия χ^2 и коэффициента корреляции Спирмена скрещиваемость линий представляли в бинарном виде, где 0 – низкая скрещиваемость, 1 – высокая.

Кластерный анализ проводили с применением программы DARwin v.6.0.21 (CIRAD, Франция) для базы с результатами генотипирования, представленной в виде бинарной матрицы. Дендрограмму строили по J.H. Ward (Ward, 1963). Расстояния рассчитывали по L. Dice (Dice, 1945) с использованием бутстрэп-поддержки (10000 итераций).

Результаты и обсуждение

Определение участков с локализацией генов *SKr* и *Krl* в полногеномной сборке CS (IWGSC CS, 2021). Для всех маркеров, фланкирующих гены *SKr* и *Krl*, выполнен поиск сайтов отжига праймеров в геноме CS с помощью функции “ПЦР *in silico*” в программе Unipro UGENE v.50.0».

Для гена *SKr* в геномной сборке CS проведен поиск последовательностей ампликонов, генерируемых праймерами *gene13* и *gene12*. Маркер *gene13* картирован проксимальнее гена *SKr*, а *gene12* косегрегирует с ним (Bouguennec et al., 2018) и потенциально может фланкировать *SKr* дистально. В результате, в качестве участка с геном *SKr* мы выбрали последовательность в 5,5 млн пн на коротком плече хромосомы 5B (рис. 1).

В случае гена *Krl* последовательности обоих фланки-

рующих его EST-SSR локусов *Xw5145* и *DR740708* были найдены в длинном плече 5BL. Расстояние между ними составило 5,7 млн пн. Поскольку для *Kr1* не известны диагностические ДНК-маркеры, было решено несколько расширить этот участок. Для этого вместо *DR740708* был взят EST-SSR локус *Xw9340*, который находится дистальнее на 13 млн пн. Другими словами, для гена *Kr1* на

физической карте хромосомы 5B определили участок в 18,9 млн пн между EST-SSR локусами *Xw5145* и *Xw9340* (см. рис. 1).

Таким образом, в геномной сборке сорта CS МП нами были установлены физические участки локализации генов *SKr* и *Kr1*, которые далее использовали для выявления микросателлитных повторов.

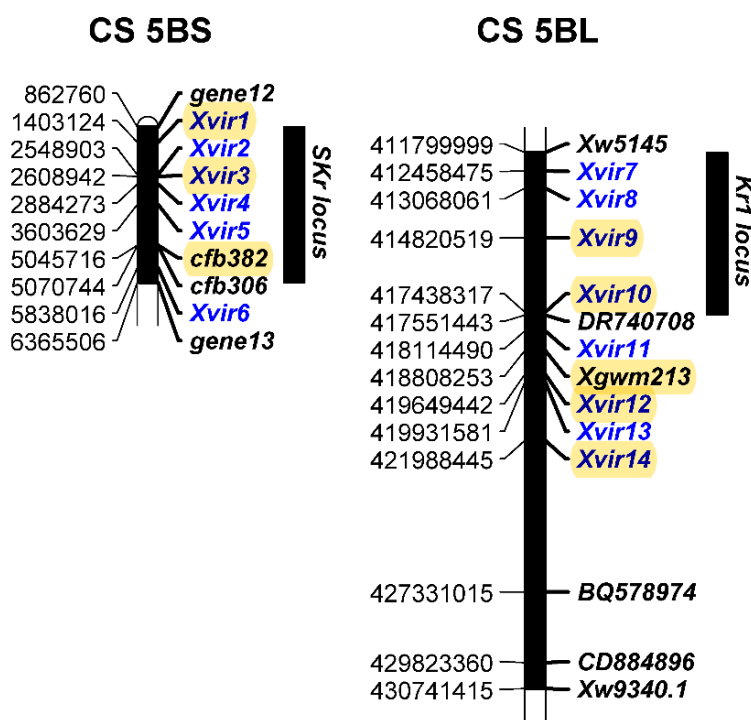


Рис. 1. Физические карты участков хромосомы 5B с локализацией генов *SKr* (5BS) и *Kr1* (5BL)

Синим шрифтом обозначены SSR-локусы, выявленные *in silico* и успешно апробированные на тестовой выборке из 16 образцов МП. Бежевой заливкой выделены полиморфные SSR-локусы, участвовавшие в генотипировании. Слева указаны позиции SSR-локусов в геномной сборке хромосомы 5B. При построении карты использовали программу MapChart v. 2.32 (Voorrips, 2002).

Fig. 1. Physical maps of chromosome 5B regions containing the *SKr* (5BS) and *Kr1* (5BL) genes

Blue font denotes SSR loci identified *in silico* and successfully tested on a set of 16 BW accessions. Polymorphic SSR loci used in genotyping are highlighted in beige. The positions of the SSR loci in the genome assembly of chromosome 5B are shown on the left. MapChart v. 2.32 (Voorrips, 2002) was used to create the map.

Поиск SSR-локусов, разработка и апробация специфичных праймеров. На участке, на котором локализован ген *SKr*, размером 5,5 млн пн, было обнаружено 19 различных микросателлитов с мотивами размером в 3-6 пн. В среднем один SSR приходился на каждые 290 тпн. Для амплификации последовательностей шести SSR-локусов – *Xvir1*, *Xvir2*, *Xvir3*, *Xvir4*, *Xvir5* и *Xvir6* – были успешно разработаны специфичные праймеры (см. табл. 1). Для остальных 13-ти SSR-локусов подобрать такие праймеры не удалось, поскольку в других участках генома мягкой пшеницы, а именно в хромосомах 5A и 5D, были выявлены сходные последовательности.

Для второго участка на длинном плече хромосомы 5B

размером в 18,9 млн пн, на котором локализован ген *Kr1*, было идентифицировано 83 SSR-последовательности, в среднем одна на каждые 228 тпн, то есть их встречаемость оказалась несколько выше, чем в коротком плече 5B. Специфичные праймеры были сконструированы для амплификации только восьми SSR-локусов (см. табл. 1), для остальных микросателлитов такие праймеры подобрать не удалось, что было связано с теми же причинами, что и в случае с геном *SKr*.

Апробацию 16 пар праймеров (см. табл. 1) проводили с целью проверки специфичности их отжига, а также для выявления полиморфных SSR-локусов, пригодных для генотипирования. Для этого нами была использова-

на тестовая выборка из 16 образцов МП различного географического происхождения, среди которых с большей вероятностью можно было обнаружить полиморфизм фрагментов ДНК в изучаемых SSR-локусах. В результате, на участке, в котором локализован ген *SKr* (хромосома 5BS), при апробации шести разработанных пар праймеров было выявлено только два полиморфных SSR-локуса: *Xvir1* и *Xvir3*, имеющих четыре и два аллеля соответственно. Остальные четыре SSR-локуса оказались мономорфными. Также полиморфным был взятый из литературы SSR-локус *cfb382* (Alfares et al., 2009), представленный четырьмя аллелями.

Для участка, в котором локализован ген *Krl* (хромосома 5BL), с использованием той же выборки образцов апробированы разработанные нами праймеры для восьми SSR-локусов (см. табл. 1), а также праймеры ещё для одного дополнительного взятого из литературы SSR-локуса *Xgwm213* (Röder et al., 1998). Четыре SSR-локуса оказались полиморфными: у *Xvir14* выявлено десять аллелей, восемь – у *Xvir12*, три – у *Xvir9* и два – у *Xvir10*. Также полиморфным был SSR-локус *Xgwm213*.

Таким образом, в результате апробации мы отобрали два полиморфных SSR-локуса *Xvir1* и *Xvir3* для гена *SKr* и четыре *Xvir9*, *Xvir10*, *Xvir12*, *Xvir14* для гена *Krl*, праймеры для амплификации которых давали специфичные, хорошо различимые в ПААГ ПЦП-продукты. Отобранные микросателлиты соответствовали классу I: они имели размер повторяющегося мотива от 3 до 6 пн, число повторов мотива – от семи и более, то есть общее число пар нуклеотидов превышало 20.

Для будущих работ по позиционному клонированию генов *SKr* и *Krl*, а также для поиска генов-кандидатов, были построены физические карты участков, на которые нанесено расположение этих генов и всех успешно амплифицированных последовательностей SSR-локусов, в том числе мономорфных (см. рис. 1). Кроме того, в эти карты была интегрирована часть близко расположенных к генам *SKr* и *Krl* локусов, известных из литературных источников (Alfares et al., 2009; Bertin et al., 2009; Bouguennec et al., 2018).

Таким образом, на участке с геном *SKr* генетическое расстояние между фланкирующими его маркерами *gene12* и *gene13* составило 0,4 сМ (Bouguennec et al., 2018), на физической карте оно оказалось эквивалентно 5,5 млн пн, и на данном участке нами обнаружено два полиморфных SSR-локуса *Xvir1* и *Xvir3*.

Для участка с геном *Krl* генетическое и физическое расстояния между фланкирующими его EST-SSR локусами *Xw5145* и *Xw9340* составило 2 сМ и 18,9 млн пн соответственно. Порядок расположения других известных маркеров на физической карте соответствовал опубликованным данным (Bertin et al., 2009). Вероятнее всего, ген *Krl* расположен между EST-SSR локусами *Xw5145* и *DR740708*, которые косегрегируют с ним. В данном участке нами выявлено два полиморфных SSR-локуса, *Xvir9* и *Xvir10*, которые наиболее близко расположены

к гену *Krl* (см. рис. 1).

Характеристика SSR-локусов. Чтобы определить, подходят ли выявленные SSR-локусы для генотипирования пшеницы, мы использовали выборку из 78 линий гексаплоидной пшеницы – 69 линий МП и 9 линий СГП различного географического происхождения, где каждая линия является потомством одного самоопыляющегося растения. По результатам апробации для генотипирования отобраны три SSR-локуса для участка хромосомы 5BS, в котором локализован ген *SKr*, и пять для участка 5BL хромосомы, в котором локализован ген *Krl* (табл. 2).

Число аллелей для выявленных нами SSR-локусов было от двух (*Xvir10*) до 11 (*Xvir14*), среднее число аллелей на SSR-локус – 5,67. Значения индекса информационного полиморфизма *PIC* варьировали от 0,23 до 0,86, а число эффективных аллелей от 1,7 до 7,1 (см. табл. 2). Наиболее полиморфными были SSR-локусы *Xvir1* (*PIC*=0,60; *Ne*=2,5), расположенные на плече хромосомы 5BS и *Xvir12* (*PIC*=0,84; *Ne*=6,3), *Xvir14* (*PIC*=0,86; *Ne*=7,1) – на 5BL.

Следует отметить, что выявленные нами SSR-локусы *Xvir12* (AAT)₂₁ и *Xvir14* (TAA)₁₇ оказались сопоставимы по индексу *PIC* с известными SSR-локусами *cfb382* (CT)₁₅(GT)₁₂ и *Xgwm213* (GA)₃₅, для которых в нашей выборке мы также выявили высокий полиморфизм.

Выявленные и успешно амплифицированные в настоящем исследовании SSR-локусы с три- и тетрануклеотидными мотивами имели преимущество в методическом плане. На рисунке 2 (рис. 2а; 2б) приведены электрофореграммы ПЦП-продуктов, полученных с использованием праймеров, специфичных для последовательностей SSR-локусов *cfb382* и *Xgwm213*. Для сравнения, на рисунке 2 (рис. 2в; 2г) указаны SSR-локусы с более протяженными повторяющимися мотивами *Xvir1* (AAT)₈ и *Xvir9* (ATGT)₇. Как видно, продукты амплификации, сгенерированные праймерами, специфичными для таких SSR-локусов, практически не образуют статтеров. На электрофореграммах нет характерной для SSR-локусов с динуклеотидными повторами «лестницы» из ПЦП-фрагментов, отличающихся от целевого продукта на один тандемный повтор. В ряде случаев такие статтеры могут быть практически неотличимыми от целевого ПЦП-продукта, что затрудняет интерпретацию полученных данных. Таким образом, преимущество использования в анализе SSR-локусов с повторяющимися мотивами в 3-6 пн заключается в упрощении интерпретации результатов.

Диагностическая эффективность аллелей SSR-локусов в идентификации генотипов мягкой пшеницы с высокой/низкой скрещиваемостью с рожью. Выявленные нами SSR-локусы расположены в участках локализации генов *SKr* и *Krl*, участвующих в контроле признака скрещиваемости МП с рожью. Поскольку эти SSR-локусы находятся близко к названным генам, то их аллели могут быть ассоциированы с признаком высокой/

Таблица 2. Характеристика SSR-локусов хромосомы 5B по результатам изучения 78 линий гексаплоидной пшеницы

Table 2. Characterization of SSR loci on chromosome 5B based on the analysis of 78 hexaploid wheat lines

№	SSR-локус специфичная ДНК/ SSR loci specific DNA	Мотив/ Motif ¹	Размер ПЦР- продукта / PCR product size ¹	Диапазон размера выявленных фрагментов (пн)/ Size range of detected fragments (bp)	Выявлено аллелей/ Alleles identified			Ne ²	PIC ³
					Всего, в том числе/ Total, including	редких (до 10%)/ rare (up to 10%)	уникальных/ unique		
5BS/ 5BS									
1	<i>Xvir1</i>	(AAT) ₈	200	0 ⁴ , 200-212	5	1	0	2,5	0,60
2	<i>Xvir3</i>	(CATA) ₁₁	263	223-267	4	2	0	1,3	0,23
3	<i>cfb382</i>	(CT) ₁₅ (GT) ₁₂	196	0 ⁴ , 194-234	11	6	2	4,4	0,77
5BL/ 5BL									
4	<i>Xvir9</i>	(ATGT) ₇	203	187-203	4	0	0	2,3	0,56
5	<i>Xvir10</i>	(GGT) ₇	299	299-305	2	0	0	1,7	0,39
6	<i>Xgwm213</i>	(GA) ₃₅	184	148-232	29	12	9	22,2	0,96
7	<i>Xvir12</i>	(AAT) ₂₁	287	278-299	8	1	0	6,3	0,84
8	<i>Xvir14</i>	(TAA) ₁₇	248	218-257	11	4	0	7,1	0,86

Примечания: 1 – число повторов мотива, а также размер ПЦР-продукта дан для сорта ‘Chinese Spring’ МП; 2 – Ne – число эффективных аллелей; 3 – PIC – polymorphic index content; 4 – для SSR-локусов *Xvir1* и *cfb382* был выявлен нулевой аллель, т.е. отсутствие ПЦР-продуктов (у двух генотипов).

Notes: 1 – the number of motif repeats, as well as the size of the PCR product are given for the BW cv. ‘Chinese Spring’; 2 – Ne – number of effective alleles; 3 – PIC – polymorphic index content; 4 – the null allele i.e., the absence of PCR products, was detected for SSR loci *Xvir1* and *cfb382* (in two genotypes).

низкой скрещиваемости. Для подтверждения этого факта из 78 линий гексаплоидной пшеницы были отобраны 69 линий, контрастных по скрещиваемости с рожью (см. Приложение/ see the Supplement). Линии СГП были исключены из анализа, поскольку их недостаточная представленность в выборке (всего 9) не позволила бы достоверно оценить ассоциацию аллелей локусов с проявлением признака.

Для каждого SSR-локуса в качестве маркерных рассматривали те аллели, которые нам удалось соотнести с высокой и с низкой скрещиваемостью с рожью. При этом число линий МП с каждым из таких аллелей должно было быть не менее пяти, чтобы можно было провести статистическую обработку данных. Этим условиям отвечали SSR-локусы *Xvir1*, *Xvir9* и *Xvir10*, у них аллели *Xvir1_206*, *Xvir9_199*, *Xvir10_300* преобладали у генотипов с «низкой скрещиваемостью», а аллели *Xvir1_200*, *Xvir1_212*, *Xvir9_203*, *Xvir10_299* – у генотипов с «высокой скрещиваемостью» (табл. 3). Дополнительно, в анализ были включены маркеры *cfb341*, *gene12*, *TGlc2*, сцепленные с геном *SKr*, которые ранее использовали для определения генотипов МП с высокой (аллели *cfb341_176*, *gene12_391* и *TGlc2_291*) или низкой (*cfb341_163*, *gene12_342* и *TGlc2_279*) скрещиваемостью с рожью (Bouguennec et al., 2018; Porotnikov et al., 2022; 2025).

SSR-локусы: *Xvir3*, *Xvir12*, *Xvir14*, *cfb382*, *Xgwm213*, были представлены слишком большим числом аллелей, чтобы установить статистически значимую ассоциацию их с признаком для выборки из 69 линий МП (см. табл. 2). В итоге, диагностическая эффективность была рассчитана для аллелей четырех локусов (*Xvir1*, *cfb341*, *gene12* и *TGlc2*), сопряженных с геном *SKr*, и двух SSR-локусов (*Xvir9* и *Xvir10*) – с геном *Kr1*. Для них также определена достоверность ассоциации аллель-признак (критерий χ^2) и вычислена корреляция между встречаемостью аллелей и уровнем скрещиваемости с рожью.

Высокая диагностическая эффективность и статистически значимая ассоциация аллель-признак были характерны для аллелей SSR-локуса *Xvir1* (Ef=82,3%; $\chi^2=17,91$), ассоциированного с геном *SKr*. Эти значения оказались сопоставимы с рассчитанными для других маркеров: *cfb341*, *gene12* и *TGlc2*, тесно сцепленных с данным геном (см. табл. 3).

Впервые для гена *Kr1* мы оценили диагностическую эффективность аллелей SSR-локусов *Xvir9* и *Xvir10*, ассоциированных с признаком скрещиваемости с рожью. Данные SSR-локусы характеризовались небольшим числом аллелей и были широко представлены в выборке. Присутствие маркерных аллелей, указывающих на «низкую» (*Xvir10_305*) и «высокую» (*Xvir9_203*, *Xvir10_299*)

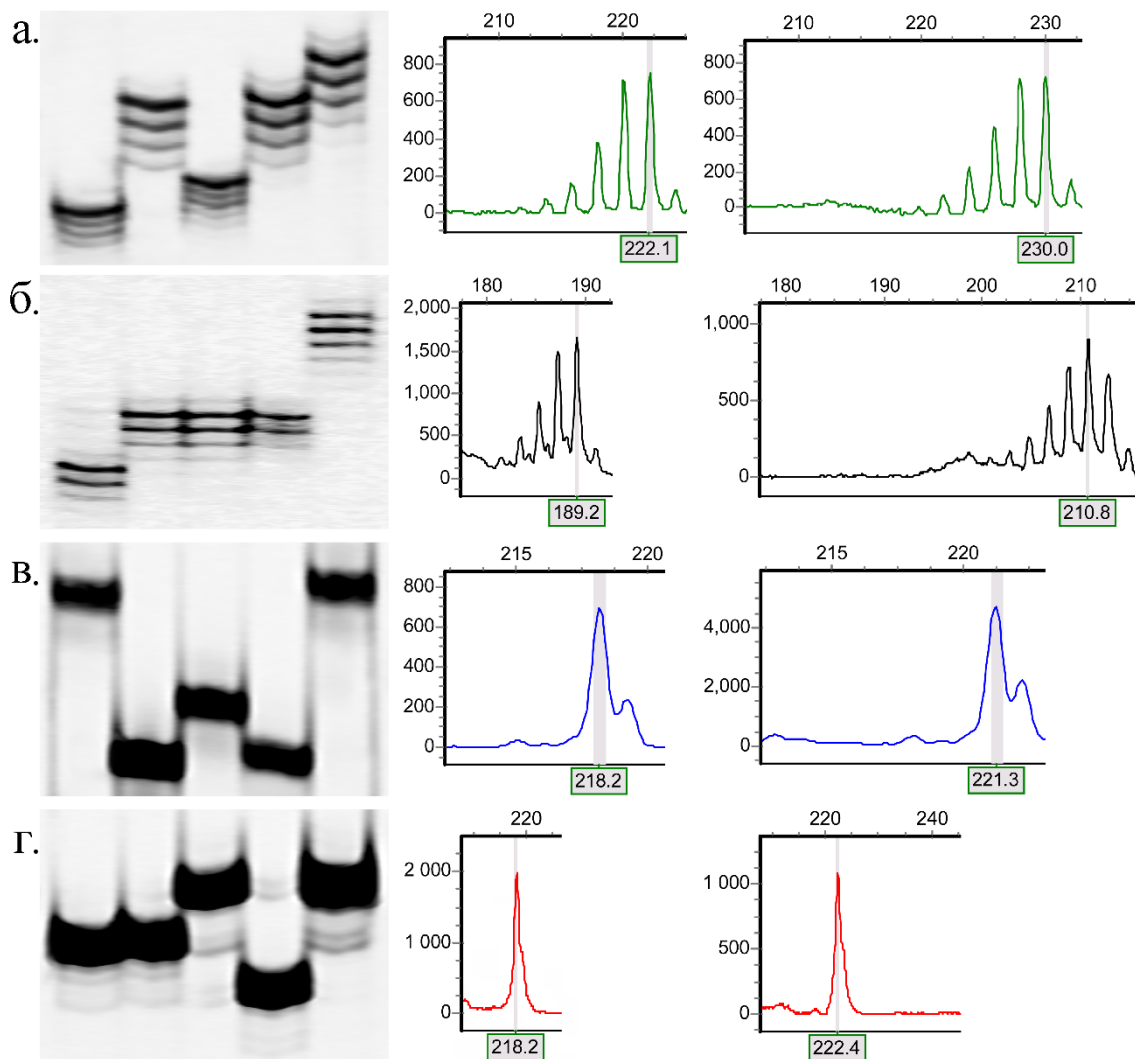


Рис. 2. Сопоставление результатов разделения ПЦР-продуктов для SSR-локусов с разной длиной повторяющегося мотива

Слева приведены электрофореграммы, полученные при электрофорезе в ПААГ с использованием LI-COR 4300S, по центру и справа – с привлечением Нанофор 05. а. – SSR-локус *cfb382* (CT)₁₅(GT)₁₂; б. – *Xgwm213* (GA)₃₅; в. – *Xvir1* (AAT)₈; г. – *Xvir9*(ATGT)₇. Размеры ПЦР-продуктов даны с учетом длины последовательности праймера M13 (19 пн)

Fig. 2. Comparison of PCR product separation for SSR loci with different lengths of the repeat motif

The left panel shows PAGE electropherograms generated on a LI-COR 4300S, the central and right panels – on Nanophor 05. а. – SSR loci *cfb382* (CT)₁₅(GT)₁₂; б. – *Xgwm213* (GA)₃₅; в. – *Xvir1* (AAT)₈; г. – *Xvir9* (ATGT)₇. The sizes of PCR products are given taking into account the length of the M13 primer sequence (19 bp)

скрещиваемость с рожью достоверно коррелировало с проявлением самого признака, однако, корреляция была ближе к умеренной (см. табл. 3). В пользу невысоких значений коэффициента корреляции свидетельствовала также и более низкая (в сравнении с *SKr*), диагностическая эффективность аллелей SSR-локусов *Xvir9* ($Ef=66,7\%$; $\chi^2=10,2$) и *Xvir10* ($Ef=72,5\%$; $\chi^2=7,7$). Важно отметить, что генотипы с аллелем *Xvir9* 199 были как с высокой, так и с низкой скрещиваемостью, примерно в равном соотношении (см. табл. 3). Поэтому для локуса *Xvir9* нами выяв-

лен только аллель *Xvir9* 203, ассоциированный с высокой скрещиваемостью с рожью. Вместе с тем, *Xvir9* и *Xvir10* – это впервые идентифицированные SSR-локусы, сцепленные с геном *Kr1*, аллели которых имеют статистически значимую взаимосвязь с признаком. Немаловажным является тот факт, что *Xvir9* и *Xvir10* располагаются между EST-SSR-локусами *Xw5145* и *DR740708*, которые косегрегируют с геном *Kr1* (Bertin et al., 2009) и, по-видимому, находятся близко от него.

Таблица 3. Диагностическая эффективность аллелей локусов, ассоциированных с генами *SKr* и *Kr1*, в выявлении генотипов МП с высокой/низкой скрещиваемостью с рожью

Table 3. Diagnostic efficiency of loci alleles associated with *SKr* and *Kr1* genes in identifying BW genotypes with high/low crossability with rye

Маркерный фрагмент (пн) ¹ / Marker fragment (bp) ¹	r ($p<0,05$) ²	Число (процент) генотипов с маркерным фрагментом скрещиваемости/ Number (percentage) of genotypes with a crossability marker fragment		Ef_3	χ^2 (3,84; $df=1$, $p=0,05$) ⁴
		Высокой/ High	Низкой/ Low		
Локусы, ассоциированные с геном <i>SKr</i> / Loci associated with the <i>SKr</i> gene					
SSR-локус <i>cfb341</i> (Alfares et al., 2009) / SSR loci <i>cfb341</i> (Alfares et al., 2009)					
163	$r=-0,430$	2 (18,18%)	9 (81,82%)	83,60%	15,5
176	$r=0,526$	37 (84,09%)	7 (15,91%)		
Геномный локус <i>gene12</i> (Bouguennec et al., 2018) / genomic loci <i>gene12</i> (Bouguennec et al., 2018)					
342	$r=-0,548$	1 (8,33%)	11 (91,67)	83,60%	15,5
391	$r=-0,463$	41 (77,36%)	12 (22,64%)		
Геномный локус <i>TGlc2</i> (Bouguennec et al., 2018) / genomic loci <i>TGlc2</i> (Bouguennec et al., 2018)					
279	$r=-0,430$	2 (18,18%)	9 (81,82%)	80,00%	17,5
291	$r=0,464$	37 (84,09%)	7 (15,91%)		
SSR-локус <i>Xvir1</i> / SSR-loci <i>Xvir1</i>					
206	$r=-0,513$	1 (9,09%)	10 (90,91%)	82,30%	17,9
200	$r=0,536^5$	30 (75,00%)	10 (25,00%)		
212		11 (11,00%)	0		
SSR-локусы, ассоциированные с геном <i>Kr1</i> / SSR loci associated with the <i>Kr1</i> gene					
<i>Xvir9</i>					
199	$r=-0,395$	19 (48,72%)	20 (51,28%)	66,70%	10,2
203	$r=0,406$	22 (91,67%)	2 (8,33%)		
<i>Xvir10</i>					
305	$r=-0,367$	7 (36,84%)	12 (63,16%)	72,50%	7,7
299	$r=0,367$	38 (76,00%)	12 (24,00%)		

Примечания: 1 – зеленым и красным шрифтом обозначены маркерные фрагменты «высокой» или «низкой скрещиваемости с рожью», соответственно; 2 – коэффициент корреляции Спирмена; 3 – диагностическая эффективность; 4 – критерий хи-квадрат с поправкой Йейтса; 5 – для аллелей *Xvir1_200* и *Xvir1_212* приведена корреляция, рассчитанная при их совместном учете, поскольку они оба относятся к одному SSR-локусу и ассоциированы с высокой скрещиваемостью с рожью

Notes: 1 – green and red fonts indicate marker fragments with «high» or «low crossability with rye», respectively; 2 – Spearman's correlation coefficient; 3 – diagnostic efficiency; 4 – Yates-corrected Chi-square test; 5 – The correlation presented for the *Xvir1_200* and *Xvir1_212* alleles was calculated taking them both into account, since they both belong to the same SSR locus and are associated with high crossbreeding with rye.

Таким образом, нами показано, что по составу аллелей каждого из изученных SSR-локусов, расположенных на участках локализации генов *SKr* и *Kr1*, нельзя определить все генотипы с высокой или с низкой скрещиваемостью с рожью (см. табл. 3). Представляло интерес уточнить характер дифференциации генотипов МП по участкам, в которых расположены гены *SKr* и *Kr1*. Для этого нами был проведен кластерный анализ для определения сходства линий МП по составу аллелей, которые были достоверно ассоциированы с высокой/низкой скрещиваемостью с рожью (см. табл. 3). В анализ были вовлечены 44 из 69 линий МП. Было выделено два основных кластера (рис. 3).

Кластер 1 с субкластерами 1.1 и 1.2 объединил 36 линий, преимущественно из Восточной Азии. В субкластер 1.1 вошла 21 линия из Китая и Японии, все они были с высокой скрещиваемостью с рожью (см. рис. 3). По аллельному составу SSR-локусов эти линии можно объе-

динить в группы со следующими комбинациями аллелей:

- группа 1 (*cfb341_176+gene12_391+TGlc2_291+Xvir1_200+Xvir9_203+Xvir10_299*). В нее вошли 12 линий и сорт CS;
- группа 2 (*cfb341_176+gene12_391+TGlc2_291+Xvir1_212+Xvir9_203+Xvir10_299*), объединившая семь линий;
- группа 3 (*cfb341_163+gene12_391+TGlc2_279+Xvir1_212+Xvir9_203+Xvir10_299*) включала линию Л22-ХСР.

Все линии субкластера 1.1 из групп 1 и 2 имели аллели «высокой скрещиваемости с рожью» (см. табл. 3, см. рис. 3).

Субкластер 1.2 объединил 15 линий МП, как с низкой (пять линий), так и с высокой (десять линий) скрещиваемостью с рожью. Данные линии содержали маркерные аллели «высокой скрещиваемости» во всех SSR-локусах, сопряженных с геном *SKr*, но в SSR-локусе *Xvir10*, связанном с геном *Kr1*, у них в ряде случаев присутствовал аллель *Xvir10_305*, сопряженный, с «низкой скрещиваемостью с рожью».

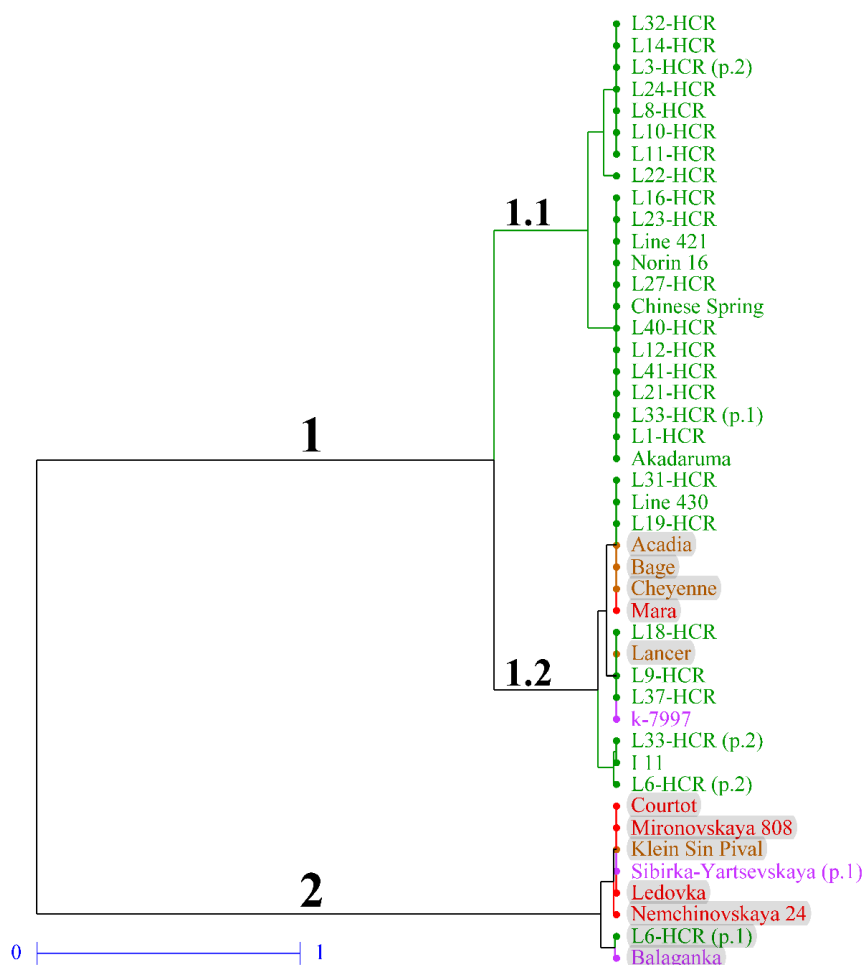


Рис. 3. Распределение 44 линий мягкой пшеницы на дендрограмме, построенной на основе анализа маркерных фрагментов шести локусов, ассоциированных с генами *SKr* и *KrI*

1 и 2 – кластеры, 1.1 и 1.2 – субкластеры. Линии пшеницы в зависимости от их географического происхождения представлены различным цветом: красный – Европа, зеленый – Восточная Азия (Китай и Япония), розовым – Монголия и Южная Сибирь (Россия: Красноярский край и Иркутская область), коричневым – страны Нового Света. Серой заливкой отмечены линии с низкой скрещиваемостью с рожью

Fig. 3. Distribution of 44 BW lines on a dendrogram constructed based on the analysis of marker fragments of six loci associated with the *SKr* and *KrI* genes

1 and 2 – clusters, 1.1 and 1.2 – subclusters. Wheat lines are color-coded based on their geographic origin: red – Europe, green – East Asia (China and Japan), pink – Mongolia and Southern Siberia (Russia: Krasnoyarsk Territory and Irkutsk Region), brown – New World countries. Lines with low crossability with rye are shaded gray

мостью с рожью». С высокой скрещиваемостью с рожью большинство (9 из 11) линий были из Китая, остальные две – из Монголии и Бразилии. С низкой завязываемостью – из Стран Нового света и Европы.

Кластер 2 представляли восемь линий. Все они, кроме 'Сибирка Ярцевская', имели низкую скрещиваемость с рожью (см. рис. 3). По географическому происхождению четыре линии были из Европы, две из Южной Сибири и по одной из Аргентины и Китая.

Таким образом, совместное использование данных об аллельных вариантах SSR-локусов, находящихся на участках расположения генов *SKr* и *KrI*, позволило выде-

лить генотипы МП с высокой скрещиваемостью с рожью, которые имели комбинации маркерных аллелей, не встречающиеся у генотипов с низкой скрещиваемостью. Линии с низкой завязываемостью гибридных зерновок кластеризовались, как правило, отдельно от совместных с рожью генотипов. Кроме того, аллели SSR-локусов, сопряженные с генами *SKr* и *KrI* дифференцировали линии не только по признаку скрещиваемости с рожью, но и по их географическому происхождению, обособив линии из Европы, Южной Сибири и Монголии, а также стран Нового Света от большей части линий из Восточной Азии.

Заключение

Методом идентификации *in silico* в геноме мягкой пшеницы сорта ‘Chinese Spring’ выявлены микросателлитные локусы в целевых участках, в которых картированы гены *SKr* и *Kr1*. Для амплификации последовательностей 14 SSR-локусов с повторяющимися мотивами в 3-4 пн разработаны специфичные праймеры. В результате тестирования праймеров шесть SSR-локусов оказались полиморфными: два ассоциированы с геном *SKr* (*Xvir1*, *Xvir3*) и четыре – с *Kr1* (*Xvir9*, *Xvir10*, *Xvir12*, *Xvir14*). Проверка апробированных праймеров SSR-локусов в выборке из 78 линий пшеницы, различного географического происхождения и уровня скрещиваемости с рожью, показала, что из них наиболее полиморфными были аллели SSR-локусов *Xvir1* ($PIC=0,60$; $N_e=2,5$), *Xvir12* ($PIC=0,84$; $N_e=6,3$) и *Xvir14* ($PIC=0,86$; $N_e=7,1$), а диагностически эффективными для идентификации генотипов с высокой/низкой скрещиваемостью с рожью были аллели SSR-локуса *Xvir1* ($Ef=82,3\%$), ассоциированного с геном *SKr*; а также *Xvir9* ($Ef=66,7\%$) и *Xvir10* ($Ef=72,5\%$) – маркеров гена *Kr1*. Совместное использование данных об аллельном составе SSR-локусов, ассоциированных с генами *SKr* и *Kr1*, позволило точнее описать полиморфизм участков, в которых локализованы эти гены, а также дифференцировать линии МП с учетом их географического происхождения и скрещиваемости с рожью. Расположение всех 14 SSR-локусов нанесено на физическую карту участков локализации генов *SKr* и *Kr1*, что может быть использовано для дальнейшего их позиционного клонирования. Данные об аллельном составе микросателлитных локусов у линий МП с высокой и низкой скрещиваемостью с рожью могут быть востребованы при подборе родительских пар для скрещивания и передачи этого признака в другие генотипы мягкой пшеницы.

References/Литература

- Alekseev Ya.I., Belov Yu.V., Malyuchenko O.P., Monakhova Yu.A., Natyrov A.N., Orekhov V.A., Kononov S.V., Kurochkin V.E., Petrov A.I. Genetic analyser for DNA fragment analysis. *Nauchnoe Priborostroyeniye = Scientific instrumentation*. 2012;22(4):86-92. [in Russian] (Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Орехов В.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Петров А.И. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК. *Научное приборостроение*. 2012;22(4):86-92).
- Alfares W., Bouguennec A., Balfourier F., Gay G., Bergès H., Vautrin S., Sourdille P., Bernard M., Feuillet C. Fine mapping and marker development for the crossability gene *SKr* on chromosome 5BS of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*. 2009;183(2):469-481. DOI: 10.1534/genetics.109.107706
- Barkley N.A., Dean R.E., Pittman R.N., Wang M.L., Holbrook C.C., Pederson G.A. Genetic diversity of cultivated and wild-type peanuts evaluated with M13-tailed SSR markers and sequencing. *Genetics Research*. 2007;89(2):93-106. DOI: 10.1017/S0016672307008695
- Bertin I., Fish L., Foote T.N., Knight E., Snape J., Moore G. Development of consistently crossable wheat genotypes for alien wheat gene transfer through fine-mapping of the *Kr1* locus. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;119(8):1371-1381. DOI: 10.1007/s00122-009-1141-z
- Bouguennec A., Lesage V.S., Gateau I., Sourdille P., Jahier J., Lonnet P. Transfer of recessive *skr* crossability trait into well-adapted French wheat cultivar Barok through marker-assisted backcrossing method. *Cereal Research Communications*. 2018;46(4):604-615. DOI: 10.1556/0806.46.2018.043
- Dice L. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 1945;26:297-302.
- Daunay A., Duval A., Baudrin L.G., Buhard O., Renault V., Deleuze J.F., How-Kit A. Low temperature isothermal amplification of microsatellites drastically reduces stutter artifact formation and improves microsatellite instability detection in cancer. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(21):e141-e141. DOI: 10.1093/nar/gkz811
- Dorokhov D.B., Klocke E. Rapid and economic technology of RAPD-analysis of plant genomes. *Молекулярная Генетика = Molecular Genetics*. 1997;3(4):443-450. [in Russian] (Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов. *Молекулярная генетика*. 1997;3(4): 443-450).
- IDT, Integrated DNA Technologies; 2025 [website]. Available from: <https://eu.idtdna.com/calc/analyser> [accessed Dec. 20, 2025]
- IWGSC CS. Genome assembly IWGSC CS RefSeq v2.1. NIH. NCBI. University of California, Davis, USA; 2021. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_018294505.1/ [accessed Dec. 20, 2025].
- Khakimova A.G., Gubareva N.K., Koshkin V.A., Mitrofanova O.P. Genetic diversity and breeding value of synthetic hexaploid wheat introduced into the VIR collection. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):738-745. [in Russian] (Хакимова А.Г., Губарева Н.К., Кошкин В.А., Митрофанова О.П. Генетическое разнообразие и селекционная ценность синтетической гексаплоидной пшеницы, привлеченной в коллекцию ВИР. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(6):738-745). DOI: 10.18699/VJ19.548
- Lange W., Wojciechowska B. The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica*. 1976;25(1):609-620. DOI: 10.1007/BF00041598
- Lein A. Die Genetische Grundlage der Kreuzbarkeit Zwischen Weizen und Roggen. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs und Vererbungslehre*. 1943;81(1):28-61. DOI: 10.1007/BF01847441 [in German]
- Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression and gene pyramiding. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2013;3(6):464-473. DOI: 10.1134/S2079059713060051
- Li Y.C., Korol A.B., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 2002;11(12):2453-2465. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x
- Merezko A.F., Erohin L.M., Judin A.E. An efficient method of grain crop pollination. Guidelines (Effektivnyy metod opyleniya zernovykh kultur: metodicheskiye ukazaniya). Leningrad: VIR; 1973. [in Russian] (Мережко А.Ф., Ерохин Л.М., Юдин А.Е. Эффективный метод опыления зерновых культур: методические указания. Л.: ВИР; 1973).
- Mitrofanova O.P., Strel'chenko P.P., Konarev A.V., Balfourier F. Genetic differentiation of hexaploid wheat inferred from analysis of microsatellite loci. *Russian Journal of Genetics*. 2009;45;1351-1359. DOI: 10.1134/S102279540911009X
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(12):3321-3323. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091
- Peakall R.O.D., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Pisarev V.E. Amphidiploids «spring wheat × spring rye». *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1960;32(2):37-56. [in Russian] (Писарев В.Е. Амфидиплоиды «яровая пшеница × яровая рожь. *Труды по прикладной ботанике,*

- генетике и селекции. 1960;32(2):37-56).
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(11):847-859. DOI: 10.1038/nrg1707
- Porotnikov I.V., Puykkenen V.P., Antonova O.Yu., Mitrofanova O.P. The efficiency of molecular markers of the *SKr* suppressor gene that determines the crossability of common wheat with rye. *Ecological genetics*. 2022;20(3):203-214. [in Russian] (Поротников И.В., Пюккенен В.П., Антонова О.Ю., Митрофанова О.П. Эффективность молекулярных маркеров гена-супрессора *SKr*, определяющего скрещиваемость мягкой пшеницы с рожью посевной. *Экологическая генетика*. 2022;20(3):203-214). DOI: 10.17816/ecogen110867
- Porotnikov I.V., Khakimova A.G., Antonova O.Yu., Mitrofanova O.P. The diversity of bread wheat landraces from Asia and synthetic hexaploid wheat by alleles of loci linked to the *SKr* gene – a suppressor of crossability of bread wheat with rye. *Turczaninowia*. 2025;28(3):30-42. [in Russian] (Поротников И.В., Хакимова А.Г., Антонова О.Ю., Митрофанова О.П. Разнообразие стародавней мягкой пшеницы из Азии и синтетической гексаплоидной пшеницы по аллелям маркерных локусов, сцепленных с геном *SKr* – супрессором скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью. *Turczaninowia*. 2025;28(3):30-42). DOI: 10.14258/turczaninowia.28.3.3
- Pyykkenen V.P. Bread wheat collection arranged according to good crossability with rye. In: *Genetic resources of cultivated plants in the XXI century: Current state, problems and prospects: Abstracts of the II Vavilov International Conference; 2007 November 26–30; St. Petersburg, Russia*. St. Petersburg: VIR; 2007. p.583-585. [in Russian] (Пюккенен В.П. Коллекция мягкой пшеницы по признаку хорошей скрещиваемости с рожью. В кн.: *Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы: тезисы докладов II Вавиловской международной конференции; 26–30 ноября 2007 г.; Санкт-Петербург, Россия*. Санкт-Петербург: ВИР; 2007. С.583-585).
- Rekhetulin R.M. Crossability in argentine spring soft wheat varieties with diploid and tetraploid rye. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1987;111:77-81. [in Russian] (Рехметулин Р.М. Скрещиваемость аргентинских сортов яровой мягкой пшеницы с диплоидной и тетраплоидной рожью. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1987;111:77-81).
- Rigin B.V. Crossability of wheat with rye. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1976;58(1):12-34. [in Russian] (Ригин Б.В. Скрещиваемость пшеницы с рожью. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1976;58(1):12-34).
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149(4):2007-2023. DOI: 10.1093/genetics/149.4.2007
- Roussel V., Koenig J., Beckert M., Balfourier F. Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108(5):920-930. DOI: 10.1007/s00122-003-1502-y
- Rui M., Zheng D.S., Fan L. The crossability percentages of 96 bread wheat landraces and cultivars from Japan with rye. *Euphytica*. 1995;92(3):301-306. DOI: 10.1007/BF00037112
- Samarina M.A., Uliyanov D.S., Mokhov T.D., Meglitskaya Ya.S., Krupin P.Yu., Karlov G.I., Kharchenko P.N., Voronov S.I., Davydova N.V., Divashuk M.G. Selection of molecular markers for genetic certification of *Triticum aestivum*. *Grain Economy of Russia*. 2024;16(4):33-40. [in Russian] (Самарина М.А., Ульянов Д.С., Мохов Т.Д., Меглицкая Я.С., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Харченко П.Н., Воронов С.И., Давыдова Н.В., Дивашук М.Г. Отбор молекулярных маркеров для генетической паспортизации *Triticum aestivum*. *Зерновое хозяйство России*. 2024;16(4):33-40). DOI: 10.31367/2079-8725-2024-93-4-33-40
- Surikov I.M., Kissel N.I. Inheriting of winter wheat-rye good crossability. *Cytology and Genetics*. 1980;14(4):71-73. [in Russian] (Суриков И.М., Киссель Н.И. Наследование хорошей скрещиваемости озимой пшеницы с рожью. *Цитология и генетика*. 1980;14(4):71-73).
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive component of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984;12(10):4127-4138. DOI: 10.1093/nar/12.10.4127
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., McCouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Genome Research*. 2001;11(8):1441-1452. DOI: 10.1101/gr.184001
- Thuillet A.C., Bru D., David J., Roumet P., Santoni S., Sourdille P., Bataillon T. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp durum Desf. *Molecular Biology and Evolution*. 2002;19(1):122-125. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003977
- Tixier M.H., Sourdille P., Charmet G., Gay G., Jaby C., Cadalen T., Bernard S., Nicolas P., Bernard M. Detection of QTLs for crossability in wheat using a doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998;97(7):1076-1082. DOI: 10.1007/s001220050994
- Totsky I.V., Rozanova I.V., Safonova A.D., Batov A.S., Gureeva Yu.A., Khlestkina E.K., Kochetov A.V. Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):677-686. DOI: 10.18699/VJ21.077
- Voorrips R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*. 2002;93(1):77-78. DOI: 10.1093/jhered/93.1.77
- Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*. 1963;58(301):236-244.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134
- Zeven A.C. Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. *Euphytica*. 1987;36(1):299-319. DOI: 10.1007/BF00730677

Информация об авторах

Поротников Игорь Вадимович, научный сотрудник, лаборатория молекулярной селекции и ДНК-паспортизации, отдел биотехнологии, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, i.v.porotnikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5841-8803>

Антонова Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая, лаборатория молекулярной селекции и ДНК-паспортизации, отдел биотехнологии, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, olgaant326@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

Митрофанова Ольга Павловна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, отдел генетических ресурсов пшеницы, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, o.mitrofanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9171-2964>

Information about the authors

Igor V. Porotnikov, Researcher, Laboratory of Molecular Breeding and DNA Passportization, Department of Biotechnology, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, i.v.porotnikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5841-8803>

Olga Yu. Antonova, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head, Laboratory of Molecular Breeding and DNA Passportization, Department of Biotechnology, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, olgaant326@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

Olga P. Mitrofanova, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Department of Wheat Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, o.mitrofanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9171-2964>

Вклад авторов: концептуализация – ИВП, ОЮА, ОПМ; методология, валидация, исследование – ИВП, ОЮА; Написание черновика – ИВП, ОЮА, ОПМ; Рецензирование, редактирование – ОПМ

Contribution of the authors: conceptualization – IVP, OYuA, OPM; methodology, validation, investigation – IVP, OYuA; writing of the original draft – all the authors: IVP, OYuA, OPM; reviewing – editing – OPM

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 27.03.2026; одобрена после рецензирования 09.07.2026; принята к публикации 28.08.2026.

The article was submitted on 27.03.2026; approved after reviewing on 09.07.2026; accepted for publication on 28.08.2026.