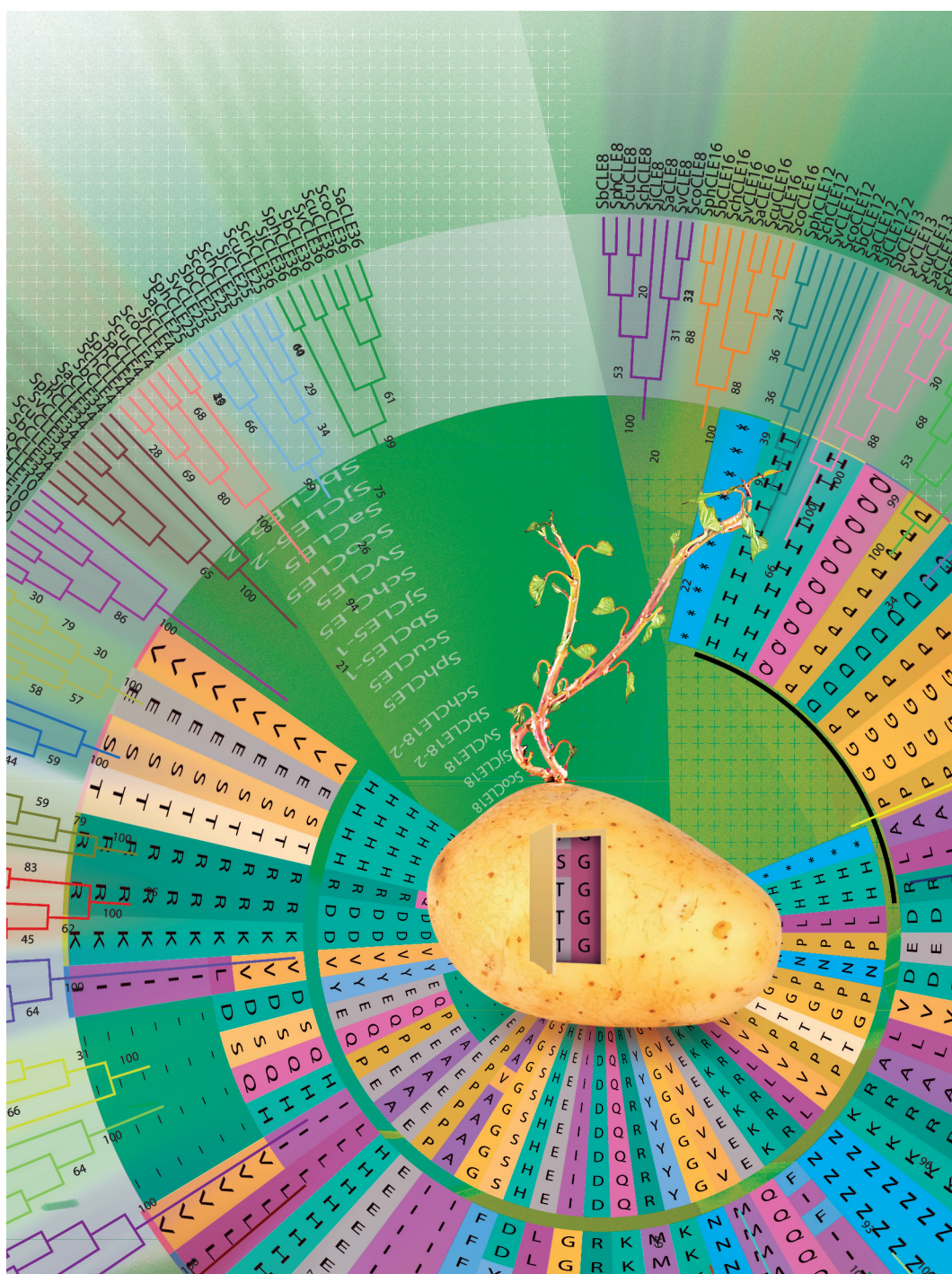


ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2021 • 25 • 7



PlantGen2021

Стрессоустойчивость растений / Генетика развития /
Биотехнология в постгенном зру

vavilov.ejpub.ru/
biomet.nsc.ru/vogis
vavilov_journal@biomet.nsc.ru
Индекс издания 42153



Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ21.078

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

Заместители главного редактора

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

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ21.078

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*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.A. 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*I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),

Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*A.M. Kudryavtsev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*I.N. Lavrik*, Dr. Sci. (Biology), Germany*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.),
Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.R. Mursalimov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),
Russia*I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States*A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia*E.Y. Rykova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*Y.N. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia*R.I. Sheiko*, Corr. Member of the NAS of Belarus,
Dr. Sci. (Agricul.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*V.A. Stepanov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*N.K. Yankovsky*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS,
Dr. Sci. (Biology), Russia

691

ОТ РЕДАКТОРА

Шестая международная научная конференция PlantGen2021.

А.В. Кочетов, Е.А. Салина

Стрессоустойчивость растений

693

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Интрогрессии *Vitis rotundifolia* Michx. для получения генотипов винограда с комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам. В.А. Вольнкин, В.В. Лиховской, И.А. Васылык, Н.А. Рыбаченко, Е.А. Луццай, С.М. Гориславец, В.А. Володин, В.И. Рисованная, Е.К. Потокина (на англ. языке)

701

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Получение и характеристика линии мягкой пшеницы (Тулайковская 10 × Саратовская 29) с интрогрессией хромосомы пырея *Thinopyrum intermedium* 6Agi2. Ю.Н. Иванова, К.К. Розенфрид, А.И. Стасюк, Е.С. Сколотнева, О.Г. Силкова

713

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Пребридинговое изучение интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, несущих комбинации *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* генов устойчивости к стеблевой ржавчине. С.Н. Сибикеев, О.А. Баранова, А.Е. Дружин

723

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Комплексная устойчивость линий яровой и озимой мягкой пшеницы к биотическим и абиотическим стрессам. И.Ф. Лапочкина, Н.Р. Гайнуллин, О.А. Баранова, Н.М. Коваленко, Л.А. Марченкова, О.В. Павлова, О.В. Митрошина

732

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристика устойчивости селекционных линий овса к заражению *Fusarium langsethiae* и накоплению Т-2/НТ-2 токсинов. О.П. Гаврилова, Т.Ю. Гагкаяева, А.С. Орина, А.С. Маркова, А.Д. Кабашов, И.Г. Лоскутов

740

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ген *Sr38*: значение для селекции мягкой пшеницы в условиях Западной Сибири. Е.С. Сколотнева, В.Н. Кельбин, В.П. Шаманин, Н.И. Бойко, В.А. Апарина, Е.А. Салина

Генетика развития

746

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм последовательностей генов *CLE* картофеля. М.С. Ганчева, М.Р. Лосев, А.А. Гурина, Л.О. Полошкевич, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова

754

ОБЗОР

Транспортеры сахаров семейства SWEET и их роль в арбускулярной микоризе. А.А. Крюков, А.О. Горбунова, Т.Р. Кудряшова, О.И. Яхин, А.А. Лубянов, У.М. Маликов, М.Ф. Шишова, А.П. Кожемяков, А.П. Юрков

Биотехнология в постгеномную эру

761

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Разработка панели маркеров для генотипирования отечественных сортов сои по генам, контролирующим срок вегетации и реакцию на фотопериод. Р.Н. Перфильев, А.Б. Щербань, Е.А. Салина

770

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Использование синтетической формы RS5 для получения новых интрогрессивных линий мягкой пшеницы. Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, Д.С. Миков, В.А. Бибишев, А.Н. Зинченко, Е.Д. Бадаева

778

ОБЗОР

Субкомпартиментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий. И.В. Уколова

787

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Использование биоинформационного анализа для определения вероятной причины перекрестного взаимодействия антител к антигенному белку ВПЧ16 L1 с белком ВПЧ6 L1. А.С. Столбиков, Р.К. Салая, Н.И. Рекославская

- 691 **FROM THE EDITOR**
The Sixth International Scientific Conference PlantGen2021.
A.V. Kochetov, E.A. Salina
- Stress resistance in plants**
- 693 **ORIGINAL ARTICLE**
Introgressions of *Vitis rotundifolia* Michx. to obtain grapevine genotypes with complex resistance to biotic and abiotic stresses. *V.A. Volynkin, V.V. Likhovskoi, I.A. Vasylyk, N.A. Rybachenko, E.A. Lushchay, S.M. Gorislavets, V.A. Volodin, V.I. Risovannaya, E.K. Potokina*
- 701 **ORIGINAL ARTICLE**
Raise and characterization of a bread wheat hybrid line (Tulaykovskaya 10 × Saratovskaya 29) with chromosome 6Agi2 introgressed from *Thinopyrum intermedium*. *Yu.N. Ivanova, K.K. Rosenfread, A.I. Stasyuk, E.S. Skolotneva, O.G. Silkova*
- 713 **ORIGINAL ARTICLE**
A prebreeding study of introgression spring bread wheat lines carrying combinations of stem rust resistance genes, *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25*. *S.N. Sibikeev, O.A. Baranova, A.E. Druzhin*
- 723 **ORIGINAL ARTICLE**
Complex resistance of spring and winter bread wheat lines to biotic and abiotic stresses. *I.F. Lapochkina, N.R. Gainullin, O.A. Baranova, N.M. Kovalenko, L.A. Marchenkova, O.V. Pavlova, O.V. Mitroshina*
- 732 **ORIGINAL ARTICLE**
Resistance of oat breeding lines to grain contamination with *Fusarium langsethiae* and T-2/HT-2 toxins. *O.P. Gavrilova, T.Yu. Gagkaeva, A.S. Orina, A.S. Markova, A.D. Kabashov, I.G. Loskutov*
- 740 **ORIGINAL ARTICLE**
The gene *Sr38* for bread wheat breeding in Western Siberia. *E.S. Skolotneva, V.N. Kelbin, V.P. Shamanin, N.I. Boyko, V.A. Aparina, E.A. Salina*

Developmental genetics

- 746 **ORIGINAL ARTICLE**
Polymorphism of *CLE* gene sequences in potato. *M.S. Gancheva, M.R. Losev, A.A. Gurina, L.O. Poliushkevich, I.E. Dodueva, L.A. Lutova*
- 754 **REVIEW**
Sugar transporters of the SWEET family and their role in arbuscular mycorrhiza. *A.A. Kryukov, A.O. Gorbunova, T.R. Kudriashova, O.I. Yakhin, A.A. Lubyaynov, U.M. Malikov, M.F. Shishova, A.P. Kozhemyakov, A.P. Yurkov*

Biotechnology in the postgenomic epoch

- 761 **ORIGINAL ARTICLE**
Development of a marker panel for genotyping of domestic soybean cultivars for genes controlling the duration of vegetation and response to photoperiod. *R.N. Perfil'ev, A.B. Shcherban, E.A. Salina*
- 770 **ORIGINAL ARTICLE**
Using the synthetic form RS5 to obtain new introgressive lines of common wheat. *R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, Y.S. Zubanova, D.M. Boldakov, D.S. Mikov, V.A. Bibishev, A.N. Zinchenko, E.D. Badaeva*
- 778 **REVIEW**
The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria. *I.V. Ukolova*
- 787 **ORIGINAL ARTICLE**
A bioinformatics approach for identifying the probable cause of the cross-interaction of antibodies to the antigenic protein HPV16 L1 with the HPV6 L1 protein. *A.S. Stolbikov, R.K. Salyaev, N.I. Rekoslavskaya*

Шестая международная научная конференция PlantGen2021



Дорогие читатели! Седьмой выпуск журнала тематический, он посвящен Шестой международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PlantGen2021), которая состоялась 14–18 июня 2021 г. в новосибирском Академгородке. Главными организаторами конференции выступили Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН и Новосибирский государственный университет. Спонсоры конференции: ООО «Максим Медикал», ООО «Феномика», ООО «СкайДжин», ООО «Квадрос-Био», ООО «Компания Хеликон», GenScript Biotech (Netherlands) B.V., ООО «Био-Ген-Аналитика», ООО «Эпендорф Раша», ООО «Вайсс Климатехник», Компания «Мерк», ООО «Диаэм».

Конференция, проходившая как в очном, так и в онлайн-формате, включала в себя следующие секции: генетика развития и стрессоустойчивость; эволюционная и функциональная геномика; биотехнология растений в пост-геномную эпоху; биоинформатика, системная биология

растений и цифровое фенотипирование; промышленная биотехнология.

В работе PlantGen2021 приняли участие 317 ученых из 22 стран, в том числе 41 иностранный, что превысило число участников предыдущей конференции, состоявшейся в 2019 г., еще до начала ограничений, связанных с пандемией. Было представлено 240 докладов, из них 97 устных и 143 стендовых. Стоит отметить весомый показатель участников – молодых ученых: 41 % (130 человек). За время конференции зарегистрировано более 6000 заходов на ее официальный сайт, где транслировались заседания. Онлайн-трансляцию смотрели участники из 22 стран, наиболее активными среди них были представители из России, Казахстана, Германии, США и Белоруссии. Трансляцию смотрели также из Чехии, Молдовы, Украины, Узбекистана, Кыргызстана, Нидерландов, Армении, Азербайджана, Канады, Франции, Грузии, Индии, Саудовской Аравии, Южной Кореи, Таджикистана, Туркменистана и Англии.

На конференции были представлены результаты новейших исследований в области генетики, геномики,



биоинформатики и биотехнологии растений, обсуждены перспективные направления исследований (в том числе совместных) по фундаментальным и прикладным аспектам изучения генома растений. Многие доклады отражали историю развития тех или иных научных направлений в России. Вниманию слушателей были предложены новые результаты из Казани, Москвы, Новосибирска, Санкт-Петербурга, Уфы, где сегодня работают ведущие отечественные научные школы в области генетики растений.

Одновременно к участию в конференции были привлечены ведущие мировые эксперты по ряду наиболее «молодых» и популярных сегодня направлений. Например, с докладами о последних достижениях в геномном редактировании выступили Сергей Свиташев (США) и Иоганн Каумляйн (Германия).

Организаторы конференции планируют дальнейшее расширение программы, в частности, на PlantGen2023 запланировано выделить в отдельную секцию доклады по биохимической генетике и физиологии растений, увеличив число сообщений по этой тематике. Сегодня значительных успехов в этом направлении добились казанские ученые, и в связи с этим рассматривается вариант проведения следующей конференции в Казани.

С каждым разом расширяется число и география участников конференции PlantGen, что говорит о ее востребованности в мировом научном сообществе и служит объективным показателем ее успешности. Ученым есть из чего выбирать: число мероприятий биологической тематики год от года растет, но конференция PlantGen по-прежнему занимает среди них достойное место.

*А.В. Кочетов,
член-корреспондент РАН, директор ИЦиГ СО РАН,
председатель конференции PlantGen2021*

*Е.А. Салина,
профессор, главный научный сотрудник ИЦиГ СО РАН,
сопредседатель конференции PlantGen2021*

Introgressions of *Vitis rotundifolia* Michx. to obtain grapevine genotypes with complex resistance to biotic and abiotic stresses

V.A. Volynkin¹, V.V. Likhovskoi¹, I.A. Vasylyk¹✉, N.A. Rybachenko¹, E.A. Lushchay¹, S.M. Gorislavets¹, V.A. Volodin¹, V.I. Risovannaya¹, E.K. Potokina^{1,2}

¹ All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" of the Russian Academy of Sciences, Yalta, Russia

² Saint Petersburg State Forest Technical University, St. Petersburg, Russia

✉ kalimera@inbox.ru

Abstract. *Vitis rotundifolia* Michx. is one of the species of the family Vitaceae, with resistance to both biotic and abiotic stresses. The present study reports new scientific knowledge about the inheritance of resistance to downy mildew, powdery mildew and frost by *V. vinifera* varieties from *V. rotundifolia*. Recombinant lines of three hybrid populations from the crossing of the maternal genotype ♀M. 31-77-10 with *V. rotundifolia* hybrids were used as the object of the study. As a result of laboratory screening, more than 40 % of recombinants of the ♀M. 31-77-10 × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790] population showed a high degree of frost resistance (–24 °C), while 6 % of transgressive recombinants were characterized by a very high degree of resistance (–27 °C). The maternal genotype ♀M. 31-77-10 does not carry alleles of resistance to powdery mildew at the *Run1* locus and in the field suffers from powdery mildew much more than the paternal genotypes. The prevalence of powdery mildew on vegetative organs in the three recombinant populations over the years varies on average between 3.2–17.1, 0.3–17.7 and 0.6–5.2 %, respectively. As a result, almost all recombinant genotypes that received a resistant allele from the paternal genome are highly resistant to powdery mildew.

Key words: grapes; *Vitis vinifera* L.; *Vitis rotundifolia* Michx.; backcrosses; biotic and abiotic stress; powdery mildew; frost; resistance; genes; introgression.

For citation: Volynkin V.A., Likhovskoi V.V., Vasylyk I.A., Rybachenko N.A., Lushchay E.A., Gorislavets S.M., Volodin V.A., Risovannaya V.I., Potokina E.K. Introgressions of *Vitis rotundifolia* Michx. to obtain grapevine genotypes with complex resistance to biotic and abiotic stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):693-700. DOI 10.18699/VJ21.079

Интрогрессии *Vitis rotundifolia* Michx. для получения генотипов винограда с комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам

В.А. Вольтинкин¹, В.В. Лиховской¹, И.А. Васылык¹✉, Н.А. Рыбаченко¹, Е.А. Лушчай¹, С.М. Гориславец¹, В.А. Володин¹, В.И. Рисованная¹, Е.К. Потокина^{1,2}

¹ Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» Российской академии наук, Ялта, Россия

² Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ kalimera@inbox.ru

Аннотация. *Vitis rotundifolia* Michx. – один из видов в семействе Vitaceae, демонстрирующий устойчивость как к биотическим, так и к абиотическим стрессам. В процессе изучения получены новые научные знания о наследовании культурным виноградом от *V. rotundifolia* признаков устойчивости к патогенам, вызывающим милдью и оидиум, и к морозу. Объектом исследования служили рекомбинантные линии трех популяций от скрещивания материнской формы ♀M. 31-77-10 с гибридами потомства *V. rotundifolia*. Установлено, что признак морозостойкости, скорее всего, имеет полигенное наследование. По результатам лабораторного изучения, в популяции ♀M. 31-77-10 × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790] более 40 % рекомбинантов характеризуются высокой степенью морозоустойчивости (–24 °C), в то время как 6 % трансгрессивных рекомбинантов – очень высокой степенью устойчивости (–27 °C). Материнский генотип ♀M. 31-77-10 не несет аллелей устойчивости к оидиуму в локусе *Run1* и сильнее, чем отцовские генотипы, поражается оидиумом в полевых условиях. Распространение оидиума на вегетативных органах в трех рекомбинантных популяциях в среднем за годы исследований колеблется в пределах 3.2–17.1, 0.3–17.7 и 0.6–5.2 % соответственно. Почти все рекомбинантные генотипы, получившие аллель устойчивости в локусе *Run1* от отцовского генома, обладают высокой устойчивостью к оидиуму.

Ключевые слова: виноград; *Vitis vinifera* L.; *Vitis rotundifolia* Michx.; беккроссы; биотический и абиотический стресс; мучнистая роса; мороз; устойчивость; гены; интрогрессия.

Introduction

Remote hybridization plays an important role in modern grape breeding. It allows combining in hybrid progeny traits of various *Vitis* species, which have significantly diverged in evolution; for example, high productivity and high berries quality of the *Vitis vinifera* L. varieties with resistance to biotic and abiotic stress of American *Vitis* species. Hybridization makes it possible, on the one hand, to obtain experimentally new forms and varieties, on the other hand, to study the relationship between genomes, structure and function of chromosomes, the patterns of inheritance of morphological and economically valuable traits. N.I. Vavilov (Vavilov, 1986) emphasized that employing remote hybridization is especially promising for the breeding of vegetative propagated plants, including grapes.

Significant success was achieved by grape breeders and growers in the development of interspecific hybrids and in the study of such important issues as the selection of parental pairs, dominance, coping with incapacity for hybridization, identifying the sources of inter-sterility and reduced fertility of hybrid plants. In contrast to the *V. vinifera* L. cultivars, many other *Vitis* species, native to North and Central America, especially *V. rotundifolia*, are distinguished by high resistance to pathogens, pests and frost. Therefore, breeders and grape growers have always found the creation of new cultivated varieties of grapes promising, combining productivity and quality of *V. vinifera* with resistance of American *Vitis* species, meaning to create a “perfect” grape variety. In the middle of the 20th century in Europe there even existed a “perfect variety” breeding program, which has been transformed in the ‘Magarach’ Institute into the breeding program “Analogue” (Volynkin et al., 2018). Currently, this breeding program has found its further development in the introgression of *V. rotundifolia* genes into *V. vinifera* genome (Volynkin et al., 2020a). It should be noted that the Institute of Viticulture and Winemaking ‘Magarach’ is one of the leading centers of grape breeding in the world (Volynkin et al., 2015), and its grapevine breeding program is based on the study of the world *Vitis* gene pool and international trends of viticulture (Volynkin et al., 2021a).

The significance of such a breeding program is explained by the fact that a considerable part of vineyards in the Russian Federation is located in the zone of risky viticulture and almost every year suffers from frost coupled with the intensive development of downy mildew (caused by *Plasmopara viticola* Berl. et De Toni) and powdery mildew (*Erysiphe necator* Schwein.). In these conditions, the period of growing season of grape plants is reduced. Besides, in winter, plants are exposed to temperatures lower than the biological adaptive capacity of this species allows.

The study of the inheritance of grape frost resistance in progeny made it possible to establish that the trait is determined, first of all, by biological specificity of a grape genotype. Some *Vitis* species die in mild frosts; others are able to survive in the most severe winters (Likhovskoi et al., 2019; Vasylyk et al., 2020). Frost resistance is also influenced by soil and climatic conditions as well as agrotechnical methods that provide plants with optimal conditions for nutrition, water supply and ailing. Cultivated grapevine in natural field conditions usually do not achieve maximum frost resistance, since the conditions of their preparation for the winter period

are often unfavorable (Pavloušek, Postbiegl, 2003; Xiaoyan et al., 2015; Polulyakh et al., 2017).

Diagnostics of the frost resistance of grape varieties plays an important role in breeding, because only if information about the degree of a trait assigned to a particular genotype is complete and accurate, it can be used as a source of a valuable trait in breeding (Kozma, 1998; Korbuly, 2000; Clark, Barchenger, 2015; Ivanisević et al., 2015; Gonçalves et al., 2016; Volynkin et al., 2020b, c). In modern research, scientists are searching for the ways of conducting express-diagnostics of the frost resistance degree based on correlations with morphological traits (Maltabar, Zhdamarova, 2012; Novikova, Naumova, 2018; Ilnitskaya et al., 2019; Volynkin et al., 2020d), or studying biochemical mechanisms of the resistance and adaptation of grape plants to environmental stress factors at the molecular level (Di Gaspero et al., 2007; Nenko et al., 2019; Ricciardi et al., 2021; Shen et al., 2021). The most complete and reliable information about the resistance of grape varieties to environmental stress factors can be obtained only as a result of combination of field and laboratory experiments (Korbuly et al., 2004; Read et al., 2004; Ulitin, Nudga, 2008; Zlenko et al., 2018).

The development of new grapevine varieties that ensure ecological purity of food based on genetically determined resistance to pathogens in combination with frost resistance is one of the priorities in modern grape breeding.

Materials and methods

Plant material. The studies were carried out in 2017–2020 in field and laboratory conditions. The object of the study was the recombinant lines of three populations obtained in the ‘Magarach’ Institute from the following crosses: ♀M. 31-77-10 × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790] (66 hybrids), ♀M. 31-77-10 × 2000-305-143 (43 hybrids) and ♀M. 31-77-10 × 2000-305-163 (30 hybrids). Hereinafter, they are referred to as populations 2-11, 3-11 and 4-11, respectively. The maternal genotype ♀M. 31-77-10 was obtained at the ‘Magarach’ Institute by crossing the cv. Nimrang (*V. vinifera*) with Seibel 13666 (a complex interspecific hybrid). In turn, the two paternal genotypes are progeny of the NC16-5 (*V. rotundifolia* × *V. vinifera*) backcrosses with various varieties of *V. vinifera*. To ensure the greatest reliability of the crosses performed, the maternal genotype taken for crossing possessed a functionally female type of flower, excluding the possibility of self-pollination.

Climatic conditions. The breeding plot was located in the South Coast of the Crimean Peninsula, on mild slopes of the South-West exposure, at an elevation of 123 m above the sea level. The breeding plot soils were rather heavy, clayey admixed with gravel.

The climate is mild warm Mediterranean sub-humid, characterized by a relatively small amplitude of daily and annual temperatures, with warm winters, mild hot summers and long warm autumns. The first frosts are usually registered in early December, and the last – in the middle of March. Thus, the growing season of grape begins from the first days of April finishing at the end of November. In very warm years, some late grapevine varieties retain their leaves until January.

Winter is mild, small frosts often alternate with frost-free periods. Frosts usually do not reach the level when damage of

buds on annual shoots is observed. In years of extremely cold winter the temperature drops to $-12...-13$ °C. Therefore, even non-frost-resistant varieties do not suffer from winter frosts in the Crimea. In the second half of March, with a noticeable increase in temperature, the buds begin to swell, and in the first or second decade of April – to burst. However, temperature rises relatively slowly in April and May due to proximity to the sea. The inhibitory effect of low temperatures also affects flowering, which is usually registered in the first half of June. The beneficial effect of the sea is observed in the second half of summer and in autumn when daily and monthly temperatures do not show any violent oscillations. Autumn is warm, mild dry, with a lot of sunny days. Summer and autumn months are characterized by a relatively low amount of precipitation and air humidity.

The conditions do not favor the distribution of such diseases as downy mildew, gray rot and anthracnose. Among fungal diseases powdery mildew causes the greatest harm to vineyards, while downy mildew spreads only sporadically. The most widespread grapevine pests on the South Coast of Crimea are phylloxera and European grape moth, which produces three generations per season here.

Laboratory testing of genotype resistance to low temperatures. The laboratory method of testing frost resistance was based on the recommendations of S. Pogosyan (1974) and M. Chernomorets (1985), with some methodology modifications (Zlenko et al., 2018). In short, the diagnostics of frost resistance of grape genotypes was carried out by stepwise hardening and freezing of two-eyed cuttings of mature shoots as follows: from $+8$ to $+4$ °C for 14 days (hardening stage I); from -3 to -5 °C for 11 days (hardening stage II); and -10 °C for 1 day (hardening stage III). Then cuttings were frozen stepwise in the temperature range: from -16 to -24 °C with a 2 °C temperature change interval; from -24 to -30 °C with an interval of 10 °C. After each of ten sequential freezing stages (-16 °C for 2 days; -18 °C for 3 days; -21 °C for 2 days; -24 °C for 2 days; -25 °C for 3 days; -26 °C for 2 days; -27 °C for 2 days) 5 cuttings of each genotype were placed to refrigerator with a temperature of $+2$ °C for 3 days for gradual defrosting. Then cuttings were water-soaked for 1 day and placed for sprouting in half-liter containers with water at a room temperature ($+22$ °C).

The assessment of frost resistance was carried out according to a 9 point scale of International Organization of Vine and Wine (OIV) descriptor, with the following points of resistance: 1 – very low (-15 °C), 3 – low (-18 °C), 5 – medium (-21 °C), 7 – high (-24 °C), 9 – very high (-27 °C and lower). The degree of genotype resistance to frost stress was determined after 4 weeks of sprouting in water by assessing the percentage of shoot development from buds after each stage of freezing. For a more objective assessment of the vine shoots vitality after freezing, the length of the developed shoots, the number and length of roots, as well as the development of inflorescences were additionally determined.

Determining the resistance to pathogens in the field. Phenotypic data were obtained by evaluating plants in the field against a natural infection background without the use of fungicides.

The nature and percentage of leaves damage were accounted according to generally accepted methods (Buga, 2007). Up

to 30 leaves from different parts of a plant were examined on every accounting bush. Each season, we carried out two examinations: the first was performed 3 weeks after grape flowering, the second – at the beginning of grape ripening. The percentage of leaves affection and degree of disease development on leaves were determined using the following scale:

- 0 – no signs of affection;
- 1 – single and barely noticeable spots on leaves;
- 2 – up to 10 % of leaf surface is affected;
- 3 – 11–25 % of leaf surface is affected;
- 4 – 26–50 % of leaf surface is affected;
- 5 – more than 50 % of leaf surface is affected.

Disease development (R , %) for a specific genotype was calculated using the formula:

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{N \cdot K} \cdot 100, \quad (1)$$

where, a is a score of the scale, according to which the lesion was evaluated in the experiment; b is the number of affected leaves within the range of this score; N is the total number of leaves evaluated (pcs); K is the highest score of the scale; and 100 is the conversion factor.

The data obtained were averaged, and then the results were interpreted according to the OIV international standards (O-452, O-454), where the degree of grape plant resistance to fungal pathogens was assessed by the degree of leaf affection using the following point scale: 1 – very low degree of resistance (extensive surface affection by the pathogen is more than 50 %); 3 – low degree of resistance (the area affected by the pathogen is 30–50 %); 5 – medium degree of resistance (the area affected by the pathogen is 20–30 %); 7 – high degree of resistance (weak pathogen affection – up to 10 %); 9 – very high degree of resistance (very small or no pathogen affection). For data analysis, the value of maximum degree of affection was used.

Laboratory testing of resistance to pathogens. In addition to the field evaluation, a phytopathological screening was carried out using the disk-test method. For the disk-test, the leaves of recombinant lines were collected in duplicate in June–July. The fourth and fifth young leaves starting from the shoot tip were taken from each hybrid plant. Grape plants, from which leaves were collected, were left unsprayed with fungicides. The disinfected leaves were placed in agar medium in Petri dishes. Visual assessment of lines resistance was carried out 6–12 days after inoculation using the OIV descriptors 452-1 ('Resistance degree of leaves to *Plasmopara viticola* in laboratory conditions (disk-test)'), 455-1 ('Resistance degree of leaves to *Erysiphe necator* in laboratory conditions (disk-test)') according to the above scale (Volynkin et al., 2021c).

Results

Resistance of grape genotypes of hybrid populations to low temperatures

Frost resistance was determined in laboratory conditions in 2019. The highest range of frost resistance variation (Fig. 1) among the genotypes of the studied cross combinations with the maternal form ♀M. 31-77-10 was observed in the population 2-11 ($-15...-27$ °C), which reflects diversity of

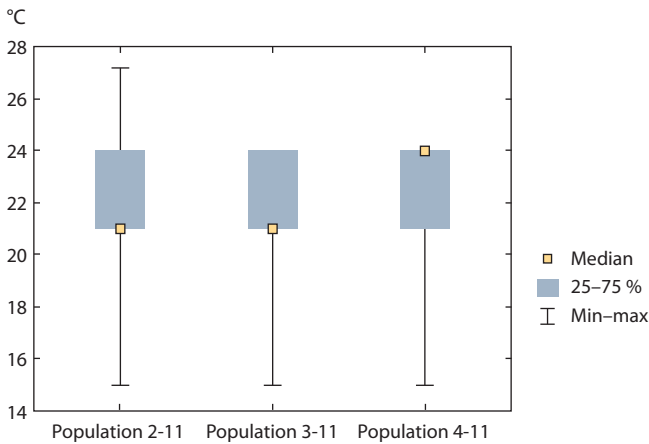


Fig. 1. Box-and-whisker plot reflecting variation of the trait “the lowest temperature in the experiment at which a plant survives” among the studied populations 2-11 (M. 31-77-10 × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790]), 3-11 (M. 31-77-10 × 2000-305-143), and 4-11 (M. 31-77-10 × 2000-305-163).

the hybrids with varying degrees of frost resistance and, as a consequence, provides a broad spectrum of valuable genotypes as a source for breeding. This conclusion is confirmed by the calculated breeding value (45.5 %) of this cross combination (Table 1). The population 4-11 is distinguished by a higher average degree of resistance to low temperatures, and is characterized by the highest breeding value among the studied hybrid populations (56.7 % of genotypes inherited the high level of resistance of parental forms).

As a result of laboratory screening of the population M. 31-77-10 × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790], about 40 % of recombinants were characterized by a high degree of frost resistance (−24 °C), and 6 % of transgressive recombinants showed a very high degree of resistance (−27 °C) (Fig. 2, see Table 1). In the populations M. 31-77-10 × 2000-305-143 and M. 31-77-10 × 2000-305-163 (see Fig. 2), 44 and 56 % of recombinants, respectively, were characterized by a high degree of frost resistance (−24 °C).

In each studied population, there were several genotypes capable of sprouting 100 % of shoots from buds after freezing at −27 °C. In populations 2-11, 3-11 and 4-11, respectively 3, 7 and 17 % of such highly viable genotypes were discovered.

A specific combining ability was observed for each population. For example, in the combination M. 31-77-10 × 2000-305-163, almost half of progeny (56.7 %) has high frost resistance, whereas genotypes with true heterosis were not detected ($Th = -16.2$). Similar principle of seedling distribution was observed in the combination of M. 31-77-10 × 2000-305-143. Hybrids of the cross M. 31-77-10 × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790] were distributed almost equally into groups of medium (42.4 %) and high (39.4 %) frost resistance. Genotypes with a true heterosis effect were identified in the population ($Th = 14.5$) (see Fig. 2).

The resistance of grape genotypes to *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* in hybrid populations

The maternal genotype ♀M. 31-77-10 is not protected by the resistance alleles in the *Run1* locus and is much more affected

Table 1. Inheritance of resistance to low temperatures by grape genotypes in hybrid populations

Indicators	Populations		
	2-11 M. 31-77-10 × × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + + DRX-M5-790]	3-11 M. 31-77-10 × × 2000-305-143	4-11 M. 31-77-10 × × 2000-305-163
Number of seedlings, pcs	66	43	30
Points of resistance in parental genotypes:			
maternal ♀	7	7	7
paternal ♂	Nd	7	7
Distribution of seedlings in populations, according to points of resistance, %			
1 point (−15 °C)	3.0	4.7	3.3
3 points (−18 °C)	9.1	18.6	6.7
5 points (−21 °C)	42.4	32.6	33.3
7 points (−24 °C)	39.4	44.2	56.7
9 points (−27 °C)	6.1	0.0	0.0
Average point of resistance to low temperatures in the population	5.7	5.3	5.9
Breeding value of the population, %	45.5	44.2	56.7
Variation coefficient, %	11.6	12.5	10.4
Hypothetic heterosis, %	−4.5	−23.9	−16.2
True heterosis (Th), %	14.5	−23.9	−16.2

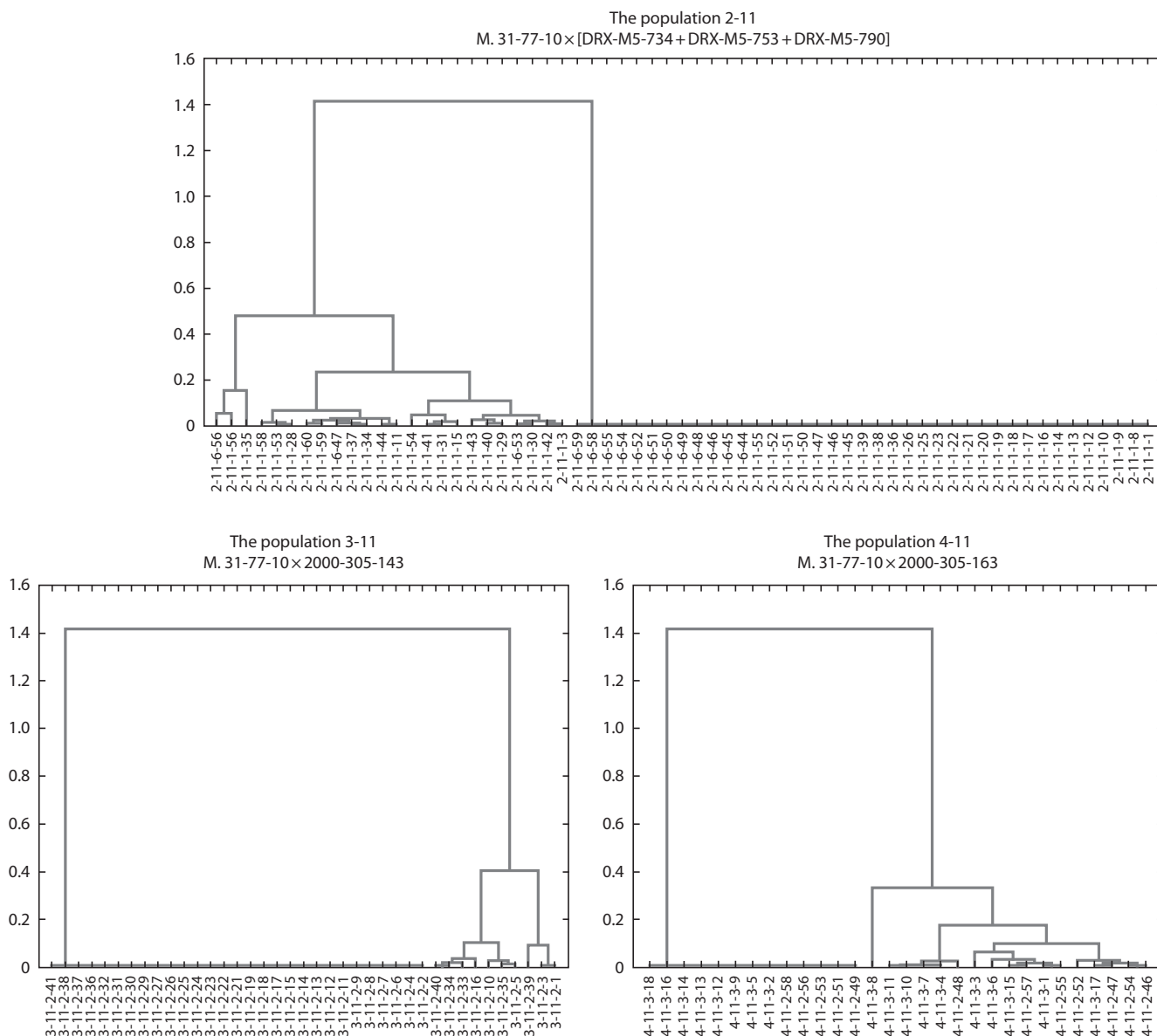


Fig. 2. Clustering of grape genotypes according to their degree of low temperature stress resistance, observed in the populations 2-11, 3-11, and 4-11.

by powdery mildew in the field compared to the paternal genotypes (e.g. 2000-305-143 and 2000-305-163) (Volynkin et al., 2021b). The percentage of oidium disease distribution on vegetative organs in the populations of recombinants varied over the years and for populations 2-11, 3-11 and 4-11 amounted to 3.2–17.1, 0.3–17.7, and 0.6–5.2 %, respectively. Due to the inheritance of resistant alleles from the paternal genome, some of the recombinant lines of hybrid populations showed a high level of resistance to *E. necator* (up to 26.7 %) (Table 2). Nevertheless, the average score for powdery mildew resistance among populations was lower than that observed for the paternal genotypes. The data obtained suggests that employing M. 31-77-10 as a parent in crosses with donors of resistance to *E. necator* allows to obtain a significant number of powdery mildew resistant genotypes in F_1 .

The average scores of resistance to *P. viticola* established in the population 3-11 (M. 31-77-10 x 2000-305-143) and in the population 4-11 (M. 31-77-10 x 2000-305-163) were interme-

diated compared to parental genotypes (Table 3). The percentage of downy mildew distribution on vegetative organs in hybrid populations fluctuated in different years and amounted to 1.3–28.3, 0.2–14.8, and 0–18.6 % for populations 2-11, 3-11 and 4-11, respectively. Employing genotypes 2000-305-143 and 2000-305-163 in cross combinations as male parents allows producing 100 % sustained progeny. Remarkably, among the progeny of the cross M. 31-77-10 x [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + DRX-M5-790] (population 2-11), 21.2 % of heterosis seedlings were observed to show the highest level of resistance (9 points).

The obtained results of the field evaluation of resistance to pathogens were confirmed by experiments on laboratory assessment of resistance using the disk test method (Volynkin et al., 2021c). The results indicate the great importance of remote hybridization of *V. vinifera* with *V. rotundifolia*, as well as derivatives of the cv. Seibel 13666 to obtain grapevine genotypes, resistant to fungi pathogens and frost.

Table 2. Inheritance of resistance to *Erysiphe necator* by grape genotypes in hybrid populations

Indicators	Populations		
	2-11	3-11	4-11
	M. 31-77-10 × × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + + DRX-M5-790]	M. 31-77-10 × × 2000-305-143	M. 31-77-10 × × 2000-305-163
Number of seedlings, pcs	66	43	30
Rating of the trait in original forms:			
maternal ♀	7	7	7
paternal ♂	Nd	9	9
Distribution of seedlings in populations, %			
1 point	0	0	0
3 points	0	0	0
5 points	34.8	25.6	6.7
7 points	59.1	62.8	66.7
9 points	6.1	11.6	26.7
Average score of resistance in the population	6.4	6.7	7.4
Breeding value of the population, %	65.2	74.4	93.3
Variation coefficient, %	17.9	17.9	14.9
Hypothetic heterosis, %	-8.2	-16.0	-7.5
True heterosis (Th), %	-8.2	-25.3	-17.8

Table 3. Inheritance of resistance to *Plasmopara viticola* by grape genotypes in hybrid populations

Indicators	Populations		
	2-11	3-11	4-11
	M. 31-77-10 × × [DRX-M5-734 + DRX-M5-753 + + DRX-M5-790]	M. 31-77-10 × × 2000-305-143	M. 31-77-10 × × 2000-305-163
Number of seedlings, pcs	66	43	30
Rating of the trait in original forms:			
maternal ♀	7	7	7
paternal ♂	Nd	9	9
Distribution of seedlings in populations, %			
1 point	0	0	0
3 points	0	0	0
5 points	22.7	0	0
7 points	56.1	55.8	46.7
9 points	21.2	44.2	53.3
Average score of resistance in the population	7.0	7.9	8.1
Breeding value of the population, %	77.3	100.0	100.0
Variation coefficient, %	19.2	12.7	12.6
Hypothetic heterosis, %	-0.43	-1.45	0.83
True heterosis (Th), %	-0.43	-12.40	-10.37

Discussion

Among all grape species, the *V. rotundifolia* Michx. is the only one having a complex of biological properties, missing in *V. vinifera* L. grape varieties (Patel, Olmo, 1955).

Vitis rotundifolia is also the only native North American ancestor, the cultivated varieties of which were obtained without any genome introgression from other species of the

Vitis genus, including *V. vinifera*. Difficulties in hybridization of genotypes of *V. vinifera* and *V. rotundifolia* are related to differences in the number of chromosomes (*V. vinifera* L., subgenus *Euvinifera*, $2n = 2x = 38$ chromosomes; *V. rotundifolia* Michx., subgenus *Muskadinia*, $2n = 2x = 40$ chromosomes). For a long time, after such interspecific crossings attempts, breeders did not get fertile plants. The first fertile hybrid (F₁)

between *V. vinifera* and *V. rotundifolia*, the N.C. 6-15 hybrid ($2n = 2x = 39$) was obtained in the USA. Using a N.C. 6-15 hybrid, cross-pollinated with an unknown variety *V. vinifera*, R.T. Dunstan (1964) obtained the remote hybrid (F_2) – DRX-55 (Dunstan *Rotundifolia* crossing symbol) ($2n = 2x = 39$). Of all remote grape hybrids, the DRX-55 was the only diploid-allotetraploid cytochimeric plant. Later on, other DRX hybrids were obtained from the same cross. By crossing remote hybrids F_4 DRX-M4-520, DRX-M4-510 ($n = 38$) with varieties GM-35-58, Cristal and Moldova, the fifth generation (F_5), combining hybrids with a somatic number of chromosomes $2n = 2x = 38$, was obtained (Alexandrov et al., 1998). Among the seedlings of hybrid population F_5 , four synthetic genotypes were discovered, carrying a new grape genome with $n = 19$ ($2n = 38$), combining chromosomes of two species *V. vinifera* and *V. rotundifolia*.

In 2011, the pollen of three forms DRX-M5-790, -753, and -734 was kindly provided by Prof. Sh. Topale (Institute Vierul, Moldova) to the ‘Magarach’ Institute for hybridization experiments. At the same time, the hybrid genotypes 2000-305-143 and 2000-305-163 were received from Prof. R. Eibach (Federal Research Institute for Grape Breeding, Geilweilerhof, Germany). Those two genotypes were obtained by crossing French breeding line MTP3082-1-42, carrying resistance loci to powdery and downy mildew, with variety ‘Regent’. The resistance loci were originally inherited from *V. rotundifolia* Michx.

In the USA, the Muscadine Grape Breeding Program is being developed in the University of Georgia. This is the oldest breeding program dedicated to the improvement of the muscadine grape. The UGA program began in 1909, and over the years has released over 30 cultivars. Current goals of the program include the development of new cultivars that combine large berry size with perfect flowers, earlier and later harvest dates, berries with dry stem scars and edible skins, and increased cold hardiness. The varieties can withstand frosts down to $-25\text{ }^\circ\text{C}$ (Morris, Brady, 2004).

Thus, *V. rotundifolia* can be considered as a potential donor of resistance genes to downy and powdery mildew pathogens in combination with frost resistance for breeding of new grape genotypes.

Conclusion

Remote hybridization involving *V. rotundifolia* can be considered as a modern and promising trend in grapevine breeding. It opens great prospects for obtaining new forms and breeding improvement of existing varieties, expands possibilities of creating new rootstocks and enriches the gene pool of cultivated grapes. It also provides a wide range of sources for breeding and conducting in-depth cytogenetic studies to reveal general patterns of diversity formation in F_1 – F_5 interspecific hybrids, as well as for developing research sources for grape genetics.

References

Alexandrov E., Topală Ș., Savin Gh. Crearea hibridilor de viță de vie apireni Folosind formele N.C. 6-15, DRX-55, DRX-58-5. In: Book of abstracts “Congr. II al Societății de Botanică din R. Moldova. Biodiversitatea Republicii în preama mileniului III”. Chișinău, 1998;111.

- Buga S.F. (Ed.). Guidelines for Certification Tests of Agricultural Fungicides. Nesvizh, Russia, 2007. (in Russian)
- Chernomorets M.V. Resistance of a Grape Plant to Low Temperature. Chisinau: Cartya Moldovenienasca, 1985. (in Russian)
- Clark J.R., Barchenger D.W. Breeding Muscadine grapes in Arkansas, USA: a new initiative. *Acta Hort.* 2015;1082:95-98. DOI 10.17660/ActaHortic.2015.1082.12.
- Di Gaspero G., Cipriani G., Adam-Blondon A.-F., Testolin R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for *R*-gene candidates. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1249-1263. DOI 10.1007/s00122-007-0516-2.
- Dunstan R.T. Hybridization of *Euvitis* × *Vitis rotundifolia*: backcrosses to muscadine. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1964;84:238-242.
- Gonçalves E., Carrasquinho I., Almeida R., Pedroso V., Martins A. Genetic correlations in grapevine and their effects on selection. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2016;22:52-63. DOI 10.1111/ajgw.12164.
- Ilnitskaya E., Guguchkina T., Talash A. New cold-tolerant grapevine cultivars for red wines. *Acta Hort.* 2019;1248:95-99. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1248.14.
- Ivanisević D., Di Gaspero G., Korać N., Foria S., Cindrić P. Grapevine genotypes with combined downy and powdery mildew resistance. *Acta Hort.* 2015;1082:47-50. DOI 10.17660/ActaHortic.2015.1082.4.
- Korbuly J. Results of breeding for resistance to winter frosts and different pathogens using *Vitis amurensis*. *Acta Hort.* 2000;528:551-557. DOI 10.17660/ActaHortic.2000.528.80.
- Korbuly J., Pernesz G., Pedryc A., Oláh R., Jahnke G.G. Evaluation of frost resistance of traditional and newly bred Hungarian wine-grape cultivars. *Acta Hort.* 2004;652:337-341. DOI 10.17660/ActaHortic.2004.652.43.
- Kozma P., Jr. Evaluation of fungus-resistant wine-grape varieties. *Acta Hort.* 1998;473(473):93-104. DOI 10.17660/ActaHortic.1998.473.9.
- Likhovskoy V.V., Zarmaev A.A., Zlenko V.A., Vasylyk I.A., Rybachenko N.A. Identification of new sources of frost resistance in grapevine cultivars and hybrids of complex genetic structure. *Magarach. Vinogradarstvo i Vinodeliye = Magarach. Viticulture and Winemaking.* 2019;21(3):186-190. DOI 10.35547/IM.2019.21.3.001. (in Russian).
- Maltabar L.M., Zhdamarova O.E. On the issue of diagnosing frost resistance of eyes in grape varieties. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture in the South of Russia.* 2012;17(5):79-86. (in Russian).
- Morris J.R., Brady P.L. The muscadine experience: adding value to enhance profits. *Research Reports and Research Bulletins. AAES Res. Rep.* 974. 2004.
- Nenko N.I., Ilyina I.A., Kiseleva G.K., Yablonskaya E.K. Low-temperature stress tolerance of grapevine varieties of different ecological and geographical origin. *Proc. Latvian Acad. Sci. Sect. B.* 2019; 73(1):56-65. DOI 10.2478/prolas-2018-0046.
- Novikova L.Yu., Naumova L.G. Regression analysis of winter hardiness of grape cultivars from Ya.I. Potapenko Don Ampelographic collection. *Magarach. Vinogradarstvo i Vinodeliye = Magarach. Viticulture and Winemaking.* 2018;4:59-61. (in Russian).
- Patel G.I., Olmo H.P. Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid *V. vinifera* × *V. rotundifolia*. *Am. J. Bot.* 1955;42:149-159.
- Pavloušek P., Postbiegl E. Genetic resources of grapevine in lednice na Morave. *Acta Hort.* 2003;603:605-608. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.603.81.
- Pogosyan S.A. Guidelines for the Selection of Grapes. Yerevan: Hayastan Publ., 1974. (in Russian).
- Polulyakh A.A., Volynkin V.A., Likhovskoy V.V. Genetic resources of grapes of the Magarach Institute. Conservation problems and prospects. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(6):608-616. DOI 10.18699/VJ17.276. (in Russian).

- Read P.E., Gu S., Gamet S., Schild J. Testing of varieties and selections under challenging climatic conditions. *Acta Hort.* 2004;652:65-72. DOI 10.17660/ActaHortic.2004.652.6.
- Ricciardi V., Marciàno D., Sargolzaei M., Maddalena G., Maghradze D., Tirelli A., Casati P., Bianco P.F., Failla O., Fracassetti D., Toffolatti S.L., De Lorenzis G. From plant resistance response to the discovery of antimicrobial compounds: the role of volatile organic compounds (VOCs) in grapevine downy mildew infection. *Plant Physiol. Biochem.* 2021;160:294-305. DOI 10.1016/j.plaphy.2021.01.035.
- Shen Q., Lin Y., Li Y., Wang G. Dynamics of H3K27me3 modification on plant adaptation to environmental cues. *Plants.* 2021;10:1165. DOI 10.3390/plants10061165.
- Ulitin V.O., Nudga T.A. Some hereditary patterns of manifestation of frost resistance of groups of grapes of various origin under conditions of model freezing. *Nauka Kubani = Science of the Kuban.* 2008;4:38-43. (in Russian)
- Vasylyk I.A., Likhovskoy V.V., Zarmaev A.A., Zlenko V.A., Rybachenko N.A. Diagnostics of frost resistance of grape varieties in the conditions of stress modeling. *Magarach. Vinogradarstvo i Vinodelie = Magarach. Viticulture and Winemaking.* 2020;22(2):105-110. DOI 10.35547/IM.2020.17.22.004. (in Russian)
- Vavilov N.I. Theoretical Foundations of Breeding. Moscow, 1987. (in Russian)
- Volynkin V.A., Gorislavets S.M., Volodin V.A., Vasylyk I.A., Lushchay E., Likhovskoi V.V., Potokina E.K. Immunogenic breeding program. Stage I – phytopathological screening of the grape gene pool. In: E3S Web of Conferences. FARBA 2021. 2021c;254:03003. DOI 10.1051/e3sconf/202125403003.
- Volynkin V., Levchenko S., Polulyah A., Likhovskoi V. Models for estimation of the existing grapevine gene pool biodiversity and for the breeding of new cultivars. *Acta Hort.* 2018;1190:15-20. DOI 10.17660/ActaHortic.2018.1190.3.
- Volynkin V., Levchenko S., Vasylyk I., Likhovskoi V. Analysis of F₂–F₆ generations from hybridization with *Vitis rotundifolia* at the Institute Magarach. *Acta Hort.* 2020a;1289:269-274. DOI 10.17660/ActaHortic.2020.1289.38.
- Volynkin V., Likhovskoi V., Levchenko S., Vasylyk I., Ryff I., Berezovskaya S., Boyko V., Belash D. Modern trends of breeding cultivars for recreational areas of viticulture. *Acta Hort.* 2021a;1307:13-20. DOI 10.17660/ActaHortic.2021.1307.3.
- Volynkin V., Likhovskoy V., Polulyakh A., Levchenko S., Ostroukhova E., Vasylyk I., Peskova I. Native grape varieties of the Euro-Asian eco-geographical region of Russia: taxonomic, biological and agro-economic specificity of cultivars from Crimea. In: *Vitis: Biology and Species.* New York: Nova Sci. Publ., 2020b;45-72.
- Volynkin V., Polulyah A., Klimenko V., Likhovskoi V., Oleinikov N., Levchenko S., Pavlova I.A., Zlenko V., Kotolovets Z., Pytel I., Roshka N. Breeding for Ukrainian table grape varieties. *VITIS – J. Grapevine Res.* 2015;54(Spec.iss.):157-158. DOI 10.5073/vitis.2015.54.special-issue.157-158.
- Volynkin V., Polulyakh A., Levchenko S., Vasylyk I.A., Likhovskoy V.V. Aspects of the particular genetics of grapes prolonged for all horticulture crops. In: Kossi Baimey H. (Ed.). *Horticultural Crops.* London: IntechOpen, 2020c. DOI 10.5772/intechopen.90566.
- Volynkin V., Polulyakh A., Levchenko S., Vasylyk I. Genome evolution and genetic diversity of grapes. *Acta Hort.* 2020d;1297:407-412. DOI 10.17660/ActaHortic.2020.1297.54.
- Volynkin V., Vasylyk I., Volodin V., Grigoreva E., Karzhaev D., Lushchay E., Ulianich P., Volkov V., Risovannaya V., Blinova S., Alekseev J., Gorislavets S., Likhovskoi V., Beatovic A., Potokina E. The assessment of agrobiological and disease resistance traits of grapevine hybrid populations (*Vitis vinifera* L. × *Muscadinia rotundifolia* Michx.) in the climatic conditions of Crimea. *Plants.* 2021b;10(6):1215. DOI 10.3390/plants10061215.
- Xiaoyan L., Lianguo L., Jinyin W., Yan L., Jinli G. Introduction experiment of the cold resistant wine grape cultivar 'Frontenac'. *Acta Hort.* 2015;1082:61-62. DOI 10.17660/ActaHortic.2015.1082.6.
- Zlenko V.A., Volynkin V.A., Vasylyk I.A. Frost-resistance of new grape varieties and hybrids of complex genetic structure. In: LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE. Chișinău, 2018;47:243-247.

ORCID ID

V.A. Volynkin orcid.org/0000-0002-8799-1163
V.V. Likhovskoi orcid.org/0000-0003-3879-0485
I.A. Vasylyk orcid.org/0000-0002-8231-0613
N.A. Rybachenko orcid.org/0000-0001-5976-3756
E.A. Lushchay orcid.org/0000-0002-5695-5936
S.M. Gorislavets orcid.org/0000-0002-6749-8048
V.A. Volodin orcid.org/0000-0002-2842-6092
V.I. Risovannaya orcid.org/0000-0003-2208-798X
E.K. Potokina orcid.org/0000-0002-2578-6279

Acknowledgements. The work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 20-16-00060).

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

Received July 29, 2021. Revised August 26, 2021. Accepted August 27, 2021.

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

Получение и характеристика линии мягкой пшеницы (Тулайковская 10 × Саратовская 29) с интрогрессией хромосомы пырея *Thinopyrum intermedium* 6Agi2

Ю.Н. Иванова¹✉, К.К. Розенфрид², А.И. Стасюк³, Е.С. Сколотнева¹, О.Г. Силкова¹

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

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

³ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ kabanenko@bionet.nsc.ru

Аннотация. Пырей промежуточный *Thinopyrum intermedium* является источником агрономически ценных признаков для мягкой пшеницы, для передачи которых используют частичные пшенично-пырейные амфидиплоиды и линии с замещением хромосомами пырея. С использованием линии Агис 1 создан сорт яровой мягкой пшеницы Тулайковская 5, который входит в родословную сорта Тулайковская 10. В геноме сорта хромосома пшеницы 6D замещена хромосомой пырея 6Agi2, несущей комплексную устойчивость к грибным заболеваниям в различных эколого-географических зонах. В данной работе изучен характер передачи хромосомы пырея 6Agi2 в гибридных популяциях сортов Саратовская 29 × Тулайковская 10 (C29 × T10) и Тулайковская 10 × Саратовская 29 (T10 × C29). Хромосома пырея 6Agi2 идентифицирована с помощью хромосомспецифичных праймеров и методом геномной *in situ* гибридизации. Согласно молекулярному анализу, хромосома 6Agi2 передавалась почти половине изученных растений в F₂ и F₃ поколениях. В F₅ поколении T10 × C29 с помощью GISH выделена и охарактеризована новая селекционная линия 49-14 (2n = 42) с парой хромосом 6Agi2. По результатам эксперимента в полевых условиях 2020 г. линия имела высокие показатели продуктивности. Масса зерен с растения (10.04 ± 0.93 г) и число зерен с растения (259.36 ± 22.49) достоверно не отличались от родительских сортов. Число зерен на колосок в главном колосе у линии 49-14 было достоверно выше, чем у сортов C29 (при p ≤ 0.001) и T10 (при p ≤ 0.05). Растения характеризовались способностью завязывать 3.77 ± 0.1 зерна на колосок, размах изменчивости признака варьировал от 2.93 до 4.62 у индивидуальных растений. Содержание белка в зерне составило 17.91 %, клейковины – 40.55 %. Согласно скринингу на устойчивость к грибным болезням, проведенному в полевых условиях 2018 и 2020 гг., хромосома 6Agi2 сохраняет у растений иммунитет к западносибирской популяции бурой ржавчины и к доминантным расам стеблевой ржавчины, а также обеспечивает средний устойчивый и средний восприимчивый типы реакции к возбудителям желтой ржавчины. Обсуждается возможность использования линий/сортов мягкой пшеницы, несущих хромосомы пырея 6Agi2, в селекции на увеличение содержания белка в зерне, на устойчивость к листовыебелым заболеваниям и на создание многоцветковых форм.

Ключевые слова: чужеродная интрогрессия; замещение хромосом; GISH; молекулярный анализ; стеблевая ржавчина; бурая ржавчина; желтая ржавчина; *Thinopyrum intermedium*; мягкая пшеница.

Для цитирования: Иванова Ю.Н., Розенфрид К.К., Стасюк А.И., Сколотнева Е.С., Силкова О.Г. Получение и характеристика линии мягкой пшеницы (Тулайковская 10 × Саратовская 29) с интрогрессией хромосомы пырея *Thinopyrum intermedium* 6Agi2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(7):701-712. DOI 10.18699/VJ21.080

Raise and characterization of a bread wheat hybrid line (Tulaykovskaya 10 × Saratovskaya 29) with chromosome 6Agi2 introgressed from *Thinopyrum intermedium*

Yu.N. Ivanova¹✉, K.K. Rosenfread², A.I. Stasyuk³, E.S. Skolotneva¹, O.G. Silkova¹

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

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ kabanenko@bionet.nsc.ru

Abstract. Wheatgrass *Thinopyrum intermedium* is a source of agronomically valuable traits for common wheat. Partial wheat-wheatgrass amphidiploids and lines with wheatgrass chromosome substitutions are extensively used as intermediates in breeding programs. Line Agis 1 (6Agi2/6D) is present in the cultivar Tulaykovskaya 10 pedigree. Wheatgrass chromosome 6Agi2 carries multiple resistance to fungal diseases in various ecogeographical zones. In this work, we studied the transfer of chromosome 6Agi2 in hybrid populations Saratovskaya 29 × Tulaykov-

skaya 10 (S29×T10) and Tulaykovskaya 10×Saratovskaya 29 (T10×S29). Chromosome 6Agi2 was identified by PCR with chromosome-specific primers and by genomic *in situ* hybridization (GISH). According to molecular data, 6Agi2 was transmitted to nearly half of the plants tested in the F₂ and F₃ generations. A new breeding line 49-14 (2n = 42) with chromosome pair 6Agi2 was isolated and characterized in T10×S29 F₅ by GISH. According to the results of our field experiment in 2020, the line had high productivity traits. The grain weights per plant (10.04 ± 0.93 g) and the number of grains per plant (259.36 ± 22.49) did not differ significantly from the parent varieties. The number of grains per spikelet in the main spike was significantly higher than in S29 ($p \leq 0.001$) or T10 ($p \leq 0.05$). Plants were characterized by the ability to set 3.77 ± 0.1 grains per spikelet, and this trait varied among individuals from 2.93 to 4.62. The grain protein content was 17.91 %, and the gluten content, 40.55 %. According to the screening for fungal disease resistance carried out in the field in 2018 and 2020, chromosome 6Agi2 makes plants retain immunity to the West Siberian population of brown rust and to dominant races of stem rust. It also provides medium resistant and medium susceptible types of response to yellow rust. The possibility of using lines/varieties of bread wheat with wheatgrass chromosomes 6Agi2 in breeding in order to increase protein content in the grain, to confer resistance to leaf diseases on plants and to create multiflowered forms is discussed.

Key words: alien introgression; chromosome substitution; GISH; molecular analysis; stem rust; brown rust; yellow rust; *Thinopyrum intermedium*; bread wheat.

For citation: Ivanova Yu.N., Rosenfread K.K., Stasyuk A.I., Skolotneva E.S., Silkova O.G. Raise and characterization of a bread wheat hybrid line (Tulaykovskaya 10×Saratovskaya 29) with chromosome 6Agi2 introgressed from *Thinopyrum intermedium*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):701-712. DOI 10.18699/VJ21.080

Введение

Дикорастущие многолетние родственные виды мягкой пшеницы рода Пырей (*Thinopyrum*) обладают широчайшим полиморфизмом и являются источником комплекса хозяйственно ценных качеств: устойчивости к грибным и вирусным заболеваниям (Friebe et al., 1996; Li H., Wang, 2009; Крупин и др., 2013, 2019; Давоян и др., 2015; Леонова, 2018), толерантности к засоленным почвам, засухе, а также характеризуются высоким содержанием белка в зерне (Цицин, 1954; Упельник и др., 2012). К роду *Thinopyrum* относят около 20 видов с различной ploидностью: ди-, аллотетра-, аллогекса-, окто- и декаплоиды (Wang R., 2011). Наиболее интенсивно используют генетический материал двух видов – пырея удлиненного *Th. elongatum* (*Agropyron elongatum*) и пырея промежуточного *Th. intermedium* (*Ag. glaucum*). От этих видов в геном мягкой пшеницы переданы гены устойчивости к бурой ржавчине (*Lr19*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr38*), стеблевой ржавчине (*Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr43*, *Sr44*), мучнистой росе (*Pm40*, *Pm43*), вирусу желтой карликовости ячменя (*Bdv2*), вирусу полосатой мозаики пшеницы (*Wsm1*) (Li H., Wang, 2009).

Первые жизнеспособные пшенично-пырейные гибриды были получены Н.В. Цициным в период с 1930 по 1933 г. при скрещивании диплоидной, тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы с *Ag. elongatum* и *Ag. glaucum* (Цицин, 1954). В результате этих работ были созданы октоплоидные формы многолетних и отрастающих пшениц (промежуточных пшенично-пырейных гибридов – ПППГ) (Цицин, 1954; Упельник и др., 2012). Гибридизация пшеницы и растений видов рода *Thinopyrum* проводилась также в США, Германии, Канаде, Китае. Получены и охарактеризованы различные гибридные формы: частичные амфилоиды, дополненные, замещенные и транслоцированные линии с высоким содержанием белка, а также устойчивые к вирусу желтой карликовости ячменя и полосатой мозаики пшеницы, мучнистой росе, желтой, бурой, стеблевой ржавчинам (Friebe et al., 1996; Fedak, Han, 2005; Li H., Wang, 2009; Chang et al., 2010; Hu L. et al., 2011; Fu et al., 2012; Zeng J. et al., 2013; Bao et al., 2014; Zheng et al., 2014; Danilova et al., 2017; Li D. et al., 2018).

В мировой практике для передачи ценных признаков мягкой пшенице широко используются частичные пшенично-пырейные амфидиплоиды (Jiang et al., 1993; Fedak, Han, 2005). В России в НИИСХ Юго-Востока и Самарском НИИСХ с использованием ПППГ созданы две устойчивые к грибным заболеваниям группы коммерческих сортов мягкой пшеницы, в геноме которых хромосома пшеницы 6D замещена хромосомой пырея *Th. intermedium* 6Agi. Хромосомы 6Agi1 и 6Agi2 не идентичны, так как имеют различный характер локализации С-бэндов при окрашивании Гимзой (Сибикеев и др., 2017). Источником хромосомы 6Agi1 в первом случае послужили замещенная линия С29-Агро139-М2-2, полученная от скрещивания сорта яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 с ПППГ 139, и Многолетка 2 с дальнейшей рекомбинацией дополненных пырейных хромосом между собой (Сибикеев и др., 2017). Для сортов самарской селекции (Тулайковская 5, Тулайковская 10, Тулайковская 100) источником хромосомы пырея 6Agi2 была замещенная линия Агис 1, полученная от скрещивания сорта Саратовская 29 с ПППГ 644 (Синиговец, 1976, 1988).

С 1984 г., когда сорт Тулайковская 5 был включен в Государственный реестр селекционных достижений, сорта самарской селекции с интрогрессией хромосомы пырея сохраняют комплексную устойчивость к бурой ржавчине и мучнистой росе в различных эколого-географических регионах России (Salina et al., 2015; Leonova et al., 2017). Показано, что *Lr*-гены у хромосомы 6Agi2 не аллельны генам *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr47*, а по типу реакции на заражение изолятами *Puccinia triticina* Eriks. подтверждена неаллельность генам *Lr19* и *Lr38* (Сибикеев и др., 2017). Тест на устойчивость к бурой ржавчине у гибридов F₂ и F₃ восприимчивых сортов с сортом Тулайковская 10 установил, что хромосома 6Agi2 несет локус устойчивости к западно-сибирской расе бурой ржавчины (Salina et al., 2015). Однако на сегодняшний день не известно количество копий генов устойчивости на хромосоме 6Agi2, как и не определена локализация генных локусов на этой хромосоме.

Для выявления генетического материала видов пырея в геноме мягкой пшеницы разрабатываются молекулярные

и цитогенетические маркеры (Han F. et al., 2004; Li G. et al., 2016; Cseh et al., 2019; Kroupin et al., 2019). Существует ряд молекулярных маркеров, специфичных для генома *Th. intermedium*, таких как микросателлиты (SSR) (Ayala-Navarrete et al., 2010), маркеры на основе экспрессирующихся последовательностей (EST) (Wang M.J. et al., 2010; Danilova et al., 2017), маркеры амплифицированных фрагментов специфичного локуса (SLAF) (Li G. et al., 2016). Известно несколько специфичных для вида *Pseudoroegneria spicata* (St-геном) RFLP (Zhang Z.Y. et al., 2001), SCAR (Liu et al., 2007) и ISSR (Zeng Z.-X. et al., 2008) маркеров, разработанных для идентификации отдельных хромосом St-генома. Для определения соответствия пырейных хромосом гомеологичной группе мягкой пшеницы используют уникальные генные ПЦР (PLUG) маркеры (Ishikawa et al., 2009; Hu L. et al., 2014), а также SNP маркеры (Cseh et al., 2019; Ma et al., 2019). Е.А. Салиной с коллегами (2016) разработаны маркеры, специфичные к длинному и короткому плечам хромосомы пырея *Th. intermedium* 6Agi2.

Сорта самарской селекции используют в отечественных селекционных программах (Мартынов и др., 2016; Леонова, 2018). В связи с этим целью нашей работы было получить селекционный материал с интрогрессией хромосомы пырея и изучить его по хозяйственно ценным признакам, а также проанализировать особенности передачи хромосомы пырея *Th. intermedium* 6Agi2 сорта Тулайковская 10 на примере гибридной популяции с сортом пшеницы Саратовская 29, который является стандартом качества зерна. Для идентификации хромосомы 6Agi2 применялись ДНК маркеры, специфичные к длинному и короткому плечам этой хромосомы, а также геномная *in situ* гибридизация.

Материалы и методы

Растительный материал. Использованы сорта яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 (С29) и Тулайковская 10 (Т10), а также гибриды С29 × Т10 F₂, F₃ поколений и Т10 × С29 F₂–F₆ поколений, полученные от самоопыления гибридов F₁. Сорта С29 и Т10 относятся к группе среднеспелых. Сорт С29 сильно восприимчив к листовым заболеваниям. Сорт Т10 характеризуется иммунитетом к листовой бурой ржавчине, в средней степени поражается мучнистой росой (<https://samniish.ru/pshenica-myagkaya-yarovaya-sort-tulajkovskaya-10.html>).

Гибриды F₂, F₃ С29 × Т10 и F₂, F₃ и F₅ поколений Т10 × С29 выращивали в условиях гидропонной теплицы ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» ФИЦ ИЦиГ СО РАН осенью 2017 и весной 2019 и 2020 гг. соответственно. Температурный режим: 22 °С – день, 16 °С – ночь, продолжительность периодов день/ночь – 16 ч/8 ч. Гибриды Т10 × С29 F₄ и F₆ выращивали в полевых условиях Мошковского района Новосибирской области летом 2018 и 2020 гг. соответственно, координаты местоположения 55.14° с. ш., 83.63° в. д.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Митотические и мейотические препараты для FISH готовили по описанной ранее методике (Иванова и др., 2019). Анализировали мейоциты на стадии метафазы I (MI).

В работе использовали: пробу *Aegilops tauschii* pAet6-09, специфичную для центромерных повторов хромосом риса, пшеницы, ржи и ячменя (Zhang P. et al., 2004), и геномную ДНК пырея, выделенную из образца растений вида *Th. intermedium*. Образец ДНК повтора pAet6-09 любезно предоставлен Dr. A. Lukaszewski (Университет Риверсайд, Калифорния, США). Все препараты анализировали при помощи микроскопа Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия). Изображения регистрировали камерой ProgRes MF (Meta Systems, Jenoptik) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН и обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS2.

ДНК растений выделяли из молодых листьев гибридов и контрольных растений при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, No. K0512) по методике производителя.

ПЦР-анализ проводили с помощью праймеров MF2/MR1r2 (длина ПЦР-фрагмента 347 п. н.) к длинному плечу хромосомы 6Agi2L *Th. intermedium*, Te6HS476 (длина ПЦР-фрагмента 200 п. н.) к короткому плечу хромосомы 6Agi2S *Th. intermedium* и MF2/MR4 (длина ПЦР-фрагмента 328 п. н.) к длинному плечу хромосомы 6DL, разработанных в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений ФИЦ ИЦиГ СО РАН (Салина и др., 2016). ПЦР проводили на амплификаторе Bio-Rad T-100 Thermal Cycler, разделение продуктов ПЦР – в 1.5 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия, визуализацию – с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Оценка хозяйственно ценных признаков. Потомство F₄ Т10 × С29, отобранное с помощью молекулярных маркеров, оценивали в полевых условиях 2018 г. по признакам «устойчивость к бурой ржавчине *Puccinia triticina* Eriks.» и «устойчивость к стеблевой ржавчине *P. graminis* Pers.». Потомство F₆, отобранное с помощью молекулярно-цитогенетического анализа, оценивали в полевых условиях 2020 г. по признакам: «устойчивость к бурой ржавчине *P. triticina* Eriks.», «устойчивость к стеблевой ржавчине *P. graminis* Pers.», «устойчивость к желтой ржавчине *P. glumarum* Eriks. et Henn.», «период всходы–цветение», «высота растения», «продуктивная кустистость», «длина главного колоса», «число колосков главного колоса», «число зерен главного колоса», «масса зерен главного колоса», «число зерен на колосок главного колоса», «число зерен с растения», «масса зерен с растения», «масса 1000 зерен», «содержание белка и клейковины в зерне». Посев был проведен 9 мая 2020 г. Делянки шириной 70 см, по 15 зерен в ряду, расстояние между рядами 25 см.

Степень поражения растений грибными заболеваниями оценивали по шкале СИММУТ (Койшыбаев и др., 2014). Содержание белка и клейковины в зерне определяли на инфракрасном экспресс-анализаторе зерна OmegaAnalyzer G (Bruins, Германия). Периодом «всходы–цветение» считали время от массовых всходов до появления первых желтых пыльников в средних колосках колоса. Дату цветения отмечали у индивидуальных колосьев. При определении достоверности различий между средними значениями двух выборочных совокупностей использовали *t*-критерий Стьюдента.

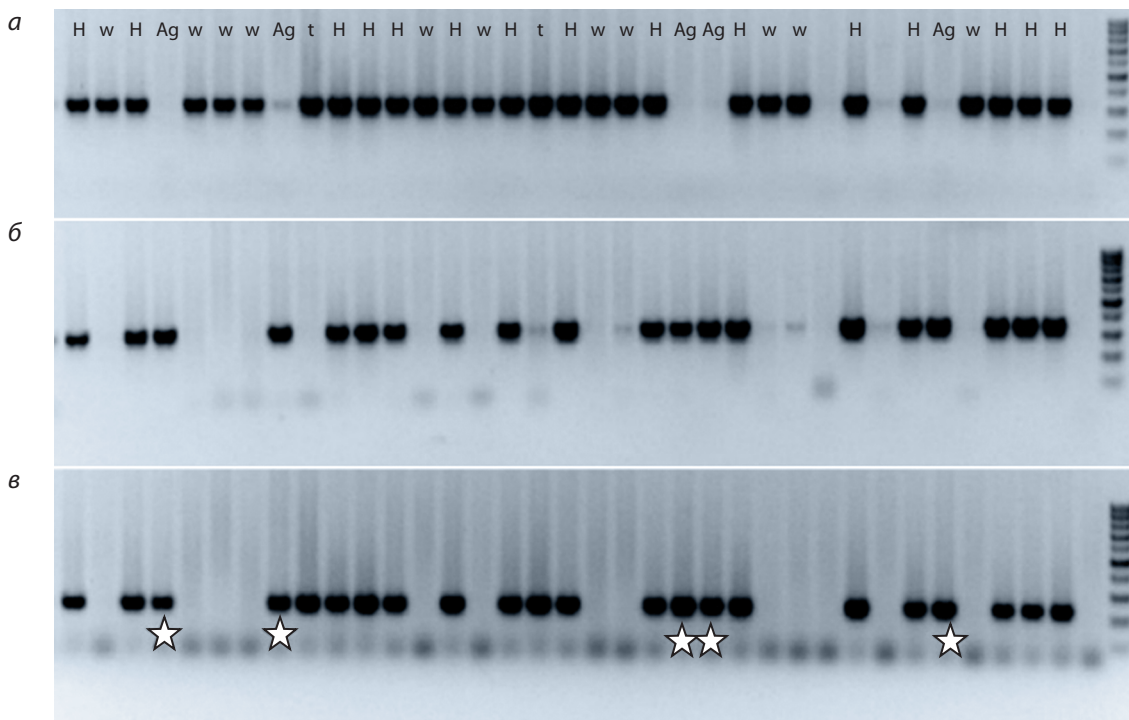


Рис. 1. Электрофореграмма амплификации маркеров к длинному плечу хромосомы 6DL (а), к короткому (б) и длинному (в) плечам хромосомы пырея 6Agi у растений F₂ поколения скрещивания C29 × T10.

Звездочкой выделены растения с замещением 6Agi2/6D. Пояснения см. в тексте и в табл. 1.

Таблица 1. Наличие хромосом или отдельных плечей хромосомы в F₂₋₃ поколениях гибридов C29 × T10 и T10 × C29 по данным ПЦР

Поколение гибридов	Изучено образцов ДНК	Только 6AgiL (t-тип)	Только 6AgiS (t-тип)	Присутствует 6Agi (Ag-тип или H-тип)	Отсутствует 6Agi (w-тип)
		число/%			
F ₂ C29 × T10	116	9/7.56	7/5.88	50/41.8	48/40.34
F ₃ C29 × T10	20	2/10	4/20	3/15	11/55
F ₂ T10 × C29	45	0	14/31.1	12/26.7	19/42.2
F ₃ T10 × C29	35	1/2.86	4/11.43	14/40	16/45.71

Результаты

Идентификация хромосомы пырея 6Agi2 в F₂₋₃ поколениях гибридов C29 × T10 и T10 × C29 с помощью хромосомоспецифичных праймеров

В F₁ поколении гибридов C29 × T10 и T10 × C29 хромосомы пырея 6Agi2 и пшеницы 6D находились в унивалентном состоянии. Поэтому, согласно ПЦР-анализу с использованием специфичных праймеров к хромосоме пырея, в F₂ поколении были обнаружены образцы ДНК с отсутствием или амплификацией ДНК. Среди 116 и 45 образцов ДНК из растений поколения F₂ C29 × T10 и T10 × C29 соответственно были выделены образцы с отсутствием фрагментов амплификации с использованием двух пар праймеров к короткому и длинному плечам хромосомы 6Agi2 и амплификацией маркера к хромосоме 6D, что указывало на отсутствие замещения 6Agi2/6D

в изученных образцах (пшеничный тип – w-тип) (рис. 1, табл. 1).

У образцов с амплификацией маркеров только к короткому или только к длинному плечу было также показано присутствие хромосомы 6D, что свидетельствовало о присутствии телоцентриков (t-тип, см. рис. 1, табл. 1). Всего в изученных образцах второго и третьего поколения было выявлено 12 телоцентриков по длинному плечу и 29 телоцентриков по короткому плечу. Соотношение телоцентриков по короткому и длинному плечу существенно отличалось от направления скрещивания. В случае комбинации T10 × C29 телоцентрики по длинному плечу встречались очень редко.

Наличие фрагментов амплификации с двумя маркерами к короткому и длинному плечу указывало на присутствие целой хромосомы 6Agi2, причем в зависимости от присутствия хромосомы 6D можно говорить или о полном

замещении 6Agi2/6D (Ag-тип), или о гетерозиготном состоянии хромосомы у данных образцов (H-тип).

Для дальнейшего анализа были отобраны растения с амплификацией маркеров к короткому и длинному плечам хромосомы пырея.

Анализ кариотипов у растений T10 × C29 поколения F₅

Чтобы уточнить присутствие в кариотипах одной или двух хромосом пырея, а также подтвердить стабильность наследования замещения, проведено окрашивание митотических хромосом с помощью геномной *in situ* гибридизации на различных этапах самоопыления. Анализ кариотипов растений, несущих замещение согласно ПЦР-анализу, выявил 42 хромосомы, среди которых обнаружены две целые хромосомы пырея (рис. 2), на длинном плече которых расположен крупный субтеломерный гетерохроматиновый блок, что соответствует распределению С-блоков на хромосоме 6Agi2 в кариотипе сорта Тулайковская 10 (Сибикеев и др., 2017). Локализация центромероспецифичного повтора рAct6-09 на хромосомах пырея характеризовалась слабой интенсивностью сигналов, что демонстрирует плохую гибридизацию повтора с центромерной ДНК хромосом пырея.

Метод *in situ* гибридизации подтвердил стабильность наследования замещения 6Agi2/6D в поколениях.

Изучение хозяйственно ценных признаков у растений T10 × C29 поколений F₅ и F₆

Сорт T10 входит в родословные современных сортов мягкой пшеницы. Он используется в создании новых форм благодаря наличию локуса устойчивости к листовой бурой ржавчине, который расположен на хромосоме пырея 6Agi2. Несмотря на замещение хромосомы 6D чужеродной хромосомой 6Agi2, T10 характеризуется высокими показателями урожайности, засухоустойчивостью и хорошими хлебопекарными качествами (<https://samniish.ru/pshenica-myagkaya-yarovaya-sort-tulajkovskaya-10.html>).

Из потомства F₄ растений T10 × C29, у которых идентифицированы хромосомы пырея, были созданы три линии: 33-2, 34-1 и 35-45. Анализ продуктивности растений сортов T10, C29 и линий F₅ T10 × C29, выращенных в условиях гидропонной теплицы, показал, что все линии превосходят сорт T10 с высокой достоверностью по всем показателям (табл. 2). В сравнении с сортом C29 все линии не отличались по продуктивной кустистости, линии 34-1 и 35-45 не отличались по таким показателям, как число

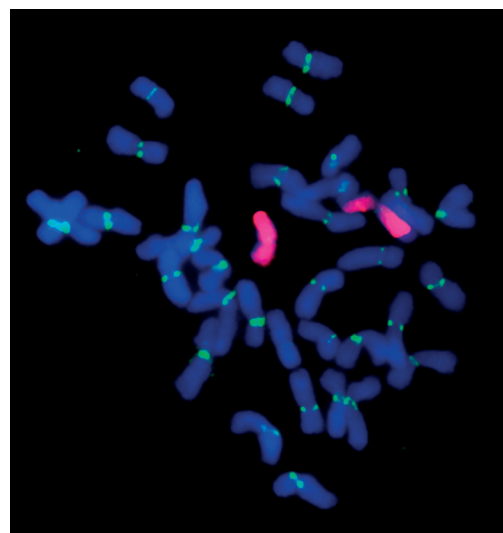


Рис. 2. Кариотип гибрида F₅ T10 × C29. Геномная *in situ* гибридизация. Красным окрашены две хромосомы пырея, зеленым – центромерные районы хромосом.

зерен с растения и масса зерен с растения, а у линии 33-2 эти показатели были достоверно ниже. Ни одна из линий не превзошла сорт C29 по массе 1000 зерен, этот показатель был достоверно ниже.

Далее был проведен индивидуальный отбор наиболее продуктивных растений из F₅ поколения линии 35-45 с целью изучения элементов продуктивности, а также продолжительности межфазного периода «всходы–цветение» у растений, выращенных в полевых условиях 2020 г. Для эксперимента из отобранной расщепляющейся линии 35-45 была выделена повторная линия 49-14.

По результатам фенологических наблюдений, период «всходы–цветение» у линии 49-14 оказался самым коротким (50.6 дня), у сортов C29 и T10 длиннее на 1 день. Продолжительность периода цветения, отмеченная у главных колосьев индивидуальных растений, составила 11, 10 и 9 дней соответственно у линии 49-14 и сортов T10, C29.

Сравнительный анализ по элементам продуктивности у линии 49-14 и сортов C29, T10 не выявил различий в значениях таких показателей, как длина главного колоса, масса зерен в главном колосе, масса зерен с растения, число зерен с растения (табл. 3). Растения линии 49-14 были достоверно выше сорта T10 и не отличались по высоте от растений сорта C29. Значения показателей «про-

Таблица 2. Сравнительный анализ линий с сортами C29 и T10 по элементам продуктивности (весна 2019 г.)

Показатель	T10	C29	33-2	34-1	35-45
Продуктивная кустистость, шт.	3.3 ± 0.03	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.2###	5.1 ± 0.2###	5.5 ± 0.3###
Число зерен с растения, шт.	60.5 ± 2.8	154.0 ± 8.9	109.7 ± 5.8****	165.3 ± 6.5###	186.5 ± 8.5****
Масса зерен с растения, г	2.3 ± 0.1	6.8 ± 0.4	3.9 ± 0.2****	6.4 ± 0.3###	7.6 ± 0.4###
Масса 1000 зерен, г	39.1 ± 0.4	43.9 ± 0.6	35.1 ± 0.9****	38.5 ± 0.3****	41.05 ± 0.5****
Всего растений	43	28	47	57	57

* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$ – достоверные различия значений линий и сорта C29.

$p \leq 0.001$ – достоверные различия значений линий и сорта T10.

Таблица 3. Элементы продуктивности и качества зерна потомства линии 49-14 и сортов Т10, С29 (лето 2020 г.)

Показатель	С29	Линия 49-14	Т10
Высота растения, см	108.33 ± 1.63	106.25 ± 1.44	98.54 ± 1.32 ^{###}
Продуктивная кустистость, шт.	6.63 ± 0.43 [*]	5.27 ± 0.42	5.04 ± 0.4 [#]
Длина главного колоса, см	11.08 ± 0.31	10.75 ± 0.26	10.35 ± 0.19
Число колосков в главном колосе, шт.	17.25 ± 0.27	16.86 ± 0.25	18.02 ± 0.29 ^{##}
Число зерен в главном колосе, шт.	51.75 ± 1.62 ^{***}	63.36 ± 2.19	56.66 ± 1.77 [#]
Число зерен на колосок в главном колосе, шт.	3.01 ± 0.09 ^{***}	3.77 ± 0.1	3.40 ± 0.08 [#]
Плотность главного колоса	1.57 ± 0.03	1.58 ± 0.03	1.68 ± 0.03 [#]
Масса зерен в главном колосе, г	2.51 ± 0.09	2.66 ± 0.13	2.42 ± 0.09
Число зерен с растения, шт.	249.38 ± 19.14	259.36 ± 22.49	216.68 ± 19.18
Масса зерен с растения, г	10.62 ± 0.89	10.04 ± 0.93	8.49 ± 0.83
Масса 1000 зерен, г	42.53 ± 0.73 ^{***}	38.44 ± 0.59	37.45 ± 0.91
Содержание белка, %	15.88 ± 1.02	17.91 ± 1.23	18.81 ± 0.73
Содержание клейковины, %	35.56 ± 1.63	40.55 ± 2.47	40.00 ± 0.88

* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$ – достоверные различия значений сорта С29 и линии 49-14.

[#] $p \leq 0.05$; ^{##} $p \leq 0.01$; ^{###} $p \leq 0.001$ – достоверные различия значений сорта Т10 и линии 49-14.

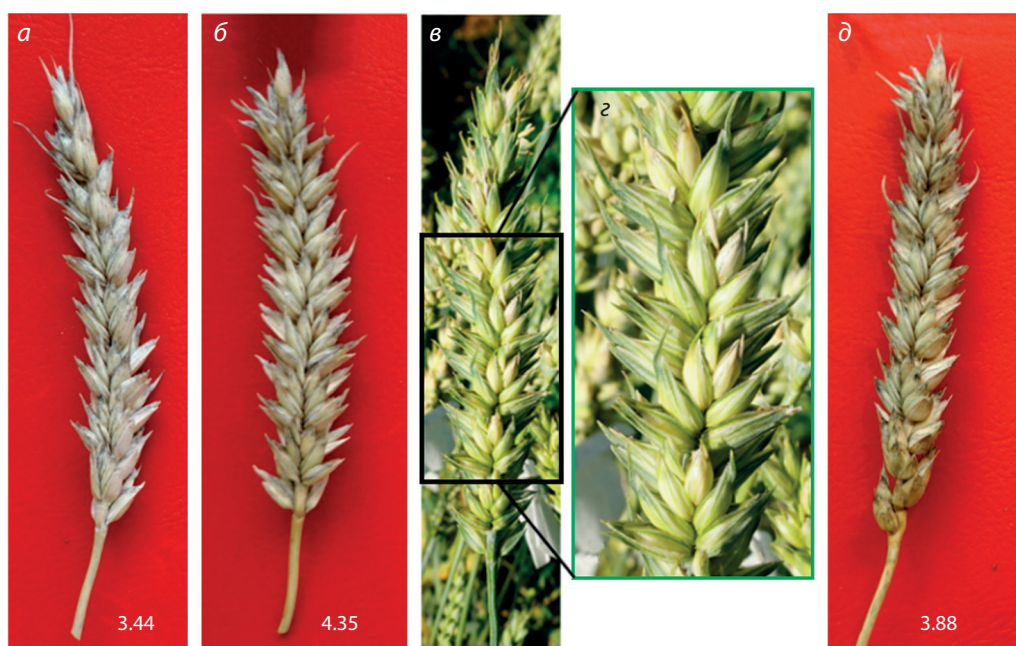


Рис. 3. Главные колосья растений с наибольшими значениями показателя «число зерен на колосок в главном колосе»: а – сорт С29 (3.44); б – линия 49-14 (4.35); в – колос линии 49-14 в стадии восковой спелости, на выноске (z) – колоски центральной части колоса; д – сорт Т10 (3.88).

дуктивная кустистость» и «плотность главного колоса» имели достоверные отличия при $p \leq 0.05$ в меньшую и большую стороны у линии 49-14 в сравнении с сортами. Показатель числа зерен в главном колосе был достоверно выше у 49-14 в сравнении с сортами С29 (при $p \leq 0.001$) и Т10 (при $p \leq 0.05$).

Число зерен на колосок в главном колосе у линии 49-14 было достоверно выше, чем у сортов С29 (при $p \leq 0.001$) и Т10 (при $p \leq 0.05$). У линии 49-14 завязывалось в среднем 3.77 ± 0.1 зерен в колоске, а размах изменчивости признака составил от 2.93 до 4.62 у индивидуальных растений (рис. 3, см. табл. 3). Масса 1000 зерен была достоверно

ниже (при $p \leq 0.001$) у селекционной линии 49-14 и сорта Т10 в сравнении с сортом С29.

При оценке качества зерна у растений сортов С29, Т10 и линии 49-14 было выявлено высокое содержание белка и клейковины (см. табл. 3), соответствующее сильной пшенице. Качество зерна линии 49-14 было на уровне сортов С29 и Т10.

Скрининг устойчивости растений Т10 × С29 поколений F₄ и F₆ к возбудителям грибных заболеваний
Устойчивость растений к возбудителям бурой и стеблевой ржавчины оценивалась в полевых условиях двух лет

(2018 и 2020). В эти годы оценка полевой устойчивости к мучнистой росе не проводилась, поскольку погодные условия были неблагоприятны для развития возбудителя этого заболевания, что выявлено по отсутствию поражения у восприимчивого сорта Саратовская 29.

В полевых условиях 2018 г. при оценке устойчивости к сибирской популяции бурой ржавчины *P. triticina* сорт С29 показал тип реакции S (susceptibility – восприимчивость), 4 балла с поражением поверхности листьев около 100 % (рис. 4, в), сорт Т10 и растения F₄ Т10 × С29 характеризовались иммунным типом с отсутствием пустул *P. triticina* (см. рис. 4, а, б).

Интересной оказалась реакция испытуемых гибридов и родительских сортов на стеблевую ржавчину. При поражении растений сорта С29 у растений сорта Т10 и F₄ Т10 × С29 преобладал иммунный ответ, за исключением одного случая. На одном из растений F₄ отмечен тип специфического взаимодействия с патогеном: единичные урединиопустулы без хлороза (5S) (см. рис. 4, а, ai). На практике обнаруженный локальный, но сильно проявившийся симптом интерпретируют как свидетельство редкой вирулентной расы гриба в местной популяции возбудителя (Roelfs et al., 1992). По данным Е.С. Сколотневой с коллегами (2020), популяция возбудителя стеблевой ржавчины в Новосибирской области действительно отличается высокой гетерогенностью, так как формируется из инокулюма южного и западного происхождения (Алтайский край и Омская область).

В полевых условиях 2020 г. у сортов и линии 49-14 на стадии колошения и цветения признаки грибных заболеваний полностью отсутствовали. При оценке устойчивости растений на стадии молочной спелости к популяции бурой ржавчины *P. triticina* сорт С29 показал тип реакции S (рис. 5), 4 балла с поражением поверхности листьев около 100 %, а сорт Т10 и линия 49-14 характеризовались иммунным типом с отсутствием пустул *P. triticina* (рис. 6).

В первой декаде августа (2–5 августа) на стадии молочной спелости выявлено начало распространения поражения растений сортов С29, Т10 и линии 49-14 возбудителем желтой ржавчины *P. striiformis*. Степень поражения листьев сорта С29 составляла от 50 до 75 % поверхности (см. рис. 5), что соответствует средней восприимчивости (MS).

Растения сорта Т10 и линии 49-14 характеризовались средней устойчивостью (MR) и средней восприимчивостью (MS) к возбудителю желтой ржавчины. Поражено от 5 до 40 % поверхности листьев с образованием хлоротичных зон (см. рис. 6).

Поражение стеблевой ржавчиной летом 2020 г. не было выявлено на растениях сортов С29, Т10 и линии 49-14.

Таким образом, согласно скринингу на устойчивость к комплексу фитопатогенов, проведенному в полевых условиях разных лет, хромосома 6Agi2 сохраняет иммунитет у растений к западносибирской популяции бурой ржавчины и иммунитет к доминантным расам стеблевой ржавчины, а также обеспечивает средний устойчивый и средний восприимчивый типы реакции к возбудителям желтой ржавчины.



Рис. 4. Отсутствие поражения бурой ржавчиной у гибридов F₄ Т10×С29 (а, б) и поражение бурой ржавчиной сорта Саратовская 29 (в). На выноске – поражение соломины стеблевой ржавчиной (ai).

Съемка 18 августа 2018 г.



Рис. 5. Поражение листьев растений сорта С29 желтой и бурой ржавчиной.

Съемка 2 августа 2020 г.



Рис. 6. Устойчивость растений линии 49-14 к бурой ржавчине и различная степень поражения листьев желтой ржавчиной.

Съемка 5 августа 2020 г.

Обсуждение

В нашей работе в F_5 поколении межсортовых гибридов Т10 × С29 выделена селекционная линия 49-14 ($2n = 42$) с интрогрессией пары хромосом пырея 6Ag12, отличающаяся высокими показателями продуктивности и иммунная к западносибирской популяции возбудителей бурой ржавчины. Тип реакции на возбудителя желтой ржавчины у растений линии 49-14 характеризовался средней устойчивостью и средней восприимчивостью, вероятно, из-за наличия в популяции различных по агрессивности рас. Поражение стеблевой ржавчиной, отмеченное только у одного растения, оценивалось как иммунитет к доминантным расам стеблевой ржавчины.

Ранее показано, что генетический материал хромосомы 6Ag12 в сортах мягкой пшеницы Тулайковская 5, Тулайковская 10, Тулайковская золотистая, Тулайковская 100, Волгоуральская сохраняет устойчивость к популяциям бурой ржавчины, специфичным для Нижней и Средней Волги, Центрального и Уральского регионов, а также для Западно-Сибирского региона (Плахотник и др., 2014; Salina et al., 2015; Leonova et al., 2017; Асхадуллин и др., 2019). Интенсивность поражения бурой ржавчиной сорта Тулайковская 10 в инфекционных питомниках Центрально-Черноземного района достигала 22 %, на основании чего сорт был отнесен ко второй группе эпидемической устойчивости – умеренно устойчивые (ER II) (Зеленева, 2019). Поражение стеблевой ржавчиной в Республике Татарстан у сорта Тулайковская 10 оценивалось в среднем 5–10 %, а мучнистой росой – в среднем 6 баллами, тип реакции к бурой ржавчине сохранялся как иммунитет (Асхадуллин и др., 2019). При оценке восприимчивости к популяции мучнистой росы Западно-Сибирского региона сорт Тулайковская 10 проявил резистентность к заболеванию. Проведенный полногеномный поиск ассоциаций позволил картировать на длинном плече хромосомы пырея 6Ag12 ген *Pm6Ag12*, который обеспечивает невосприимчивость к возбудителю мучнистой росы (Леонова, 2019). По результатам испытания в Средневолжском регионе сорт Тулайковская 10 показал иммунитет к бурой ржавчине, среднюю устойчивость (поражение 20 %) к стеблевой, желтой ржавчинам и мучнистой росе (Сюков и др., 2016). Таким образом, в различных эколого-географических регионах сорт Тулайковская 10 сохраняет иммунитет к полевым популяциям бурой ржавчины, средневосприимчив к стеблевой и желтой ржавчинам, но проявляет различную реакцию на возбудителя мучнистой росы.

Интрогрессия хромосомы пырея 6Ag12 в виде замещения хромосомы 6D не снижает показатели урожайности, качества зерна и засухоустойчивость (Филатова и др., 2010; Volkova et al., 2010), но в отдельных случаях при использовании сорта Тулайковская 10 в качестве донора генов устойчивости среди потомства с хромосомой 6Ag12 выявляются образцы со сниженными продуктивной кустистостью и массой 1000 зерен (Стасюк и др., 2017). Содержание белка и клейковины у селекционной линии 49-14 было на уровне сортов С29 и Т10 и соответствовало характеристикам качества зерна сильной пшеницы (ГОСТ..., 2018, 2019). По показателям продуктивности линия 49-14 уступала родительским сортам по таким признакам, как

продуктивная кустистость (С29), число колосков в главном колосе (Т10), масса 1000 зерен (С29). Несмотря на более низкую продуктивную кустистость, меньшее число колосков в главном колосе и меньшую массу 1000 зерен, показатели «масса зерен с растения» и «число зерен с растения» у линии 49-14 достоверно не отличались от родительских сортов. Это стало возможным благодаря достоверному превышению значения показателя «число зерен на колосок в главном колосе» у линии 49-14 в сравнении с сортами С29 (при $p \leq 0.001$) и Т10 (при $p \leq 0.05$). Растения этой линии характеризовались способностью завязывать 3.77 ± 0.1 зерна на колосок, размах изменчивости признака составил от 2.93 до 4.62 у индивидуальных растений, а в колосках средней части колоса могло развиваться до 6 зерновок. Колоски имели веерообразную форму (см. рис. 3), это специфичный признак многоцветковости у пшеницы (Martinek et al., 2005; Арбузова и др., 2016).

Хотя колосок мягкой пшеницы является многоцветковым, в большинстве случаев в нем завязывается всего два-три зерна. Потенциальная способность формирования большего числа зерновок у пшеницы намного превышает реальную урожайность, поэтому многие исследования направлены на поиск рычагов управления этим процессом. В настоящее время генетические и физиологические основы селекции на увеличение зерен в колосе и колоске, а в конечном итоге на единицу посевной площади, стали предметом активного изучения (Cui et al., 2012; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012; Арбузова и др., 2016; Guo et al., 2016–2018; Bhusal et al., 2017; Philipp et al., 2018; Sukumaran et al., 2018; Wolde et al., 2019; Hu J. et al., 2020). Оптимальным подходом для понимания формирования признака «число зерен и фертильность колоса» являются анализ репродуктивных стадий развития колоса, колоска, цветков, зерен и изучение их генетической регуляции. Признак «число зерен в колоске» зависит от процесса закладки зачатков цветков (цветковые примордии), затем от выживания цветков на следующем этапе развития и от эффективности их оплодотворения. На стадии «белого пыльника» в колоске формируется в норме до 12 цветковых примордиев (зачатков), однако во время онтогенеза до 60 % цветков могут остаться недоразвитыми (Guo et al., 2016, 2017). В большей степени это относится к апикальным (верхним) цветкам колоска. По данным Ф.М. Куперман (1969), на V этапе органогенеза темпы роста двух нижних и последующих цветковых бугорков в колоске характеризуются неравномерностью, в колоске может сформироваться до пяти, реже до семи цветков. В нижних цветках очень быстро закладываются зачатки генеративных органов, тычинок и пестика, в третьем и особенно в четвертом, пятом и последующих цветках наблюдается определенное отставание в формировании органов. В верхних цветках чаще всего пестик остается недоразвитым. На хромосомах 4A, 5A, 6A, 7A, 2B, 5B, 7B и 7D локализованы QTL, ответственные за проявление признака «число цветковых примордиев в колоске» (Guo et al., 2017). Параллельно в этой работе на основании корреляционного и кластерного анализов делается вывод, что количество зерен в колоске не зависит от максимального числа зачатков цветков в нем

(Guo et al., 2017). Следовательно, число зерен в колоске определяется фертильностью каждого цветка (Куперман, 1969; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012).

Методом полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) у европейских сортов мягкой пшеницы на длинном плече хромосомы 2A выявлен QTL, ответственный за увеличение числа зерен в колоске (Guo et al., 2017). Последующее изучение этого локуса позволило у твердой пшеницы картировать ген *Grain Number Increase 1 (GN1)*, кодирующий транскрипционный фактор с гомеодоменом HDZip1, мутация которого вносит существенный вклад в увеличение фертильных цветков за счет верхних цветков колоска (Sakuma et al., 2019). Предполагают, что *GN1* возник в результате дупликации генов в эволюции пшеницы, а мутации этого гена отбирались при доместикации, так как они увеличивали количество фертильных цветков и, соответственно, зерен. Транскрипционный фактор *ARGONAUTE1d (AGO1d)* также оказывает влияние на проявление признака «число зерен в колосе» у мягкой и твердой пшеницы (Feng et al., 2017). *AGO1d* играет важную роль в развитии пыльников и пыльцы у пшеницы на ранних этапах онтогенеза; нарушение функционирования *AGO1d* вызывает укорочение колоса, уменьшение размеров пыльников, снижение фертильности пыльцы и, как итог, уменьшение числа зерен в колосе (Feng et al., 2017).

На проявление признаков у растения влияет совокупная реакция взаимодействия генотипа, внешних условий и агротехники. В большей мере это относится к количественным признакам, включающим элементы урожайности (Пискарев и др., 2016; Стасюк и др., 2017). Во время V и VI этапов органогенеза ведущее значение в комплексе факторов внешней среды приобретают фотопериод и спектральный состав света (Куперман, 1969). Низкая интенсивность красного и дальнего красного спектров света снижает число фертильных цветков во время цветения, число зерен на растении и массу 1000 зерен (Ugarte et al., 2010). Комплекс экологических условий, необходимых для каждой стадии онтогенеза, соответствует условиям, в которых сформировались виды, разновидности и сорта. По физиологическим особенностям развития сорта С29 и Т10 относятся к волжской степной и лесостепной агроэкологическим группам или ко второму морфофизиологическому типу (Куперман, 1969) (https://samniish.ru/yaqovaya_myagkaya_pshenica.html). Сорта этого типа (устойчивые к летней засухе) развиваются главным образом за счет зимних и ранневесенних осадков, в районах с дефицитом влаги во вторую половину лета. Сорта западносибирской селекции относятся к пятому морфофизиологическому типу. Экологический тип сибирских лесостепных пшениц сформирован особенностями климатических условий: холодные и сухие апрель, май, первая половина июня; обильные осадки во второй половине лета (июль); пониженная температура в августе. Задержка на V этапе органогенеза позволяет значительно эффективнее использовать позднелетние осадки для формирования крупного колоса и многоцветковых колосков. Особенности физиологии развития и высокая засухоустойчивость у сортов второго морфофизиологического типа позволяют возделывать их в степных и лесостепных районах Западной Сибири (Куперман, 1969). Следовательно, ге-

нотипы сортов С29 и Т10 экологически пластичны, а в климатических условиях лесостепи Западной Сибири во время V этапа органогенеза способны к синхронности метамерного роста колосков, когда четыре-пять, а иногда и больше цветков в колоске развиваются нормально.

Генетический материал *Agropyron cristatum* (пырей хохлатый, житняк гребенчатый) тоже положительно влияет на элементы структуры урожая. Дополненные линии мягкой пшеницы с хромосомой 6P *Ag. cristatum*, но в большей степени замещенные линии 6P/6D характеризуются повышенной продуктивной кустистостью и значительным увеличением зерен в колосе и колоске – до 4.5 зерновки на колосок (Wu et al., 2006; Han H. et al., 2014). На основании полученных данных был сделан вывод, что на хромосоме 6P локализуются гены, контролирующие число цветков и зерновок в колосе и колоске (Wu et al., 2006). Возможно, хромосома 6Agi2 *Th. intermedium* несет ген/гены, контролирующие синхронность метамерного роста колосков у сорта Т10, а у линии 49-14 (Т10×С29) наблюдается аддитивный характер проявления признака «число зерен в колоске», что обеспечивает им нормальное развитие до шести цветков в колоске.

Заключение

Таким образом, создание многоцветковых форм (Han H. et al., 2014; Арбузова и др., 2016) и разработка генетических основ признака «многоцветковость» (Guo et al., 2016; Sakuma et al., 2019) составляют комплексный подход для решения задачи повышения урожайности зерна пшеницы в селекционных программах.

Список литературы / References

- Арбузова В.С., Добровольская О.Б., Мартинек П., Чуманова Е.В., Ефремова Т.Т. Наследование признака «многоцветковость» у мягкой пшеницы и оценка продуктивности колоса гибридов F₂. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(3):355-363. DOI 10.18699/VJ16.125.
- [Arbuzova V.S., Dobrovolskaya O.B., Martinek P., Chumanova E.V., Efremova T.T. Inheritance of signs of “many-flowered” common wheat and evaluation of productivity of the spike of F₂ hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(3):355-363. DOI 10.18699/VJ16.125. (in Russian)]
- Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф., Василова Н.З., Хусаннова И.И., Тазутдинова М.Р. Сорт в системе защиты яровой пшеницы от листостебельных болезней. *Вестн. Казан. ГАУ*. 2019;3(54): 10-14. DOI 10.12737/article_5db8423bb4f997.64890554.
- [Askhadullin D.F., Askhadullin D.F., Vasilova N.Z., Khusainova I.I., Tazutdinova M.R. A variety in the spring wheat protection system from leafy diseases. *Vestnik Kazanskogo GAU = Vestnik of the Kazan State Agrarian University*. 2019;3(54):10-14. DOI 10.12737/article_5db8423bb4f997.64890554. (in Russian)]
- ГОСТ 9353-2016. Пшеница. Технические условия. 2018. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200139414>
- [State Standard 9353-2016. Wheat: Specifications. 2018. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200139414> (in Russian)]
- ГОСТ 26574-2017. Мука пшеничная хлебопекарная. Технические условия (с поправкой). 2019. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200157423>
- [State Standard 26574-2017. Wheat Bakery Flour: Specifications (amended). 2019. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200157423> (in Russian)]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С., Миков Д.С. Интрогрессивные линии мягкой пшеницы

- с генетическим материалом *Agropyron glaucum*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(1):83-90. DOI 10.18699/VJ15.010.
- [Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Zinchenco A.N., Zubanova Y.S., Mikov D.S. Introgression of common wheat lines with genetic material of *Agropyron glaucum*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(1):83-90. DOI 10.18699/VJ15.010. (in Russian)]
- Зеленева Ю.В. Обоснование генетической защиты пшеницы от вредоносных болезней в условиях Центрально-Черноземного региона: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб.; Пушкин, 2019. Режим доступа: https://rusneb.ru/catalog/000200_000018_RU_NLR_BIBL_A_012131792/
- [Zeleneva Yu.V. Substantiation of the genetic protection of wheat from diseases in the Central Chernozem Belt. Dr. Biol. Sci. Diss. St. Petersburg; Pushkin, 2019. Available at: https://rusneb.ru/catalog/000200_000018_RU_NLR_BIBL_A_012131792/ (in Russian)]
- Иванова Ю.Н., Соловей Л.А., Логинова Д.Б., Мирошникова Е.Е., Дубовец Н.И., Силкова О.Г. Создание и характеристика линии мягкой пшеницы с центрической транслокацией T2DL.2RL. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):846-855. DOI 10.18699/VJ19.558.
- [Ivanova Yu.N., Solovey L.A., Loginova D.B., Miroshnikova E.E., Dubovets N.I., Silkova O.G. The creation and characterization of the bread wheat line with a centric translocation T2DL.2RL. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):846-855. DOI 10.18699/VJ19.558. (in Russian)]
- Койшыбаев М., Шаманин В.П., Моргунов А.И. Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням: Метод. указания. Анкара: FAO-CEK, 2014.
- [Koishybaev M., Shamanin V.P., Morgunov A.I. Wheat Screening for Resistance to Major Diseases: Guidelines. Ankara: FAO-SEK Publ., 2014. (in Russian)]
- Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Белов В.И., Жемчужина А.И., Коваленко Е.Д., Упельник В.П., Карлов Г.И. Исследование промежуточных пшенично-пырейных гибридов на устойчивость к листовой ржавчине. *С.-х. биология*. 2013;48(1):68-73. DOI 10.15389/agrobiol.2013.1.68rus.
- [Krupin P.Yu., Divashuk M.G., Belov V.I., Zhemchuzhina A.I., Kovalenko E.D., Upeľnik V.P., Karlov G.I. Investigation of intermediary wheat-Agropyron hybrids on resistance to leaf rust. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2013;48(1):68-73. DOI 10.15389/agrobiol.2013.1.68eng.]
- Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы (обзор). *С.-х. биология*. 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiol.2019.3.409rus.
- [Krupin P.Yu., Divashuk M.G., Karlov G.I. Gene resources of perennial wild cereals involved in breeding to improve wheat crop (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiol.2019.3.409eng.]
- Куперман Ф.М. Физиология развития, роста и органогенеза пшеницы. В: Генкель П.А. (Ред.). Физиология пшеницы. IV. Физиология сельскохозяйственных растений. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1969;7-193.
- [Kuperman F.M. Physiology of the development, growth and organogenesis of wheat. In: Henkel P.A. (Ed.). *Wheat Physiology. IV. Physiology of Agricultural Plants*. Moscow: Moscow University Publ., 1969;7-193. (in Russian)]
- Леонова И.Н. Влияние чужеродного генетического материала на проявление хозяйственно важных признаков мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367.
- [Leonova I.N. Influence of alien genetic material on the manifestation of agronomically important traits of common wheat (*T. aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367. (in Russian)]
- Леонова И.Н. Идентификация генетических локусов, ассоциированных с устойчивостью яровой мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) к мучнистой росе. *Генетика*. 2019;55(11):1312-1326. DOI 10.1134/S0016675819110080.
- [Leonova I.N. Genome-wide association study of powdery mildew resistance in Russian spring wheat varieties (*T. aestivum* L.). *Russ. J. Genet.* 2019;55(11):1360-1374. DOI 10.1134/S1022795419110085.]
- Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Крупнов В.А. Генеалогический анализ использования двух видов пырея (*Agropyron*) в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на устойчивость к болезням. *Генетика*. 2016;52(2):179-188. DOI 10.7868/S0016675816020077.
- [Martynov S.P., Dobrotvorskaya T.V., Krupnov V.A. Genealogical analysis of the use of two wheatgrass (*Agropyron*) species in common wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding for disease resistance. *Russ. J. Genet.* 2016;52(2):154-163. DOI 10.1134/S1022795416020071.]
- Пискарев В.В., Бойко Н.И., Кондратьева И.В. Источники хозяйственно ценных признаков для селекции пшеницы мягкой яровой (*Triticum aestivum* L.) в условиях лесостепи Приобья Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(3):277-285. DOI 10.18699/VJ16.166.
- [Piskarev V.V., Boyko N.I., Kondratieva I.V. Sources of agronomically important traits for breeding of soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in the forest steppe of Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(3):277-285. DOI 10.18699/VJ16.166. (in Russian)]
- Плахотник В.В., Зеленева Ю.В., Судникова В.П. Источники и высокоэффективные доноры для селекции яровой пшеницы на устойчивость к стрессовым факторам среды. *Вопр. соврем. науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского*. 2014;1(50):109-113.
- [Plakhotnik V.V., Zeleneva Yu.V., Sudnikova V.P. Sources and high performance donors for spring wheat selection to increase resistance to stress factors of environment. *Voprosy Sovremennoj Nauki i Praktiki. Universitet imeni V.I. Vernadskogo = Problems of Contemporary Science and Practice. Vernadsky University*. 2014;1(50):109-113. (in Russian)]
- Салина Е.А., Леонова И.Н., Щербань А.Б., Стасюк А.И. Пат. RU 2598275 C1. Способ создания линий озимой мягкой пшеницы с комплексной устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчине и мучнистой росе. ИЦиГ СО РАН. Заявл. 29.07.2015. Опул. 20.09.2016. Бюл. № 26.
- [Salina E.A., Leonova I.N., Shcherban A.B., Stasyuk A.I. Patent RU 2598275 C1. Method of creating lines of winter soft wheat with complex resistance to brown and stem rust and powdery mildew (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS). Date of filing: 29.07.2015. Date of publication: 20.09.2016. Bull. No. 26. (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Бадаева Е.Д., Гуляева Е.И., Дружин А.Е., Шишкина А.А., Драгович А.Ю., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Тхи Май Кхуат, Дивашук М.Г. Сравнительный анализ 6Ag¹ и 6Ag² хромосом *Agropyron intermedium* (Host) Beauv у сортов и линий мягкой пшеницы с пшенично-пырейными замещениями. *Генетика*. 2017;53(3):298-309. DOI 10.7868/S0016675817030110.
- [Sibikeev S.N., Badaeva E.D., Gulyaeva E.I., Druzhin A.E., Shishkina A.A., Dragovich A.Yu., Kroupin P.Yu., Karlov G.I., Thi Mai Khuat, Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Ag¹ and 6Ag² chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat-wheatgrass substitutions. *Russ. J. Genet.* 2017;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115.]
- Синиговец М.Е. Перенесение устойчивости к ржавчине от пырея в пшеницу путем добавления и замещения хромосом. *Генетика*. 1976;12(9):13-20.
- [Sinigovets M.E. Transferring wheatgrass rust resistance to wheat by adding and replacing chromosomes. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1976;12(9):13-20. (in Russian)]

- Синиговец М.Е. Цитогенетические основы использования пырея в улучшении пшеницы: Дис. ... д-ра биол. наук. Большие Вя- земы, 1988. OD 71 89-3/185. Режим доступа: <https://search.rsl.ru/ru/record/01008509447>.
[Sinigovets M.E. Cytogenetic fundamentals of using wheatgrass in wheat improvement. Dr. Biol. Sci. Diss. Bol'shie Vyazemy, 1988. OD 71 89-3/185. Available at: <https://search.rsl.ru/ru/record/01008509447>. (in Russian)]
- Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргунов А.И., Бойко Н.И., Шама-нин В.П., Салина Е.А. Расовый состав новосибирской популя-ции *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., Boiko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races composition of the Novosibirsk popula- tion of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092. (in Russian)]
- Стасюк А.И., Леонова И.Н., Салина Е.А. Проявление хозяйствен-но важных признаков у яровых гибридов мягкой пшеницы, отобранных с помощью MAS-технологии при скрещивании озимых сортов с яровыми донорами устойчивости к бурой ржавчине. *С.-х. биология*. 2017;52(3):526-534. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.526rus.
[Stasyuk A.I., Leonova I.N., Salina E.A. Variability of agronomi- cally important traits in spring wheat hybrids obtained by marker- assisted selection from crosses of winter wheat with spring wheat donors of resistance genes. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(3):526-534. DOI 10.15389/agro- biology.2017.3.526eng.]
- Сюков В.В., Шаболкина Е.Н., Шевченко С.Н., Вьюшков А.А. Яро-вая мягкая пшеница Тулайковская 110. *Молодой ученый*. 2016; 27.3:57-60.
[Syukov V.V., Shabolkina E.N., Shevchenko S.N., Vyushkov A.A. Spring soft wheat Tulaykovskaya 110. *Molodoy Uchenyy = Young Scientist*. 2016;27.3:57-60. (in Russian)]
- Упельник В.П., Белов В.И., Иванова Л.П., Долгова С.П., Демид-ов А.С. Наследие академика Н.В. Цицина – современное со-стояние и перспективы использования коллекции промежу-точных пшенично-пырейных гибридов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(3):667-674.
[Upelniek V.P., Belov V.I., Ivanova L.P., Dolgova S.P., Demidov A.S. Heritage of academician N.V. Tsitsin: state-of-the-art and potential of the collection of intermediate wheat × couch-grass hy-brids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(3):667-674. (in Russian)]
- Филатова Е.В., Сюков В.В., Анисимкина Н.В. Влияние пырейной транслокации Т-5 на фракционный состав белка яровой мягкой пшеницы. *Аграр. вестн. Юго-Востока*. 2010;4:15-17.
[Filatova E.V., Syukov V.V., Anisimkina N.V. Influence of the T-5 translocation from wheat grass on the protein fractional structure of spring bread wheat. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka = Agrarian Herald of the Southeast*. 2010;4:15-17. (in Russian)]
- Цицин Н.В. Отдаленная гибридизация растений. М.: Сельхозгиз, 1954;3-64.
[Tsitsin N.V. Remote Hybridization of Plants. Moscow: Selkhozgiz Publ., 1954;3-64. (in Russian)]
- Ayala-Navarrete L., Thompson N., Ohm H., Anderson J. Molecular markers show a complex mosaic pattern of wheat-*Thinopyrum intermedium* translocations carrying resistance to YDV. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121:961-970. DOI 10.1007/s00122-010-1365-y.
- Bao Y., Wu X., Zhang C., Li X., He F., Qi X., Wang H. Chromosomal constitutions and reactions to powdery mildew and stripe rust of four novel wheat-*Thinopyrum intermedium* partial amphiploids. *J. Genet. Genomics*. 2014;41(12):663-666. DOI 10.1016/j.jgg.2014.11.003.
- Bhusal N., Sarial A.K., Sharma P., Sareen S. Mapping QTLs for grain yield components in wheat under heat stress. *PLoS One*. 2017; 12(12):e0189594. DOI 10.1371/journal.pone.0189594.
- Chang Z.-J., Zhang X.-J., Yang Z.-J., Zhan H.-X., Li X., Liu C., Zhang C.-Z. Characterization of a partial wheat-*Thinopyrum intermedium* amphiploid and its reaction to fungal diseases of wheat. *Hereditas*. 2010;147(6):304-312. DOI 10.1111/j.1601-5223.2010.02156.x.
- Cseh A., Yang C., Hubbart-Edwards S., Scholefield D., Ashling S.S., Burridge A.J., Wilkinson P.A., King I.P., King J., Grewal S. Devel- opment and validation of an exome-based SNP marker set for iden- tification of the St, J^r and J^s genomes of *Thinopyrum intermedium* in a wheat background. *Theor. Appl. Genet.* 2019;132:1555-1570. DOI 10.1007/s00122-019-03300-9.
- Cui F., Ding A., Li J., Zhao C., Wang L., Wang X., Qi X., Li X., Li G., Gao J., Wang H. QTL detection of seven spike-related traits and their genetic correlations in wheat using two related RIL popula- tions. *Euphytica*. 2012;186:177-192. DOI 10.1007/s10681-011- 0550-7.
- Danilova T.V., Zhang G., Liu W., Friebe B., Gill B.S. Homoeologous recombination-based transfer and molecular cytogenetic mapping of a wheat streak mosaic virus and *Triticum* mosaic virus resistance gene *Wsm3* from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130(3):549-556. DOI 10.1007/s00122-016-2834-8.
- Fedak G., Han F. Characterization of derivatives from wheat-*Thinopyrum* wide crosses. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109:360-367. DOI 10.1159/000082420.
- Feng N., Song G., Guan J., Chen K., Jia M., Huang D., Wu J., Zhang L., Kong X., Geng S., Liu J., Li A., Mao L. Transcriptome profiling of wheat inflorescence development from spikelet initiation to floral patterning identified stage-specific regulatory genes. *Plant Physiol.* 2017;174(3):1779-1794. DOI 10.1104/pp.17.00310.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characteriza- tion of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*. 1996;91:59-87.
- Fu S., Lv Z., Qi B., Guo X., Li J., Liu B., Han F. Molecular cytogenetic characterization of wheat-*Thinopyrum elongatum* addition, substi- tution and translocation lines with a novel source of resistance to wheat fusarium head blight. *J. Genet. Genomics*. 2012;39:103-110. DOI 10.1016/j.jgg.2011.11.008.
- Guo Z., Chen D., Alqudah A.M., Röder M.S., Ganai M.W., Schnur- busch T. Genome-wide association analyses of 54 traits identified multiple loci for the determination of floret fertility in wheat. *New Phytol.* 2017;214:257-270. DOI 10.1111/nph.14342.
- Guo Z., Slafer G.A., Schnurbusch T. Genotypic variation in spike ferti- lity traits and ovary size as determinants of floret and grain survival rate in wheat. *J. Exp. Bot.* 2016;67:4221-4230. DOI 10.1093/jxb/ erw200.
- Guo Z., Zhao Y., Röder M.S., Reif J.C., Ganai M.W., Chen D., Schnur- busch T. Manipulation and prediction of spike morphology traits for the improvement of grain yield in wheat. *Sci. Rep.* 2018;8:14435. DOI 10.1038/s41598-018-31977-3.
- Han F., Liu B., Fedak G., Liu Z. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat-*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analy- sis. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1070-1076. DOI 10.1007/s00122- 004-1720-y.
- Han H., Bai L., Su J., Zhang J., Song L., Gao A., Yang X., Li X., Liu W., Li L. Genetic rearrangements of six wheat-*Agropyron cris- tatum* 6P addition lines revealed by molecular markers. *PLoS One*. 2014;9(3):e91066. DOI 10.1371/journal.pone.0091066.
- Hu J., Wang X., Zhang G., Jiang P., Chen W., Hao Y., Ma X., Xu S., Jia J., Kong L., Wang H. QTL mapping for yield-related traits in wheat based on four RIL populations. *Theor. Appl. Genet.* 2020;133: 917-933. DOI 10.1007/s00122-019-03515-w.
- Hu L.J., Li G.R., Zeng Z.X., Chang Z.J., Liu C., Zhou J.P., Yang Z.J. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-*Thinopyrum* substitution line with stripe rust resistance. *Euphytica*. 2011;177: 169-177. DOI 10.1007/s10681-010-0216-x.
- Hu L., Li G., Zhan H., Liu C., Yang Z. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat-*Thinopyrum intermedium*

- derivative lines. *J. Genet.* 2014;93:69-74. DOI 10.1007/s12041-012-0158-2.
- Ishikawa G., Nakamura T., Ashida T., Saito M., Nasuda S., Endo T.R., Wu J., Matsumoto T. Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:499-514. DOI 10.1007/s00122-008-0916-y.
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica.* 1993;73:199-212. DOI 10.1007/BF00036700.
- Kroupin P., Kuznetsova V., Romanov D., Kocheshkova A., Karlov G., Dang T.X., Khuat T.M.L., Kirov I., Alexandrov O., Polkhovskiy A., Razumova O., Divashuk M. Pipeline for the rapid development of cytogenetic markers using genomic data of related species. *Genes.* 2019;10(2):113. DOI 10.3390/genes10020113.
- Leonova I.N., Stasyuk A.I., Skolotneva E.S., Salina E.A. Enhancement of leaf rust resistance of Siberian winter wheat varieties by marker-assisted selection. *Cereal Res. Commun.* 2017;45(4):621-632. DOI 10.1556/0806.45.2017.048.
- Li D., Long D., Li T., Wu Y., Wang Y., Zeng J., Xu L., Fan X., Sha L., Zhang H., Zhou Y., Kang H. Cytogenetics and stripe rust resistance of wheat-*Thinopyrum elongatum* hybrid derivatives. *Mol. Cytogenet.* 2018;11:16. DOI 10.1186/s13039-018-0366-4.
- Li G., Wang H., Lang T., Li J., La S., Yang E., Yang Z. New molecular markers and cytogenetic probes enable chromosome identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* introgression lines for improving protein and gluten contents. *Planta.* 2016;244:865-876. DOI 10.1007/s00425-016-2554-y.
- Li H., Wang X. *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. *J. Genet. Genomics.* 2009;36(9):557-565. DOI 10.1016/S1673-8527(08)60147-2.
- Liu C., Yang Z.J., Li G.R., Feng J., Zhou J.P., Ren Z.L. A discussion on genetic relationship in genome between *Thinopyrum* and *Dasyphyrum*. *Chinese High Tech. Lett.* 2007;17:295-300.
- Ma H., Zhang J., Zhang J., Zhou S., Han H., Liu W., Yang X., Li X., Li L. Development of P genome-specific SNPs and their application in tracing *Agropyron cristatum* introgressions in common wheat. *Crop J.* 2019;7(2):151-162. DOI 10.1016/j.cj.2018.07.003.
- Martinek P., Watanabe N., Peng Z.S. Gene resources of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different arrangement of spikelets in spike. In: 7th International Wheat Conference, Mar del Plata, 2005.
- Philipp N., Weichert H., Bohra U., Weschke W., Schulthess A.W., Weber H. Grain number and grain yield distribution along the spike remain stable despite breeding for high yield in winter wheat. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205452. DOI 10.1371/journal.pone.0205452.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico: CIMMYT, 1992.
- Sakuma S., Golan G., Guo Z., Ogawa T., Tagiri A., Sugimoto K., Bernhardt N., Brassac J., Mascher M., Hensel G., Ohnishi S., Jinno H., Yamashita Y., Ayalon I., Peleg Z., Schnurbush T., Komatsuda T. Unleashing floret fertility in wheat through the mutation of a homeobox gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(11):5182-5187. DOI 10.1073/pnas.1815465116.
- Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica.* 2015;204:91-101. DOI 10.1007/s10681-014-1344-5.
- Sreenivasulu N., Schnurbusch T. A genetic playground for enhancing grain number in cereals. *Trends Plant Sci.* 2012;17(2):91-101. DOI 10.1016/j.tplants.2011.11.003.
- Sukumaran S., Lopes M., Dreisigacker S., Reynolds M. Genetic analysis of multi environmental spring wheat trials identifies genomic regions for locus-specific tradeoffs for grain weight and grain number. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:985-998. DOI 10.1007/s00122-017-3037-7.
- Wang M.J., Zhang Y., Lin Z.S., Ye X.G., Yuan Y.P., Ma W., Xin Z.Y. Development of EST-PCR markers for *Thinopyrum intermedium* chromosome 2Ai#2 and their application in characterization of novel wheat-grass recombinants. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121:1369-1380. DOI 10.1007/s00122-010-1394-6.
- Wang R.R.C. *Agropyron* and *Psathyrostachys*. In: Kole C. (Ed.) Wild Crop Relatives: Genomic Breeding Resources. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011;77-108. DOI 10.1007/978-3-642-14228-4_2.
- Ugarte C.C., Trupkin S.A., Ghiglione H., Slafer G., Casal J.J. Low red/far-red ratios delay spike and stem growth in wheat. *J. Exp. Bot.* 2010;61(11):3151-3162. DOI 10.1093/jxb/erq140.
- Volkova L.V., Bebyakin V.M., Lyskova I.V. Plasticity and stability of spring wheat varieties and breeding forms according to grain productivity and quality. *Russ. Agricult. Sci.* 2010;36(1):1-4. DOI 10.3103/S1068367410010015.
- Wolde G.M., Mascher M., Schnurbusch T. Genetic modification of spikelet arrangement in wheat increases grain number without significantly affecting grain weight. *Mol. Genet. Genomics.* 2019;294:457-468. DOI 10.1007/s00438-018-1523-5.
- Wu J., Yang X., Wang H., Li H., Li L., Li X., Liu W. The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *Agropyron cristatum* into wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2006;114:13-20. DOI 10.1007/s00122-006-0405-0.
- Zeng J., Cao W., Fedak G., Sun S., Mccallum B., Fetch T., Xue A., Zhou Y. Molecular cytological characterization of two novel durum – *Thinopyrum intermedium* partial amphiploids with resistance to leaf rust, stem rust and *Fusarium* head blight. *Hereditas.* 2013; 150(1):10-16. DOI 10.1111/j.1601-5223.2012.02262.x.
- Zeng Z.-X., Yang Z.-J., Hu L.-J., Liu C., Li G.R., Ren Z.-L. Development of St genome specific ISSR marker. *Acta Bot. Boreal. Occident. Sin.* 2008;28(8):1533-1540.
- Zhang P., Li W., Fellers J., Friebe B., Gill B.S. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma.* 2004;112:288-299. DOI 10.1007/s00412-004-0273-9.
- Zhang Z.Y., Xin Z.Y., Larkin P.J. Molecular characterization of a *Thinopyrum intermedium* group 2 chromosome (2Ai-2) conferring resistance to barley yellow dwarf virus. *Genome.* 2001;44(6):1129-1135. DOI 10.1139/g01-083.
- Zheng Q., Lv Z., Niu Z., Li B., Li H., Xu S.S., Han F., Li Z. Molecular cytogenetic characterization and stem rust resistance of five wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploids. *J. Genet. Genomics.* 2014;41(11):591-599. DOI 10.1016/j.jgg.2014.06.003.

ORCID ID

Yu.N. Ivanova orcid.org/0000-0002-9655-4539
E.S. Skolotneva orcid.org/0000-0001-8047-5695
O.G. Silkova orcid.org/0000-0003-3299-2975

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-76-30003. Работа в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН и ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» ИЦиГ СО РАН выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта № 0259-2021-0012.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.03.2021. После доработки 17.06.2021. Принята к публикации 24.06.2021.

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

Пребридинговое изучение интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, несущих комбинации *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* генов устойчивости к стеблевой ржавчине

С.Н. Сибикеев¹✉, О.А. Баранова², А.Е. Дружин¹

¹ Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ sibikeev_sergey@mail.ru

Аннотация. Гены *Sr22*, *Sr35* и *Sr25* привлекают внимание селекционеров мягкой пшеницы эффективностью против расы *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ug99 и ее биотипов. К настоящему времени защитный эффект комбинаций генов *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* не исследован, неизвестно их влияние на агрономические показатели. В представленной работе эти показатели изучены с использованием линий яровой мягкой пшеницы Л503/W3534//Л503 (*Sr22+Sr25*) и Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 (*Sr35+Sr25*). Линии оценивали на устойчивость к *P. graminis* f. sp. *tritici* в условиях естественных эпифитотий 2016–2020 гг., а также к саратовской, лысогорской и омской популяциям патогена и к изолятам гриба, PgtZ1 (TKSTF) и PgtF18.6 – в лабораторных условиях (TKSTF + *Sr33*). С помощью молекулярных маркеров подтверждено наличие изучаемых *Sr*-генов. Выявлена высокая эффективность комбинации генов *Sr22+Sr25* как при естественных эпифитотиях патогена, так и в лабораторных исследованиях. Комбинация *Sr35+Sr25* оказалась неэффективной. В среднем за 2018–2020 гг. у линий с обеими комбинациями генов отмечено понижение массы 1000 зерен и увеличение периода «всходы–колошение». У линии с комбинацией генов *Sr22+Sr25* обнаружены незначительные эффекты на показатели клейковины и упругость теста, но отношение упругости теста к растяжимости было выше, а сила муки, пористость и объем хлеба – ниже; у линии с комбинацией *Sr35+Sr25* количество клейковины ниже, но крепость, упругость теста и отношение упругости теста к растяжимости выше, сила муки и пористость хлеба на уровне реципиента, но объем хлеба ниже.

Ключевые слова: мягкая пшеница; интрогрессивные линии; комбинации генов *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25*; пребридинговые исследования.

Для цитирования: Сибикеев С.Н., Баранова О.А., Дружин А.Е. Пребридинговое изучение интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, несущих комбинации *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* генов устойчивости к стеблевой ржавчине. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):713-722. DOI 10.18699/VJ21.081

A prebreeding study of introgression spring bread wheat lines carrying combinations of stem rust resistance genes, *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25*

S.N. Sibikeev¹✉, O.A. Baranova², A.E. Druzhin¹

¹ Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

² All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ sibikeev_sergey@mail.ru

Abstract. The *Sr22*, *Sr35*, and *Sr25* genes attract the attention of bread wheat breeders with their effectiveness against *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race Ug99 and its biotypes. The effectiveness and impact of *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25* gene combinations on agronomic traits have not yet been studied. In the present article, these traits were studied using the spring bread wheat lines L503/W3534//L503, L503/*Sr35*//L503/3/L503 carrying the *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25* genes during 2016–2020. These lines were assessed for resistance to *P. graminis* f. sp. *tritici* under natural epiphytotics and to the Saratov, Lysohorsk and Omsk populations of the pathogen and to the PgtZ1 (TKSTF) and PgtF18.6 fungus isolates in laboratory conditions (TKSTF + *Sr33*). The presence of the studied *Sr*-genes was confirmed by using molecular markers. Prebreeding studies were conducted during 2018–2020 vegetation periods. Under the natural epiphytotics of the pathogen and in the laboratory conditions, the *Sr22+Sr25* combination was highly effective, while *Sr35+Sr25* was ineffective. For grain yield, the lines with the *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25* genes were superior to the recipient cultivar L503 in one year (*Sr22+Sr25* in 2019; *Sr35+Sr25* in 2018), with a decrease in 2020, but in general there were no differences. For the period 2018–2020, both combinations showed a decrease in 1000 grains weight and an increase in the germination-earring period. The line with *Sr22+Sr25* genes showed insignificant effects on gluten and dough tenacity, but the ratio of dough tenacity to extensibility was

higher, and flour strength, porosity and bread volume were lower; in the line with *Sr35+Sr25* genes, the gluten content was lower, but the strength, tenacity of the dough and the ratio of dough tenacity to extensibility were higher, flour strength and the porosity of the bread were at the recipient level, but the volume of bread was lower. Key words: bread wheat; introgressive lines; *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25* gene combinations; prebreeding studies.

For citation: Sibikeev S.N., Baranova O.A., Druzhin A.E. A prebreeding study of introgression spring bread wheat lines carrying combinations of stem rust resistance genes, *Sr22+Sr25* and *Sr35+Sr25*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):713-722. DOI 10.18699/VJ21.081

Введение

В последнее десятилетие для зоны Нижнего и Среднего Поволжья России отмечается повышение вредоносности спектра болезней мягкой пшеницы. В 2016 г. наблюдалась сильная эпифитотия стеблевой ржавчины, в 2017 г. – сильная эпифитотия бурой ржавчины и септориоза листьев, в 2019 г. – сильная эпифитотия желтой пятнистости листьев (Baranova et al., 2019; Сибикеев и др., 2020) и в 2020 г. – локальная, но сильная эпифитотия стеблевой ржавчины (С.Н. Сибикеев, неопубликованные данные). Таким образом, происходит постоянное воздействие на растения мягкой пшеницы возбудителей грибных болезней, в связи с чем повышение урожайности возделываемых растений за счет устойчивости к биотическим факторам значительно возрастает.

В Саратовской области из вышеуказанных болезней пшеницы значительно увеличилась роль возбудителя стеблевой ржавчины, болезнь стала постоянно присутствовать на посевах яровой и озимой мягкой пшеницы. Так, развитие *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* на восприимчивых сортах и линиях яровой пшеницы наблюдали даже в засушливые вегетационные сезоны 2018–2019 гг. По вредоносности стеблевая ржавчина пшеницы в Саратовской области стала занимать одно из первых мест. Этот факт объясняется в основном глобальными изменениями климата в совокупности с агробиологическими факторами. Среди последних важное значение имеют два основных фактора, во-первых, большинство сортов мягкой пшеницы в Саратовской области восприимчивы к данному патогену, а именно: Саратовская 55, Саратовская 68, Саратовская 70, Саратовская 73, Альбидум 32, Фаворит, Воевода и Лебедушка. Сорта Прохоровка, Юго-Восточная 2 и Добрыня были гетерогенны по устойчивости (Baranova et al., 2019); во вторых – присутствие высоковирулентной популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*. Так, в саратовских популяциях за 2016–2020 гг. доля высоковирулентных патотипов (от 14 до 20 генов вирулентности) колебалась от 35 до 60 % (О.А. Баранова, неопубликованные данные).

Для избегания экономически значимых потерь от болезни мягкой пшеницы, в том числе стеблевой ржавчиной, необходима постоянная научно-обоснованная селекция на устойчивость к патогенам. Эта работа должна быть основана на знании биологии патогена, его вирулентности, генетики устойчивости возделываемых сортов культурных растений и на достаточном количестве и разнообразии генов устойчивости к патогенам, т.е. она должна быть опережающей (McIntosh, 1992; McIntosh, Brown, 1997).

Как показывает селекционная практика, наиболее труднорешаемая задача – расширение генетического разнообразия эффективных генов устойчивости. Так, исследование О.А. Барановой (2020) на наборе из 32 новых сортов

мягкой пшеницы, занесенных в «Государственный реестр селекционных достижений...» РФ за 2017–2018 гг., показали, что высокой эффективностью против возбудителя стеблевой ржавчины обладают лишь 11 сортов. Из них семь сортов защищены одним геном, *Sr31*, три сорта – комбинацией генов *Sr31+Sr57* и один сорт – комбинацией *Sr31+Sr28*. Таким образом, защита может определяться лишь одним геном *Sr31*, так как взаимодействие генов в комбинациях не доказано. Кроме того, ситуация осложняется тем, что ген *Sr31* преодолен расой Ug99, состоящей в настоящее время из 13 биотипов (<http://globalrust.org/pathogens/pathogen-home-page>). Раса Ug99 распространена в странах Африки и Ближнего Востока, она мигрирует в направлении Средней и Юго-Восточной Азии, возможен ее занос и на территорию Российской Федерации. В связи с этим при селекции устойчивых к *P. graminis* f. sp. *tritici* сортов мягкой пшеницы необходимо учитывать этот факт и включать в селекционный процесс гены *Sr* и их комбинации, эффективные против биотипов расы Ug99.

В настоящее время из общего количества идентифицированных генов устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы от «дикарей» интрогрессировано 29 из 61 (McIntosh et al., 2013, 2016, 2018, 2020). Среди них особое место занимают гены *Sr25*, *Sr22* и *Sr35*. Все они эффективны против расы Ug99 и ее биотипов (http://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22). Ген *Sr25* перенесен от пырея удлиненного, *Agropyron elongatum* ($2n = 70$) в мягкую пшеницу в составе транслокации 7DS-7DL-7Ae#1L, *Sr22* и *Sr35* – из генома культурной однозернянки в хромосомы 7AL и 3AL соответственно (McIntosh et al., 1995).

Если комплекс генов *Sr25/Lr19* (ген устойчивости к бурой ржавчине) широко используется в сортах и селекционном материале яровой мягкой пшеницы в Средне-волжском и Нижневолжском регионах (Gulyaeva et al., 2019; Гульяева и др., 2020), то ген *Sr22* – лишь в сортах Schomburgk и BT-Schomburgk в Австралии и наборе почти изогенных линий, а ген *Sr35* не интродуцирован в коммерческие сорта (McIntosh et al., 1995, 2013). Ограниченное применение в практической селекции генов *Sr22* и *Sr35* в основном связано с тем, что они либо не компенсируют отсутствие пшеничного хроматина, либо содержат нежелательные генетические факторы с негативными эффектами (Paull et al., 1994). Гены *Sr25/Lr19*, а точнее, транслокация 7DS-7DL-7Ae#1L, положительно влияют на агрономические признаки (Singh et al., 1998; Sibikeev et al., 2016; Сибикеев и др., 2018). Ранее отмечено, что увеличение продуктивности зерна в присутствии этой транслокации определяется лучшим использованием ассимилятов репродуктивными органами (Miralles et al., 2007). Однако исследований комбинаций *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* как по эффективности против возбудителя стеблевой ржавчины,

так и по влиянию интрогрессированного генетического материала на агрономически важные признаки (пребридинговые исследования) не проводили.

Целью наших исследований было выявить перспективность комбинаций *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* генов для практической селекции как по эффективности против *P. graminis*, так и по влиянию на продуктивность и качество зерна.

Материалы и методы

Используемый материал включал следующие генотипы яровой мягкой пшеницы: сорт-реципиент Л503, несет транслокацию 7DS-7DL-7Ae#1L с генами *Sr25/Lr19* (Badaeva et al., 2018); сорт-стандарт для Саратовской области Фаворит, содержит замещение 6D(6Agⁱ) (Sibikeev et al., 2017).

Интрогрессивные линии: Л503/W3534//Л503, где W3534 – почти изогенная линия сорта Marquis с геном *Sr22*, а именно W3534 = Marquis*5//Stewart*3/*T. monococtum*; Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503, где *Sr35* – почти изогенная линия сорта Marquis с геном *Sr35*, а именно *Sr35* = Marquis*5//G2919, G2919 – канадский источник *T. monococtum*. Линии W3534 и *Sr35* были любезно предоставлены доктором Р.А. McIntosh (Институт селекции растений, Гоббитти, Австралия) и в качестве отцовских форм были использованы для скрещивания с сортом яровой мягкой пшеницы Л503.

Исследования включали три этапа. Первый этап – для подтверждения наличия комбинаций *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* у изучаемых интрогрессивных линий была проведена идентификация *Sr*-генов с применением молекулярных маркеров для *Sr25* (Gb) (Prins et al., 2001), *Sr22* (*Xbarc 121*, *Xcfa 2123*, *Xcfa 2019*, *Xwmc633*) (Khan et al., 2005; Yu et al., 2010), *Sr35* (*Xcfa 2170*) (Zhang et al., 2010). Амплификацию осуществляли на амплификаторах C1000 Thermal Cycler (BioRad), разделение продуктов амплификации проводили в 2 % агарозных и 8 % полиакриламидных гелях, окрашенных бромистым этидием. В качестве положительного контроля были линия WSR22TB, содержащая ген *Sr22* и родительскую линию W3435 (*Sr22*), а также линия Marquis*5//G2919 (*Sr35*), LC-SR25-ARS (*Sr25*). Негативным контролем служил восприимчивый сорт Хакасская, контролем на контаминацию – ПЦР смесь

без добавления ДНК. В качестве маркера молекулярного веса был GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (“Fementas”). Визуализацию продуктов амплификации выполняли с помощью геледокументирующей системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad), ПЦР ставили в двух повторностях.

Второй этап – оценка на устойчивость линий к возбудителю стеблевой ржавчины в полевых условиях в 2016–2020 гг. – фаза «молочно-восковая спелость» (селекционный посев Федерального аграрного научного центра Юго-Востока) на естественном фоне развития патогена. Тип инфекции стеблевой ржавчины пшеницы определяли по шкале А.Р. Roelfs с коллегами (1992), где реакция, R, – устойчивость (resistant), MR – умеренная устойчивость (moderate resistant), MS – умеренная восприимчивость (moderate susceptible), S – восприимчивость (susceptible) соответственно. Степень поражения ржавчиной (в %) оценивали по шкале R.F. Peterson с коллегами (1948). В фазе проростков (первого листа) во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты растений изучили ювенильную устойчивость образцов пшеницы к болезни по методике (Jin et al., 2007). Десятидневные проростки с полностью развернутым первым листом инокулировали суспензией урединиоспор популяций патогена, собранных в Омской области, а также в Лысогорском районе Саратовской области с сорта Фаворит, который несет замещение 6Agⁱ(6D), а также двумя изолятами гриба – PgtZ1 (TKSTF) и PgtF18.6 (TKSTF + *Sr33*). Характеристика вирулентности изолятов PgtZ1 и PgtF18.6 приведена в табл. 1.

Инфекционная нагрузка составляла 1 мг спор гриба в 1 мл (Singh et al., 2008). В качестве восприимчивого контроля был сорт яровой мягкой пшеницы Хакасская. Результаты учитывали на 10-е сутки по шкале Е.С. Stakman с коллегами (1962), где 0 – отсутствие симптомов; 0; – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом; 3 – пустулы среднего размера без некроза; 4 – крупные пустулы без некроза; X – пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы. Растения с типом реакции 0, 0;, 1, 2 считались устойчивыми, а с 3, 4 и X – восприимчивыми.

Третий этап – оценка показателей продуктивности зерна, физических свойств теста и хлебопекарных показателей у интрогрессивных линий Л503/W3534//Л503

Таблица 1. Характеристика вирулентности у изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, используемых для инокуляции интрогрессивных линий пшеницы в фазе проростков

Изолят	Раса	Популяция	Вирулентность	Авирулентность
Вирулентность/авирулентность к <i>Sr</i> -линиям из “North American differential set”				
PgtZ1	TKSTF	Зерноградская	5, 21, 9e, 7b, 6, 8a, 9g, 36, 9b, 30, 9a, 9d, 10, Tmp, 38, McN	11, 17, 24, 31
PgtF18.6	TKSTF	Лысогорская	5, 21, 9e, 7b, 6, 8a, 9g, 36, 9b, 30, 9a, 9d, 10, Tmp, 38, McN	11, 17, 24, 31
Вирулентность/авирулентность к добавочным почти изогенным <i>Sr</i> -линиям				
PgtZ1	TKSTF	Зерноградская	12, 15, 20, 25, 27, 28, 29, 32, 39, 7a+12, 7b+18, 17+13	2compl, 13, 22, 26, 26+9g, 33, 33+5, 35, 37, 40, 44
PgtF18.6	TKSTF+ <i>Sr33</i>	Лысогорская	12, 15, 20, 25, 27, 28, 29, 32, 33, 39, 7a+12, 7b+18, 17+13	2compl, 13, 22, 26, 26+9g, 35, 37, 40, 44

(*Sr22+Sr25*) и *Л503/Sr35//Л503/3/Л503 (Sr35+Sr25)* в сравнении с сортом-реципиентом *Л503* и сортом-стандартом *Фаворит*. Исследования проводили в 2018–2020 гг., наиболее благоприятным был 2020 г., однако и в этот вегетационный период наблюдался дефицит осадков с фазы цветения до полной спелости, а 2018 и 2019 гг. выделялись как острозасушливые в течение всего полевого сезона.

Экспериментальный материал рандомизированно высевали в 7 м² делянки в трехкратной повторности. Норма высева – 400 зерен на 1 м². Качество зерна и теста оценивали по содержанию сырой клейковины и показателям прибора ИДК-1 и альвеографа Шопена с выпечкой опытных образцов хлебцев. Содержание белка в зерне урожая 2020 г. определяли на анализаторе зерна Infratec™ 1241. Полученные данные подвергли соответствующему статистическому анализу с использованием программ Agros-2.10.

Результаты

Идентификация генов устойчивости

Для подтверждения наличия комбинаций *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* генов у интрогрессивных линий *Л503/W3534//Л503* и *Л503/Sr35//Л503/3/Л503* проведена идентификация *Sr*-генов с применением молекулярных маркеров исследуемых *Sr*-генов.

Ген *Sr22* интрогрессирован в тетраплоидную пшеницу от *Triticum monococcum* L. ssp. *aegilopoides* (синоним *T. boeoticum* Boiss.). Для его идентификации обычно используют три тесно сцепленных молекулярных маркера: *Xcfa2019*, *Xcfa2123* и *Xbarc121* (Yu et al., 2010). В работе (Olson et al., 2010) получен набор линий с *Sr22* и

предложены ближайшие фланкирующие маркеры этого гена – *Xwmc633* и *Xcfa2123*. В нашем исследовании использованы все четыре маркера *Sr22*: *Xbarc121*, *Xcfa2123*, *Xcfa2019* и *Xwmc633* (рис. 1).

Размер полученных продуктов ПЦР с маркерами *Xbarc121*, *Xcfa2123*, *Xcfa2019* и *Xwmc633* приведен в табл. 2. Показано, что при постановке ПЦР с праймерами *barc121F/R*, *cfa2123F/R*, *cfa2019F/R*, и *wmc633F/R* амплифицируются фрагменты разного размера и не только те, которые заявлены как диагностические. Так, при амплификации с праймерами *wmc633F/R* у линий *SWSR22TB* и *W3534* был получен диагностический фрагмент размером 117 п. о. У интрогрессивной линии *Л503/W3534//Л503* фрагмент был порядка 211 п. о. В работе E.L. Olson с коллегами (2010) у линии *U5616-20-154* с небольшим фрагментом *T. monococcum* при амплификации с праймерами *wmc633F/R* получен фрагмент 229 п. о., что объяснялось рекомбинацией между геном устойчивости и всеми маркерами, картированными в этом районе.

Для маркера *Xbarc121* ампликон размером 215 п. н., описанный как диагностический фрагмент в работе (Yu et al., 2010), наблюдался у контрольных линий *SWSR22TB* и *W3534*, а также у линии *Л503/W3534//Л503*. При анализе продуктов ПЦР для маркера *Xcfa2123* наши результаты совпали с данными J.K. Haile с коллегами (2013). У контрольных линий *SWSR22TB* и *W3534* амплифицировался фрагмент размером 234 п. о. Аналогичный фрагмент отмечен у линии *Л503/W3534//Л503*, однако он был и у сорта *Хакасская*. У сорта *Инна* размер ампликонов был несколько больше – 240 и 250 п. о. При амплификации с праймерами *cfa2019F/R* у линии *SWSR22TB* в нашей

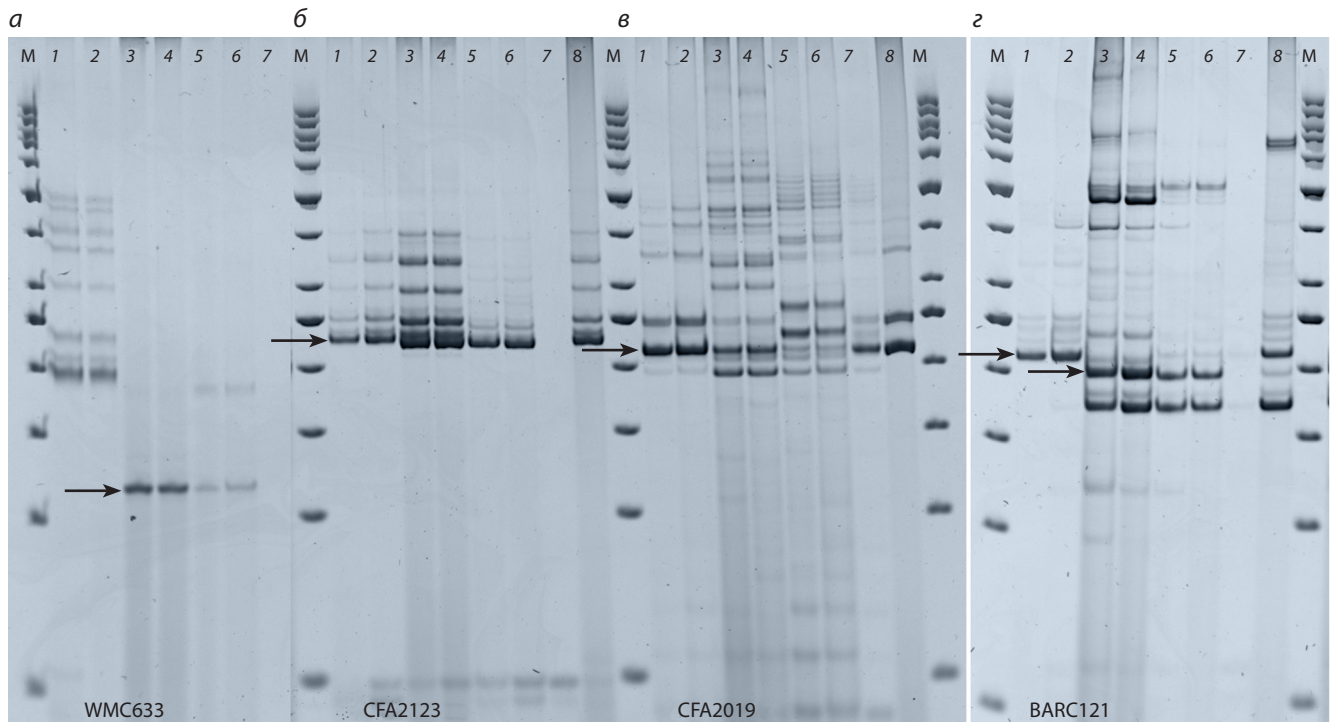


Рис. 1. Идентификация гена *Sr22* с использованием молекулярных маркеров *Xwmc633* (а), *Xcfa2123* (б), *Xcfa2019* (в) и *Xbarc121*(z).

М – маркер молекулярного веса 50 бп "Fermentas", № 1, 2 – линия *Л503/W3534//Л503*; положительный контроль *Sr22*: 3, 4 – линия *W3534*, 5, 6 – линия *SWSR22TB*; отрицательный контроль *Sr22*: 7 – сорт *Хакасская*, 8 – сорт *Инна*.

Таблица 2. Полиморфизм по величине амплификационных фрагментов молекулярных маркеров гена устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr22*

Образец пшеницы	Маркеры, размер ампликона, п. о.											
	<i>Xbarc121</i>				<i>Xcfa2123</i>			<i>Xcfa2019</i>			<i>Xwmc633</i>	
	170	197	215	234	234	240	250	200	238	250	117	211
SWSR22ТВ (контроль +)	170	197	215	–	234	–	–	–	238	250	117	–
W3534 (контроль +)	170	197	215	–	234	–	250	200	238	–	117	–
Л503/В3534//Л503	–	–	215	–	234	–	–	–	238	250	–	211
Хакасская (контроль –)	–	–	–	234	234	–	–	–	238	–	–	–
Инна (контроль –)	–	–	–	–	–	240	250	–	238	250	–	–

Примечание. «–» – отсутствие ампликона.

работе выявлялись два фрагмента, 238 и 250 п. о., так же, как у линии Л503/В3534//Л503. У линии W3534 были фрагменты 200 и 238 п. о. Однако следует отметить, что фрагмент 238 п. о. амплифицировался и у отрицательных контролей – сортов Хакасская и Инна. Амплификация диагностического фрагмента 238 п. о. для *Xcfa2019* показана и в работе (Olson et al., 2010), что не совпадает с данными (Haile et al., 2013).

Таким образом, у линии Л503/В3534//Л503 выявлены ампликоны по трем маркерам к *Sr22*: *Xbarc121*, *Xcfa2123*, *Xcfa2019*. Кроме того, эта линия была устойчива к изолятам *P. graminis*, PgtZ1 и PgtF18.6, авирулентным к линии с *Sr22* и вирулентным к линии с *Sr25*, а исходя из данных родословной и идентификации генов устойчивости, других *Sr*-генов в этой линии нет. Поэтому мы заключили, что линия Л503/В3534//Л503 содержит *Sr22*.

Ген *Sr35* был идентифицирован с помощью маркера *Xcfa2170* (рис. 2) у линии Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503. В качестве контроля была родительская линия Marquis*5/G2919 (*Sr35*).

При идентификации *Sr35* с применением маркера *Xcfa2170* у положительных контролей был получен диагностический фрагмент размером 160 п. о., что совпадает с данными J.K. Haile с коллегами (2013). Кроме генов *Sr22* и *Sr35*, у линий Л503/В3534//Л503 и Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 с помощью маркера Gb также был идентифицирован *Sr25/Lr19*. Нужно отметить, что линия Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 была устойчива к расе Ug99 в Кении (Baranova et al., 2021).

Таким образом, доказано, что интрогрессивные линии Л503/В3534//Л503 и Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 несут комбинации генов *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25*, следовательно, приводимые далее результаты фитопатологических и пребридинговых исследований являются корректными.

Фитопатологический анализ устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины

Анализ типа реакции к возбудителю стеблевой ржавчины проводили как в полевых условиях при естественных эпифитотиях болезни, так и в лабораторных – при искусственном инфицировании проростков. Как представили оценки устойчивости к *P. graminis* f. sp. *tritici* в условиях эпифитотий 2016–2020 гг., линия Л503/В3534//Л503

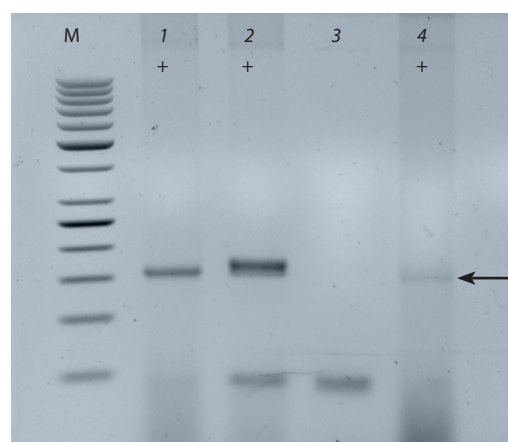


Рис. 2. Идентификация гена *Sr35* с использованием молекулярного маркера *Xcfa2170*.

М – маркер молекулярного веса 50 п.о. “Fermentas”, № 1 – линия Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503; положительный контроль *Sr35*: 2 и 4 – линия Marquis*5/G2919 (*Sr35*); отрицательный контроль: 3 – сорт Хакасская. Стрелкой указан диагностический фрагмент с молекулярным весом 160 п.о.

(*Sr22+Sr25*) показала тип реакции на патоген R, в то время как у Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 (*Sr35+Sr25*) тип реакции R был при эпифитотиях 2016–2019 гг., а в 2020 г. – 20MS. При этом сорт-реципиент Л503 (*Sr25*) в 2016, 2017 и 2020 гг. – 25MS, 20MS, 30MS и в 2018, 2019 гг. – R, а сорт Фаворит (6D(6Agⁱ) *LrAgⁱ/SrAgⁱ*) в эпифитотиях *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2016–2020 гг. тип реакции на патогена – 75S, 50S, 10S, исключение – 2019 г., когда наблюдали на части растений тип реакции 5S, а на части растений – R. Это было вызвано острой засухой и слабым развитием *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2019 г. (табл. 3).

Результаты оценки устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины на проростках в лабораторных условиях приведены в табл. 4. Лабораторная оценка на проростках исследуемых линий показала устойчивый тип реакции на патоген у линии с комбинацией генов *Sr22+Sr25* и восприимчивый – у линии с комбинацией *Sr35+Sr25*. Необходимо отметить, что данные типы реакций были как к популяциям *P. graminis* f. sp. *tritici*, так и к изолятам PgtZ1 и PgtF18.6.

Таблица 3. Полевая оценка устойчивости к *P. graminis* f. sp. *tritici* интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы в 2016–2020 гг. (стадия «молочно-восковая спелость»)

Сорт, линия	Полевая оценка устойчивости к болезни				
	2016 г.	2017 г.	2018 г.	2019 г.	2020 г.
Л503/W3534//Л503 (<i>Sr22+Sr25</i>)	R	R	R	R	R
Л503/ <i>Sr35</i> //Л503/3/Л503 (<i>Sr35+Sr25</i>)	R	R	R	R	20MS
Л503 (<i>Sr25</i>)	25MS	20MS	R	R	30MS
Фаворит (6D(6Ag) <i>LrAg/SrAg</i>)	75S	50S	10S	5S, R	50S

Таблица 4. Проростковая устойчивость интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы к *P. graminis* f. sp. *tritici*

Сорт, линия	Тип реакции, балл			
	Популяции <i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Изоляты <i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	
	лысогорская	омская	PgtZ1	PgtF18.6
Л503/W3534//Л503 (<i>Sr22+Sr25</i>)	1 ⁺	0;	0; 1	2
Л503/ <i>Sr35</i> //Л503/3/Л503 (<i>Sr35+Sr25</i>)	3 ⁻	2 ⁺	3 ⁺	3 ⁻
Хакасская (восприимчивый контроль)	4	4	4	4 ⁺

Таким образом, фитопатологический анализ устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины интрогрессивных линий Л503/W3534//Л503 (*Sr22+Sr25*) и Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 (*Sr35+Sr25*) как при естественных эпифитотиях *P. graminis*, так и при искусственном инфицировании продемонстрировал высокую и эффективную устойчивость комбинации *Sr22+Sr25* и восприимчивость комбинации *Sr35+Sr25* при эпифитотии 2020 г. и лабораторной оценке.

Пребридинговые исследования интрогрессивных линий

Результаты изучения продуктивности зерна у интрогрессивных линий Л503/W3534//Л503 (*Sr22+Sr25*) и Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 (*Sr35+Sr25*) показали, что в среднем за период с 2018 по 2020 г. нет значимых различий по урожайности у линий по сравнению с сортом-реципиентом Л503 и сортом-стандартом Фаворит (табл. 5), что ожидаемо, так как показатели по продуктивности в 2020 г. в 2 раза превышают урожайность 2018 и 2019 гг. Тем не менее анализ продуктивности зерна по годам выявил, что в 2018 г. на фоне сильной засухи в течение всего вегетационного периода урожайность была наиболее высокой у линии с комбинацией *Sr35+Sr25* (значимое превышение сорта-реципиента Л503 и на уровне сорта-стандарта Фаворит). У этой же линии наблюдалось незначимое превышение по урожайности зерна сорта Л503 в вегетационный сезон 2019 г. при схожей засухе, как и в 2018 г. Однако линия с комбинацией *Sr35+Sr25* значительно уступила по продуктивности зерна в условиях вегетационного сезона 2020 г., который характеризовался избытком влаги и умеренной температурой воздуха от всходов до начала цветения, затем до полного созревания отмечалась засуха с высокими температурами.

В целом за три года испытания по абсолютному показателю урожайности зерна Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503

(*Sr35+Sr25*) равна сорту-реципиенту Л503. Линия Л503/W3534//Л503 (*Sr22+Sr25*) по урожайности зерна была на уровне сорта Л503 в 2018 г., превышала Л503 в 2019 г. и значительно уступила сортам Л503 и Фаворит в 2020 г. По абсолютным цифрам продуктивности зерна линия Л503/W3534//Л503 (*Sr22+Sr25*) уступает как Л503, так и Фавориту. При сравнении изучаемых линий между собой обнаружено, что более продуктивной линией (по абсолютным цифрам) является Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 (*Sr35+Sr25*).

В среднем за 2018–2020 гг. анализ массы 1000 зерен как одного из важных элементов продуктивности зерна показал значимое понижение у линий с комбинацией *Sr22+Sr25* (28.2 г) и *Sr35+Sr25* (30.1 г) по сравнению с сортом-реципиентом Л503 (31.3 г). Причем это понижение было большим у линии с *Sr22+Sr25*, которая значительно уступила *Sr35+Sr25*, при этом у сорта-стандарта Фаворит – 28.0 г при НСР₀₅ = 0.95 г и F* = 9.67. По показателю период «всходы–колошение» наблюдались значимые различия между сортом-реципиентом Л503 (44.3 сут) и линиями с комбинацией *Sr22+Sr25* (47.7 сут) и *Sr35+Sr25* (46.7 сут), между линиями различия были незначительными при НСР₀₅ = 1.0 сут и F* = 27.60. По высоте растений различий между исследуемыми линиями и сортами Л503 и Фаворит не было.

Важный этап в создании сортов мягкой пшеницы – качество конечной продукции – муки и хлеба. К сожалению, нередко вовлечение чужеродной генетической изменчивости в генофонд мягкой пшеницы ухудшает ряд показателей качества муки и хлеба. В течение исследований выявлено, что линии с комбинациями *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* и сорт-реципиент Л503 не имели значимых различий по содержанию белка, но превышали сорт-стандарт Фаворит (см. табл. 5). По содержанию и крепости клейковины, по показателям прибора ИДК-1, получены следующие результаты: линия с комбинацией *Sr35+Sr25* значительно снизила содержание клейковины, но была суще-

Таблица 5. Показатели продуктивности зерна у интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией генов *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* и сортов Л503 и Фаворит за 2018–2020 гг.

Сорт, линия	Урожайность зерна, кг/га				Белок, %
	2018	2019	2020	Среднее	2020
Л503 (<i>Lr19/Sr25</i>)	616 a	991 a	2660 c	1422	16.4 b
Л503/W3534//Л503 (<i>Lr19/Sr25+Sr22</i>)	633 a	1170 b	1660 a	1154	16.9 b
Л503/ <i>Sr35</i> //Л503/3/Л503 (<i>Lr19/Sr25+Sr35</i>)	938 c	1036 ab	2388 b	1454	16.9 b
Фаворит (стандарт) (<i>Lr/Sr6Agi</i>)	852 bc	1067 ab	2743 c	1554	15.5 a
НСР ₀₅	172	170	263	NS	0.5

Таблица 6. Показатели качества муки и хлеба у интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией генов *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* и сортов Л503 и Фаворит в среднем за 2018–2020 гг.

Сорт, линия	Клейковина		Альвеограф*		Хлеб**			
	%	ИДК1	P, мм	P/L	W, ед. а.	V, см ³	Пористость, балл	Цвет мякиша
Л503	38.0 b	84 bc	68 a	1.2 a	164 b	770 bc	4.9 b	Желтый
Л503/W3534//Л503	38.0 b	90 c	68 a	2.2 b	98 a	680 a	4.3 a	
Л503/ <i>Sr35</i> //Л503/3/Л503	31.6 a	73 a	103 b	3.0 c	187 b	690 a	4.9 b	
Фаворит (стандарт)	32.1 a	75 a	69 a	1.0 a	173 b	800 c	4.8 b	Кремовый

* Показатели альвеографа: P – упругость теста; P/L – отношение упругости теста к растяжимости, W – сила муки;

** Показатели оценки хлеба: V – объем хлеба, пористость.

ственно большей крепости по отношению к сорту Л503, а линия с комбинацией *Sr22+Sr25* по этим параметрам не отличалась от сорта-реципиента Л503. Значения показателей упругости теста и отношения упругости теста к растяжимости (P/L) распределились следующим образом: более высокие – у комбинации *Sr35+Sr25*, а комбинация *Sr22+Sr25* по упругости не отличалась от сорта Л503, но имела более высокое отношение упругости теста к растяжимости (P/L). Линия с комбинацией *Sr22+Sr25* значительно снизила силу муки, пористость мякиша и объем хлеба по отношению к сорту-реципиенту Л503. В то же время линия с комбинацией *Sr35+Sr25* имела несущественное повышение силы муки, снизила объем хлеба, но высокий равный балл пористости хлеба по отношению к Л503.

В целом можно сделать вывод, что на показатели муки и хлеба (кроме содержания клейковины) меньшее влияние оказала комбинация *Sr35+Sr25* (табл. 6).

Обсуждение

Как отмечено выше, все три изучаемых гена, *Sr22*, *Sr25*, *Sr35*, эффективны против биотипов расы *P. graminis* f. sp. *tritici* Ug99 (http://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22). Однако наши исследования продемонстрировали, что высокую эффективность к болезни показывает лишь комбинация генов устойчивости *Sr22+Sr25*. Эти результаты были неожиданными, так как гены *Sr25* и *Sr22* не эффективны против саратовской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* (О.А. Баранова, неопубликованные данные).

Есть основание предположить, что в данном случае проявляется аддитивный эффект, или так называемая запретная комбинация.

В то же время при лабораторной оценке ген *Sr35* в отдельности эффективен против саратовской популяции 2016, 2017 и 2020 гг. и лысогогорской популяции Саратовской области 2018 и 2019 гг. (О.А. Баранова, неопубликованные данные). Однако комбинация генов *Sr35+Sr25* у линии Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 показала восприимчивость к возбудителю стеблевой ржавчины. Объяснений этому явлению может быть несколько. Во-первых, в лабораторных исследованиях инфицировали проростки, а в полевых условиях при эпифитотиях патогена оценивали взрослые растения в стадиях «начало налива зерна» или «молочно-восковая спелость». Возможно, ген *Sr35* имеет только проростковую устойчивость к данному набору популяций *P. graminis* f. sp. *tritici*. Во-вторых, может быть, экспрессия гена *Sr35* подавляется генами супрессорами сорта Л503. Похожие случаи наблюдались при экспрессии гена *Sr21*, также перенесенного от *T. monococtum* L. (The, Baker, 1975; по: Леонова, 2018).

При анализе влияния комбинаций генов *Sr22+Sr25* и *Sr35+Sr25* на агрономические показатели, в первую очередь продуктивность зерна и качество муки и хлеба, необходимо учитывать известные индивидуальные эффекты изучаемых генов устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины. Ген *Sr25* был перенесен в мягкую пшеницу в составе транслокации 7DS-7DL-7Ae#1L от хро-

мосомы 7Ae#1 пырея удлиненного, в которой определен следующий порядок расположения генов (от центромеры к теломерному концу): *Sd1-Xpsr165-Xpsr105-aAmy-D2-Xpsr129-Lr19-Wsp-D1-Sr25-Y-Ep-D1* (Prins et al., 1996). Без сомнений, влияние на агрономические показатели оказывает вся транслокация.

Наши ранние исследования показали, что эта транслокация нейтральна по отношению к урожайности зерна, значимо увеличивает количество клейковины, не изменяя ее качество, и не влияет на упругость теста, отношение упругости к растяжению теста и силу муки, однако значимо понижает объем хлебцев при одинаковой пористости. 7DS-7DL-7Ae#1L транслокация не влияла на период «всходы–колошение» и высоту растений (Сибикеев и др., 2018). Таким образом, данная транслокация не ухудшает агрономические показатели.

Известно, что ген *Sr22* был интрогрессирован в мягкую пшеницу из двух диплоидных видов, несущих геном А, – *T. boeoticum* Boiss., источника G-21 (Gerechter-Amati et al., 1971), и *T. monocosmum*, источника RL5244 (Kerber, Dyck, 1973). Переносы от этих двух источников включают различное количество интрогрессированного хроматина. Перенос из *T. boeoticum* содержит почти полностью длинное плечо и часть короткого плеча 7A^m (сорт Steinwedel), а из *T. monocosmum* – дистальную часть 7A^mL (сорт Marquis) (Kerber, Dyck, 1973; Paull et al., 1994).

Так как рекомбинация между геномом А мягкой пшеницы и геномами А^m *T. boeoticum* и *T. monocosmum* ограничена из-за действия системы генов *Ph* (pairing homeologous) (Luo et al., 2000), интрогрессивный материал с геном *Sr22* в большинстве случаев наследуется как единый блок. Как показали исследования J.G. Paull с коллегами (1994), интрогрессии с геном *Sr22* понижали урожай зерна, увеличивали период «всходы–колошение». В то же время исследования Т.Т. The с коллегами (1988) выявили незначительное понижение продуктивности зерна, зависящего от генотипа-реципиента (в пределах 10 %). Предпринимались успешные попытки уменьшения интрогрессивного материала с геном *Sr22* от *T. boeoticum* для возможного улучшения агрономических признаков (Olson et al., 2010). Из доступных источников не известно об изучении влияния комбинации *Sr22+Sr25* на агрономические признаки и качество муки и хлеба. Кроме того, в наших исследованиях была взята почти изогенная линия сорта Marquis с геном *Sr22* от *T. monocosmum* (W3534), которая несет меньший блок интрогрессивного материала от 7A^m.

По урожайности зерна из трех лет изучения один год (2019 г.) было значимое превышение сорта-реципиента Л503, но один год (2020 г.) – значимое понижение, в целом отличий не было, но по абсолютным цифрам отмечается снижение продуктивности (1154 кг/га у интрогрессивной линии с *Sr22+Sr25* и 1422 кг/га у Л503). По периоду «всходы–колошение» так же, как в предыдущих исследованиях, наблюдалось увеличение этого периода у линии с *Sr22+Sr25* на четыре дня, в то же время отмечалось понижение массы 1000 зерен, а по высоте растений различий не было.

В наших исследованиях установлено, что у линии с *Sr22+Sr25* более низкое качество муки и хлеба по сравне-

нию с сортом-реципиентом Л503, в основном за счет пониженной силы муки, более грубой пористости и меньшего объема хлеба, в то же время отмечено высокое содержание белка в зерне: 16.9 против 16.4 % у Л503.

При анализе комбинации генов *Sr35+Sr25* необходимо отметить, что ген *Sr35* локализован в хромосоме 3AL в 41.5 См от центромеры (McIntosh et al., 1995) и детально изучен по структуре и регуляции (Zhang et al., 2010; Saintelac et al., 2013), но, к сожалению, в доступных источниках не удалось найти сведений о его влиянии на агрономические признаки. Однако отсутствие коммерческих сортов мягкой пшеницы с этим геном указывает на негативное влияние на хозяйственную ценность (McIntosh et al., 2013).

В наших исследованиях выявлено, что линия с комбинацией генов *Sr35+Sr25* из трех лет изучения по урожайности зерна уступила только в 2020 г. и превысила в 2018 г. В целом значимых отличий не было, по абсолютным цифрам продуктивность зерна за период 2018–2020 гг. у линии с комбинацией генов *Sr35+Sr25* – 1454 кг/га, а у сорта Л503 – 1422 кг/га. По периоду «всходы–колошение» линия с комбинацией генов *Sr35+Sr25* колосится на два дня позже, чем сорт Л503, по массе 1000 зерен отмечено значимое снижение, а по высоте растений различий с сортом-реципиентом Л503 не было. По качеству муки и хлеба линия с комбинацией генов *Sr35+Sr25* почти не отличалась от сорта Л503, кроме значимого снижения объема хлеба. По содержанию белка в зерне линия с комбинацией генов *Sr35+Sr25* незначительно превышала Л503 – 16.9 и 16.4 % соответственно.

Заключение

В целом по всему изучаемому комплексу хозяйственно ценных признаков сочетание генов *Sr35+Sr25* представляется более эффективным, чем линия с комбинацией генов *Sr22+Sr25*. Исследование показало, что сочетание генов *Sr35+Sr25* не ухудшает агрономические показатели пшеницы, однако возможно, что экспрессия гена *Sr35* в линии Л503/*Sr35*//Л503/3/Л503 подавляется генами-супрессорами сорта Л503. Необходимы дальнейшее исследование экспрессии гена *Sr35* в сочетании с другими генами устойчивости, такими как *Sr31*, и использование его в российских селекционных программах.

Список литературы / References

- Баранова О.А. Молекулярная идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине у новых допущенных к использованию сортов пшеницы. *Вестн. защиты растений*. 2020;103(2):113-118. DOI 10.31993/2308-6459-2020-103-2-4936.
- [Baranova O.A. Molecular identification of stem rust resistance genes in new regional wheat varieties. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2020;103(2):113-118. DOI 10.31993/2308-6459-2020-103-2-4936. (in Russian)]
- Гультяева Е.И., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Шайдаюк Е.Л. Расширение генетического разнообразия сортов яровой мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.) в Нижнем Поволжье. *С.-х. биология*. 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus.
- [Gulyaeva E.I., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Shaydayuk E.L. Enlargement of genetic diversity of spring bread wheat resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in Lower Volga region. *Selskhozaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus. (in Russian)]

- Леонова И.Н. Влияние чужеродного генетического материала на проявление хозяйственно важных признаков мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018; 22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367.
[Leonova I.N. Influence of alien genetic material on the manifestation of agronomically important traits of common wheat (*T. aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):321-328. DOI 10.18699/VJ18.367. (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Друзин А.Е., Андреева Л.В. Анализ влияния комбинации 7DS-7DL-7AE#1L+1BL-1RS транслокаций на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы. *Усп. соврем. естествознания*. 2018;6:49-53. DOI 10.17513/use.36780.
[Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Andreeva L.V. Influence analysis of combination 7DS-7DL-7AE#1L+1BL-1RS translocations on spring wheat yield and grain quality. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2018;6:49-53. DOI 10.17513/use.36780. (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Конькова Э.А., Салмова М.Ф. Характеристика вирулентности возбудителя бурой ржавчины мягкой пшеницы в условиях саратовской области. *Аграр. науч. журнал*. 2020;9:40-44. DOI 10.28983/asj.y2020i9pp40-44.
[Sibikeev S.N., Konkova E.A., Salmova M.F. Characteristic of the bread wheat leaf rust pathogen virulence in the Saratov region conditions. *Agrarnyy Nautchnyy Zhurnal = Agrarian Scientific Journal*. 2020;9:40-44. DOI 10.28983/asj.y2020i9pp40-44. (in Russian)]
- Badaeva E.D., Ruban A.S., Shishkina A.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Surzhikov S.A., Dragovich A.Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. ($2n = 4x = 28$, UeUeXcXc) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat *Ae. columnaris* introgression lines. *Genome*. 2018;61(2):131-143.
- Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E. Molecular identification of the stem rust resistance genes in the introgression lines of spring bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):296-303. DOI 10.18699/VJ19.494.
- Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Gulyaeva E.I. Resistance of spring bread wheat lines developed by ARISER to abiotic stress and rust pathogens. In: Kochetov A.V., Salina E.A. (Ed.). *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology*. The 6th Intern. Scientific Conf. 14-18 June 2021. Novosibirsk. Novosibirsk, 2021. DOI 10.18699/PlantGen2021-016.
- Gerechter-Amati Z.K., Wahl I., Vardi A., Zohary D. Transfer of stem rust seedling resistance from wild diploid einkorn to tetraploid durum wheat by means of a triploid hybrid bridge. *Euphytica*. 1971; 20:281-285.
- Gulyaeva E., Sibikeev S., Druzhin A., Shaydayuk E.L. Leaf rust resistance genes identification in the spring bread wheat breeding material of the Agricultural Research Institute for South-East Regions of Russia. *Ratar. Povrt*. 2019;56(2):34-40. DOI 10.5937/ratpov56-20733.
- Haile J.K., Hammer K., Badebo A., Singh R.P., Röder M.S. Haplotype analysis of molecular markers linked to stem rust resistance genes in Ethiopian improved durum wheat varieties and tetraploid wheat landraces. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2013;60:853-864. DOI 10.1007/s10722-012-9880-0.
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A., Yahyaoui A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 2007;91:1096-1099.
- Kerber E.R., Dyck P.L. Inheritance of stem rust resistance transferred from diploid wheat (*Triticum monococcum*) to tetraploid and hexaploid wheat and chromosome location of gene involved. *Can. J. Genet. Cytol.* 1973;15:397-409.
- Khan R., Bariana H., Dholakia B., Naik S., Lagu M., Rathjen A., Bhavani S., Gupta V. Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:846-850. DOI 10.1007/s00122-005-0005-4.
- Luo M.C., Yang Z.L., Kota R.S., Dvorak J. Recombination of chromosomes 3A(m) and 5A(m) of *Triticum monococcum* with homeologous chromosomes 3A and 5A of wheat: The distribution of recombination across chromosomes. *Genetics*. 2000;154:1301-1308.
- McIntosh R.A. Preemptive breeding to control wheat rusts. *Euphytica*. 1992;63:103-113.
- McIntosh R.A., Brown G.N. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1997;35:311-326.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2015-2016 Supplement. *Annual Wheat Newsletter*. (KSU, USA). 2016;62:102-115.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2018 Supplement. *Annual Wheat Newsletter*. (KSU, USA). 2018;64:73-93.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2020 Supplement. *Annual Wheat Newsletter*. (KSU, USA). 2020;66:109-128.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Melbourne: CSIRO Publ., 1995. DOI 10.1007/978-94-011-0083-0.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. In: 12th Int. Wheat Genet. Symp., 8-13 September. 2013. Yokohama, Japan. 2013;29-30.
- Miralles D.J., Resnicoff E., Carrtero R. Yield improvement associated with *Lr19* translocation in wheat: which plant attributes are modified? In: Spiertz J.H.J., Struik P.C., van Laar H.H. (Eds.). *Scale and Complexity in Plant Systems Research: Gene-Plant-Crop Relations*. Dordrecht: Springer, 2007;169-176.
- Olson E.L., Brown-Guedira G., Marshall D., Stack E., Bowden R.L., Jin Y., Rouse M., Pumphrey M.O. Development of wheat lines having a small introgressed segment carrying stem rust resistance gene *Sr22*. *Crop Sci.* 2010;50:1823-1830. DOI 10.2135/cropsci2009.11.0652.
- Paull J.G., Pallotta M.A., Langridge P. The T.T. RFLP markers associated with *Sr22* and recombination between chromosome 7A of bread wheat and the diploid species *Triticum boeoticum*. *Theor. Appl. Genet.* 1994;89:1039-1045. DOI 10.1007/BF00224536.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 1948;26(5):496-500. DOI 10.1139/cjr48c-033.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Koebner R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103(4):618-624. DOI 10.1007/PL00002918.
- Prins R., Marais G.F., Janse B.J.H., Pretorius Z.A., Marais A.S. A physical map of the *Thinopyrum* – derived *Lr19* translocation. *Genome*. 1996;39:1013-1019. DOI 10.1139/g96-126.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saaru E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1992.
- Saintenac C., Zhang W., Salcedo A., Rouse M.N., Trick H.N., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to Ug99 stem rust race group. *Science*. 2013;341(6147):783-786. DOI 10.1126/science.1239022.
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E. Prebreeding research of near-isogenic lines of spring bread wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. and *Aegilops ventricosa* Tausch. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6:338-343. DOI 10.1134/S2079059716030126.
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Gulyaeva E.I., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Agi and 6Agi2 chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat-wheatgrass substitutions. *Russ. J. Genet.* 2017;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115.

- Singh D., Park R.F., McIntosh R.A., Bariana H.S. Characterisation of stem rust and stripe rust seedling resistance genes in selected wheat cultivars from the United Kingdom. *J. Plant Pathol.* 2008;90(3): 553-562.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S., Crossa J. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7AG and 1BL.1RS in spring wheat. *Crop Sci.* 1998;38:27-33. DOI 10.2135/cropsci1998.0011183X003800010005x.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *U. S. Dept. Agric. Res. Serv.* 1962;E-617 (rev.):1-53.
- The T.T., Latter B.D.H., McIntosh R.A., Ellison F.W., Brennan P.S., Fisher J., Hollamby G.J., Rathjen A.J., Wilson R.E. Grain yields of near-isogenic lines with added genes for stem rust resistance. In: Miller T.E., Koebner R.M.D. (Eds.) Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge, UK. 13–19 July. 1988. Cambridge: Inst. Plant Sci. Res., 1988;901-906.
- Yu L.X., Liu S., Anderson J.A., Singh R.P., Jin Y., Dubcovsky J., Brown-Guidera G., Bhavani S., Morgounov A., He Z., Huerta-Espino J., Sorrells M.E. Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Mol. Breed.* 2010;26:667-680. DOI 10.1007/s11032-010-9403-7.
- Zhang W., Olson E., Saintenac C., Rouse M., Abate Z., Jin Y., Akhunov E., Pumphrey M., Dubcovsky J. Genetic maps of stem rust resistance gene *Sr35* in diploid and hexaploid wheat. *Crop Sci.* 2010; 50:2464-2474. DOI 10.2135/cropsci2010.04.0202/.

ORCID ID

S.N. Sibikeev orcid.org/0000-0001-8324-9765
O.A. Baranova orcid.org/0000-0001-9439-2102
A.E. Druzhin orcid.org/0000-0002-3968-2470

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-016-00170 а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.02.2021. После доработки 08.07.2021. Принята к публикации 08.07.2021.

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

Комплексная устойчивость линий яровой и озимой мягкой пшеницы к биотическим и абиотическим стрессам

И.Ф. Лапочкина¹✉, Н.Р. Гайнуллин¹, О.А. Баранова², Н.М. Коваленко², Л.А. Марченкова¹,
О.В. Павлова¹, О.В. Митрошина¹

¹ Федеральное исследовательское учреждение «Немчиновка», пос. Новоивановское, Московская область, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ inna-lapochkina@yandex.ru

Аннотация. Оригинальный исходный материал яровой и озимой мягкой пшеницы с групповой устойчивостью к стеблевой и бурой ржавчинам создан с использованием новых доноров устойчивости к стеблевой ржавчине – озимой мягкой пшеницы GT 96/90 (Болгария) и линии 119/4-06rw с генетическим материалом соответственно видов *Triticum migushovae* и (*Aegilops speltoides* и *Secale cereale*), линии яровой пшеницы 113/00i-4, полученной с привлечением видов *Ae. triuncialis* и *T. kiharae*, а также ярового образца 145/00i с генетическим материалом вида *Ae. speltoides*, устойчивого к бурой ржавчине. Передачу эффективных *Sr*-генов потомству отслеживали с помощью молекулярных маркеров. Новые линии прошли полевую оценку устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине при эпифитотийном развитии болезней в Центральном регионе Российской Федерации, а также на Северном Кавказе и в Западной Сибири и показали высокую устойчивость к этим патогенам. Четырнадцать генотипов с групповой устойчивостью к этим болезням и родительские формы, принимавшие участие в происхождении линий, в лабораторных условиях оценили на устойчивость к темно-бурой (*Cochliobolus sativus*) и желтой (*Pyrenophora tritici-repentis*) пятнистостям с применением изолятов из Казахстана и Омска. Выделена высокоустойчивая родительская форма озимой мягкой пшеницы из коллекции «Арсенал», 119/4-06rw (пшенично-эгилопсно-ржаной гибрид $2n = 42$) с групповой устойчивостью к двум пятнистостям и четыре среднеустойчивых генотипа к обоим изолятам желтой пятнистости (из казахстанской и омской популяций патогена), а также генотипы, устойчивые к омскому изоляту *P. tritici-repentis* (родительская форма 113/00i-4 и линии 1-16i, 6-16i, 9-16i). Среди образцов озимой пшеницы выделено четыре с групповой устойчивостью к темно-бурой и желтой пятнистостям. Дополнительно оценена стрессоустойчивость линий в лабораторных условиях на ранних этапах онтогенеза к засолению NaCl и длительному затоплению семян водой. Линии 33-16i, 37-16i, 32-16i и 9-16i проявили высокую способность противостоять избытку влаги. Высокой солеустойчивостью, превышающей средний показатель, 49.7 %, характеризовались линии 33-16i, 37-16i, 32-16i и 3-16i. Среди озимых генотипов выделены образцы с повышенной устойчивостью к гипоксии, 37-19w, 32-19w, 16-19w, 90-19w, и солеустойчивостью – 20-19w, 9-19w, 37-19w, 90-19w, достоверно превышающие стандартный сорт Московская 39. Эти образцы представляют интерес как источники устойчивости к анаэробному и солевому стрессу, а также как доноры устойчивости к группе грибных заболеваний: бурой и стеблевой ржавчинам и желтой пятнистости листьев. Повышенный уровень устойчивости нового исходного материала мы связываем с наличием чужеродных транслокаций у исходных родительских форм, участвовавших в происхождении линий.
Ключевые слова: мягкая пшеница; стеблевая и бурая ржавчины; темно-бурая и желтая пятнистости; солеустойчивость; устойчивость к гипоксии.

Для цитирования: Лапочкина И.Ф., Гайнуллин Н.Р., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Марченкова Л.А., Павлова О.В., Митрошина О.В. Комплексная устойчивость линий яровой и озимой мягкой пшеницы к биотическим и абиотическим стрессам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):723-731. DOI 10.18699/VJ21.082

Complex resistance of spring and winter bread wheat lines to biotic and abiotic stresses

I.F. Lapochkina¹✉, N.R. Gainullin¹, O.A. Baranova², N.M. Kovalenko², L.A. Marchenkova¹, O.V. Pavlova¹, O.V. Mitroshina¹

¹ Federal Research Center "Nemchinovka", Novoivanovskoe, Moscow region, Russia

² All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ inna-lapochkina@yandex.ru

Abstract. An original initial material of spring and winter bread wheat with group resistance to stem and leaf rust was developed using new donors of resistance to stem rust: winter soft wheat GT 96/90 (Bulgaria) and accession 119/4-06rw with genetic material of the species *Triticum migushovae* and (*Aegilops speltoides* and *Secale cereale*), respectively, a line of spring wheat 113/00i-4 obtained using the species *Ae. triuncialis* and *T. kiharae*, as well as spring accession 145/00i with genetic material of the species *Ae. speltoides* resistant to leaf rust. The transfer of effective *Sr*-genes to progeny was

monitored using molecular markers. New lines underwent a field assessment of resistance to leaf and stem rust in the epiphytotic development of diseases in the Central Region of the Russian Federation, as well as in the North Caucasus and Western Siberia, and showed high resistance to these pathogens. Fourteen genotypes of spring wheat with group resistance to these diseases and parental forms that participated in the origin of the lines were evaluated for resistance to spot blotch (*Cochliobolus sativus*) and tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) using isolates from Kazakhstan and Omsk in laboratory conditions. A highly resistant parental form of winter soft wheat from "Arsenal" collection 119/4-06rw (wheat-*Ae. speltooides*-rye hybrid $2n = 42$) with group resistance to two spots, four medium-resistant genotypes to both isolates of tan spot from Kazakhstan and Omsk populations of the pathogen, as well as genotypes resistant to the Omsk isolate of *P. tritici-repentis* (parental form 113/00i-4 and lines 1-16i, 6-16i, 9-16i) were isolated. Among the lines of winter wheat, four were identified with group resistance to spot blotch and tan spot. Additionally, the stress resistance of the lines to NaCl salinization and prolonged flooding of seeds with water was evaluated at the early stages of ontogenesis in laboratory conditions. Lines 33-16i, 37-16i, 32-16i and 9-16i showed a high ability to withstand excess moisture. Lines 33-16i, 37-16i, 32-16i and 3-16i were characterized by high salt tolerance, exceeding the average of 49.7%. Among the winter genotypes, lines were identified with increased resistance to hypoxia (37-19w, 32-19w, 16-19w, 90-19w) and with increased salt tolerance (20-19w, 9-19w, 37-19w, 90-19w), significantly exceeding the standard cv. Moskovskaya 39. The listed lines are of interest as sources of resistance to anaerobic and salt stress, as well as donors of resistance to a group of fungal diseases: leaf and stem rust and tan spot. We attribute the increased level of resistance of the new initial material to the presence of alien translocations in the original parental forms involved in the origin of the lines.

Key words: common wheat; stem and leaf rust; spot blotch and tan spot; salt resistance; resistance to hypoxia.

For citation: Lapochkina I.F., Gainullin N.R., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Marchenkova L.A., Pavlova O.V., Mitroshina O.V. Complex resistance of spring and winter bread wheat lines to biotic and abiotic stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):723-731. DOI 10.18699/VJ21.082

Введение

Нечерноземье относится к зоне рискованного земледелия, которая всегда изобиловала стрессовыми факторами абиотического и биотического порядка. Преобладающие грибные заболевания – мучнистая роса, бурая ржавчина, а с 2010 г. на поля вернулась стеблевая ржавчина, которой не было 27 лет. В последние годы в связи с потеплением посевы пшеницы периодически поражаются листовыми пятнистостями (темно-бурой и желтой), септориозом. Вредоносность этих заболеваний высокая, и потери урожая могут достигать 40–50% (Афанасенко и др., 2011; Михайлова и др., 2012; Ким, Волкова, 2020).

Из абиотических стрессов, с одной стороны, наблюдаются частые майские засухи, обуславливающие изреживание посевов, а с другой, возможны избыток влаги, затопление посевов во время снеготаяния, поражение снежной плесенью. Во время вегетации часты ливневые осадки, приводящие к полеганию зерновых. Несмотря на значительные успехи селекционеров в создании высокопродуктивных сортов яровой и озимой пшеницы для этой зоны, получение устойчивых сортов к биотическим и абиотическим факторам среды остается актуальным, особенно в последние десятилетия, когда мы сталкиваемся с реальными фактами изменения климата на планете, которые влияют на видовой спектр фитопатогенных грибов и их расовый состав (Lekomtseva et al., 2007, 2008; Zeleneva et al., 2021).

Основная цель наших исследований состояла в создании продуктивных конкурентоспособных линий яровой и озимой пшеницы с устойчивостью к стеблевой ржавчине *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Pgt) и другим опасным патогенам (*P. tritricina*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Cochliobolus sativus*) и выявлении других хозяйственно ценных свойств и признаков созданного материала. Стратегия и тактика получения такого исходного материала базировались на ранее созданной коллекции мягкой пшеницы «Арсенал» (Лапочкина, 2005), представленной генотипами с дополненными хромосомами *Aegi-*

lops speltooides и чужеродными транслокациями *Ae. speltooides*, *Ae. triuncialis*, *Triticum kiharae* и *Secale cereale*, а также на поиске новых источников устойчивости к расе Ug99 стеблевой ржавчины.

Материалы и методы

Предыстория создания линий пшеницы с повышенной устойчивостью к ржавчинным грибам началась в 2010 г., когда часть коллекции «Арсенал» (90 образцов), а также образцы из Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) (129 образцов) были оценены в Университете штата Миннесота (США) на устойчивость к стеблевой ржавчине, расе Ug99, на стадии проростков. Было отобрано семь генотипов мягкой пшеницы с $2n = 42$ и $2n = 44$ из коллекции «Арсенал», а также несколько генотипов из коллекции ВИР, проявивших устойчивость к этому опасному патогену (тип реакции на проникновение гриба: 0, 1, 2). Для дальнейшего изучения и гибридизации были оставлены гексаплоидные образцы с известным происхождением и наличием чужеродного материала: озимая пшенично-эгилопсно-ржаная линия 119/4-06rw (*Ae. speltooides*, *S. cereale*), линия из Болгарии GT 96/90 с генетическим материалом вида *T. migushchovae*, сорт озимой пшеницы Донская полукарликовая (*Ae. squarrosa*) и образец яровой пшеницы 113/00i-4 с генетическим материалом видов *Ae. triuncialis* и *T. kiharae*.

Оценка хозяйственно ценных признаков в полевых условиях Московской области на инфекционном фоне бурой ржавчины показала высокую устойчивость к популяции бурой ржавчины (0–5% поражения) у всех образцов. Образцы 113/00i-4 (далее в таблицах – 113) и 119/4-06rw (далее – 119) были высокоустойчивы к мучнистой росе, а образцы из ВИР (сорт Донская полукарликовая и линия GT 96/90) (далее – Д/п и 96) – восприимчивы к этому заболеванию. Но они обладали другими хозяйственно ценными признаками – скороспелостью (раннее выколашивание) и короткостебельностью. Все образцы были

достаточно продуктивны для того, чтобы не опасаться снижения продуктивности при гибридизации.

У образцов была проведена идентификация *Sr*-генов с помощью молекулярных маркеров, рекомендованных для маркер-ориентированной селекции (MAS). Использовали молекулярные маркеры к 11 *Sr*-генам: Xgwm533 – *Sr2* (Hayden et al., 2004); STS638 – *Sr15* (Neu et al., 2002); Wpt5343 – *Sr17* (Cossa et al., 2007); Xbarc121, Xcfa2123, Xcfa2019 – *Sr22* (Khan et al., 2005; Yu et al., 2010); Sr24#12, Sr24#50 – *Sr24/Lr24* (Mago et al., 2005); Scm9 – *Sr31* (Weng et al., 2007); Xbarc55, Xstm773 – *Sr32* (Somers et al., 2004; Dundas et al., 2007; Yu et al., 2009); Xwmc477, Xstm773-2 – *Sr36* (Tsilo et al., 2008); Sr39#22 – *Sr39* (Mago et al., 2009); Xgwm344 – *Sr40* (Wu et al., 2009); Xgwm501 – *Sr47* (Faris et al., 2008).

Условия ПЦР приведены в оригинальных работах, но для каждого маркера подбирали наиболее оптимальные условия. Были идентифицированы гены, как эффективные, так и не эффективные к расе Ug99 стеблевой ржавчины, но проявляющие устойчивость в Нечерноземной зоне и на Северном Кавказе (Baranova et al., 2015). Так как в нашем распоряжении было три озимых генотипа и только один яровой, то была продумана стратегия получения гибридных популяций с яровым и озимым образом жизни с использованием различных фонов выращивания растений.

Первоначально провели скрещивания родительских форм с учетом их альтернативных признаков. Высокорослый источник скрещивали с короткостебельным, позднеспелый – с рановыколашивающимся; устойчивый к мучнистой росе генотип скрещивали с восприимчивым к этой болезни. В первый год провели прямые и обратные скрещивания трех образцов: GT 96/90, 119/4-06rw и 113/00i-4. Сорт Донская полукарликовая выколашивался настолько рано, что не удалось провести с ним гибридизацию. Семена F₂ делили пополам и выращивали на различных фонах.

Для получения яровых генотипов посев осуществляли весной в поле, а выколосившиеся растения опыляли рекуррентной родительской формой – линией 113/00i-4 или привлекали для опыления образец 145/05i, устойчивый к мучнистой росе и бурой ржавчине, но восприимчивый к стеблевой ржавчине.

Вторую половину семян высевали в грунт с подогревом в феврале. Когда появлялись всходы, подогрев отключали. Растения проходили яровизацию и выколашивались в естественных условиях. Затем их, в зависимости от габитуса, опыляли либо сортом Донская полукарликовая, либо линией GT96/90 или озимой линией 119/4-06rw. Использование подогретого фона, обычного посева и посевов в сосуды в теплице позволило ускорить процесс создания безкроссного потомства различной степени насыщенности.

После самоопыления из этого потомства на инфекционном фоне бурой ржавчины отбирали индивидуальные растения по признакам устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе, а также с другими ценными признаками. У этих растений идентифицировали гены устойчивости к стеблевой ржавчине с применением молекулярных маркеров, перечисленных выше, и выделяли растения с не-

сколькими генами устойчивости в гомозиготном состоянии с комплексом хозяйственно ценных признаков для полевых испытаний устойчивости в Московской области, Краснодарском крае и Западной Сибири (г. Омск).

Иммунологическую оценку линий на устойчивость к стеблевой ржавчине в Центральном и Западно-Сибирском регионах проводили в полевых условиях к природной популяции гриба, а в Краснодарском крае – на искусственном инфекционном фоне развития стеблевой и бурой ржавчин. В последнем случае в качестве инфекционного материала использовали северокавказские популяции *Puccinia* spp. Учет пораженности растений выполняли в период максимального развития заболеваний. Критериями оценки служили тип реакции и степень поражения растений по шкале, рекомендуемой СИММИТ (Roelfs, Singh, 1992).

У родительских форм скрещивания и линий с комплексом хозяйственно ценных признаков осуществляли определение устойчивости к темно-бурой (*Cochliobolus sativus*) и желтой пятнистостям (*P. tritici-repentis*). Для последней использовали два изолята, выделенные из популяций *P. tritici-repentis*, распространенных в Западной Сибири: (омский изолят) из умеренной климатической зоны с континентальным климатом лесостепи и (казахстанский изолят) из резко континентальной зоны Северного Казахстана. Изоляты различаются по вирулентности. Оценка выполняли в лабораторных условиях на отрезках листьев, помещенных в раствор бензимидазола (0.004 %), по методике (Михайлова и др., 2012).

Стрессоустойчивость линий яровой и озимой пшеницы к абиотическим стрессам, а именно к затоплению водой (гипоксии) и засолению NaCl, оценивали в лабораторных условиях на ранних этапах онтогенеза по общепринятым методикам (Белецкая, 1976; Семушкина и др., 1976). Опыты закладывали в двух повторностях.

Статистические показатели и достоверность их различий определяли в сравнении со стандартными сортами с применением статистического анализа (Мартынов, 1999).

Результаты и обсуждение

В ходе идентификации *Sr*-генов с использованием молекулярных маркеров, рекомендованных для MAS, были идентифицированы гены – как эффективные, так и неэффективные к расе Ug99 (Баранова и др., 2015) (табл. 1), но проявляющие устойчивость в Нечерноземной зоне.

Таблица 1. Идентифицированные *Sr*-гены у источников устойчивости к стеблевой ржавчине, расе Ug99

Источник устойчивости	Гены устойчивости к стеблевой ржавчине	
	эффективные	неэффективные
119/4-06rw	<i>Sr22, Sr32</i>	<i>Sr9a, Sr17, Sr19</i>
GT 96/90	<i>Sr24, Sr36, Sr40, Sr47</i>	<i>Sr15, Sr17, Sr31</i>
Донская полукарликовая	<i>Sr32</i>	<i>Sr9a, Sr17, Sr19</i>
113/00i-4	<i>Sr2, Sr36, Sr39, Sr40, Sr47</i>	<i>Sr15</i>

Таблица 2. Оценка линий яровой и озимой пшеницы к ржавчинным грибам и мучнистой росе в различных регионах РФ

Патоген	Частота устойчивых генотипов, %		
	Краснодар	Омск	Москва
Яровая пшеница (198 линий), 2015 г.			
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	81.0	66.5	–
<i>P. triticina</i>	82.0	98.0	–
<i>B. graminis</i>	–	–	36.0
Озимая пшеница (367 линий), 2016 г.			
	Краснодар	Москва	
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	46.0	96.0	
<i>P. triticina</i>	97.0	98.7	
<i>B. graminis</i>	–	40.0	

У полученного беккроссного потомства после самоопыления зафиксировано от 2 до 4 эффективных генов устойчивости. Генетическое разнообразие по *Sr*-генам среди растений яровой и озимой пшеницы различалось. У яровых растений выявлено 9 основных сочетаний генов: *Sr2+Sr36*; *Sr2+39*; *Sr2+Sr32*; *Sr2+22*; *Sr2+Sr36+Sr40*; *Sr2+Sr32+Sr40*; *Sr2+Sr22+Sr40*; *Sr2+Sr32+Sr39*; *Sr2+Sr22+Sr32+Sr40*. У озимых оно вдвое выше, но частота встречаемости гена устойчивости взрослого растения *Sr2* отмечена только у 35 % индивидуальных растений, отобранных для идентификации генов. И в половине случаев ген *Sr2* находился в гетерозиготном состоянии. Для растений озимой пшеницы было характерно уникальное сочетание генов устойчивости, редко используемых в селекционном процессе: *Sr22+Sr32*; *Sr22+Sr47*; *Sr32+Sr47*; *Sr2+Sr22+Sr32*; *Sr22+Sr32+Sr40*; *Sr36+Sr39+Sr47*. Обнаружено растение с четырьмя генами устойчивости: *Sr2+Sr22+Sr32+Sr40*.

Потомство 198 яровых линий мягкой пшеницы и 367 линий озимой пшеницы с двумя-тремя генами устойчивости *Sr* оценено в разных географических точках РФ к бурой и стеблевой ржавчинам, различающимся спектром генов вирулентности (Лапочкина и др., 2016, 2018). По результатам отобраны устойчивые линии с групповой устойчивостью к обоим патогенам (табл. 2). Среди линий яровой пшеницы отмечена высокая частота устойчивых генотипов к северокавказской популяции стеблевой и бурой ржавчины (81–82 %).

Частота встречаемости устойчивых генотипов к западносибирской популяции стеблевой ржавчины была ниже (66.5 %). Эти данные обуславливал поздний посев яровых, который использовали преднамеренно как фактор, стимулирующий поражение патогеном. Из-за засухи в 2015 г. из 198 линий выжило 167, из них 111 линий были устойчивы к стеблевой ржавчине, и почти весь материал был устойчив к бурой ржавчине. Следует также отметить, что Западная Сибирь характеризуется наличием агрессивной популяции возбудителя стеблевой ржавчины.

Об этом свидетельствуют результаты оценки коллекции изогенных линий и сортообразцов с известными генами устойчивости к стеблевой ржавчине, которые проявили дифференциацию только при первой оценке поражения, а в дальнейшем результаты нивелировались из-за сильного развития болезни (Лапочкина и др., 2016), а также данные исследований расового состава западносибирских популяций этого патогена (Сколотнева и др., 2020).

В Московской области в 2015 г. развития ржавчинных грибов не наблюдали, а попытка создать искусственный фон по бурой ржавчине не удалась из-за высоких температур и низкой влажности воздуха и почвы. Однако в этом году (2015 г.) выделена 71 линия (36 %) с устойчивостью к мучнистой росе.

Оценку устойчивости 367 линий озимой пшеницы осуществляли в Краснодаре и Москве в 2016 г. в условиях эпифитотийного развития стеблевой ржавчины. В Краснодаре отобрано 168 линий, устойчивых к *P. graminis*, почти все линии были устойчивы к бурой ржавчине. В Москве в условиях эпифитотии стеблевой ржавчины также отмечали высокий выход устойчивых генотипов (96–98 % к обоим патогенам). Частота встречаемости генотипов с устойчивостью к мучнистой росе составила около 40 %.

По результатам проведенных оценок отобрано около 70 линий яровой пшеницы и более 100 озимых линий, сочетающих групповую устойчивость к ржавчинным грибам с комплексом других хозяйственно ценных признаков (ранний срок выколашивания, оптимальная высота, продуктивность колоса 1.7–2.5 г, крупное зерно и высокое содержание белка и клейковины в зерне).

Среди линий с комплексом хозяйственно ценных признаков выполнена дополнительная оценка устойчивости к патогенам, вызывающим развитие темно-бурой и желтой пятнистости на листьях. Всего оценено 14 линий яровой пшеницы, 9 линий озимой пшеницы и исходные родительские формы скрещивания (табл. 3).

Выделен единственный образец, 119/4-06gw, из коллекции «Арсенал», среднеустойчивый к темно-бурой пятнистости с типом реакции 2. Это отличный результат по отношению к темно-бурой пятнистости. Устойчивые образцы к темно-бурой пятнистости выделяются крайне редко. Как правило, у образцов мягкой пшеницы фиксируется тип реакции 3–4. Устойчивая реакция к этому патогену обычно связывается с видами *T. macha*, *T. vavilovii*, *T. timopheevii*, *T. monococcum* и *T. spelta* (Михайлова и др., 2012).

При заражении отрезков листьев *P. tritici-repentis* использовали два изолята: из Казахстана и Омска. Высокую устойчивость к обоим изолятам проявили линия 119/4-06gw и линия из Болгарии GT96/90. Высокая устойчивость к омскому изоляту желтой пятнистости обнаружена у линии яровой пшеницы 113/00i-4 с генетическим материалом *Ae. triuncialis* и *T. kiharae*.

Среди 14 протестированных линий яровой пшеницы устойчивых генотипов к темно-бурой пятнистости не получено. К омскому изоляту желтой пятнистости было устойчиво 10 образцов, а 4 образца (16i-16i, 17i-16i, 33-16i, 48-16i) проявили устойчивость одновременно к казахстанскому и омскому изолятам желтой пятнистости.

Таблица 3. Оценка источников устойчивости к стеблевой ржавчине и линий яровой и озимой пшеницы, полученных с их участием, к желтой (*P. tritici-repentis*) и темно-бурой (*C. sativus*) пятнистостям

Линия, сорт	Происхождение	Тип реакции к пятнистостям		
		желтая		темно-бурая
		Изолят из		
		Казахстана	Омска	
GT96/90	Жировка/Мироновская полуинтенсивная	1/1 – R	1/1 – R	3
119/4-06rw	Родина/ <i>Ae. speltoides</i> (10 кР)/ <i>S. cereale</i> (0.75 кР)	0/0 – R	0/0 – R	2
113/00i-4	Родина/ <i>Ae. triuncialis</i> (5 кР)/ <i>T. kiharae</i>	2/2 – MR	2/1 – MR	4
Донская полукарликовая	Русалка/Северодонская	2/2 – MR	2/2 – MR	3
1-16i	(96/113)/145/113	3/3 – S	2/1 – MR	3
6-16i	(96/113)/113	2/3 – MS	1/1 – R	4
9-16i	(96/119)113	2/3 – MS	1/1 – R	3
16-15i	(96/113)/113	1/2 – MR	2/1 – MR	3
17-16i	(96/113)	1/2 – MR	2/1 – MR	4
28-16i	(113/96)145/113	3/1 – MS	2/1 – MR	4
31-16i	(96/113)/113	2/1 – MR	3/2 – S	4
32-16i	(96/113)/113	3/3 – S	3/2 – S	3
33-16i	(96/113)/113/113	2/2 – MR	2/2 – MR	3
37-16i	(96/113)/145	2/2	2/2	4
44-16i	(113/119)/113	2/3 – MS	2/2 – MR	4
45-16i	(96/119)/113	1/3 – MS	1/2 – MR	4
48-16i	(96/119)/113	2/1 – MR	1/2 – MR	3
57-16i	(96/119)/113	2/3 – MS	1/3 – MS	3
Лада	(Обрий/Ленинградка)/Московская 35	3/3	4/3	3
9-19w	(113/119)/Д	1/1	–	2
16-19w	(113/119)/Д/Д/Д	2/2	–	3
20-18w	(96/113)/96/96	1/1	–	3
31-19w	(96/113)/Д	1/1, 2/1	–	2
36-19w	(96/113)/Д/96	2/2	–	3
48-19w	(113/96)/Д/Д	2/2	–	3
63-19w	(113/96)/96	2/2	–	2
90-19w	(119/96)/119	2/2	–	2
92-19w	(119/96)/Д	2/2	–	3
Московская 39	Обрий/Янтарная 50	2/2	–	3

Среди девяти образцов озимой пшеницы, которые в селекционном плане дошли до контрольного питомника (КП) и конкурсного сортоиспытания, удалось обнаружить четыре с устойчивостью к темно-бурой пятнистости: 9-19w, 31-19w, 63-19w, 90-19w. При заражении наиболее вирулентным изолятом желтой пятнистости из Казахстана выделены эти же четыре линии с высокой устойчивостью к *P. tritici-repentis*.

Оценку стрессоустойчивости линий яровой и озимой пшеницы к затоплению водой (гипоксии) и засолению NaCl проводили в лабораторных условиях на ранних этапах онтогенеза. Были протестированы 11 линий яровой пшеницы из питомника испытания потомств второго года и два стандарта (современный сорт Злата и предыдущий сорт Лада) (табл. 4). Отмечен высокий уровень вариации по признаку устойчивости к гипоксии: CV > 40 %.

Таблица 4. Реакция линий яровой пшеницы на затопление семян водой

Линия, сорт	Число нормально проросших семян		Устойчивость к гипоксии, %
	Контроль	Опыт	
Злата (стандарт)	100	47	47.0
Лада	96	82	85.4
33-16i	95	60	66.6
37-16i	88	51	58.0
32-16i	90	52	57.8
9-16i	92	52	56.5
3-16i	93	47	50.5
48-16i	87	40	46.0
57-16i	94	40	42.6
17-16i	88	7	8.0
Среднее	89.1	42.2	46.0
CV, %	13.2	48.2	43.2
HCP ₀₀₅	–	–	7.7

Таблица 5. Реакция линий озимой пшеницы на затопление семян водой

Линия, сорт	Число нормально проросших семян		Устойчивость к гипоксии, %
	Контроль	Опыт	
Московская 39	98	75	76.5
37-19w	96	83	86.5
32-19 w	94	78	83.0
16-19 w	90	72	80.0
9-19 w	98	75	76.5
4-19 w	92	63	68.5
96-19 w	96	65	67.7
20-19 w	96	65	67.7
41-19 w	100	62	62.0
36-19 w	100	47	47.0
2-19 w	96	31	32.3
Среднее по опыту	96.1	64.5	63.5
CV, %	3.0	30.5	29.6

Четыре линии, 33-16i, 37-16i, 32-16i и 9-16i, достоверно превысили показатели сорта Злата по указанному стресс-фактору, однако, как и данный сорт, уступали селекционному шедевру Э.Д. Неттевича – сорту Лада (Неттевич и др., 1996).

По устойчивости к гипоксии оценено около 20 линий озимой пшеницы из КП 2019 г. (условия формирования семян были благоприятными) и из КП 2020 г. (зерно формировалось в условиях обильных ливневых осадков и полегания посевов). Отмечен высокий уровень вариации признака «число нормально проросших семян» – более 30 %. Выделено четыре генотипа с устойчивостью выше среднего по опыту и выше стандарта: 37-19w, 32-19w, 16-19w и 9-19w (табл. 5).

Результаты, полученные с семенами озимых линий, сформированные в неблагоприятных условиях 2020 г., были более контрастными. У стандартного сорта только 50 % семян проросли нормально после затопления. На этом фоне две линии, 90-19w и 16-19w, достоверно превысили уровень устойчивости к гипоксии стандартного сорта.

Вредоносное действие засоления NaCl у яровой пшеницы сказалось на депрессии длины проростков. Высокой устойчивостью к NaCl, превышающей среднее по опыту (49.6 %), обладали оба стандарта и линия 37-16i (табл. 6). Если сравнивать действие анаэробного стресса и засоления на яровой пшенице, то диапазон изменчивости при солеустойчивости от 40 до 62 %, а при анаэробном стрессе – от 8 до 85 %, отмечается более сильная дифференциация генотипов яровой пшеницы по водному стрессу.

На линиях озимой пшеницы также отмечен высокий уровень депрессии ростовых процессов при засолении (CV = 28 %). Выявлена высокая способность противостоять солевому стрессу, превышающая как среднее по опыту, так и значение стандартного сорта, у линий 20-19w, 9-19w и 37-19w (табл. 7).

Опыт, заложенный семенами, сформированными в неблагоприятном 2020 г., показал, с одной стороны, снижение уровня солеустойчивости у Московской-39 с 68 до 49 %, а с другой, позволил выделить еще один образец (90-19w) с устойчивостью к этому стрессу, который с 2021 г. находится в питомнике конкурсного сортоиспытания.

Некоторые из линий уже сейчас проходят дополнительное экологическое испытание в Рязанской области в ФГБНУ «Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ». При расширении экологических испытаний линий озимой пшеницы до Западной Сибири (беккроссное потомство индивидуальных растений передано в Омский государственный аграрный университет) возможно создание новой культуры – озимой пшеницы для этого региона. Существует высокая вероятность отбора зимостойких линий озимой пшеницы с групповой устойчивостью к грибным болезням, показавших хороший уровень перезимовки, по результатам оценок в мае 2021 г. (см. рисунок). Эти линии с высокой вероятностью должны быть устойчивы к ржавчинным грибам, так как данный материал уже прошел оценку на устойчивость к этим патогенам в Краснодарском крае и в Московской области в 2016 г. во время эпифитотии стеблевой ржавчины. Поскольку среди них есть генотипы, устойчивые к засолению, то существует высокая вероятность отобрать и генотипы, устойчивые к засухе, что актуально для Западной Сибири, таким образом, обе устойчивости коррелируют.

Таблица 6. Депрессивное действие NaCl на ростовые процессы у линий яровой пшеницы

Линия, сорт	Длина проростков, мм		Устойчивость к засолению, %
	Опыт	Контроль	
Злата (стандарт)	50.0	82.7	60.5
Лада	51.6	90.6	57.0
33-16i	55.5	107.3	51.3
37-16i	60.8	98.2	62.0
32-16i	54.5	101.2	54.0
9-16i	37.3	87.9	42.5
3-16i	53.5	103.3	51.4
48-16i	46.9	118.7	39.5
57-16i	55.0	111.9	49.2
16-15i	41.1	102.3	40.2
17-16i	45.1	96.1	47.0
Среднее	50.1	100.0	49.6
HCP ₀₀₅			5.1

Таблица 7. Депрессивное действие NaCl на ростовые процессы у линий озимой пшеницы

Линия, сорт	Длина проростков, мм		Устойчивость к засолению, %
	Опыт	Контроль	
Московская 39	62.5	92.3	67.7
20-19w	71.3	74.4	95.8
9-19w	95.0	98.2	96.7
37-19w	60.0	73.4	81.8
41-19w	62.8	83.6	75.1
32-18w	45.2	64.4	70.2
35-19w	53.2	76.6	69.5
74-19w	52.0	89.7	58.0
36-19w	37.6	60.5	54.1
16-19w	45.8	90.3	50.7
Среднее	55.1	79.4	69.0
CV, %	27.5	12.7	21.1
HCP ₀₀₅			10.6

Заключение

После комплексной оценки созданного исходного материала и выявления дополнительных положительных свойств облегчается выбор селекционных линий для размножения и конкурсного сортоиспытания. Если в предыдущие годы мы акцентировали внимание на линиях, обладающих устойчивостью к ржавчинным болезням и имеющих высокое содержание белка и клейковины в зер-



Отрастание линий озимой пшеницы в Западной Сибири в мае 2021 г. Фото любезно предоставлено для публикации д-ром с.-х. наук, профессором Омского ГАУ В.П. Шаманиным.

не, то теперь в поле зрения попали линии с комплексной устойчивостью к фитопатогенам и абиотическим стрессам: линии яровой пшеницы, 9-16i, 32-16i, 37-16i и 48-16i, линии озимой пшеницы, 20-19w, 9-19w, 90-19w, а также линии 31-19w и 48-19w с расширенной групповой устойчивостью к грибным болезням (стеблевой и бурой ржавчинам, мучнистой росе, желтой и темно-бурой пятнистостям). Такой материал можно использовать в качестве источников устойчивости к неблагоприятным факторам среды на следующем этапе улучшения мягкой пшеницы, а также возможно выявить его конкуренцию с современными сортами пшеницы по продуктивности.

Созданный исходный материал представляет интерес для молекулярно-генетического картирования генов устойчивости и QTL, а также в маркер-вспомогательной селекции по генам *Sr*, особенно по генам, редко используемым при повышении иммунитета к стеблевой ржавчине: *Sr32*, *Sr39*, *Sr40* и *Sr47*.

Список литературы / References

- Афанасенко О.С., Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Анисимова А.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А., Новожилов К.В. Новые и потенциально опасные болезни зерновых культур в России. *Вестн. защиты растений*. 2011;4:3-18.
- [Afanasenko O.S., Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Anisimova A.V., Kovalenko N.M., Baranova O.A., Novozhilov K.V. New and potential dangerous diseases of cereal crops in Russia. *Vestnik*

- Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2011;4:3-18. (in Russian)]
- Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иорданская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(3):316-322. [Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gainullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(3):316-322. (in Russian)]
- Белецкая Е.К. Методическая рекомендация. Определение устойчивости пшеницы и ржи к избытку влаги на первых этапах их роста. Киев, 1976. [Beletskaya E.K. Guidelines for Determination of Wheat and Rye Tolerance of Excess Water at Early Stages of Their Growth. Kiev, 1976. (in Russian)]
- Ким Ю.С., Волкова Г.В. Желтая пятнистость листьев пшеницы: распространение, вредоносность, расовый состав (обзор). *Вестн. Ульянов. гос. с.-х. академии*. 2020;2(50):105-116. DOI 10.18286/1816-4501-2020-2-105-116. [Kim Yu.S., Volkova G.V. Tan spot of wheat leaves: distribution, harmfulness, and racial composition (review). *Vestnik Ulyanovskoy Gosudarstvennoy Selskokhozyajstvennoy Akademii = Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2020;2(50):105-116. DOI 10.18286/1816-4501-2020-2-105-116. (in Russian)]
- Лапочкина И.Ф. Чужеродная генетическая изменчивость и ее роль в селекции пшеницы. В: Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб.: ВИР, 2005;684-740. [Lapochkina I.F. Alien genetic variability and its role in wheat breeding. In: Identified Plant Gene Pool and Breeding. St. Petersburg: VIR Publ., 2005;684-740. (in Russian)]
- Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Гайнуллин Н.Р., Волкова Г.В., Гладкова Е.В., Ковалева Е.О., Осипова А.В. Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(6):676-684. DOI 10.18699/VJ18.410. [Lapochkina I.F., Baranova O.A., Gainullin N.R., Volkova G.V., Gladkova E.V., Kovaleva E.O., Osipova A.V. The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(6):676-684. DOI 10.18699/VJ18.410. (in Russian)]
- Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Шаманин В.П., Волкова Г.В., Гайнуллин Н.Р., Анисимова А.В., Галингер Д.Н., Лазарева Е.Н., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф. Создание исходного материала яровой мягкой пшеницы для селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), в том числе и к расе Ug99, в России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(3):320-328. DOI 10.18699/VJ16.167. [Lapochkina I.F., Baranova O.A., Shamanin V.P., Volkova G.V., Gainullin N.R., Anisimova A.V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E.V., Vaganova O.F. The development of initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including race Ug99, in Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(3):320-328. DOI 10.18699/VJ16.167. (in Russian)]
- Мартынов С.П. Статистический и биометрико-генетический анализ в растениеводстве и селекции. Пакет программ AGROS, версия 2.09. Тверь, 1999. [Martynov S.P. Statistical and Biometric Genetic Analysis in Crop Production and Breeding. AGROS Software Package, version 2.09. Tver, 1999. (in Russian)]
- Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб.: ВИЗР, 2012. [Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Wheat Yellow Spot. Guidelines for the Study of Populations of the Yellow Leaf Spot Agent *Pyrenophora tritici-repentis* and the Resistance of Varieties. St. Petersburg: VIZR, 2012. (in Russian)]
- Неттевич Э.Д., Давыдова Н.В., Шарахов А.Л. Результаты селекции яровой пшеницы в Московском селекцентре. *Селекция и семеноводство*. 1996;(11):2-9. [Nettevich E.D., Davydova N.V., Sharakhov A.L. The results of spring wheat breeding in the Moscow Breeding Center. *Seleksiya i Semenovodstvo = Selection and Seed Production*. 1996;(11):2-9. (in Russian)]
- Семущкина Л.А., Хазова Г.В., Удовенко Г.В. Применение анализа изменения ростовых процессов для диагностики солеустойчивости растений. В: Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Л., 1976;238-343. [Semushkina L.A., Khazova G.V., Udovenko G.V. Application of the analysis of changes in growth processes for the diagnosis of salt tolerance in plants. In: Methods for Assessing Plant Resistance to Adverse Environmental Factors. Leningrad, 1976;238-343. (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., Kel'bin V.N., Morgunov A.I., Boiko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races composition of the Novosibirsk population of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092. (in Russian)]
- Crossa J., Burgueño J., Dreisigacker S., Vargas M., Herrera-Foessel S.A., Lillemo M., Singh R.P., Trethowan R., Warburton M., Franco J., Reynolds M., Crouch J.H., Ortiz R. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics*. 2007;177:1889-1913. DOI 10.1534/genetics.107.078659.
- Dundas I.S., Anugrahwati D.R., Verlin D.C., Park R.F., Bariana H.S., Mago R., Islam A.K.M.R. New sources of rust resistance from alien species: Meliorating linked defects and discovery. *Aust. J. Agric. Res.* 2007;58:545-549. DOI 10.1071/AR07056.
- Faris J.D., Xu S.S., Cai X., Friesen T.L., Jin Y. Molecular and cytogenetic characterization of a durum wheat-*Aegilops speltoides* chromosome translocation conferring resistance to stem rust. *Chromosome Res.* 2008;16:1097-1105. DOI 10.1007/s10577-008-1261-3.
- Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1641-1647. DOI 10.1007/s00122-004-1787-5.
- Khan R.R., Bariana H.S., Dholakia B.B., Naik S.V., Lagu M.D., Rathjen A.J., Bhavani S., Gupta V.S. Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:846-850. DOI 10.1007/s00122-005-0005-4.
- Lekomtseva S.N., Volkova V.T., Zaitseva L.G., Chaika M.N., Skolotneva E.S. Races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Russian Federation in 2001-2005. *Ann. Wheat Newsletter*. 2007;53:65-67.
- Lekomtseva S.N., Volkova V.T., Zaitseva L.G., Skolotneva E.S., Chaika M.N. Races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Russian Federation in 2006. *Ann. Wheat Newsletter*. 2008;54:188-119.
- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S., Spielmeier W., Lawrence G.J., Pryor A.J., Ellis J.G. Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(3):496-504. DOI 10.1007/s00122-005-2039-z.

- Mago R., Zhang P., Bariana H.S., Verlin D.C., Bansal U.K., Ellis J.G., Dundas I.S. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:1441-1450. DOI 10.1007/s00122-009-1146-7.
- Neu C.H., Stein N., Keller B. Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombinations on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. *Genome.* 2002;45:737-744. DOI 10.1139/G02-040.
- Roelfs A.P., Singh R.P. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Management. Mexico: CIMMIT, 1992.
- Somers D.J., Isaac P., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1105-1114. DOI 10.1007/s00122-004-1740-7.
- Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. *Crop Sci.* 2008;48:253-261. DOI 10.2135/cropsci2007.04.0204.
- Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breed.* 2007;126:482-486. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x.
- Wu S., Pumphrey M., Bai G. Molecular mapping of stem-rust-resistance gene *Sr40* in wheat. *Crop Sci.* 2009;49:1681-1686. DOI 10.2135/cropsci2008.11.0666.
- Yu G.T., Zhang Q., Klindworth D.L., Friesen T.L., Knox R., Jin Y., Zhong S., Cai X., Xu S.S. Molecular and cytogenetic characterization of wheat introgression lines carrying the stem rust resistance gene *Sr39*. *Crop Sci.* 2010;50:1393-1400. DOI 10.2135/cropsci2009.10.0633.
- Yu L.X., Abate Z., Anderson J.A., Bansal U.K., Bariana H.S., Bhavani S., Dubcovsky J., Lagudah E.S., Liu S.X., Sambasivam P.K., Singh R.P., Sorrells M.E. Developing and optimizing markers for stem rust resistance in wheat. In: BGRI Technical Workshop, Borlaug Global Rust Initiative, Cd. Obregón, Sonora, Mexico; 17-20 March 2009. 2009;117-130.
- Zeleneva Yu.V., Afanasenko O.S., Sudnikova V.P. Influence of agroclimatic conditions, life form, and host species on the species complex of wheat septoria pathogens. *Biology Bulletin.* 2021;48(10):74-80. DOI 10.1134/S1062359021100277.

ORCID ID

I.F. Lapochkina orcid.org/0000-0002-2328-2798
N.R. Gainullin orcid.org/0000-0002-0970-662X
O.A. Baranova orcid.org/0000-0001-9439-2102
N.M. Kovalenko orcid.org/0000-0001-9577-8816
L.A. Marchenkova orcid.org/0000-0001-6029-8089
O.V. Pavlova orcid.org/0000-0001-7705-075X
O.V. Mitroshina orcid.org/0000-0002-8321-0307

Благодарности. Исследование проведено при частичной поддержке РФФИ в 2013–2015 гг. (проект № 13-04-00922).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.07.2021. После доработки 11.08.2021. Принята к публикации 12.08.2021.

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

Характеристика устойчивости селекционных линий овса к заражению *Fusarium langsethiae* и накоплению Т-2/HT-2 токсинов

О.П. Гаврилова¹, Т.Ю. Гагкаева¹, А.С. Орина¹, А.С. Маркова², А.Д. Кабашов², И.Г. Лоскутов³✉

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», пос. Новоивановское, Московская область, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

✉ i.loskutov@vir.nw.ru

Аннотация. Фузариоз относится к важным заболеваниям овса, поскольку многие виды грибов *Fusarium* способны продуцировать микотоксины, негативно влияющие на качество зерна. Иммунных к заражению грибами *Fusarium* зерновых культур нет, однако наблюдаются различия генотипов по степени устойчивости. Целью исследования стала характеристика перспективных линий голозерного овса по устойчивости к зараженности зерна грибами и содержанию фузариотоксинов. Анализировали 13 селекционных линий и два сорта голозерного овса, Немчиновский 61 и Вятский, а также сорт пленчатого овса Яков, которые выращивали на естественном фоне в Федеральном исследовательском центре «Немчиновка» в 2019–2020 гг. Зараженность зерна грибами определяли микологическим методом, а также с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, анализ микотоксинов выполняли иммуноферментным методом. Проведенные анализы показали, что зерно всех образцов овса было заражено грибами, однако их численность и видовое разнообразие варьировали в зависимости от анализируемого генотипа и года исследований. Микобиоту генотипов овса преимущественно составляли виды родов *Alternaria* (15–90 % от всех выделенных грибов), *Cochliobolus* (1–33 %), *Cladosporium* (1–19 %), *Epicoccum* (0–11 %) и *Fusarium* (3–17 %). Основными представителями фузариевых грибов были *F. poae*, продуцирующий ниваленол, и *F. langsethiae*, производящий Т-2/HT-2 токсины. Наибольшее количество ДНК *F. langsethiae*, а также Т-2/HT-2 токсинов содержалось в зерне пленчатого сорта Яков и составило $(27.9–71.9) \times 10^{-4}$ пг/пг и 790–1230 мкг/кг соответственно. В зерне анализируемых линий овса содержание ДНК *F. langsethiae* варьировало в диапазоне $(1.2–42.7) \times 10^{-4}$ пг/пг, Т-2/HT-2 токсинов – от 5 до 229 мкг/кг. Две линии голозерного овса, 54h2476 и 66h2618, а также новый сорт Азиль (линия 57h2396) можно охарактеризовать в условиях эксперимента как высокоустойчивые к заражению грибами *Fusarium* и контаминации микотоксинами в сравнении с контролем – сортом Вятский.

Ключевые слова: *Avena sativa*; голозерный; селекция; устойчивость; фузариоз; ДНК; микотоксины.

Для цитирования: Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Орина А.С., Маркова А.С., Кабашов А.Д., Лоскутов И.Г. Характеристика устойчивости селекционных линий овса к заражению *Fusarium langsethiae* и накоплению Т-2/HT-2 токсинов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(7):732-739. DOI 10.18699/VJ21.083

Resistance of oat breeding lines to grain contamination with *Fusarium langsethiae* and Т-2/HT-2 toxins

O.P. Gavrilova¹, T.Yu. Gagkaeva¹, A.S. Orina¹, A.S. Markova², A.D. Kabashov², I.G. Loskutov³✉

¹ All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Federal Research Center “Nemchinovka”, Novoivanovskoe, Moscow region, Russia

³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

✉ i.loskutov@vir.nw.ru

Abstract. Fusarium disease of oats reduces yield quality due to decreasing germination that is caused by the contamination of grain with mycotoxins produced by *Fusarium* fungi. The aim of this study was to characterize the resistance of naked breeding lines of oats to fungal grain infection and to contamination with Т-2 and HT-2 toxins. Thirteen naked oat breeding lines and two naked varieties, Nemchinovskiy 61 and Vyatskiy, as well as a husked variety Yakov, were grown under natural conditions in the Nemchinovka Federal Research Center in 2019–2020. The contamination of grain with fungi was determined by the mycological method and real-time PCR. The analysis of mycotoxins was carried out by ELISA. In oats, *Alternaria* (the grain infection was 15–90 %), *Cochliobolus* (1–33 %), *Cladosporium* (1–19 %), *Epicoccum* (0–11 %), and *Fusarium* (3–17 %) fungi prevailed in the grain mycobiota. The predominant *Fusarium* species were *F. poae* (its proportion among *Fusarium* fungi was 49–68 %) and *F. langsethiae* (29–28 %). The highest amounts of *F. langsethiae* DNA ($(27.9–71.9) \times 10^{-4}$ pg/ng) and Т-2/HT-2 toxins (790–1230 µg/kg) were found in the grain of husked oat Yakov. Among the analysed naked oat lines, the amount of *F. langsethiae* DNA varied in the range of $(1.2–42.7) \times 10^{-4}$ pg/ng,

and the content of T-2/HT-2 toxins was in the range of 5–229 µg/kg. Two oat breeding lines, 54h2476 and 66h2618, as well as a new variety, Azil (57h2396), can be characterized as highly resistant to infection with *Fusarium* fungi and contamination with mycotoxins compared to the control variety Vyatskiy.

Key words: *Avena sativa*; naked; breeding; resistance; *Fusarium*; DNA; mycotoxins.

For citation: Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., Markova A.S., Kabashov A.D., Loskutov I.G. Resistance of oat breeding lines to grain contamination with *Fusarium langsethiae* and T-2/HT-2 toxins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):732-739. DOI 10.18699/VJ21.083

Введение

На протяжении последнего десятилетия объем информации о фузариозе овса (*Avena sativa* L.), вызываемом разными видами грибов рода *Fusarium* Link, многократно увеличился, поскольку фузариоз признан одной из основных болезней, влияющих на качество зерна этой культуры. Помимо непосредственного негативного влияния на хозяйственно ценные признаки, например уменьшения массы зерна (Martinelli et al., 2014), вредоносность грибов *Fusarium* определяется их способностью продуцировать микотоксины, которые накапливаются в зараженных зернах, сохраняются в обработанных продуктах и могут вызывать иммуносупрессию и другие проблемы здоровья у людей и животных (Fogoud et al., 2019). Современные исследования проблемы фузариоза овса включают не только определение видового состава возбудителей заболевания и выявление продуцируемых ими токсичных вторичных метаболитов (Fredlund et al., 2013; Gavrilova et al., 2016; Hofgaard et al., 2016; Schöneberg et al., 2018), но также изучение хозяино-патогенных взаимоотношений (Divon et al., 2012; Tekle et al., 2012; Martin et al., 2018; Willforss et al., 2020) и поиск потенциальных источников устойчивости к заболеванию (Лоскутов и др., 2016; Gagkaeva et al., 2013, 2017; Tekle et al., 2018; Chropová et al., 2020; Hautsalo et al., 2020), в том числе с использованием молекулярных методов анализа (He et al., 2013; Bjørnstad et al., 2017; Isidro-Sánchez et al., 2020).

Состав и соотношение видов грибов *Fusarium*, вызывающих фузариоз овса, значительно варьируют в зависимости от места возделывания культуры и климатических условий, складывающихся в вегетационный период (Schöneberg et al., 2018). Как правило, доминирующие виды *Fusarium* на зерне овса – это *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. sporotrichioides* Sherb. и *F. langsethiae* Torp & Nirenberg (Kurowski, Wysocka, 2009; Fredlund et al., 2013; Gavrilova et al., 2016; Hofgaard et al., 2016), реже *F. graminearum* Schwabe (Schöneberg et al., 2018) и *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (Варгач и др., 2019). Все эти виды фузариевых грибов способны продуцировать различные микотоксины. Результаты многочисленных исследований демонстрируют, что основную опасность представляет контаминация зерна овса Т-2 и HT-2 токсинами, продуцируемыми *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae* (Ороку et al., 2013; Буркин и др., 2015; Hofgaard et al., 2016; Kononenko et al., 2020; De Colli et al., 2021).

При создании новых сортов овса признак «устойчивость к фузариозу» долгое время не учитывался, несмотря на высокую повсеместную зараженность этой культуры грибами *Fusarium*. Слабое проявление или отсутствие видимых симптомов фузариоза на метелках овса, в отличие от более выраженных симптомов на колосьях других

зерновых культур, – основная проблема при полевой оценке устойчивости генотипов растений (Tekauz et al., 2008; Imathiou et al., 2013; Martin et al., 2018; Жуйкова, Баталова, 2019). Однако, несмотря на отсутствие симптомов на метелках, могут формироваться как щуплые, так и выполненные, но несущие внутреннюю инфекцию и микотоксины зерновки, доля которых зависит от агрессивности вида *Fusarium* и от условий, сопутствующих заражению растений.

Иммунных к заражению грибами *Fusarium* зерновых культур нет, однако наблюдаются различия генотипов по степени устойчивости. Показано, что генотип, устойчивый к одному виду *Fusarium*, проявляет устойчивость и к другим видам этого рода (Mesterhazy et al., 2005). В настоящее время описано несколько типов устойчивости зерновых культур к фузариозу (Boutigny et al., 2008; Tekle et al., 2018): устойчивость к проникновению (I) и распространению (II) патогена; устойчивость зерен к заражению патогеном (III); толерантность (IV); способность к накоплению и/или деградации микотоксинов в зерне (V). Надо отметить, что овес посевной (*A. sativa* L.) имеет два подвида – овес пленчатый (*A. sativa* subsp. *sativa* L.) и голозерный (*A. sativa* subsp. *nudisativa* (Husn.) Rod. et Sold.), которые отличаются друг от друга по морфологическим признакам, биохимическим свойствам и по устойчивости к абиотическим и биотическим факторам (Культурная флора, 1994; Loskutov et al., 2020). Относительно высокая устойчивость голозерного овса к фузариозу зерна, по сравнению с пленчатым, неоднократно отмечена разными исследователями (Tekauz et al., 2008; Yan et al., 2010; Gagkaeva et al., 2013; Martin et al., 2018; Chropová et al., 2020).

Информация об устойчивости к фузариозу зерна генотипов овса из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), проанализированных на искусственном инфекционном фоне *F. sporotrichioides*, была систематизирована в виде каталога (Гагкаева и др., 2012). Успешным примером объединения усилий разных групп исследователей стал сорт пленчатого овса Всадник, который является первым официально зарегистрированным сортом, относительно устойчивым к фузариозу, характеризующийся низким уровнем накопления микотоксинов в зерне, по сравнению с имеющим широкий ареал возделывания стандартным сортом пленчатого овса Конкур (Мишенькина, Захаров, 2017).

В настоящее время внимание многих российских селекционеров сосредоточено на создании сортов овса голозерного подвида, отличающихся улучшенными показателями качества зерна и устойчивости к грибным заболеваниям (Кабашов и др., 2018; Исачкова и др., 2019;

Batalova et al., 2019; Жуйкова и др., 2020). О достигнутых успехах селекции свидетельствует рост числа сортов голозерного овса, включенных в «Государственный реестр селекционных достижений...», который в 2020 г. насчитывал 121 сорт пленчатого и 15 сортов голозерного овса¹. С 2010 г. в Госреестр включено 11 новых сортов голозерного подвида, что составляет 73.3 % от их общего числа.

Цель исследования – характеристика перспективных линий голозерного овса, выращенных на естественном фоне в Федеральном исследовательском центре (ФИЦ) «Немчиновка», по устойчивости к зараженности зерна грибами и содержанию фузариотоксинов.

Материалы и методы

Материалом исследования в 2019 г. были 10 селекционных линий голозерного овса (*A. sativa* subsp. *nudisativa* (Husn.) Rod. et Sold.), а в 2020 г. – 13 линий, созданных в ФИЦ «Немчиновка». Кроме того, оценивали недавно выведенный в ФИЦ «Немчиновка» сорт голозерного овса Немчиновский 61 и в качестве контроля – сорт голозерного овса Вятский (Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого). В исследование также был включен сорт пленчатого овса Яков (ФИЦ «Немчиновка»), который является стандартом для Центрально-Черноземного региона, утвержденным Государственным реестром в 2012 г. (табл. 1).

Условия выращивания селекционного материала. В 2019–2020 гг. все образцы выращивали в питомнике «Конкурсное сортоиспытание» на полях ФИЦ «Немчиновка» в Московской области на делянках площадью 10 м² по предшественнику яровой ячмень, согласно «Методике государственного сортоиспытания...»². Уборка урожая овса в годы исследований произведена в сроки достижения полной спелости зерна – 8 августа 2019 г. и 16 августа 2020 г. Погодные условия вегетационного периода различались в 2019 и 2020 гг. (табл. 2). Второй год исследований характеризовался повышенным температурным режимом в июне-августе по сравнению со среднепогодными значениями, а также превышением в 1.7–2.6 раза общего количества осадков в мае-июле по сравнению с этими месяцами в 2019 г.

Анализ зараженности грибами зерна на питательной среде. Для оценки зараженности грибами и выявления видового состава микобиоты поверхность зерен каждого образца стерилизовали 5 % гипохлоритом натрия, затем отмывали стерильной водой. В чашки Петри на поверхность картофельно-сахарозной агаризованной среды (КСА) раскладывали не менее 100 зерен каждого образца (Orina et al., 2018), инкубировали в темноте при 24 °С в термостате MIR-254 (Sanyo, Великобритания), через 7 сут проводили учет всхожести зерна, а также численности и видового разнообразия микобиоты.

Таксономическую принадлежность грибов определяли по сумме макро- и микроморфологических признаков с использованием определителей и специализированной

Таблица 1. Сорта и линии ярового овса, включенные в исследования

Линия/сорт	Родословная	Год анализа
57h2396/Азиль	Крестьянский местный × Залп	2019, 2020
2h2348	Крестьянский местный × Рысак	
16h2476	32h1962 × AC Lotta (к-14619)	2020
54h2476	32h1962 × AC Lotta (к-14619)	
2h2532	AC Baton (к-14803) × 53h2035	
52h2467	28h1827 × Abel (к-14638)	2020
50h2613	Залп × Bullion (к-14683)	
70h2613	15h1946 × Bullion (к-14683)	
55h2618	55h2106 × Pennline 2005 (к-14344)	2019, 2020
66h2618	55h2106 × Pennline 2005 (к-14344)	
4h2708	Вятский × Рысак	2020
16h2771	Крестьянский местный × 14h2255	
15h2657	119h2093 × 37h2273	2019, 2020
Немчиновский 61	Крестьянский местный × 15h1880	
Вятский (контроль)	Индивидуальный отбор из образца коллекции ВИР Adam (к-14253, Чехия) с последующим многократным отбором по признаку «пленчатость»	2019, 2020
Яков (стандарт)	Soroca (к-13243) × 36h1127	

литературы (Ellis, 1971; Gerlach, Nirenberg, 1982; Samson et al., 2002; Torp, Nirenberg, 2004).

Зараженность зерна грибами рассчитывали как процентное отношение числа зерен, из которых были выделены грибы определенной таксономической группы, к общему числу анализируемых зерен.

Анализ ДНК *F. langsethiae* в зерне. Зерно каждого образца (10 г) гомогенизировали в стерильных размольных стаканах на мельнице Tube Mill Control (КА, Германия) при 25000 об./мин в течение 30 с – для голозерных образцов и 45 с – для пленчатого. Выделение ДНК проводили из 200 мг полученной зерновой муки с помощью СТАВ-метода (Gagkaeva et al., 2013). Типовой штамм *F. langsethiae* из коллекции микроорганизмов лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского НИИ защиты растений культивировали на КСА, а затем из мицелия гриба выделяли ДНК, используя набор реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва).

Концентрации полученной ДНК из муки и мицелия штаммов оценивали с помощью флуориметра Qubit 2.0 с набором реагентов Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и выравняли до рабочих значений 20–60 нг/мкл.

Содержание в зерне ДНК *F. langsethiae* оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием видо-

¹ Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (по состоянию на 26 февраля 2020 г.) <https://gossortrf.ru/gosreestr/>.

² Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 2. Зерновые, крупяные, зернобобовые, кукуруза и кормовые культуры. М., 1989.

Таблица 2. Погодные условия вегетационных сезонов 2019 и 2020 гг. в Одинцовском районе Московской области (метеостанция № 27515)

Месяц	Температура, °С			Средняя влажность, %	Общее кол-во осадков, мм	Кол-во дней с осадками
	средняя	min	max			
2019 г.						
Май	+16.1	+1.3	+28.5	59	50	16
Июнь	+19.6	+8.6	+31.3	57	60	11
Июль	+16.6	+8.3	+29.3	70	42	20
Август	+16.2	+6.8	+27.9	71	36	14
2020 г.						
Май	+11.5	+0.7	+24.1	68	124	24
Июнь	+19.1	+8.0	+30.5	68	100	14
Июль	+18.3	+9.1	+30.5	78	110	20
Август	+17.3	+8.6	+30.3	75	46	13

специфичных праймеров и пробы, меченной красителем Су5 и гасителем флуоресценции ВНQ-2 (Yli-Mattila et al., 2008).

Амплификацию проводили на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США) согласно следующему протоколу: 1 × [95 °С, 3 мин]; 40 × [95 °С, 10 с; 60 °С, 10 с; 72 °С, 20 с]. Для каждого образца определяли количество пг ДНК грибов в зерне в отношении к количеству нг общей выделенной ДНК (пг/нг).

Анализ микотоксинов. Микотоксины из 1 г муки экстрагировали 5 мл водного раствора ацетонитрила (84:16 по объему) в течение 14–16 ч в условиях постоянного перемешивания. Суммарное количество Т-2 и НТ-2 токсинов в полученных экстрактах определяли с помощью непрямого конкурентного иммуоферментного анализа. Использовали сертифицированную тест-систему «Т-2 токсин – ИФА» (ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Россия) с нижним пределом определения микотоксинов 4 мкг/кг.

Статистический анализ. Анализы ДНК и микотоксинов грибов в зерне выполняли не менее двух раз. Для расчета средних значений, доверительного интервала, дисперсионного (ANOVA) и корреляционного (связь между количественными признаками оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона, *r*) анализов использовали программы Microsoft Excel 2010, Minitab 17 и Statistica 10.0. Достоверность различий принимали при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты

Видовой состав грибов, выявленных в зерне овса

Микологический анализ показал, что основную долю в зерне образцов овса составляли виды родов *Alternaria* Nees, *Cochliobolus* Drechsler, *Cladosporium* Link, *Epicoccum* Link и *Fusarium*. Единично из зерна были выделены грибы родов *Acremonium* Link, *Arthrimum* Kunze, *Gliocladium* Corda, *Microdochium* Syd. & P. Syd., *Mucor* Fresen., *Nigrospora* Zimm., *Penicillium* Link, *Phoma* Sacc. и *Trichothecium* Link.

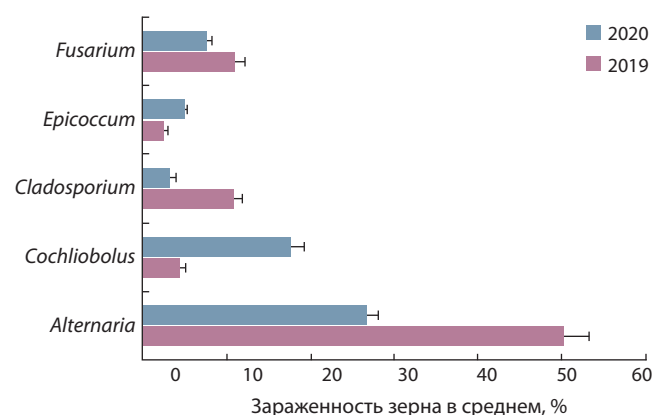


Рис. 1. Зараженность зерна овса грибами (ФИЦ «Немчиновка», Московская область, 2019–2020 гг.).

В оба года исследований грибы рода *Alternaria* были наиболее обильными представителями микобиоты зерна (рис. 1). Анализ морфологических признаков грибов *Alternaria* показал, что среди них основную долю составили виды, относящиеся к секции *Alternaria* (86 % в 2019 г. и 84 % в 2020 г.), остальные изоляты относились к видам секции *Infectoriae*.

Зараженность зерна грибами рода *Cochliobolus*, среди которых встречались виды *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif (*Pyrenophora avenae* Ito & Kurib) и др., в анализируемые годы различалась существенно. В 2019 г. зараженность зерна грибами *Cochliobolus* варьировала в диапазоне 1–13 %, а в 2020 г. – 6–33 %.

Средняя инфицированность зерна фузариевыми грибами по годам статистически не различалась. Зараженность зерна голозерных линий и сорта Немчиновский 61 варьировала от 5 до 17 % в 2019 г. и от 3 до 13 % в 2020 г. У пленчатого сорта Яков в 2019 и 2020 гг. этот показатель составил 26 и 17 % соответственно, а у сорта Вятский – 5 и 3 %. В оба года исследований только у двух линий, 54h2476 и 66h2618, зараженность зерна фузариевыми

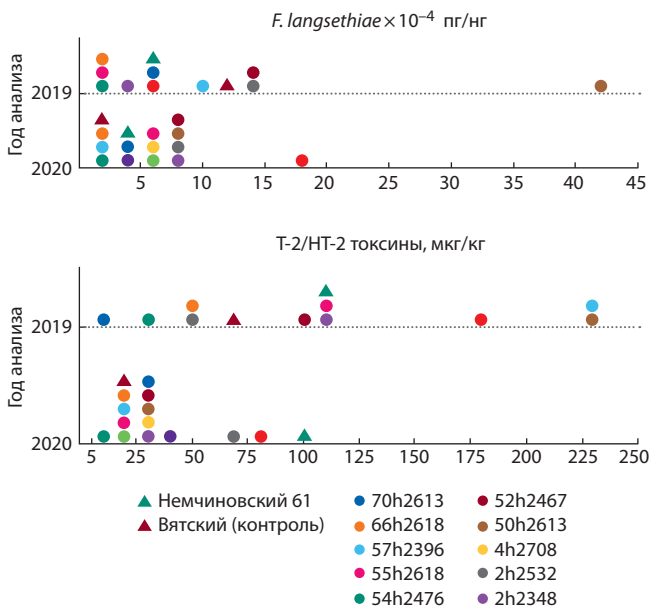


Рис. 2. Содержание ДНК гриба *F. langsethiae* и Т-2/НТ-2 токсинов в зерне голозерных линий и сортов овса, выращенных в ФИЦ «Немчиновка».

грибами была ниже или соответствовала показателям контроля – голозерного сорта Вятский. В микобиоте овса идентифицировали девять видов рода *Fusarium*. Основными представителями фузариевых грибов были токсигенно продуцирующие *F. poae* и *F. langsethiae*. Их доли от общего числа выявленных грибов *Fusarium* составляли в 2019–2020 гг. для *F. poae* – 49–68 %, для *F. langsethiae* – 29–28 %.

Содержание ДНК *F. langsethiae* и Т-2/НТ-2 токсинов в зерне

Максимальное количество ДНК *F. langsethiae* было в зерне пленчатого сорта Яков: 71.9×10^{-4} пг/нг в 2019 г. и 27.9×10^{-4} пг/нг в 2020 г. В зерне сорта Вятский содержание ДНК этого гриба было существенно ниже – 11.0×10^{-4} пг/нг в 2019 г. и 1.2×10^{-4} пг/нг в 2020 г. В 2019 г. только три селекционные линии, 2h2532, 52h2467 и 50h2613, содержали ДНК *F. langsethiae* в количествах выше, чем голозерный сорт Вятский, а в 2020 г. этот показатель был выше у всех селекционных линий (рис. 2).

Количество Т-2/НТ-2 токсинов было максимальным в зерне пленчатого сорта Яков – 1230 мкг/кг в 2019 г. и 790 мкг/кг в 2020 г. В зерне сорта Вятский эти микотоксины обнаружены в более низких количествах: 71 и 23 мкг/кг в 2019 г. и 2020 г. соответственно. Содержание Т-2/НТ-2 токсинов в зерне анализируемых генотипов варьировало в диапазонах 5–230 мкг/кг в 2019 г. и 10–100 мкг/кг в 2020 г. (см. рис. 2).

Обсуждение

Микологический анализ показал, что зерно всех образцов овса было заражено грибами, однако численность и видовое разнообразие выявленных микроорганизмов варьировали в зависимости от анализируемого генотипа и года исследований.

Средние температуры воздуха в период вегетации овса в оба года исследований были сходными, однако количество осадков за четыре месяца вегетации в 2020 г. в 2 раза превышало количество осадков за аналогичный период в 2019 г. В результате существенно (в 4 раза) выросла средняя зараженность зерна грибами *Cochliobolus*, а зараженность грибами *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium*, наоборот, заметно уменьшилась: в 1.4–3.5 раза.

На фоне высокой инфицированности образцов урожая 2020 г. грибами *Cochliobolus* установлена отрицательная связь между зараженностью зерна этими грибами и грибами *Alternaria* ($r = -0.56$ при $p = 0.024$). Антагонистические взаимоотношения между представителями этих двух родов, обитающих на зерновых культурах, были показаны ранее (Казакова и др., 2016; Gannibal, 2018; Орина и др., 2020). Вероятно, в условиях избыточного увлажнения преимущество получают грибы *Cochliobolus*, которые оказываются конкурентоспособнее по сравнению с грибами *Alternaria* и *Fusarium*.

Выявлена достоверная положительная связь между зараженностью зерна грибами *Alternaria* и *Fusarium* ($r = 0.64$ при $p = 0.019$), а также *Epicoccum* и *Fusarium* ($r = 0.57$ при $p = 0.043$) образцов урожая 2019 г. Симбиотический характер взаимоотношений между грибами *Alternaria* и *Fusarium*, в том числе в зерне овса, установлен неоднократно (Kosiak et al., 2004; Orina et al., 2017; Каракотов и др., 2019).

Основные доли среди грибов рода *Fusarium*, выделенных из анализируемых образцов, занимали виды *F. poae* и *F. langsethiae*. Гриб *F. poae* образует ниваленол и диацетоксисцирпенол, *F. langsethiae* – Т-2/НТ-2 токсины и также диацетоксисцирпенол. Содержание Т-2 токсина регламентируется в зерне овса, кормах и продуктах на его основе и не должно превышать 100 мкг/кг^{3, 4}.

Относительно невысокая зараженность зерна *F. langsethiae* (максимально 14 % в 2019 г. и 5 % в 2020 г.) приводит к существенному накоплению микотоксинов в зерне восприимчивых генотипов. Поэтому селекционный материал мы оценивали с точки зрения накопления в зерне ДНК *F. langsethiae* и суммарного количества Т-2/НТ-2 токсинов.

Максимальная зараженность *F. langsethiae*, количество ДНК гриба и Т-2/НТ-2 токсинов обнаружено в зерне пленчатого сорта Яков, по сравнению с которым все голозерные линии и сорта содержали значительно меньше ДНК гриба и микотоксинов. Корреляционный анализ показал достоверную положительную связь между содержанием ДНК *F. langsethiae* и количествами Т-2/НТ-2 токсинов в зерне голозерных образцов ($r = 0.54$ при $p = 0.069$ в 2019 г. и $r = 0.51$ при $p = 0.054$ в 2020 г.).

В результате нашего исследования установлены существенные различия по содержанию ДНК *F. langsethiae* в зерне анализируемых линий и сортов овса, но при этом ни один из генотипов не избежал загрязнения зерна Т-2/НТ-2 токсинами. Эти данные еще раз подчеркивают, что оценку устойчивости к фузариозу зерна необходимо

³ Технический регламент Таможенного союза 015/2011 «О безопасности зерна» с изменениями на 15 сентября 2017 г. Приложение № 2.

⁴ Технический регламент Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» с изменениями от 8 августа 2019 г. Приложение № 3.

проводить по нескольким параметрам, отражающим различные типы устойчивости.

Высказано предположение, что тип V устойчивости овса к фузариозу зависит от вида микотоксина, а локусы количественных признаков, связанные с низким уровнем накопления дезоксиниваленола (ДОН) (He et al., 2013; Martín et al., 2018), вероятно, не будут обеспечивать устойчивость генотипов к другим микотоксинам. Однако наши собственные данные (Gagkaeva et al., 2013) и результаты коллег, изучавших те же генотипы, VIR-7766 (Hautsalo et al., 2021), сорта Аргамак (Willforss et al., 2020) и Вятский (Chrpová et al., 2020), показали их относительную высокую устойчивость к накоплению разных микотоксинов (Т-2/НТ-2 токсины и ДОН), независимо от условий экспериментов.

При равных условиях ключевую роль в устойчивости селекционного материала к фузариозу играет генетическая основа созданных линий. Установлено, что две голозерные линии, имеющие в родословной сорт Залп, в первый год исследования отличались более высоким содержанием микотоксинов и ДНК грибов, чем другие анализируемые генотипы овса. По всей видимости, скрещивание с этим сортом увеличивает восприимчивость к фузариозу зерна.

Заключение

Созданные в ведущем селекционном центре России ФИЦ «Немчиновка» перспективные голозерные линии овса охарактеризовали по сумме признаков, отражающих различные типы устойчивости к фузариозу зерна: количеству ДНК *F. langsethiae* и образующих этим грибом Т-2/НТ-2 токсинов. На основании результатов, полученных в 2019–2020 гг., две линии голозерного овса, 54h2476 и 66h2618, можно охарактеризовать как высокоустойчивые к заражению *F. langsethiae* и контаминации Т-2/НТ-2 токсинами, поскольку их показатели ниже или соответствуют таковым устойчивого к фузариозу зерна сорта Вятский – контроля в условиях эксперимента. Эти линии – наиболее перспективные генотипы для создания новых, безопасных с микотоксикологической точки зрения, сортов. Следует также отметить новый сорт Азиль (линия 57h2396 в 2019 г.), который проявил относительно высокую устойчивость к фузариозу зерна в оба года исследований.

Список литературы / References

Буркин А.А., Кононенко Г.П., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. Микотоксикологическое обследование зерна овса и продуктов его переработки. В: Современная микология в России. Т. 5. Матер. III Междунар. микол. форума. 14–15 апреля 2015 г. М., 2015; 221–223.
[Burkin A.A., Kononenko G.P., Gavrilo O.P., Gagkaeva T.Yu. Mycotoxicological examination of oat grain and products of its processing. In: Current Mycology in Russia. Vol. 5. Proc. III Int. Mycol. Forum, 14–15 Apr. 2015. Moscow, 2015; 221–223. (in Russian)]
Варгач Ю.И., Головин С.Е., Лоскутов И.Г. Изучение микромитозов на овсе посевном (*Avena sativa* L.) в условиях Ступинского района Московской области. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2019;180(3):96–105. DOI 10.30901/2227-8834-2019-3-96-105.
[Vargach Yu.I., Golovin S.E., Loskutov I.G. Research on micromycetes in oats (*Avena sativa* L.) under the conditions of Stupino district, Moscow province. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i

Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2019;180(3):96–105. DOI 10.30901/2227-8834-2019-3-96-105. (in Russian)]

Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Лоскутов И.Г., Блинова Е.В., Аникина Л.В. Характеристика образцов овса по устойчивости к фузариозу. В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 808. СПб.: ВИР, 2012.

[Gagkaeva T.Yu., Gavrilo O.P., Loskutov I.G., Blinova E.V., Anikina L.V. Evaluation of oat accessions from the VIR collection for *Fusarium* head blight resistance. In: Catalogue of World VIR Collection. Vol. 808. St. Petersburg, 2012. (in Russian)]

Жуйкова О.А., Баталова Г.А. Анализ проявления основных болезней сортов овса пленчатого питомника конкурсного испытания ФАНЦ Северо-Востока. В: Матер. V Междунар. науч.-практ. конф. «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве». 1–5 апреля 2019 г. Киров, 2019; 21–24.

[Zhuikova O.A., Batalova G.A. Analysis of the main diseases of hulled oat varieties in the nursery for competitive trials of the Federal Agrarian Center of the Northeast. In: Int. Conf. “Methods and Technologies in Plant Breeding and Crop Industry”. Apr. 1–5, 2019. Kirov, Russia. Kirov, 2019; 21–24. (in Russian)]

Жуйкова О.А., Градобоева Т.П., Баталова Г.А. Эффективность инфекционных фонов при оценке овса на устойчивость к грибным болезням. Рос. с.-х. наука. 2020;(3):10–13. DOI 10.31857/S2500262720030035.

[Zhuikova O.A., Gradoboeva T.P., Batalova G.A. Effectiveness of infectious backgrounds in evaluating oat for resistance to fungal diseases. Rossiiskaya Sel'skokhozyaistvennaya Nauka = Russian Agricultural Sciences. 2020;(3):10–13. DOI 10.31857/S25002627 20030035. (in Russian)]

Исачкова О.А., Ганичев Б.Л., Логинова А.О. Устойчивость голозерного овса к головневым грибам в Западной Сибири. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2019;49(3):55–61. DOI 10.26898/0370-8799-2019-3-7.
[Isachkova O.A., Ganichev B.L., Loginova A.O. Resistance of hull-less oats to smut fungi in Western Siberia. Sibirskiy Vestnik Sel'skokhozyaistvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Science. 2019;49(3):55–61. DOI 10.26898/0370-8799-2019-3-7. (in Russian)]

Кабашов А.Д., Колупаева А.С., Лейбович Я.Г., Разумовская Л.Г., Филоненко З.В. Предварительные итоги селекции голозерного овса. Селекция, семеноводство и генетика. 2018;4(4):20–24. DOI 10.24411/2413-4112-2018-10003.

[Kabashov A.D., Kolupaeva A.S., Leibovich Ya.G., Razumovskaya L.G., Filonenko Z.V. Preliminary results of hull-less oats breeding. Seleksiya, Semenovodstvo i Genetika = Breeding, Seed Production and Genetics. 2018;4(4):20–24. DOI 10.24411/2413-4112-2018-10003. (in Russian)]

Казакова О.А., Торопова Е.Ю., Воробьева И.Г. Взаимоотношения фитопатогенов семян ячменя в Западной Сибири. АПК России. 2016;23(5):931–934.

[Kazakova O.A., Toropova E.Yu., Vorobyeva I.G. The interrelations between phytopathogens of barley seeds in Western Siberia. APK Rossii = Agro-Industrial Complex of Russia. 2016;23(5):931–934. (in Russian)]

Каракотов С.Д., Аршава Н.В., Башкатова М.Б. Мониторинг и контроль заболеваний пшеницы в Южном Зауралье. Защита и карантин растений. 2019;(7):18–25.

[Karakotov S.D., Arshava N.V., Bashkatova M.B. Monitoring and control of wheat diseases in the Southern Trans-Urals. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2019;(7): 18–25. (in Russian)]

Культурная флора. Т. 2. Ч. 3. Овес. Под ред. В.Д. Кобылянского, В.Н. Солдатова. М.: Колос, 1994.

[Kobylyansky V.D., Soldatov V.N. (Eds.). Flora of Cultivated Plants. Vol. 2. Part 3. Oats. Moscow: Kolos Publ., 1994. (in Russian)]

Лоскутов И.Г., Блинова Е.В., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. Разнообразие культурного овса по хозяйственно ценным признакам и их связь с устойчивостью к фузариозу. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):286–294. DOI 10.18699/VJ16.151.

- [Loskutov I.G., Blinova E.V., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. The valuable characteristics of oats genotypes and resistance to *Fusarium* disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(3):286-294. DOI 10.18699/VJ16.151. (in Russian)]
- Мишенькина О.Г., Захаров В.Г. Новые высокопродуктивные ценные по качеству сорта овса для производства безопасных продуктов питания. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2017;(4):91-95.
- [Mishen'kina O.G., Zakharov V.G. New high-productive, valuable for the quality of the oats varieties for safe food products manufacturing. *Zernobobovye i Krupyanye Kul'tury = Legumes and Groat Crops*. 2017;(4):91-95. (in Russian)]
- Орина А.С., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Ганнибал Ф.Б. Микромитозы *Alternaria* spp. и *Bipolaris sorokiniana* и микотоксины в зерне, выращенном в Уральском федеральном округе. *Микология и фитопатология*. 2020;54(5):365-377. DOI 10.31857/S0026364820050086.
- [Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Gannibal Ph.B. Micro-mycetes *Alternaria* spp. and *Bipolaris sorokiniana* and mycotoxins in the grain from the Ural region. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(5):365-377. DOI 10.31857/S0026364820050086. (in Russian)]
- Batalova G.A., Loskutov I.G., Shevchenko S.N., Zhuikova O.A., Krotova N.V., Tulyakova M.V. On breeding of naked oat cultivar Virovets. *Russ. Agric. Sci.* 2019;45(5):412-415. DOI 10.3103/S1068367419050033.
- Bjørnstad Å., He X., Tekle S., Klos K., Huang H.F., Tinker N.A., Helge D. Genetic variation and associations involving *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Plant Breed.* 2017;136:1-17. DOI 10.1111/pbr.12502.
- Boutigny A.-L., Richard-Forget F., Barreau C. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur. J. Plant Pathol.* 2008;121:411-423. DOI 10.1007/s10658-007-9266-x.
- Chrpová J., Palicová J., Štěrbová L., Trávníčková M., Dumalášová V., Chourová M. Resistance against *Fusarium* head blight in oats. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2020;107(1):49-54. DOI 10.13080/z-a.2020.107.007.
- De Colli L., De Ruyck K., Abdallah M.F., Finnan J., Mullins E., Kildea S., Spink J., Elliott C., Danaher M. Natural co-occurrence of multiple mycotoxins in unprocessed oats grown in Ireland with various production systems. *Toxins*. 2021;13(3):188. DOI 10.3390/toxins13030188.
- Divon H.H., Razzaghian J., Udnes-Aamot H., Klemsdal S.S. *Fusarium langsethiae* (Torp and Nirenberg), investigation of alternative infection routes in oat. *Eur. J. Plant Pathol.* 2012;132:147-161. DOI 10.1007/s10658-011-9858-3.
- Ellis M.B. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, 1971.
- Foroud N.A., Baines D., Gagkaeva T.Yu., Thakor N., Badea A., Steiner B., Bürstmayr M., Bürstmayr H. Trichothecenes in cereal grains – an update. *Toxins*. 2019;11(11):634. DOI 10.3390/toxins11110634.
- Fredlund E., Gidlund A., Sulyok M., Börjesson T., Krska R., Olsen M., Lindblad M. Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats – occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 2013;167(2):276-283. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.026.
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Orina A.S., Blinova E.V., Loskutov I.G. Response of wild *Avena* species to fungal infection of grain. *Crop J.* 2017;5(6):499-508. DOI 10.1016/j.cj.2017.04.005.
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Yli-Mattila T., Loskutov I.G. The sources of resistance to *Fusarium* head blight in VIR oat collection. *Euphytica*. 2013;191(3):355-364. DOI 10.1007/s10681-013-0865-7.
- Gannibal Ph.B. Factors affecting *Alternaria* appearance in grains in European Russia. *Agricultural Biology (Sel'skokhozyaistvennaya Biologia)*. 2018;53(3):605-615. DOI 10.15389/agrobiol.2018.3.605eng.
- Gavrilova O.P., Gannibal Ph.B., Gagkaeva T.Yu. *Fusarium* and *Alternaria* fungi in grain of oats grown in the North-Western Russia regarding cultivar specificity. *Agricultural Biology (Sel'skokhozyaistvennaya Biologia)*. 2016;51(1):111-118. DOI 10.15389/agrobiol.2016.1.111eng.
- Gerlach W., Nirenberg H.I. The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Berlin, 1982.
- Hautsalo J., Jauhainen L., Hannukkala A., Manninen O., Veteläinen M., Pietilä L., Peltoniemi K., Jalli M. Resistance to *Fusarium* head blight in oats based on analyses of multiple field and greenhouse studies. *Eur. J. Plant Pathol.* 2020;158:15-33. DOI 10.1007/s10658-020-02039-0.
- Hautsalo J., Latvala S., Manninen O., Haapalainen M., Hannukkala A., Jalli M. Two oat genotypes with different field resistance to *Fusarium* head blight respond similarly to the infection at spikelet level. *J. Plant Pathol.* 2021;103:299-304. DOI 10.1007/s42161-020-00670-8.
- He X., Skinnes H., Oliver R.E., Jackson E.W., Bjørnstad Å. Linkage mapping and identification of QTL affecting deoxynivalenol (DON) content (*Fusarium* resistance) in oats (*Avena sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2013;126:2655-2670. DOI 10.1007/s00122-013-2163-0.
- Hofgaard I.S., Aamot H.U., Torp T., Jestoi M., Lattanzio V.M.T., Klemsdal S.S., Waalwijk C., Van der Lee T., Brodal G. Associations between *Fusarium* species and mycotoxins in oat and spring wheat from farmers' fields in Norway over a six-year period. *World Mycotoxin J.* 2016;9:365-378. DOI 10.3389/fmicb.2016.00556.
- Imathiu S.M., Ray R.V., Back M.I., Hare M.C., Edwards S.G. A survey investigating the infection of *Fusarium langsethiae* and production of HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oat fields. *J. Phytopathol.* 2013;161(7-8):553-561. DOI 10.1111/jph.12105.
- Isidro-Sánchez J., D'Arcy Cusack K., Verheecke-Vaessen C., Kahla A., Bekele W., Doohan F., Magan N., Medina A. Genome-wide association mapping of *Fusarium langsethiae* infection and mycotoxin accumulation in oat (*Avena sativa* L.). *Plant Genome*. 2020;13(2):e20023. DOI 10.1002/tpg2.20023.
- Kononenko G.P., Burkin A.A., Zotova Ye.V. Mycotoxilogical monitoring. Part 2. Wheat, barley, oat and maize grain. *Vet. Microbiol.* 2020;2(33):139-145. DOI 10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145.
- Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Andersen B. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality – a matched pair sample study. *Int. J. Food Microbiol.* 2004;93(1):51-62. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.006.
- Kurowski T.P., Wysocka U. Fungal communities colonizing grain of hulled and naked oat grown under organic farming system. *Phytopathologia*. 2009;54:53-59.
- Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V., Vargach Yu.I., Porokhvinova E.A., Blinova E.V., Gnuitkov A.A., Rodionov A.V. Modern approach of structuring the variety diversity of the naked and covered forms of cultural oats (*Avena sativa* L.). *Ecol. Genet.* 2020;18(1):27-41. DOI 10.17816/ecogen12977.
- Martin C., Schöneberg T., Vogelgsang S., Mendes Ferreira C.S., Morisoli R., Bertossa M., Bucheli T., Mauch-Mani B., Mascher F. Responses of oat grains to *Fusarium poae* and *F. langsethiae* infections and mycotoxin contaminations. *Toxins*. 2018;10:47. DOI 10.3390/toxins10010047.
- Martinelli J.A., Chaves M.S., Graichen F.A.S., Federizzi L.C., Dresch L.F. Impact of *Fusarium* head blight in reducing the weight of oat grains. *J. Agric. Sci.* 2014;6(5):188-198. DOI 10.5539/jas.v6n5p188.
- Mesterhazy A., Bartok T., Kaszonyi G., Varga M., Toth M., Varga J. Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 2005;112:267-281. DOI 10.1007/s10658-005-2853-9.
- Opoku N., Back M., Edwards S.G. Development of *Fusarium langsethiae* in commercial cereal production. *Eur. J. Plant Pathol.* 2013;136:159-170. DOI 10.1007/s10658-012-0151-x.
- Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. Adaptation of the quantitative PCR method for the detection of the main representatives of ce-

- real grain mycobiota. *MIR J.* 2018;5(1):78-83. DOI 10.18527/2500-2236-2018-5-1-78-83.
- Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Loskutov I.G. Symbiotic relationships between aggressive *Fusarium* and *Alternaria* fungi colonizing oat grain. *Agricultural Biology (Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya)*. 2017;52(5):986-994. DOI 10.15389/agrobiology.2017.5.986eng.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. Introduction to Food- and Airborne Fungi. Utrecht, 2002.
- Schöneberg T., Jenny E., Wettstein F.E., Bucheli T.D., Mascher F., Bertossa M., Musa T., Seifert K., Gräfenhan T., Keller B., Vogelgsang S. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Swiss oats – impact of cropping factors. *Eur. J. Agron.* 2018;92:123-132. DOI 10.1016/j.eja.2017.09.004.
- Tekauz A.B., Mitchell Fetch J.W., Rossnagel B.G., Savard M.E. Progress in assessing the impact of *Fusarium* head blight on oat in western Canada and screening of avena germplasm for resistance. *Cereal Res. Commun.* 2008;36(8):49-56. DOI 10.1556/CRC.36.2008.Suppl.B.8.
- Tekle S., Dill-Macky R., Skinnes H., Tronsmo A.M., Bjørnstad Å. Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). *Eur. J. Plant Pathol.* 2012;132:431-442. DOI 10.1007/s10658-011-9888-x.
- Tekle S., Lillemo M., Skinnes H., Reitan L., Buraas T., Bjørnstad Å. Screening of oat accessions for *Fusarium* head blight resistance using spawn-inoculated field experiments. *Crop Sci.* 2018;58:143-151. DOI 10.2135/cropsci2017.04.0264.
- Torp M., Nirenberg H.I. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *Int. J. Food Microbiol.* 2004;95:247-256. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.014.
- Willforss J., Leonova S., Tillander J., Andreasson E., Marttila S., Olsson O., Chawade A., Levander F. Interactive proteogenomic exploration of response to *Fusarium* head blight in oat varieties with different resistance. *J. Proteomics.* 2020;218:103688. DOI 10.1016/j.jprot.2020.103688.
- Yan W., Fregeau-Reid J., Rioux S., Pageau D., Xue A., Martin R., Fedak G., de Haan B., Lajeunesse J., Savard M. Response of oat genotypes to *Fusarium* head blight in Eastern Canada. *Crop Sci.* 2010; 50:134-142. DOI 10.2135/cropsci2009.03.0129.
- Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Jestoi M., Parikka P., Hietaniemi V., Gagkaeva T., Sarlin T., Haikara A., Laaksonen S., Rizzo A. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 2008;41(4):243-260. DOI 10.1080/03235400600680659.

ORCID ID

O.P. Gavrilova orcid.org/0000-0002-5350-3221
T.Yu. Gagkaeva orcid.org/0000-0002-3276-561X
A.S. Orina orcid.org/0000-0002-7657-6618
A.S. Markova orcid.org/0000-0002-2528-1422
A.D. Kabashov orcid.org/0000-0002-7450-3845
I.G. Loskutov orcid.org/0000-0002-9250-7225

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 19-76-30005).

Авторы благодарят к.м.н. А.А. Буркина (Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал «ФНЦ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН», Москва, Россия) за помощь в анализе микотоксинов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.06.2021. После доработки 20.09.2021. Принята к публикации 21.09.2021.

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

Ген *Sr38*: значение для селекции мягкой пшеницы в условиях Западной Сибири

Е.С. Сколотнева¹✉, В.Н. Кельбин¹, В.П. Шаманин², Н.И. Бойко³, В.А. Апарина³, Е.А. Салина^{1, 4}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

³ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ sk-ska@yandex.ru

Аннотация. Современная селекция пшеницы на иммунитет широко применяет генетический резерв близкородственных видов из семейства Triticeae. Транслокация 2NS/2AS привнесена в геном культурного злака *Triticum aestivum* от дикорастущего сородича *T. ventricosum* и содержит гены *Lr37*, *Yr17* и *Sr38*, которые отвечают за устойчивость пшеницы на уровне проростков к бурой, желтой и стеблевой ржавчине с соответствующими возбудителями: *Puccinia triticina* Eriks., *P. striiformis* West. f. sp. *tritici* и *P. graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. Данная транслокация известна в таких мировых сортах, как Trident, Madsen, Rendezvous, а также в отечественных сортах южной селекции Морозко, Сварог, Граф, Маркиз и Гомер. При этом ген *Sr38* до сих пор не введен в производственные сорта, высеваемые на территории Западной Сибири, поэтому сохраняет практическое значение для селекции на иммунитет в областях, где патогенная популяция *P. graminis* f. sp. *tritici* представлена авирулентными клонами. Основная цель работы состояла в анализе частоты а/вирулентных клонов к гену *Sr38* в расширенной западносибирской выборке возбудителя стеблевой ржавчины. В лаборатории с контролируемым климатом (Институт цитологии и генетики СО РАН) на проростках универсального восприимчивого сорта Хакасская выделено 139 монопустьных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из образцов урединиоспор Новосибирской, Омской областей, Алтайского и Красноярского края, собранных в 2019–2020 гг. на производственных и селекционных посевах мягкой пшеницы. Путем заражения тестерных генотипов пшеницы, несущих ген *Sr38* (VPM1 и Trident), выявлены вариации по частоте а/вирулентных клонов в географических образцах *P. graminis* f. sp. *tritici*. В целом текущая западносибирская популяция представлена на 60 % авирулентными клонами гриба к гену *Sr38*, при этом в образцах популяции из Красноярского края не выявлено ни одного вирулентного изолята. Поиск источников гена устойчивости к стеблевой ржавчине среди отечественного селекционного материала был выполнен с помощью специфических молекулярных маркеров на транслокацию 2NS/2AS. Исходя из перспективы использования в регионе, выбор проводили среди коллекций линий и сортов мягкой яровой пшеницы Омского ГАУ, адаптированных к условиям Западной Сибири. Присутствие гена постулировалось путем проведения процедуры генотипирования с помощью специфических праймеров (VENTRIUP-LN2) и фитопатологического тестирования авирулентными клонами гриба. Носителями доминантных аллелей гена *Sr38* оказались линии Лютесценс 12-18, Лютесценс 81-17, Лютесценс 66-16, Эритроспермум 79/07, 9-31 и 8-26. Полученные данные по составу образцов западносибирской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* позволяют рассматривать ген *Sr38* в качестве кандидата для включения в селекцию пшеницы в Красноярском крае, а также в составе генных пирамид в Новосибирской области и Алтайском крае.

Ключевые слова: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; авирулентные клоны; устойчивость; *Triticum aestivum*; *Sr38*.

Для цитирования: Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Шаманин В.П., Бойко Н.И., Апарина В.А., Салина Е.А. Ген *Sr38*: значение для селекции мягкой пшеницы в условиях Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):740-745. DOI 10.18699/VJ21.084

The gene *Sr38* for bread wheat breeding in Western Siberia

E.S. Skolotneva¹✉, V.N. Kelbin¹, V.P. Shamanin², N.I. Boyko³, V.A. Aparina³, E.A. Salina^{1, 4}

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

² Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

³ 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, Novosibirsk, Russia

⁴ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ sk-ska@yandex.ru

Abstract. Present-day wheat breeding for immunity exploits extensively closely related species from the family Triticeae as gene donors. The 2NS/2AS translocation has been introduced into the genome of the cultivated cereal *Triticum aestivum* from the wild relative *T. ventricosum*. It contains the *Lr37*, *Yr17*, and *Sr38* genes, which support

seedling resistance to the pathogens *Puccinia triticina* Eriks., *P. striiformis* West. f. sp. *tritici*, and *P. graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn, which cause brown, yellow, and stem rust of wheat, respectively. This translocation is present in the varieties Trident, Madsen, and Rendezvous grown worldwide and in the Russian varieties Morozko, Svarog, Graf, Marquis, and Homer bred in southern regions. However, the *Sr38* gene has not yet been introduced into commercial varieties in West Siberia; thus, it remains of practical importance for breeding in areas where populations of *P. graminis* f. sp. *tritici* are represented by avirulent clones. The main goal of this work was to analyze the frequency of clones (a)virulent to the *Sr38* gene in an extended West Siberian collection of stem rust agent isolates. In 2019–2020, 139 single pustule isolates of *P. graminis* f. sp. *tritici* were obtained on seedlings of the standard susceptible cultivar Khakasskaya in an environmentally controlled laboratory (Institute of Cytology and Genetics SB RAS) from samples of urediniospores collected on commercial and experimental bread wheat fields in the Novosibirsk, Omsk, Altai, and Krasnoyarsk regions. By inoculating test wheat genotypes carrying *Sr38* (VPM1 and Trident), variations in the purity of (a)virulent clones were detected in geographical samples of *P. graminis* f. sp. *tritici*. In general, clones avirulent to *Sr38* constitute 60 % of the West Siberian fungus population, whereas not a single virulent isolate was detected in the Krasnoyarsk collection. The Russian breeding material was screened for sources of the stem rust resistance gene by using molecular markers specific to the 2NS/2AS translocation. A collection of hybrid lines and varieties of bread spring wheat adapted to West Siberia (Omsk SAU) was analyzed to identify accessions promising for the region. The presence of the gene was postulated by genotyping with specific primers (VENTRIUP-LN2) and phytopathological tests with avirulent clones of the fungus. Dominant *Sr38* alleles were identified in Lutescens 12-18, Lutescens 81-17, Lutescens 66-16, Erythrosporum 79/07, 9-31, and 8-26. On the grounds of the composition of the West Siberian *P. graminis* f. sp. *tritici* population, the *Sr38* gene can be considered a candidate for pyramiding genotypes promising for the Novosibirsk, Altai, and Krasnoyarsk regions.

Key words: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; avirulent clones; resistance; *Triticum aestivum*; *Sr38*.

For citation: Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Shamanin V.P., Boyko N.I., Aparina V.A., Salina E.A. The gene *Sr38* for bread wheat breeding in Western Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):740-745. DOI 10.18699/VJ21.084

Введение

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* – культура с длительной историей возделывания в большинстве стран мира. Неизбежным становится истощение разнообразия генов пшеничного генома, готовых послужить новым источником важных хозяйственно ценных признаков, среди которых устойчивость к болезням. Современная селекция пшеницы на иммунитет широко применяет генетический резерв дикорастущих сородичей из семейства Triticeae, таких как *Triticum monococcum* L., *T. speltoides* (Tausch) Gren., *T. ventricosum* (McIntosh et al., 1995; Dubcovsky et al., 1996; Friebe et al., 1996). Протяженный участок хромосомы (25–38 сМ), содержащий три гена устойчивости к ржавчинным заболеваниям, был перенесен в геном мягкой озимой пшеницы сорта VPM1 от *T. ventricosum* (Maia, 1967) и локализован как транслокация 2NS/2AS (Bariana, McIntosh, 1993). Приобретенные гены *Lr37*, *Yr17* и *Sr38* отвечают за устойчивость пшеницы к бурой, желтой и стеблевой ржавчине с соответствующими возбудителями: *Puccinia triticina* Eriks., *P. striiformis* West. f. sp. *tritici* и *P. graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. Транслокацию 2NS/2AS интрогрессировали и в другие коммерческие сорта – Trident, Madsen, Rendezvous (McIntosh et al., 1995), после чего она была интенсивно вовлечена в селекцию в различных регионах мира, обеспечивая эффективную защиту от ржавчинных патогенов, а также некоторых видов злаковых нематод (Duck, Lukow, 1988; Robert et al., 1999; Seah et al., 2000). В Национальном центре зерна им. П.П. Лукьяненко созданы, включены в Государственный реестр РФ и допущены к использованию в производстве по Центрально-Черноземному, Северо-Кавказскому, Средне-Волжскому и Нижне-Волжскому регионам сорта с идентифицированным геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr37*, а соответственно, и с генами устойчивости к стеблевой и желтой ржавчине *Sr38*, *Yr17*:

Морозко (2015), Сварог (2017), Граф (2018), Маркиз (2019) и Гомер (2020) (Беспалова и др., 2019а, б).

Более двадцати лет назад ген *Sr38* потерял свою эффективность к стеблевой ржавчине в странах Азии и Северной Африки, откуда получила распространение южная агрессивная раса Ug99 (Pretorius et al., 2000). Однако в России раса Ug99 до сих пор не регистрируется среди фитопатогенного комплекса пшеницы (Баранова и др., 2015; Skolotneva et al., 2020). Более того, показано, что ген *Sr38* эффективнее экспрессируется при низких температурах (Helguera et al., 2003), что позволяет рассматривать его в качестве кандидата для включения в селекцию пшеницы в регионах с умеренным климатом. Ген *Sr38* до сих пор широко не введен в производственные сорта, высеваемые на территории Западной Сибири (Сочалова, Лихенко, 2015), поэтому сохраняет практическое значение для селекции на иммунитет в областях, где патогенная популяция *P. graminis* f. sp. *tritici* представлена авирулентными клонами.

Разработано несколько молекулярных маркеров к транслокации 2NS/2AS для облегчения переноса генов *Lr37*, *Yr17* и *Sr38* в коммерческие сорта. Первым предложенным маркером был доминантный SCAR маркер (sequence characterized amplified region), расположенный на расстоянии 0.8 ± 0.7 сМ от гена *Yr17* (Robert et al., 1999). В настоящее время для идентификации транслокации 2NS/2AS в генетическом материале пшеницы широко применяют два маркера (Helguera et al., 2003). Кодоминантный CAPS (cleavage amplified polymorphic sequence) маркер требует дополнительной стадии расщепления диагностического фрагмента с помощью ферментов рестрикции. Доминантный ПЦР-маркер разработан непосредственно на специфическую последовательность распространенного аллеля внутри транслокации 2NS/2AS. Для его получения используют пару праймеров VENTRIUP-LN2, разделяя про-

дукты амплификации в агарозном геле (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Sr38>), что является очевидным преимуществом маркера.

Целью данной работы был анализ частоты а/вирулентных клонов к гену *Sr38* в расширенной западносибирской выборке возбудителя стеблевой ржавчины за счет образцов из Красноярского края. Кроме того, последовательной частью работы стал поиск носителей гена *Sr38* с помощью молекулярных ДНК-маркеров. Использовалась коллекция линий и сортов мягкой яровой пшеницы, адаптированных к условиям Западной Сибири.

Материалы и методы

Расширенная западносибирская выборка возбудителя стеблевой ржавчины была представлена образцами из Новосибирской, Омской областей, Алтайского и Красноярского края, собранных в 2019–2020 гг. на производственных и селекционных посевах мягкой пшеницы. В условиях лаборатории с контролируемым климатом (ИЦиГ СО РАН) на проростках универсального восприимчивого сорта Хакасская из сборных образцов урединоспор было выделено 139 монопустульных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* (табл. 1).

Для выявления частоты а/вирулентных клонов к гену *Sr38* использовали тестерные генотипы пшеницы: изогенную линию и сорта из наборов для дифференциации рас стеблевой ржавчины пшеницы США и Канады, несущие ген *Sr38* (VPM и Trident соответственно). Семенной материал был предварительно верифицирован с помощью молекулярных маркеров к гену, из дальнейшей работы исключены растения, для которых обнаружен отрицательный сигнал на ДНК-матрице.

Анализ устойчивости проводили на проростках, условия подготовки и проведения инокуляции клонами гриба подробно описаны в работе (Сколотнева и др., 2020). Для интерпретации инфекционных типов на тестерных генотипах пшеницы использовали 4-балльную шкалу Стэкмана (Stakman et al., 1962).

Коллекция из 80 линий и сортов мягкой яровой пшеницы, адаптированных к условиям Западной Сибири, представлена проф. В.П. Шаманиным (Омский ГАУ). Образцы ДНК выделяли из верхушек проростков растений с помощью СТАВ метода (Rogers, Bendich, 1985). Количество ДНК оценивали флуориметром Qubit 4 (Invitrogen, США).

Идентификацию гена *Sr38* в селекционном материале проводили с помощью пары праймеров VENTRIUP (5'-AGGGCTACTGACCAAGGCT-3') и LN2 (5'-TGCACTACAGCAGTATGTACACAAAA-3') на транслокацию 2NS/2AS. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в конечном объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 × SE-Буфер AS (Amomonium Sulfate), dNTPs (0.2 mM каждого), праймеры (0.2 мкМ каждого), MgCl₂ (1.5 mM), 50 нг геномной ДНК, 1 е. а. Таq ДНК полимеразы (SibEnzyme). Амплификацию выполняли на приборе Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) в следующем режиме: 7 мин при 94 °C, 30 циклов при 94 °C (30 с), 65 °C (30 с), 72 °C (40 с) и финальная элонгация 72 °C (10 мин). Детекцию продуктов амплификации проводили в 2 % агарозном геле. Для оценки размера фрагментов использовали ДНК-маркер Step 50 plus (Биолабмикс).

Таблица 1. Частота авирулентных клонов *P. graminis* f. sp. *tritici* на тестерных генотипах пшеницы с *Sr38*

Место сбора образца	Год	Кол-во монопустульных изолятов	Авирулентные клоны на линиях <i>Sr38</i> , %
Омская область	2020	33	9
Новосибирская область	2019, 2020	57	65
Алтайский край	2019	21	71
Красноярский край	2020	28	100
В целом		139	60

Постулирование гена завершалось процедурой фитопатологического тестирования устойчивости изолятами *P. graminis* f. sp. *tritici*, авирулентными к *Sr38*. Оценивалась устойчивость растений на стадии проростков по вышеупомянутой схеме, в качестве восприимчивого контроля был взят сорт Хакасская. Опыт выполнен на 10 растениях каждого генотипа в двух повторностях.

Результаты и обсуждение

Оценка образцов возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы из различных областей Западно-Сибирского региона выявила вариации по частоте клонов гриба, не поражающих тестерные генотипы с *Sr38*, т. е. авирулентные к ним (см. табл. 1). Отмечен градиент с запада на восток: минимальная частота в Омской области против 100 % авирулентности образца популяции из Красноярского края. Полиморфизм обнаруженных инфекционных типов в ответ на заражение монопустульными изолятами *P. graminis* f. sp. *tritici* из различных выборок представлен на рис. 1. Получены все варианты, описываемые баллами «1», «2», «3» и «3+», но для образцов из Алтайского и Красноярского края преобладают варианты, соответствующие реакциям устойчивости и средней устойчивости хозяина. Интересно отметить факт появления авирулентных клонов в образцах новосибирской и алтайской инфекции, что не было зафиксировано при анализе расового состава западносибирской популяции, выполненном в 2017 г. (Skolotneva et al., 2020). Вероятным объяснением может быть занос инокулюма *P. graminis* f. sp. *tritici* из южных регионов: известно, что ген *Sr38* эффективен в северных районах Казахстана и в Китае (Койшыбаев, 2018; Li et al., 2018).

В целом текущая западносибирская популяция представлена на 60 % авирулентными клонами гриба к гену *Sr38*. Если исключить из рассмотрения выборку из Омской области, где уже несколько лет ген описывается в категории неэффективных к местному патогену (Shamanin et al., 2020), то частота клонов гриба, не поражающих генотипы с *Sr38*, возрастет до 78 %. Это позволяет предложить ген *Sr38* в качестве кандидата для включения в пирамиды генов в селекционных программах восточных областей региона. Эффективность генотипов *Sr25+Sr38*, *Sr31+Sr38* показана, например, на Урале, где одиночно *Sr38* не позволяет обеспечить должную защиту от стеблевой ржавчины

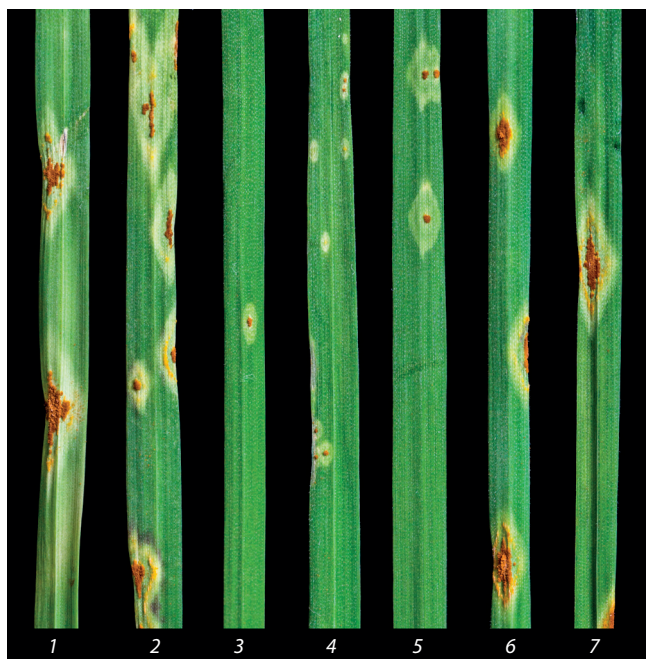


Рис. 1. Инфекционные типы *P. graminis* f. sp. *tritici* из различных географических выборок на тестерных генотипах с *Sr38*.

Заражение изолятами гриба: 1–3 – из Новосибирской области (1 – тип реакции «3+», 2 – тип реакции «3–», 3 – тип реакции «1»); 4 – из Алтайского края (тип реакции «1»); 5 – из Красноярского края (тип реакции «2»); 6, 7 – из Омской области (6 – тип реакции «3», 7 – тип реакции «3+»).

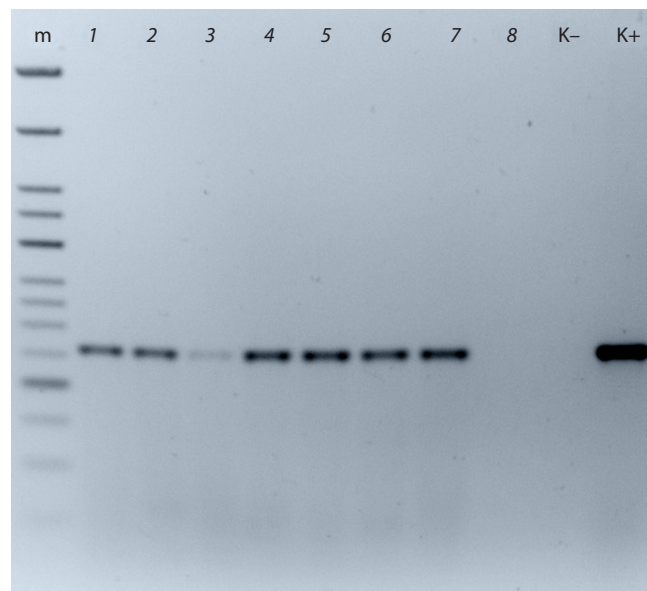


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации молекулярных маркеров к гену *Sr38* на ДНК матрицах мягкой пшеницы из западносибирской коллекции селекционных линий ОмГАУ.

m – ДНК-маркер Step 50 plus (Биолабмикс); 1 – Лютесценс 12-18; 2 – Лютесценс 34-16; 3 – Лютесценс 81-17; 4 – Лютесценс 66-16; 5 – Эритроспермум 79/07; 6 – линия 9-31; 7 – линия 8-26; 8 – генотип 2 из коллекции Омского ГАУ; «K–» и «K+» – отрицательный (сорт Хакасская) и положительный (VPM1) контроль.

Таблица 2. Родословная некоторых линий мягкой пшеницы из западносибирской коллекции Омского ГАУ, устойчивых к стеблевой ржавчине в условиях естественного инфекционного фона Омской области, 2019 г.

Линия	Родословная	Полевая оценка
Лютесценс 12-18	MN6616M/3/NL456/VEE#5//DUCULA/4/KARAGANDINSKAYA 70	20MR
Лютесценс 34-16	OMSKAYA 36/BAVIS//TERTSIYA	10MR
Лютесценс 81-17	ERITROSPERMUM 55-94-01-20/5/PYN/BAU/3/MON/IMU//ALD/PVN/4/VEE#5/SARA//DUCULA/6/FITON 42	10MR
Лютесценс 66-16	27.90.98.3/3/KA/NAC//TRCH/4/ALTAYSKAYA 530	25MR
9-31	UKR-OD 1530.94/AE.SQUARROSA(1027)/Pamyati Azieva	20MR
8-26	AISBERG/AE.SQUARROSA(369)/Omgau 90	20MR

(Дружин и др., 2018). Кроме того, селекционная ценность транслокации 2NS/2AS состоит в том, что она несет гены устойчивости *Lr37* и *Yr17*, которые сохраняют эффективность к западносибирским образцам возбудителей бурой и желтой ржавчины (Skolotneva et al., 2018; Гуляева, Шайдаюк, 2020).

Поиск источников гена *Sr38* среди отечественного селекционного материала был выполнен с помощью специфического молекулярного маркера на транслокацию 2NS/2AS. Исходя из перспективы использования в регионе, выбор проводили среди коллекции линий и сортов мягкой яровой пшеницы Омского ГАУ, адаптированных к условиям Западной Сибири. Присутствие гена постулировалось путем проведения процедуры генотипирования с помощью специфических праймеров (VENTRIUP-LN2) и фитопатологического тестирования авирулентными клонами гриба.

Положительный сигнал, соответствующий диагностическому фрагменту размером 259 п. н., был получен на ДНК-матрицах семи селекционных линий пшеницы: Лютесценс 12-18, Лютесценс 34-16, Лютесценс 81-17, Лютесценс 66-16, Эритроспермум 79/07, 9-31, 8-26 (рис. 2). Родословная перечисленных сортов и гибридных линий приведена в табл. 2. Обращает на себя внимание сильное различие предполагаемых носителей гена *Sr38* по происхождению, что составляет ценность материала в качестве разнообразных доноров устойчивости.

Для фитопатологического тестирования западносибирской коллекции сортов и гибридных линий мягкой пшеницы из образцов инфекции Красноярского края выбраны изоляты *P. graminis* f. sp. *tritici* гриба, показывающие стабильно воспроизводимые реакции устойчивости на тестерных генотипах пшеницы с *Sr38*. Инфекционные типы «0» и «1» были описаны на зараженных растениях

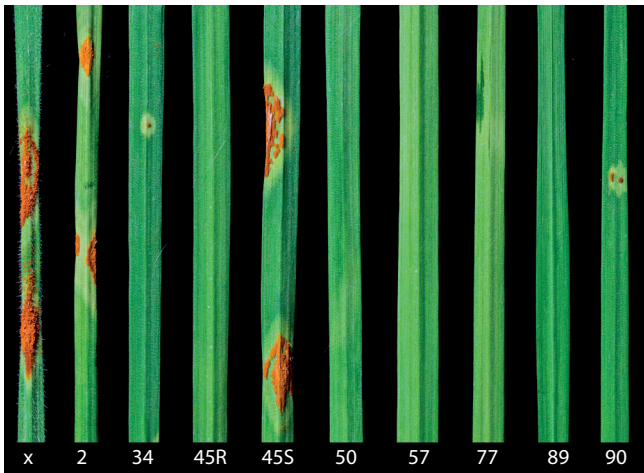


Рис. 3. Реакция селекционных линий мягкой пшеницы из западно-сибирской коллекции ОмГАУ на заражение изолятами *P. graminis* f. sp. *tritici*, авирулентными к *Sr38*.

Растения на стадии проростков: x – сорт Хакасская (тип реакции «4»); 2 – генотип 2 из коллекции ОмГАУ (тип реакции «3»); 34 – Лютесценс 12-18 (тип реакции «1»); 45R и 45S – Лютесценс 34-16 (тип реакции «0» и «4» соответственно); 50 – Лютесценс 81-17 (тип реакции «0»); 57 – Лютесценс 66-16 (тип реакции «0»); 77 – Эритроспермум 79/07 (тип реакции «0»); 89 – линия 9-31 (тип реакции «0»); 90 – линия 8-26 (тип реакции «1»).

Лютесценс 12-18, Лютесценс 34-16, Лютесценс 81-17, Лютесценс 66-16, Эритроспермум 79/07, 9-31, 8-26, что соответствует реакции устойчивости (рис. 3). Для сравнения, помимо контроля восприимчивости (сорт Хакасская), в анализ был включен генотип 2 без гена *Sr38*, по данным генотипирования с использованием молекулярных маркеров. На них наблюдали максимальное развитие симптомов стеблевой ржавчины с баллами 3 и 4. Часть протестированных растений Лютесценс 34-16 была восприимчива к изолятам гриба с авирулентностью к *Sr38* (см. рис. 3, 45R и 45S). На их долю в проанализированной выборке пришлось около 30 %, что говорит о наличии в селекционном материале биотипов, различающихся по признаку устойчивости к стеблевой ржавчине. Используемый молекулярный маркер к гену является доминантным, поэтому не может исключать гетерозиготность признака, что выявилось в результате фитопатологического тестирования. Для остальных шести селекционных образцов западно-сибирской коллекции сортов и линий мягкой пшеницы (Лютесценс 12-18, Лютесценс 81-17, Лютесценс 66-16, Эритроспермум 79/07, 9-31, 8-26) подтверждено присутствие устойчивых аллелей гена *Sr38*, экспрессирующихся в ответ на заражение авирулентными клонами гриба по закону Флора «ген-на-ген» взаимодействия хозяина и патогена. Данные иммунологического скрининга этих линий, полученные во время полевых испытаний селекционного материала на естественном инфекционном фоне в Омской области в 2019 г., свидетельствуют о средней устойчивости к стеблевой ржавчине носителей гена *Sr38* (см. табл. 2). Это согласуется с результатами фитопатологического тестирования материала с помощью образцов Омской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* на уровне проростков.

Заключение

Полученные данные по составу образцов западносибирской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* позволяют рассмотреть ген *Sr38* в качестве кандидата для включения в селекцию пшеницы в Красноярском крае, а также в составе генных пирамид в Новосибирской области и Алтайском крае. Носителями доминантных аллелей гена *Sr38* являются следующие селекционные линии мягкой пшеницы Омского ГАУ: Лютесценс 12-18, Лютесценс 81-17, Лютесценс 66-16, Эритроспермум 79/07, линии 9-31 и 8-26. Этот селекционный материал адаптирован к условиям региона и может быть рекомендован для селекционных учреждений Западной Сибири в качестве доноров устойчивости к стеблевой ржавчине.

Список литературы / References

- Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иорданская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(3):316-322. DOI 10.18699/VJ15.041.
- [Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(3):344-350. DOI 10.1134/S2079059716030011.]
- Беспалова Л.А., Аблова И.Б., Худокормова Ж.Н., Пузырная О.Ю., Набоков Г.Д., Агаева Е.В., Тархов А.С. Генетические детерминанты резистентности сортов озимой пшеницы к *Puccinia* spp. В: Состояние и перспективы развития аграрной науки в условиях изменяющегося климата: Материалы Междунар. науч.-практ. конф., Краснодар, 5–6 сент. 2019 года. Краснодар: Изд-во «ЭДВИ», 2019а:11-18.
- [Bespalova L.A., Ablova I.B., Khudokormova Zh.N., Puzyrnaya O.Yu., Nabokov G.D., Agaeva E.V., Tarhov A.S. Genetic determinants of resistance of winter wheat varieties to *Puccinia* spp. In: Proceedings of the Int. Conf. "State and Prospects for the Development of Agricultural Science in a Changing Climate". Krasnodar: EDVI Publ., 2019a:11-18. (in Russian)]
- Беспалова Л.А., Аблова И.Б., Худокормова Ж.Н., Пузырная О.Ю., Набоков Г.Д., Агаева Е.В., Тархов А.С. Генетическая защищенность сортов озимой пшеницы от ржавчинных болезней. *Рисоводство*. 2019б;4(45):30-37.
- [Bespalova L.A., Ablova I.B., Khudokormova Zh.N., Puzyrnaya O.Yu., Nabokov G.D., Agaeva E.V., Tarhov A.S. Genetic protection of winter wheat varieties against rust diseases. *Risovodstvo = Rice Growing*. 2019b;4(45):30-37. (in Russian)]
- Гульятеева Е.И., Шайдаюк Е.Л. Вирулентность российских популяций возбудителя желтой ржавчины пшеницы. *Микология и фитопатология*. 2020;54(4):299-304. DOI 10.31857/S0026364820040042.
- [Gulyaeva E.I., Shaydayuk Ye.L. Virulence of Russian populations of stripe rust causal agent. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(4):299-304. DOI 10.31857/S0026364820040042. (in Russian)]
- Дружин А.Е., Сибикеев С.Н., Власовец Л.Т., Голубева Т.Д., Калинин Т.В. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у нового сорта яровой мягкой пшеницы Александрит, созданного методом интрогрессивной селекции. *Успехи современной естествознания*. 2018;9:12-17. DOI 10.17513/use.36859.
- [Druzhin A.Ye., Sibikeev S.N., Vlasovets L.T., Golubeva T.D., Kalintseva T.V. The study of agronomic valuable and adaptive traits in a new cultivar of spring bread wheat Alexandrite produced by introgression breeding. *Uspekhi Sovremennogo Yestestvoznaniya = Ad-*

- vances in *Current Natural Sciences*. 2018;9:12-17. DOI 10.17513/use.36859. (in Russian)]
- Койшыбаев М. Болезни пшеницы. Анкара: Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО), 2018.
[Koishybayev M. Wheat Diseases. Ankara: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018. (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*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092. (in Russian)]
- Сочалова Л.П., Лихенко И.Е. Генетическое разнообразие яровой пшеницы по устойчивости к мигрирующим заболеваниям. Новосибирск, 2015.
[Sochalova L.P., Lichenko I.E. The Genetic Diversity of Spring Wheat in Resistance to Migratory Diseases. Novosibirsk, 2015. (in Russian)]
- Bariana H.S., McIntosh R.A. Cytogenetic studies in wheat. XV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. *Genome*. 1993; 36(3):476-482. DOI 10.1139/g93-065.
- Dubcovsky J., Luo M.C., Zhong G.Y., Bransteitter R., Desai A., Kilian A., Kleinhofs A., Dvořák J. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*. 1996;143(2):983-999. DOI 10.1093/genetics/143.2.983.
- Dyck P.L., Lukow O.M. The genetic analysis of two interspecific sources of leaf rust resistance and their effect on the quality of common wheat. *Can. J. Plant Sci.* 1988;68(3):633-639. DOI 10.4141/cjps88-076.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*. 1996;91(1):59-87. DOI 10.1007/BF00035277.
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-qi L., Dubcovsky J. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci.* 2003;43(5):1839-1847. DOI 10.2135/cropsci2003.1839.
- Li T.Y., Ma Y.C., Wu X.X., Chen S., Xu X.F., Wang H., Cao Y.Y., Xuan Y.X. Race and virulence characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in China. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197579. DOI 10.1371/journal.pone.0197579.
- Maia N. Obtention des bles tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques bles × *Aegilops*. *C.R. Séances Acad. Agric. Fr.* 1967;53:149-154.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts an Atlas of Resistance Genes. Australia: CSIRO Publ., 1995. DOI 10.1007/BF03214019.
- Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 2000;84(2):203. DOI 10.1094/pdis.2000.84.2.203b.
- Robert O., Abelard C., Dedryver F. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat. *Mol. Breed.* 1999;5(2):167-175. DOI 10.1023/A:1009672021411.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985;5(2):69-76. DOI 10.1007/BF00020088.
- Seah S., Spielmeier W., Jahier J., Sivasithamparam K., Lagudah E.S. Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000;13(3):334-341. DOI 10.1094/MPMI.2000.13.3.334.
- Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Shepelev S.S., Pozherukova V.E., Salina E.A., Skolotneva E.S., Hodson D., Hovmeller M., Morgunov A.I. Stem rust in Western Siberia – race composition and effective resistance genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):131-138. DOI 10.18699/VJ20.60823.
- Skolotneva E.S., Kosman E., Patpour M., Kelbin V.N., Morgunov A., Shamanin V.P., Salina E.A. Virulence phenotypes of Siberian wheat stem rust population in 2017–2018. *Front. Agron.* 2020;2:6. DOI 10.3389/fagro.2020.00006.
- Skolotneva E.S., Leonova I.N., Bukatich E.Y., Boiko N.I., Piskarev V.V., Salina E.A. Effectiveness of leaf rust resistance genes against *Puccinia triticina* populations in Western Siberia during 2008–2017. *J. Plant Dis. Prot.* 2018;125(6):549-555. DOI 10.1007/s41348-018-0191-3.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of Physiologic Races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Washington: USDA, 1962.

ORCID ID

E.S. Skolotneva orcid.org/0000-0001-8047-5695
V.N. Kelbin orcid.org/0000-0002-3455-5704
V.P. Shamanin orcid.org/0000-0003-4767-9957
N.I. Boyko orcid.org/0000-0002-5026-4907
V.A. Aparina orcid.org/0000-0003-2714-7216
E.A. Salina orcid.org/0000-0001-8590-847X

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (научный проект № 19-316-90051) и бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0259-2019-0001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.04.2021. После доработки 23.08.2021. Принята к публикации 23.08.2021.

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

Полиморфизм последовательностей генов *CLE* картофеля

М.С. Ганчева¹✉, М.Р. Лосев¹, А.А. Гурина², Л.О. Полюшкевич¹, И.Е. Додуева¹, Л.А. Лутова¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР),

Санкт-Петербург, Россия

✉ ganchovai@gmail.com

Аннотация. *CLE* (CLV3/ESR) – одна из важнейших групп пептидных фитогормонов. Ее представители регулируют развитие различных органов и тканей растений, а также взаимодействие с некоторыми паразитами и симбионтами и ответ на факторы окружающей среды. В связи с этим идентификация и изучение генов *CLE*, кодирующих пептиды этой группы, у культурных растений представляют большой практический интерес. О функциях *CLE* пептидов у картофеля известно немного, поскольку гены *CLE* картофеля *Solanum phureja* Juz. et Buk. были охарактеризованы только в 2021 г. Вместе с тем картофель включает в себя много клубненосных видов рода *Solanum* L., как диких, так и культурных, и разнообразие его форм может зависеть в том числе от различий по последовательностям генов *CLE*. В этой работе мы впервые произвели поиск и анализ последовательностей генов *CLE* у трех диких видов картофеля (*S. bukasovii* Juz. et Rybin., *S. verrucosum* Schldtl., *S. commersonii* Dunal.) и четырех культурных (*S. chaucha* Juz. et Buk., *S. curtilobum* Juz. et Buk., *S. juzepczukii* Juz. et Buk., *S. ajanhuiri* Juz. et Buk.). У проанализированных видов картофеля выявлено 332 гена *CLE*: от 40 до 43 генов этого семейства для каждого вида картофеля. У всех видов картофеля, взятых в исследование, выявлены гомологи ранее идентифицированных генов *CLE* *S. phureja*; в то же время ген *CLE42*, отсутствующий в геноме *S. phureja*, найден у всех остальных проанализированных нами видов картофеля. Наибольшие отличия по аминокислотным последовательностям белков *CLE* оказались характерны для *S. commersonii* – вида, растущего вне ареалов культурных видов картофеля и, вероятно, не входящего в число их предков. Обнаружены также примеры полиморфизма по аминокислотным последовательностям доменов белков *CLE*, несущих разную функциональную нагрузку. Дальнейшее изучение белков *CLE* картофеля позволит выявить их роль в развитии этой важнейшей сельскохозяйственной культуры, в том числе в формировании признаков продуктивности.

Ключевые слова: гены *CLE*; картофель; *Solanum bukasovii*; *Solanum verrucosum*; *Solanum commersonii*; *Solanum chaucha*; *Solanum curtilobum*; *Solanum juzepczukii*; *Solanum ajanhuiri*.

Для цитирования: Ганчева М.С., Лосев М.Р., Гурина А.А., Полюшкевич Л.О., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Полиморфизм последовательностей генов *CLE* картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):746-753. DOI 10.18699/VJ21.085

Polymorphism of *CLE* gene sequences in potato

M.S. Gancheva¹✉, M.R. Losev¹, A.A. Gurina², L.O. Poliushkevich¹, I.E. Dodueva¹, L.A. Lutova¹

¹ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

✉ ganchovai@gmail.com

Abstract. *CLE* (CLV3/ESR) is one of the most important groups of peptide phytohormones: its members regulate the development of various plant organs and tissues, as well as interaction with some parasites and symbionts and response to environmental factors. In this regard, the identification and study of the *CLE* genes encoding the peptides of this group in cultivated plants are of great practical interest. Relatively little is known about the functions of *CLE* peptides in potato, since the *CLE* genes of the potato *Solanum phureja* Juz. et Buk. were characterized only in 2021. At the same time, potato includes plenty of tuberous species of the genus *Solanum* L., both wild and cultivated, and the diversity of its forms may depend on differences in the sequences of *CLE* genes. In this work, we performed a search for and analysis of the *CLE* gene sequences in three wild potato species (*S. bukasovii* Juz., *S. verrucosum* Schldtl., *S. commersonii* Dunal) and four cultivated species (*S. chaucha* Juz. et Buk., *S. curtilobum* Juz. et Buk., *S. juzepczukii* Juz. et Buk., *S. ajanhuiri* Juz. et Buk.). In total, we identified 332 *CLE* genes in the analyzed potato species: from 40 to 43 genes of this family for each potato species. All potato species taken for analysis had homologues of previously identified *S. phureja* *CLE* genes; at the same time, the *CLE42* gene, which is absent from the *S. phureja* genome, is present in all other analyzed potato species. Polymorphism of *CLE* proteins of *S. commersonii* is significantly higher than that of other analyzed potato species, due to the fact that *S. commersonii* grows in places outside the growing areas of other potato species and this potato is probably not one of the ancestors of cultivated potato. We also found examples of polymorphism of domains of *CLE* proteins that carried different func-

tions. Further study of potato *CLE* proteins will reveal their role in development, including regulation of productivity in this important agricultural crop.

Key words: *CLE* genes; potato; *Solanum bukasovii*; *Solanum verrucosum*; *Solanum commersonii*; *Solanum chaucha*; *Solanum curtilobum*; *Solanum juzepczukii*; *Solanum ajanhuiri*.

For citation: Gancheva M.S., Losev M.R., Gurina A.A., Poliushkevich L.O., Dodueva I.E., Lutova L.A. Polymorphism of *CLE* gene sequences in potato. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):746-753. DOI 10.18699/VJ21.085

Введение

Рост и развитие высших растений, а также их ответ на внешние стимулы регулируются с помощью межклеточных коммуникаций, опосредованных фитогормонами. Помимо давно известных и детально изученных «классических» фитогормонов (ИУК, цитокининов, АБК и т. д.), важную роль в координации развития растений играют многочисленные семейства пептидных гормонов, представляющих собой мобильные секретируемые олигопептиды или небольшие белки (Ганчева и др., 2019). Одно из самых известных семейств пептидных фитогормонов с очень широкими функциями – пептиды *CLE* (*CLV3/ESR*), получившие свое название по первым выявленным представителям: пептидам *CLAVATA3 (CLV3)* резуховидки (Clark et al., 1995) и *ENDOSPERM SURROUNDING REGION (ESR)* кукурузы (Opsahl-Ferstad et al., 1997). К настоящему времени гены, кодирующие пептиды *CLE*, выявлены у всех групп наземных растений, а также у зеленой водоросли *Chlamidomonas reinhardtii* (Oelkers et al., 2008; Goad et al., 2017).

Гены *CLE* кодируют белки длиной 100–150 аминокислот (АК), которые имеют сигнальный домен на N-конце, консервативный *CLE*-домен на C-конце и варибельный домен между ними (Strabala et al., 2014). *CLE*-домен, состоящий из 12 АК, является функциональной частью белка *CLE*: сразу после синтеза белок-предшественник подвергается протеолитическому процессингу и посттрансляционным модификациям (Kondo et al., 2006; Ni et al., 2011). В результате от него остается *CLE*-домен с модификациями консервативных остатков пролина (гидроксигированием, арабинозилацией) – это и есть зрелый пептид *CLE*. Секретируясь в межклеточное пространство, пептиды *CLE* становятся лигандами для рецепторных киназ семейств *Leucine Repeats containing Receptor-Like Kinases (LRR-RLK)* и *CRINKLY4*, расположенных на плазматических мембранах клеток (Полюшкевич и др., 2020). Взаимодействуя с рецепторами, пептиды *CLE* запускают сигнальный каскад, в числе мишеней которого – гомеодоменсодержащие транскрипционные факторы семейства *WOX*, регулирующие поддержание ниш ствольных клеток у растений (Творогова и др., 2021). К числу известных функций пептидов *CLE* относятся контроль активности апикальных меристем и камбия, дифференцировка проводящих тканей, образование боковых корней и клубеньков, ранний эмбриогенез, развитие устьиц, а также ответ на ряд средовых факторов: нехватку воды и изменение содержания азота в почве (Yamaguchi et al., 2016; Fletcher, 2020) (рис. 1).

У всех изученных видов покрытосеменных семейство пептидов *CLE* кодируется многочисленными генами. Так, в относительно небольшом геноме резуховидки *Ara-*

bidopsis thaliana имеется 32 гена *CLE* (Sharma et al., 2003; Strabala et al., 2006), при этом каждый из них отличается уникальным пространственным характером экспрессии (Jun et al., 2010). Однако некоторые гены *CLE* кодируют одинаковые пептиды *CLE*. Предполагается, что такая избыточность *CLE*-пептидов служит для тонкой регуляции развития (Kinoshita et al., 2007).

Очевидно, что семейство генов *CLE* далеко не исчерпывается открытыми к настоящему моменту генами; накопление геномных данных и усовершенствование программного обеспечения позволяют находить новых представителей этого семейства. В нашем исследовании в референсном геноме картофеля, являющемся последовательностью удвоенного моноплоида клона *Solanum phureja* DM-1-3 516R44 (Gancheva et al., 2021), был выявлен 41 ген *CLE*, который кодирует 37 уникальных пептидов *CLE*. В то же время известно множество культурных и дикорастущих видов картофеля. По представлениям разных авторов, к картофелю (*Solanum* L., секция *Petota Dumort.*) относится от 112 до 235 видов (Huamán, Ross, 1985; Spooner et al., 2014). Геномы некоторых видов картофеля секвенированы и доступны в базах данных.

В нашей работе мы произвели поиск и анализ генов *CLE* в геномах семи видов картофеля: трех диких видов (*S. bukasovii*, *S. verrucosum*, *S. commersonii*) и четырех примитивных культурных видов (*S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. ajanhuiri*), представленных в базе данных NCBI. Всего мы обнаружили 332 гена *CLE* и выявили уникальные пептиды у единичных видов картофеля, которые могут выполнять иные функции либо вовсе потерять функциональность. Мы обнаружили также сходство последовательностей разных *CLE*, что может говорить об их общем происхождении.

Материалы и методы

В работе использовали представленные в базе данных NCBI сборки геномов различных видов картофеля: диких видов *S. commersonii*, *S. verrucosum* и *S. bukasovii*, а также примитивных культурных видов *S. chaucha*, *S. juzepczukii*, *S. curtilobum* и *S. ajanhuiri*.

Solanum commersonii – широко распространенный в Южной Америке диплоидный вид картофеля, ареал которого приурочен к прибрежной зоне Атлантического океана, преимущественно в Аргентине и Уругвае, и простирается от уровня моря до высоты 1300 м. Этот вид является рудеральным. Основные места его обитания – каменистые участки, дюны, посадки культурных растений (Hawkes, Hjerting, 1969).

Диплоидный вид *S. verrucosum*, в отличие от других рассмотренных нами видов, распространен в Северной Америке, а точнее в Мексике. Тем не менее считается,

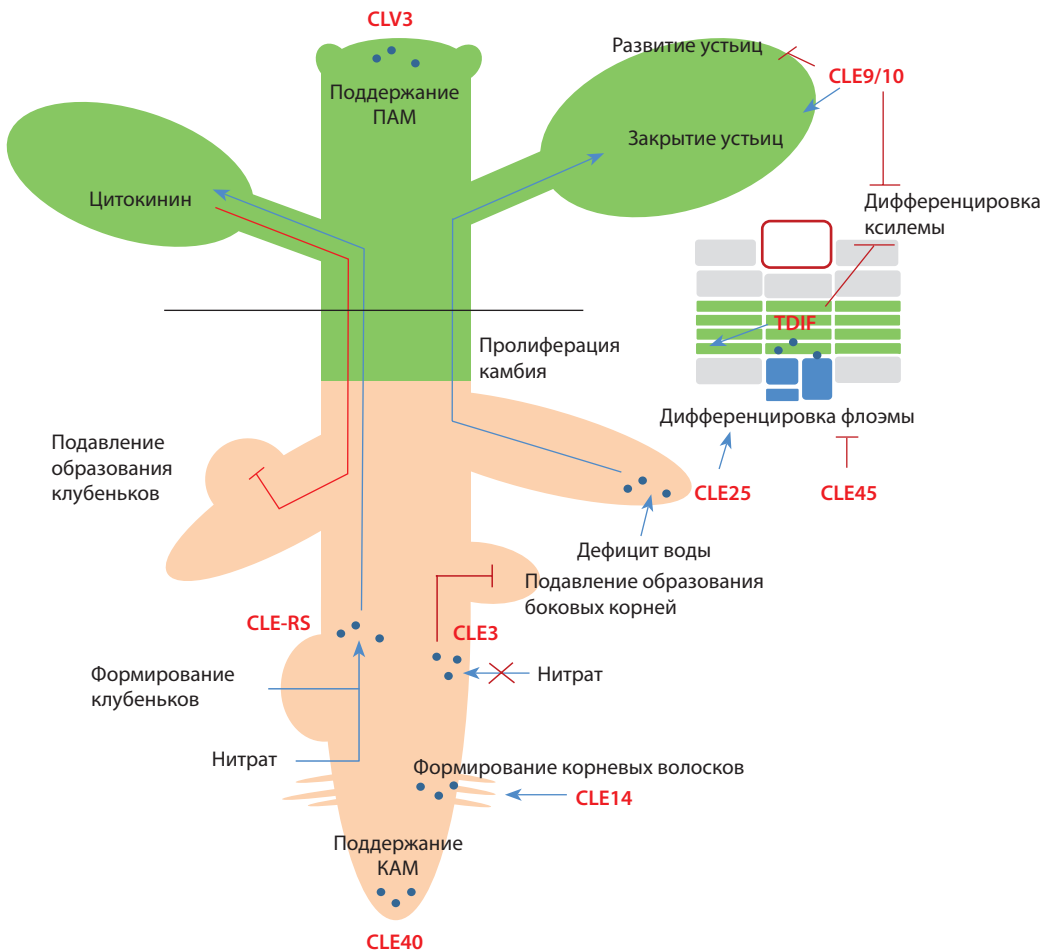


Рис. 1. Некоторые функции пептидов CLE в развитии растений.
ПAM – апикальная меристема побега; KAM – апикальная меристема корня.

что эволюционно он ближе к предкам культурных видов картофеля, чем *S. commersonii* (Hawkes, 1990). Его местообитания – лесные массивы.

Южноамериканский диплоидный вид *S. bukasovii* произрастает на высоте 3300–4000 м над уровнем моря в Перу. Относится к группе диких видов картофеля, от которых предположительно произошли культурные виды (Li et al., 2018).

Solanum juzepczukii и *S. curtilobum* – высокогорные триплоидный и пентаплоидный виды соответственно, обладающие крайне ограниченным ареалом. Относятся к группе «горьких» картофелей из-за высокого содержания гликоалкалоидов. Фактически были обнаружены лишь отдельные их клоны, возделываемые в высокогорных районах Перу и Боливии, где не могут возделываться другие виды картофеля. Являются более морозостойкими в сравнении с другими культурными видами (Лехнович, 1971).

Solanum ajanhuiri – диплоидный высокогорный вид, который возделывается на высоте более 3900 м в районе озера Титикака. Тоже морозостойкий, но, в отличие от *S. juzepczukii* и *S. curtilobum*, имеет значительно более низкое содержание гликоалкалоидов в клубнях (Hawkes, 1990).

Solanum chaucha – триплоидный вид, встречающийся преимущественно в северных горных районах Южной Америки (Эквадор, Колумбия), а также на севере Перу. Возделывается на более низких высотах по сравнению с вышеперечисленными культурными видами картофеля (Hawkes, 1990).

Поиск генов *CLE* у разных видов картофеля производили по гомологии с генами этого семейства у картофеля *S. phureja* (Gancheva et al., 2021), резуховидки *A. thaliana* (Sharma et al., 2003; Strabala et al., 2006) и томата *Solanum lycopersicum* (Zhang et al., 2014; Gancheva et al., 2021) с использованием базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), где размещены сборки геномов изучаемых видов картофеля (см. таблицу), с помощью инструмента Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) и алгоритма discontinuous megablast (Altschul et al., 1990). Выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма Muscle из программы MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) (Kumar et al., 2016).

Филогенетический анализ выполняли в программе MEGA7 методом ближайшего соседа (Saitou, Nei, 1987) со стандартными настройками и бутстрепом 1000 (Felsenstein, 1985). Сигнальные домены белков CLE предска-

Количество выявленных генов CLE у разных видов картофеля, взятых в анализ

№ п/п	Вид картофеля	Номер сборки	Сокращение	Кол-во выявленных CLE	Характеристика вида
1	<i>S. chaucha</i> Juz. et Buk.	GCA_009849625.1	Sch	43	Примитивный культурный
2	<i>S. curtilobum</i> Juz. et Buk.	GCA_009849645.1	Scu	40	
3	<i>S. juzepczukii</i> Juz. et Buk.	GCA_009849685.1	Sj	42	
4	<i>S. phureja</i> Juz. et Buk.	GCA_009849755.1	Sph	41	
5	<i>S. ajanhuiri</i> Juz. et Buk.	GCA_009849805.1	Sa	40	Дикий
6	<i>S. bukasovii</i> Juz. et Rybin.	GCA_009849815.1	Sb	43	
7	<i>S. commersonii</i> Dunal.	GCA_001239805.1	Sco	42	
8	<i>S. verrucosum</i> Schtdl.	GCA_900185145.1	Sv	41	

зывали с использованием программы SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Консенсусные последовательности белков CLE визуализировали в программе Geneious Prime (<https://www.geneious.com/features/>).

Результаты

С помощью базы данных NCBI по гомологии с генами CLE картофеля *S. phureja* (*SphCLE*), резуховидки (*A. thaliana*) и томата (*S. lycopersicum*) нами были идентифицированы гены CLE у картофеля семи видов: примитивных культурных видов *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. ajanhuiri* и диких видов *S. bukasovii*, *S. commersonii*, *S. verrucosum* (Приложение)¹. Мы также произвели идентификацию генов CLE у примитивного культурного картофеля *S. stenotomum* и дикого вида *S. pinnatisectum*, однако недостаточное качество сборок не позволило внести эти гены в дальнейший анализ.

Для каждого вида картофеля было найдено разное количество генов CLE – от 40 до 43 (см. таблицу). Это связано в первую очередь с различным уровнем сборок. Так, геном *S. verrucosum* представлен в базе данных в виде протяженных скэффолдов, тогда как для *S. curtilobum* это сборка на уровне контигов, в результате чего некоторые гены CLE не взяты в анализ в связи с обрывом контига и невозможностью проанализировать всю последовательность гена. Гомологи большинства ранее идентифицированных нами генов CLE *S. phureja* (*SphCLE*) (Gancheva et al., 2021) были обнаружены у всех видов картофеля, взятых в анализ. В то же время ген, названный нами *CLE42*, не найден в геноме *S. phureja*, хотя присутствует у всех остальных изученных нами видов картофеля.

Анализируя аминокислотные последовательности (АКП) отдельных белков CLE у разных видов картофеля, мы обнаружили их высокое сходство между собой (78–98 % идентичных АК) (рис. 2), причем присутствуют как полностью идентичные АКП белков (например, АКП CLE39 у шести из восьми проанализированных видов идентичны), так и варианты, когда идентичных АКП среди видов нет (CLE3, CLE16, CLE40). Тем не менее белки CLE у разных видов картофеля очень похожи между собой, и по полной последовательности белка отдельные CLE формируют группы, каждая из которых включает все

гомологи одного белка CLE у разных видов картофеля (рис. 3). Среди всех проанализированных видов картофеля у *S. commersonii* в белках CLE присутствует большее число уникальных АК, которых нет у других видов.

В составе молекул белков CLE выделяют три домена: сигнальный (СД), варибельный (ВД) и CLE-домен. CLE-домен является функциональной частью белка, которая наиболее консервативна, и замены в ней довольно редки. В остальных участках белка замены происходят намного чаще. Наибольший эффект от замен будет при их появлении в домене CLE, однако остальные части белка, такие как СД и ВД, тоже важны и играют роль в осуществлении функции пептида CLE. Они вовлечены в процессинг пептида CLE и могут таким образом влиять на наличие рабочего пептида в определенных клетках и тканях (Meng et al., 2010). Оказалось, что у разных видов картофеля АКП доменов CLE в пределах каждой группы, как правило, идентичны. В то же время нуклеотидные последовательности (НП) CLE-домена у белков одной группы часто различаются между видами. Так, белки группы CLE12, хоть имеют и идентичные АКП CLE-доменов, отличаются по НП соответствующих участков генов.

Несмотря на то что у *S. phureja* мы выявили 41 ген CLE, они кодируют всего 37 пептидов CLE (Gancheva et al., 2021). Связано это с тем, что АКП CLE доменов у некоторых белков идентичны (например, у CLE8 и CLE12). Однако у других видов картофеля найдено еще 20 доменов CLE, которых нет у *S. phureja*. Все эти домены имеют сходство с доменами CLE белков *S. phureja*, но отличаются от них на 1–4 АК (рис. 4).

Как упоминалось выше, у некоторых CLE белков одного вида растений домены CLE идентичны (например, у CLE41 и CLE44 резуховидки). У картофеля обнаружено 10 пар белков с идентичными CLE-доменами: идентичны по АКП зрелые пептиды в группах CLE10 и CLE38, CLE17 и CLE18, CLE25 и CLE34, CLE6 и CLE19, CLE8 и CLE12, но остальные части этих белков (за пределами CLE-домена) существенно различаются внутри каждой пары.

Некоторые CLE белки картофеля имеют сходную АКП, но их домены CLE не идентичны и различаются на одну или несколько АК (например, CLE32 и CLE35, CLE26 и CLE27). Интересно, что некоторые белки группируются по-разному в зависимости от того, что сравнивается –

¹ Приложение см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx12.pdf>

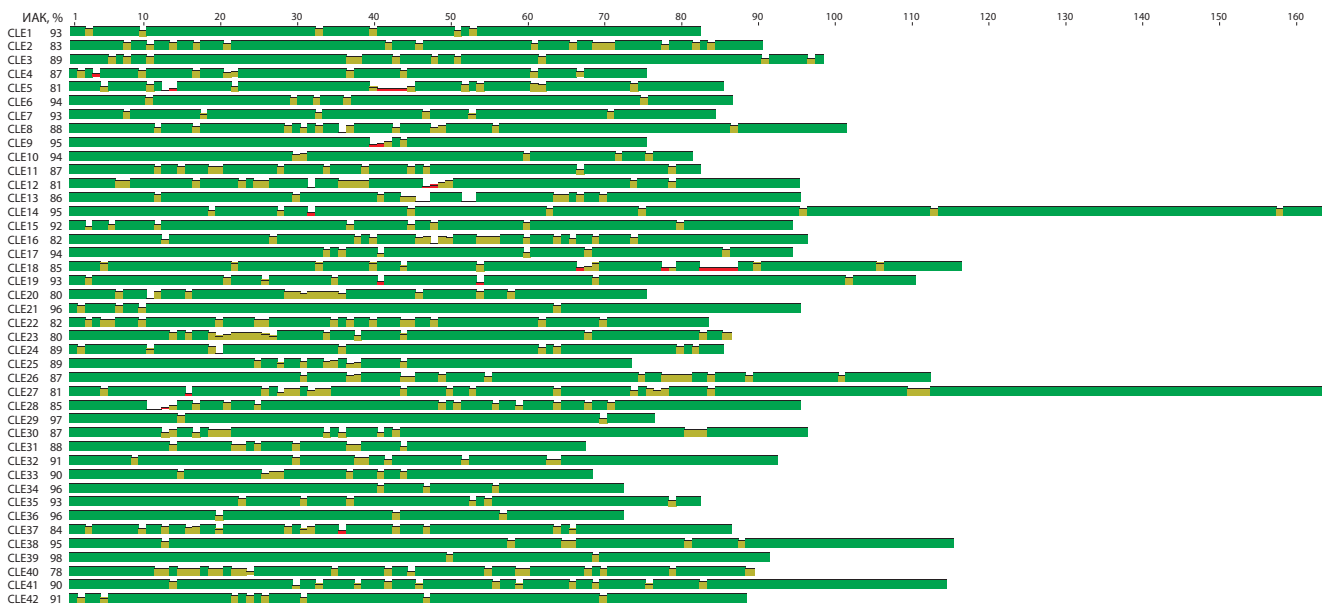


Рис. 2. Консенсусные последовательности белков CLE у восьми видов картофеля.

ИАК – идентичные АК, %.

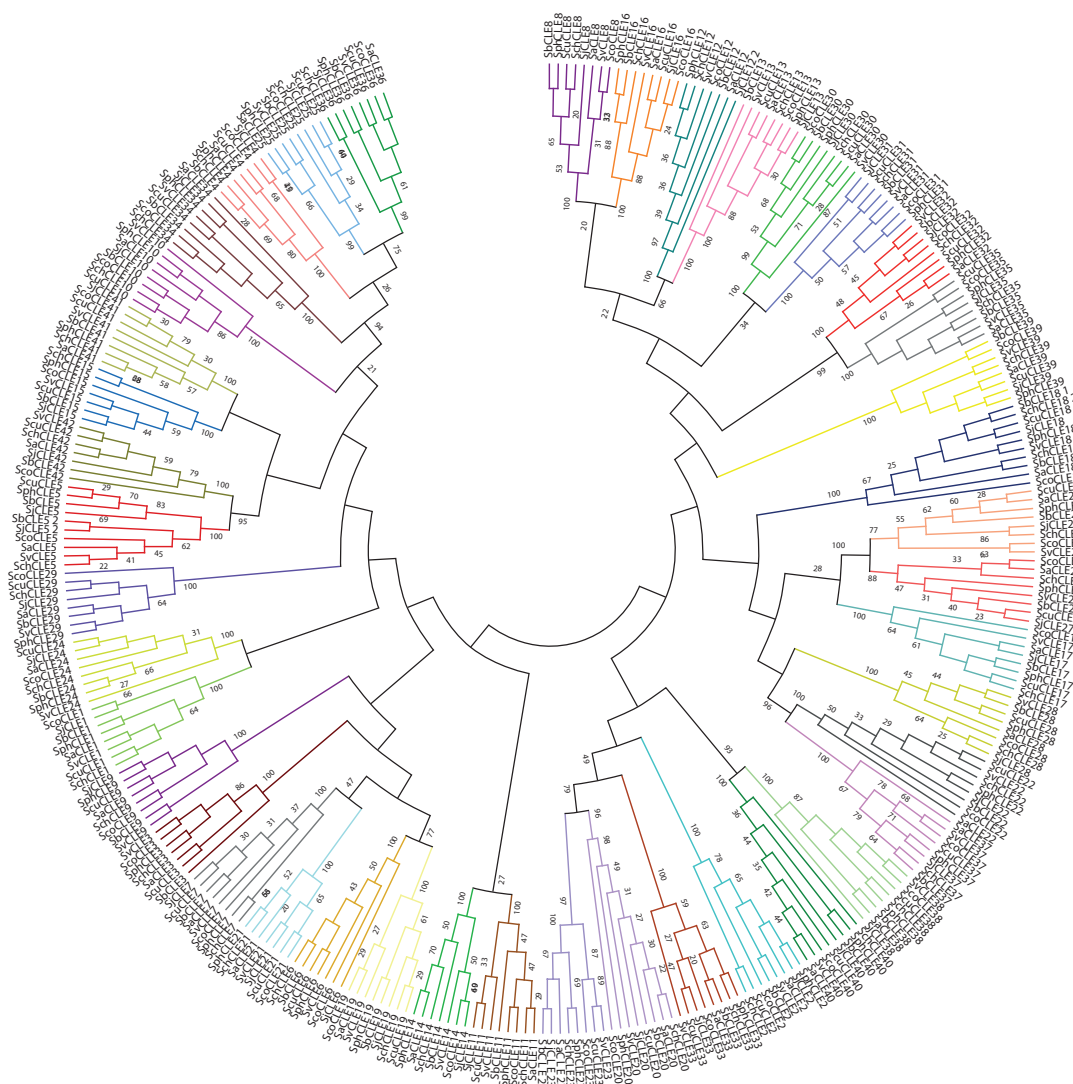


Рис. 3. Филогенетическое дерево белков CLE картофеля.

CLE-домен или оставшаяся часть белка. Так, по CLE-домену CLE37 ближе к CLE31 (отличаются на 1 АК), однако по остальной части белка CLE37 объединяется вместе с CLE22. То же самое происходит у CLE25 и CLE34: они имеют одинаковые CLE-домены, но их последовательности вне домена различаются, и по ним CLE34 группируется вместе с CLE36, а не CLE25. Иногда такая ситуация имеет место в пределах только одного вида картофеля: к примеру, CLE-домен *ScuCLE4* всего на 1 АК отличается от CLE25 (в то время как у остальных видов картофеля CLE-домены белков CLE4 отличаются на 2 АК от CLE25), притом часть вне домена определенно является CLE4. Очевидно, различия по последовательности CLE-домена (и, следовательно, зрелого пептида) должны приводить к функциональным различиям таких белков, несмотря на большое сходство их АКП. Сходные по АКП, но различающиеся по CLE-домену белки CLE имеются и у других видов растений (например, CLE41 и CLE42 или CLE25 и CLE26 резуховидки). Считается, что их гены могли возникнуть в результате дупликаций с последующими мутациями в последовательности CLE-домена, приведшими к появлению новых функций (Yaginuma et al., 2011; Takahashi et al., 2018). Действительно, некоторые гены *CLE* у картофеля дублированы, и их последовательности очень слабо отличаются друг от друга. Так, у всех видов картофеля, взятых в анализ, дублированы гены *CLE26* и *CLE2*. В ряде случаев у таких дублированных генов имеются замены в последовательности домена CLE, что ведет к появлению уникального пептида (например, *SvCLE2-2*). Тем не менее, в связи с высоким уровнем сходства, такие гены не учитываются в таблице.

В некоторых случаях домен CLE некоторых CLE белков идентичен у нескольких видов картофеля и отличается от CLE-доменов тех же белков у других видов. Так, у белков CLE26 *S. juzepczukii* и *S. chaucha* во втором положении CLE-домена находится I, тогда как у прочих видов – L; у белков CLE11 *S. verrucosum*, *S. curtilobum* и *S. juzepczukii* в положении 5 CLE-домена стоит E, тогда как у других видов – Q (см. рис. 4). Наибольшее число уникальных доменов CLE, отличающихся от таковых у всех прочих видов картофеля, было найдено у *S. verrucosum*, *S. commersonii* и *S. juzepczukii*.

Более крупные межвидовые различия по АКП белков CLE касаются последовательностей вне домена CLE. Например, среди генов группы *CLE8* выделяется *SvCLE8*, у которого есть три дополнительных нуклеотида в варибельном домене (ВД), что делает белок на 1 АК длиннее. У белков CLE18 *S. verrucosum*, *S. commersonii*, *S. bukasovii*, *S. chaucha* и *S. juzepczukii* в ВД присутствует участок длиной 5 АК, в то время как у CLE18 других видов такого участка нет; при этом у *S. bukasovii* и *S. chaucha* есть по два гена *CLE18*, кодирующих белки как с участком, так и без него (рис. 5). Сходная ситуация имеет место для

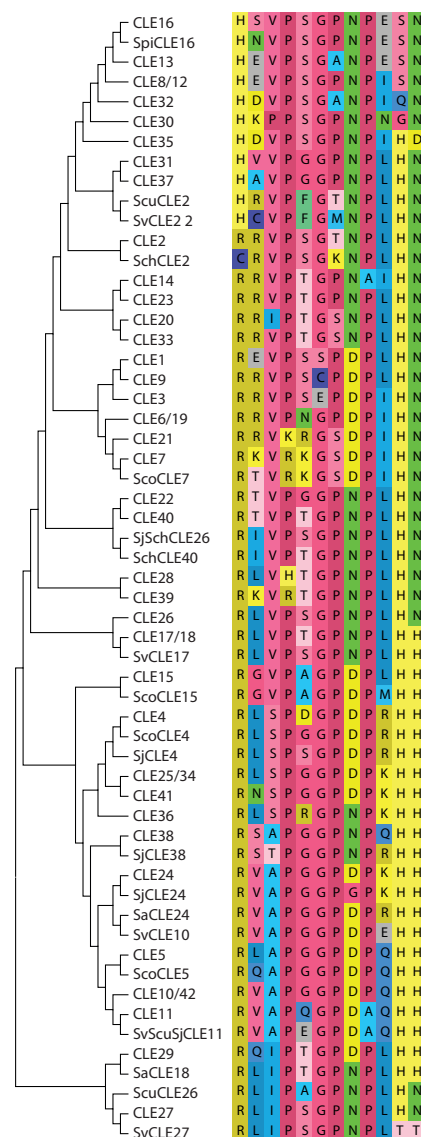


Рис. 4. Дерево и выравнивание уникальных пептидов CLE картофеля.

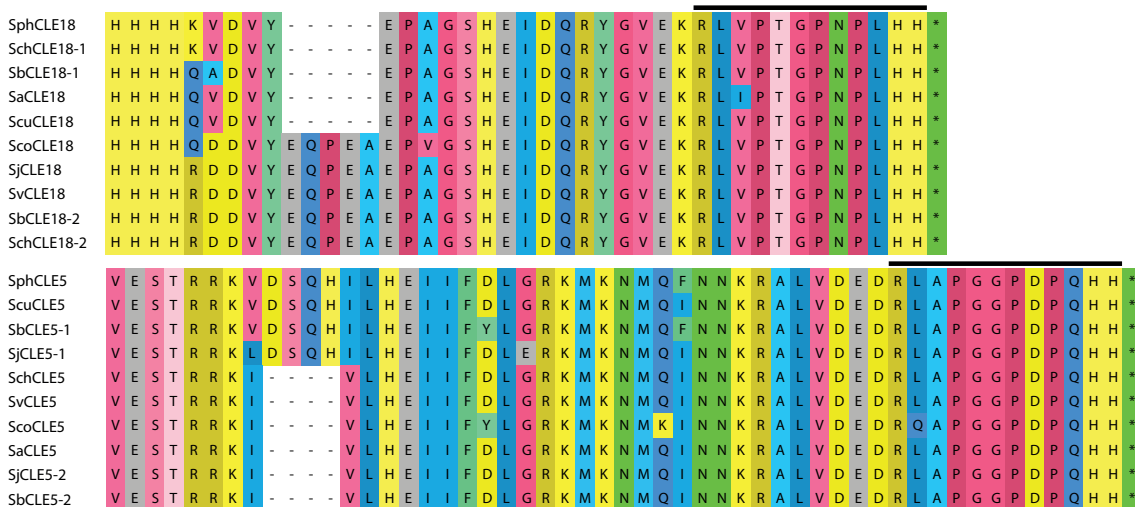


Рис. 5. Фрагменты выравниваний белков CLE18 и CLE5. Черной линией выделен CLE-домен.

белка CLE5: участок в 4 АК в ВД присутствует у *S. phureja*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. bukasovii*, но отсутствует у *S. chaucha*, *S. verrucosum*, *S. ajanhuiri*, *S. commersonii*, тогда как у *S. bukasovii* и *S. juzepczukii* имеется по два гена CLE5, кодирующих белки как без этого участка, так и с ним (см. рис. 5). Иногда такие крупные отличия по АКП белков CLE наблюдаются только в пределах одного вида. Так, у белка SvCLE30, в отличие от CLE30 других видов картофеля, в ВД отсутствуют 3 АК; в ВД ScoCLE20 отсутствует участок в 8 АК, а его сигнальный домен (СД) удлинён на 1 АК. У *S. juzepczukii* найдены два гена *CLE12*, один из которых кодирует белок, отличающийся от CLE12 других видов тем, что начало его СД удлинено на 6 АК, при этом в ВД отсутствуют 3 АК.

Итак, анализ последовательностей генов и белков CLE у проанализированных нами видов картофеля выявил полиморфизм по разным участкам белков CLE, несущим разную функциональную нагрузку. Такой полиморфизм может сказываться на функционировании пептидов CLE; касаются изменения самого домена CLE, из которого образуется собственно пептид CLE, или последовательностей вне его, которые могут влиять на процессинг белка CLE. Вместе с тем точные данные о функциональном различии белков CLE у видов картофеля могут быть получены только при более детальном анализе функций каждого из них. Например, в опытах по сверхэкспрессии соответствующих генов или обработке растений синтетическими пептидами. Наше исследование может послужить заделом в этой области.

Обсуждение

Нами проведены поиск и анализ генов, кодирующих белки CLE, у разных видов картофеля: диких и примитивных культурных. Из 332 выявленных генов *CLE* мы обнаружили 57 генов, кодирующих уникальные пептиды CLE. Всего выявлено 42 гена, которые присутствуют почти у всех проанализированных видов картофеля, при этом есть гены как очень похожие между собой у разных видов, так и имеющие значительные межвидовые различия. Так, в генах *S. commersonii* предположительно происходило наибольшее количество уникальных замен, что привело к серьезным отличиям его белков CLE от таковых у прочих видов картофеля. Этот дикий вид картофеля характеризуется и иным местом произрастания – вне ареалов культурных видов картофеля, и, скорее всего, не входит в число предков культурного картофеля (Юзепчук, Букасов, 1929).

Некоторые выявленные различия в последовательностях белков CLE уникальны для определенного вида картофеля, а некоторые касаются нескольких видов картофеля. Особенно интересны белки CLE5 и CLE18, которые выделяются наличием или отсутствием участка в 4–5 АК. И есть виды картофеля, у которых присутствуют оба варианта белка (см. рис. 4), что может быть связано с естественной гибридизацией картофеля (Hawkes, 1990).

У некоторых видов картофеля происходила замены в домене CLE, которые могли повлиять на функции соответствующих пептидов. Так, известно, что отличие на 1 АК в домене CLE у *A. thaliana* приводит к тому, что один пептид (CLE25) участвует в ответе на нехватку воды, а второй (CLE26) – нет (Takahashi et al., 2018). Уникальные

пептиды, появившиеся у единичных видов картофеля в связи с отличиями в домене CLE, могут выполнять иные функции либо вовсе потерять функциональность. Кроме того, изменения в последовательности вне домена CLE могут сказаться на функционировании пептида CLE, и у разных видов картофеля есть изменения, коснувшиеся варибельного или сигнального доменов, что также могло повлиять на работу пептидов. В то же время сходство последовательностей разных CLE может говорить об их общем происхождении. Наличие дублированных генов, таких как *CLE2-2*, у которых происходят замены в последовательности домена CLE и которые в дальнейшем могут приводить к появлению новых генов, подтверждает это предположение.

Заключение

Таким образом, мы обнаружили, что белки CLE у разных видов картофеля чаще всего очень похожи друг на друга, но имеют и отличия, которые могли повлиять на их функционирование. Дальнейшее изучение белков CLE позволит выявить их роль в развитии картофеля.

Список литературы / References

- Ганчева М.С., Маловичко Ю.В., Полошкевич Л.О., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Пептидные гормоны растений. *Физиология растений*. 2019;66(2):83-103. DOI 10.1134/S001533031901007X.
- [Gancheva M.S., Malovichko Y.V., Poliushkevich L.O., Dodueva I.E., Lutova L.A. Plant peptide hormones. *Russ. J. Plant Physiol.* 2019;66:171-189. DOI 10.1134/S1021443719010072.]
- Лехнович В.С. Культурные виды картофеля. В: Культурная Флора СССР. Т. 9. Картофель. Л., 1971;41-304.
- [Lekhnovich V.S. Cultivated Potato Species. In: Flora of Cultivated Plants of the USSR. Vol. 9. Potato. Leningrad, 1971;41-304. (in Russian)]
- Полошкевич Л.О., Ганчева М.С., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Рецепторы пептидов CLE у растений. *Физиология растений*. 2020; 67(1):1-17. DOI 10.1134/S0015330320010285.
- [Poliushkevich L.O., Gancheva M.S., Dodueva I.E., Lutova L.A. Receptors of CLE peptides in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020; 67(1):1-16. DOI 10.1134/S1021443720010288.]
- Творогова В.Е., Красноперова Е.Ю., Кудряшов А.А., Поценковская Э.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Что могут рассказать белки WOX? Обзор мишеней, регуляторов, партнеров. *Молекулярная биология*. 2021;55(3):362-391. DOI 10.31857/S0026898421030174.
- [Tvorogova V.E., Krasnoperova E.Y., Potsenkovskaia E.A., Kudriashov A.A., Dodueva I.E., Lutova L.A. What does the WOX say? Review of regulators, targets, partners. *Mol. Biol.* 2021. DOI 10.1134/S002689332102031X.]
- Юзепчук С.В., Букасов С.М. К вопросу о происхождении картофеля. В: Труды Всесоюз. съезда по генетике, селекции и семеноводству. Л., 1929;3:593-611.
- [Juzepczuk S.W., Bukasov S.M. A contribution to the question of the origin of the potato. In: Proceedings of the USSR Congress of Genetics, Plant and Animal Breeding. Leningrad, 1929;3:593-611. (in Russian)]
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215(3):403-410. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development*. 1995;121(7):2057-2067. DOI 10.1242/dev.121.7.2057.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39(4):783-791. DOI 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

- Fletcher J.C. Recent advances in Arabidopsis CLE peptide signaling. *Trends Plant Sci.* 2020;25(10):1005-1016. DOI 10.1016/j.tplants.2020.04.014.
- Gancheva M., Dodueva I., Lebedeva M., Lutova L. *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE)* gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.): identification and expression analysis. *Agronomy.* 2021;11(5):984. DOI 10.3390/agronomy11050984.
- Goad D.M., Zhu C., Kellogg E.A. Comprehensive identification and clustering of CLV3/ESR-related (CLE) genes in plants finds groups with potentially shared function. *New Phytol.* 2017;216(2):605-616. DOI 10.1111/nph.14348.
- Hawkes J.G. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press., 1990.
- Hawkes J.G., Hjerting J.P. The Potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study. Oxford, 1969.
- Huamán Z., Ross R.W. Updated listing of potato species names, abbreviations and taxonomic status. *Am. J. Potato Res.* 1985;62(11):629-641. DOI 10.1007/BF02854438.
- Jun J., Fiume E., Roeder A.H., Meng L., Sharma V.K., Osmont K.S., Baker C., Ha C.M., Meyerowitz E.M., Feldman L.J., Fletcher J.C. Comprehensive analysis of *CLE* polypeptide signaling gene expression and overexpression activity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2010;154(4):1721-1736. DOI 10.1104/pp.110.163683.
- Kinoshita A., Nakamura Y., Sasaki E., Kyozuka J., Fukuda H., Sawa S. Gain-of-function phenotypes of chemically synthetic CLAVATA3/ESR-related (CLE) peptides in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* 2007;48(12):1821-1825. DOI 10.1093/pcp/pcm154.
- Kondo T., Sawa S., Kinoshita A., Mizuno S., Kakimoto T., Fukuda H., Sakagami Y. A plant peptide encoded by CLV3 identified by *in situ* MALDI-TOF MS analysis. *Science.* 2006;313(5788):845-848. DOI 10.1126/science.1128439.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(7):1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Li Y., Colleoni C., Zhang J., Liang Q., Hu Y., Ruess H., Simon R., Liu Y., Liu H., Yu G., Schmitt E., Ponitzki C., Liu G., Huang H., Zhan F., Chen L., Huang Y., Spooner D., Huang B. Genomic analyses yield markers for identifying agronomically important genes in potato. *Mol. Plant.* 2018;11(3):473-484. DOI 10.1016/j.molp.2018.01.009.
- Meng L., Ruth K.C., Fletcher J.C., Feldman L. The roles of different CLE domains in Arabidopsis CLE polypeptide activity and functional specificity. *Mol. Plant.* 2010;3(4):760-772. DOI 10.1093/mp/ssp021.
- Ni J., Guo Y., Jin H., Hartsell J., Clark S.E. Characterization of a CLE processing activity. *Plant Mol. Biol.* 2011;75(1-2):67-75. DOI 10.1007/s11103-010-9708-2.
- Oelkers K., Goffard N., Weiller G.F., Gresshoff P.M., Mathesius U., Frickey T. Bioinformatic analysis of the CLE signaling peptide family. *BMC Plant Biol.* 2008;8:1. DOI 10.1186/1471-2229-8-1.
- Opsahl-Ferstad H.-G., Deunff E.L., Dumas C., Rogowski P.M. *ZmEsr*, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J.* 1997;12:235-246. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1997.12010235.x.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4(4):406-425. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sharma V.K., Ramirez J., Fletcher J.C. The Arabidopsis CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. *Plant Mol. Biol.* 2003;51(3):415-425. DOI 10.1023/a:1022038932376.
- Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Rev.* 2014;80(4):283-383. DOI 10.1007/s12229-014-9146-y.
- Strabala T.J., O'Donnell P.J., Smit A.M., Ampomah-Dwamena C., Martin E.J., Netzler N., Nieuwenhuizen N.J., Quinn B.D., Foote H.C., Hudson K.R. Gain-of-function phenotypes of many CLAVATA3/ESR genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. *Plant Physiol.* 2006;140(4):1331-1344. DOI 10.1104/pp.105.075515.
- Strabala T.J., Phillips L., West M., Stanbra L. Bioinformatic and phylogenetic analysis of the CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION (CLE) and the CLE-LIKE signal peptide genes in the Pinophyta. *BMC Plant Biol.* 2014;14:47. DOI 10.1186/1471-2229-14-47.
- Takahashi F., Suzuki T., Osakabe Y., Betsuyaku S., Kondo Y., Dohmae N., Fukuda H., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature.* 2018;556(7700):235-238. DOI 10.1038/s41586-018-0009-2.
- Yaginuma H., Hirakawa Y., Kondo Y., Ohashi-Ito K., Fukuda H. A novel function of TDIF-related peptides: promotion of axillary bud formation. *Plant Cell Physiol.* 2011;52(8):1354-1364. DOI 10.1093/pcp/pcr081.
- Yamaguchi Y.L., Ishida T., Sawa S. CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *J. Exp. Bot.* 2016;67(16):4813-4826. DOI 10.1093/jxb/erw208.
- Zhang Y., Yang S., Song Y., Wang J. Genome-wide characterization, expression and functional analysis of CLV3/ESR gene family in tomato. *BMC Genom.* 2014;15(1):827. DOI 10.1186/1471-2164-15-827.

ORCID ID

M.S. Gancheva orcid.org/0000-0002-9631-6143
M.R. Losev orcid.org/0000-0003-0968-8684
A.A. Gurina orcid.org/0000-0002-1791-3063
L.O. Poliushevich orcid.org/0000-0003-2896-1893
I.E. Dodueva orcid.org/0000-0001-5282-718X
L.A. Lutova orcid.org/0000-0001-6125-0757

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-316-80004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.05.2021. После доработки 16.07.2021. Принята к публикации 16.07.2021.

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

Транспортеры сахаров семейства SWEET и их роль в арбускулярной микоризе

А.А. Крюков¹✉, А.О. Горбунова¹, Т.Р. Кудряшова², О.И. Яхин^{3, 4}, А.А. Лубянов⁵, У.М. Маликов⁶, М.Ф. Шишова⁷, А.П. Кожемяков¹, А.П. Юрков¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

⁴ Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения – обособленное структурное подразделение

Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

⁵ Научно-производственное предприятие «Эко Природа», с. Улькунды, Дуванский район, Республика Башкортостан, Россия

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет телекоммуникаций им. проф. М.А. Бонч-Бруевича, Санкт-Петербург, Россия

⁷ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

✉ rainniar@rambler.ru

Аннотация. В продуктивности растений существенную роль играют транспортеры сахаров, поскольку с их помощью координируются и осуществляются потоки углеводов от листьев к органам потребления. Кроме того, с участием транспортеров сахаров регулируется значительная часть обмена питательными веществами с микроорганизмами ризосферы (бактериями и грибами), что является необходимым условием для формирования симбиотических отношений. В связи с этим в обзоре уделено особое внимание углеводному питанию при развитии арбускулярной микоризы (АМ) – симбиоза растений с грибами подотдела *Glomeromycotina*, в результате которого растение-хозяин получает от микосимбионта микроэлементы, главным образом фосфор, а гриб взамен получает продукты ассимиляции углерода. Пути эффективного транспорта питательных веществ в АМ-симбиозе до сих пор не раскрыты. Одно из трех ключевых семейств углеводных транспортеров растений – SWEET, переносчики сахаров. Именно среди белков SWEET могут быть выявлены специфические для симбиоза с АМ-грибами транспортеры. В обзоре представлены данные по истории изучения, структуре, локализации, филогении и функциям белков SWEET. Отмечена высокая вариабельность как самих белков SWEET, так и их функций. При этом одни и те же белки у разных растений могут выполнять различные функции. Особая роль уделена участию транспортеров семейства SWEET в развитии АМ-симбиоза растений и грибов. Транспортеры SWEET могут также играть ключевую роль в устойчивости к абиотическим стрессам, позволяя растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды. Развитие знаний о симбиотических системах будет способствовать созданию микробных препаратов для использования в сельском хозяйстве Российской Федерации.

Ключевые слова: арбускулярная микориза; SWEET; транспорт сахара; сахароза; глюкоза; гены транспортеров сахаров.

Для цитирования: Крюков А.А., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Яхин О.И., Лубянов А.А., Маликов У.М., Шишова М.Ф., Кожемяков А.П., Юрков А.П. Транспортеры сахаров семейства SWEET и их роль в арбускулярной микоризе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):754-760. DOI 10.18699/VJ21.086

Sugar transporters of the SWEET family and their role in arbuscular mycorrhiza

А.А. Kryukov¹✉, А.О. Gorbunova¹, T.R. Kudriashova², O.I. Yakhin^{3, 4}, А.А. Lubyaynov⁵, U.M. Malikov⁶, M.F. Shishova⁷, А.П. Kozhemyakov¹, А.П. Yurkov¹

¹ All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

⁴ Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry and Soil Science – Subdivision of the Federal Research Center

“Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia

⁵ Research, Development and Production Enterprise “Eco Priroda”, Ulkundy village, Duvansky district, Republic of Bashkortostan, Russia

⁶ The Bonch-Bruевич Saint Petersburg State University of Telecommunications, St. Petersburg, Russia

⁷ St. Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

✉ rainniar@rambler.ru

Abstract. Plant sugar transporters play an essential role in the organism’s productivity by carrying out carbohydrate transportation from source cells in the leaves to sink cells in the cortex. In addition, they aid in the regulation of a substantial part of the exchange of nutrients with microorganisms in the rhizosphere (bacteria and fungi), an activi-

ty essential to the formation of symbiotic relationships. This review pays special attention to carbohydrate nutrition during the development of arbuscular mycorrhiza (AM), a symbiosis of plants with fungi from the Glomeromycotina subdivision. This relationship results in the host plant receiving micronutrients from the mycosymbiont, mainly phosphorus, and the fungus receiving carbon assimilation products in return. While the efficient nutrient transport pathways in AM symbiosis are yet to be discovered, SWEET sugar transporters are one of the three key families of plant carbohydrate transporters. Specific AM symbiosis transporters can be identified among the SWEET proteins. The survey provides data on the study history, structure and localization, phylogeny and functions of the SWEET proteins. A high variability of both the SWEET proteins themselves and their functions is noted along with the fact that the same proteins may perform different functions in different plants. A special role is given to the SWEET transporters in AM development. SWEET transporters can also play a key role in abiotic stress tolerance, thus allowing plants to adapt to adverse environmental conditions. The development of knowledge about symbiotic systems will contribute to the creation of microbial preparations for use in agriculture in the Russian Federation.

Key words: arbuscular mycorrhiza; SWEET; sugar transport; sucrose; glucose; sugar transporter genes.

For citation: Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Yakhin O.I., Lubyaynov A.A., Malikov U.M., Shishova M.F., Kozhemyakov A.P., Yurkov A.P. Sugar transporters of the SWEET family and their role in arbuscular mycorrhiza. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):754-760. DOI 10.18699/VJ21.086

Введение

Растительные транспортеры сахаров относят к трем ключевым семействам: SUT (SUC), MST (включая подсемейства STP, TMT, PMT, VGT, pGlcT/SGB1, ESL, INT) и SWEET (sugars will eventually be exported transporters). Наиболее изученными являются транспортеры семейств SUT и MST. SUT транспортеры растений осуществляют транспортировку сахарозы из листьев на дальние расстояния, после чего сахара попадают в целевые органы и различные ткани растений, расщепляются на моносахара и транспортируются MST белками. Известно, что большинство растительных транспортеров из этих семейств неспецифичны для симбиотических растительно-микробных систем, например арбускулярной микоризы (AM).

В 2010 г. L.-Q. Chen с коллегами описали новое семейство транспортеров – SWEET, которые работают энерго-независимо в обоих направлениях для транспортировки различных сахаров во всех органах и тканях растений. В настоящее время белки SWEET – это наименее изученная группа транспортеров, в которой, согласно современным представлениям, могут быть выявлены белки, специфичные для AM-симбиоза (Chen et al., 2010). Литературные источники отражают противоречивые сведения о белках семейства SWEET, и данный обзор является попыткой разобраться в проблеме и объединить существующие знания о белках этой группы. В связи с этим целью настоящего исследования стал обзор данных о филогении генов семейства SWEET, функциях кодируемых ими белков, а также оценка их роли в транспорте сахаров при образовании AM-симбиоза.

Общие представления о транспортерах семейства SWEET

Первые открытые SWEET белки, названные MtN3 (у *Medicago truncatula* Gaertn. участвует в развитии клубеньков) и Saliva (ген обнаружен у *Drosophila* и экспрессируется в слюнных железах во время развития эмбриона), были идентифицированы в конце 1990-х гг. Поэтому трансмембранные домены, из которых состоят эти белки, названы MtN3/Saliva или MtN3_slv domain, а также известны как PQ loop – повторы (Chen et al., 2010). Первым выделил SWEET транспортеры в отдельное семейство

белков L.-Q. Chen в 2010 г., подробно описав их у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. При этом было найдено 17 различных транспортеров, в названии которых обозначена видовая принадлежность к конкретному растению и номер белка, например AtSWEET17. В той же работе SWEET белки были рассмотрены у *Oryza sativa* L. (Chen et al., 2010). Позже SWEET белки были исследованы у множества других растений, а также у животных и прокариот (названные у последних SemiSWEET) (Chen et al., 2012; Feng et al., 2015; Patil et al., 2015; Manck-Götzenberger, Requena, 2016; Hu L.P. et al., 2017). Сейчас считается, что SemiSWEET или SWEET встречаются у всех живых организмов (Feng et al., 2015). Нумерация новых SWEET белков, обнаруживаемых у других организмов, проводится согласно их ортологии с белками арабидопсиса *A. thaliana*. Хотя позднее были отмечены некоторые расхождения и вариации в нумерации ортологов *A. thaliana* (Приложение 1)¹ (Doody et al., 2019).

Структура и локализация белков семейства SWEET на мембранах

SWEET белки являются унипортерами, локализованными обычно на плазматической мембране и транспортирующими углеводы через мембраны по градиенту концентрации (Chen et al., 2010). Часто белки SWEET у растений содержат семь трансмембранных (ТМ) спиралей (Xuan et al., 2013). Тем не менее G. Patil с коллегами в 2015 г. обнаружили, что у *Vitis vinifera* L. SWEET состоит из 14 ТМН (trans-membrane helixes – ТМ спирали), что показывает, что структуры спиралей белков SWEET могут различаться (Patil et al., 2015). Бактериальные SemiSWEET белки самые маленькие среди известных транспортеров, состоят примерно из 100 аминокислот, свернутых в три спирали – 3 ТМН, которые вместе образуют triple helix bundle (ТНВ). Дупликация ТНВ прокариот привела к появлению эукариотических SWEET транспортеров, состоящих обычно из двух ТНВ и дополнительной линкерной спирали, нумеруемой как ТМН4 (Feng et al., 2015). Примечательно, что на мембране три ТМН в ТНВ расположены не последовательно: третья ТМН зажата между первой и

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx13.pdf>

второй. N-конец белка при этом локализован на внешней стороне мембраны, а С-конец – на внутренней. У эукариот С-конец удлинен, на нем имеются сайты фосфорилирования, которые могут быть использованы для посттрансляционной модификации (Jeena et al., 2019). Известно, что нуклеотидная последовательность, кодирующая ТМН4, является наиболее вариабельной среди других ТМН, и ее происхождение обсуждается (Jeena et al., 2019).

Интересно, что у некоторых эукариот обнаруживаются схожие с прокариотами структуры белков SWEET. Например, у пшеницы *Triticum aestivum* L. может также встречаться SemiSWEET, состоящий из трех и четырех ТМН (Gautam et al., 2019). По мнению исследователей, присутствие у пшеницы TaSWEET с 3, 4, 6 и 7 ТМН подразумевает, что в геноме может происходить как дупликация, так и слияние структур SWEET белков (Gautam et al., 2019). SuperSWEET sugar transporters найдены у *Phytophthora*. Они содержат от 18 до 25 ТМН и состоят из 5–8 повторов semiSWEET (Jia et al., 2017). Таким образом, следует полагать, что структуры SWEET белков очень вариабельны.

Филогенетика SWEET, их изоформы

При построении филогенетического дерева оказалось, что SWEET гены растений, несмотря на низкую гомологию, группируются в четыре клады (Chen et al., 2015). Данное разделение в эволюции произошло очень давно, и представители каждой из клад наблюдаются почти у всех (возможно, всех) наземных растений. При этом вторая клада наиболее древняя, ее представители имеют некоторую гомологию со SWEET водорослей (Li X. et al., 2018). У млекопитающих и некоторых микроорганизмов, например *Chlamydomonas*, обнаружены белки, попадающие в отдельную от других SWEET кладу V (Chen et al., 2012).

Увеличение числа изоформ SWEET является следствием дублирования или слияния генов ТНВ, что способствует расширению функций транспортеров и адаптации растений к новым условиям (Li X. et al., 2018). Количество изоформ SWEET в значительной степени варьирует среди видов растений. Например, одноклеточные и зеленые водоросли имеют только 1–3 изоформы SWEET, но у однодольных и двудольных их наблюдается уже 18–23 и 15–68 соответственно (Li X. et al., 2018). По другим данным известно, что пшеница *T. aestivum* (однодольное) имеет 108 изоформ SWEET генов, локализованных на хромосоме 21, при этом часть из них относится к ортологам SWEET арабидопсиса (для 14 генов арабидопсиса), а часть – к трем новым типам, не имеющим значимой гомологии с генами арабидопсиса (Gautam et al., 2019). У *M. truncatula* насчитывается до 26 изоформ (Doidy et al., 2019). В то же время есть вероятность, что это не все выявленные транспортеры, поскольку в 2015 г. их было обнаружено только 24 (Chandran, 2015).

Считается, что представители четырех клад разделяются не только филогенетически, но и функционально. Так, большинство исследователей отмечают, что представители клады I и II этих белков транспортируют гексозы, клады III – преимущественно участвуют в транспорте сахарозы, а клады IV – в основном включены в процес-

сы транспорта фруктозы (см. Прил. 1) (Chen et al., 2012; Feng et al., 2015). Но это не всегда так. В. Ну с коллегами в 2019 г. показали, что MtSWEET5b и MtSWEET7 (*M. truncatula*) могут транспортировать не только гексозы, но и сахарозу. Исключения могут быть и у других растений: например, LjSWEET3 (*Lotus japonicus* L.) тоже транспортирует сахарозу вместо гексоз; MtSWEET16 может участвовать в транспорте сахарозы и маннозы. Таким образом, нельзя говорить строго о разделении по кладам SWEET генов для типов переносимого субстрата (см. Прил. 1) (Hu B. et al., 2019).

Анализ нуклеотидных последовательностей SWEET генов показывает их значительную вариабельность. Между четырьмя кладами она может достигать 80 % (т. е. в некоторых случаях имеет место только 20 % гомологии) (неопубл. данные, Крюков и др., 2021). Обычно при такой изменчивости выровнять последовательности и затем построить филогению не представляется возможным. В связи с этим к существующим филогенетическим деревьям SWEET генов следует относиться с особой осторожностью. Интрон-экзонная структура генов SWEET может также значительно различаться (Cao et al., 2019). Большинство генов *MtSWEET* (у *M. truncatula*) содержит в своем составе 5 интронов, исключая гены *MtSWEET4*, *MtSWEET6*, *MtSWEET7* и *MtSWEET13*, содержащие 4 интрона, и *MtSWEET2b*, включающий 16 интронов (Hu B. et al., 2019). Неоднородна и структура SWEET белков *M. truncatula*: большинство содержат 7 ТМН, но у *MtSWEET4* и *MtSWEET11* – 6 ТМН, а *MtSWEET2b* содержит 15 ТМН вместо 7 (Hu B. et al., 2019).

Функции белков семейства SWEET

Как указано выше, представители четырех клад, возможно, разделены функционально. Однако следует отметить, что данные по функциям у разных авторов на определенные белки SWEET могут различаться (см. Прил. 1 и 2). Это может быть связано с несколькими возможными причинами: 1) ортологи SWEET у разных видов могут выполнять разные функции; 2) ортологи могут выполнять разные функции при различных условиях, и их гены будут по-разному экспрессироваться; 3) возможные паралоги в пределах каждой клады могут быть схожи, и поэтому возможны ошибки в их идентификации.

Во всех случаях SWEET белки являются энергонезависимыми двунаправленными унипортерами. Хотя, по мнению некоторых исследователей, это до конца не доказано (Chen et al., 2015). SWEET белки участвуют во множестве процессов, будь то в растении (см. Прил. 1) или у млекопитающих. Кроме транспорта углеводов, по всей видимости, они могут участвовать в транспорте и других агентов, например гиббереллинов, что было показано на арабидопсисе (Kanno et al., 2016). На примере гороха (*Pisum sativum* L.) обнаружено, что взаимодействие между транспортерами SWEET и CWINV (инвертаза клеточной стенки) в присутствии цитокининов приводит к образованию множественных побегов и потере апикального доминирования во время заражения патогеном *Rhodococcus fastian* (Doidy et al., 2019).

Транспортеры SWEET могут также играть роль в устойчивости к абиотическим стрессам, позволяя растени-

ям адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды (см. Прил. 1 и 2) (Chandran, 2015). Накопление сахаров растениями разные авторы связывали с абиотическими стрессами (Hu B. et al., 2019). Холодовой, водный стресс и другие факторы окружающей среды могут индуцировать у растений экспрессию генов SWEET, что позволяет предположить связь этих генов с ответами растений на названные стрессы (Kafle et al., 2019; Wei et al., 2019).

В литературе имеется много данных о функциях белков SWEET у растений разных видов. Так, LjSWEET3 опосредует транспорт сахарозы к клубенькам (Sugiyama et al., 2017). Гены *AtSWEET1* и *AtSWEET5* значительно экспрессируются на разных стадиях созревания пыльцы. Почти все представители клады II участвуют в транспорте сахаров к репродуктивным органам – пыльце, семенам, а некоторые – к грибным патогенам (Chen et al., 2010). *AtSWEET11* и *AtSWEET12* были признаны важными транспортерами сахарозы из клеток паренхимы во флоэму (Chen et al., 2012). В то же время SWEET белки клады III связаны с восприимчивостью и устойчивостью к патогенам (Gautam et al., 2019). По данным W.J. Guo с соавторами, белки *AtSWEET17*, *AtSWEET16* клады IV активны в кортикальных клетках корня и локализованы на тонопласте (Guo et al., 2014).

Патогены ризосферы могут вызывать повышенную экспрессию белков клады III, что приводит к дополнительному транспорту сахарозы в корни и способствует питанию ризосферных микроорганизмов (Doidy et al., 2019). В работе (Chen et al., 2010) показано, что патогенные бактерии, например *Xanthomonas*, могут попадать в ткани растения-хозяина и индуцировать экспрессию генов *SWEET* (из клады III в первую очередь *SWEET11* и *SWEET14*) для получения сахаров. Подобно симбиотическим АМ-грибам, патогенные грибы умеют индуцировать экспрессию генов для получения сахаров (Chen et al., 2010).

Экспрессия многих SWEET меняется под воздействием стресс-факторов на растение. Например, в условиях дефицита воды экспрессия генов *MtSWEET3a*, *MtSWEET3b*, *MtSWEET9b* и *MtSWEET13* значительно повышается, в то время как экспрессия *MtSWEET1a*, *MtSWEET3c*, *MtSWEET15c* значительно падает (см. Прил. 2) (Hu B. et al., 2019). *MtSWEET16* является уникальным, поскольку его экспрессия в основном усиливается в листьях, тогда как ортолог на горохе *PsSWEET16* экспрессируется в основном в корнях и стебле (Doidy et al., 2019). Ортологи SWEET3 (*PsSWEET3.1*, *MtSWEET3.3* и *LjSWEET3* (Sugiyama et al., 2017)), SWEET11 (*MtSWEET11* и *PsSWEET11* (Kryvoruchko et al., 2016)) и SWEET15 (*MtSWEET15.3* и *PsSWEET15.3* (Gamas et al., 1996)) специфически экспрессируются в корневых клубеньках у бобовых растений.

Многие транспортеры имеют значительную экспрессию в АМ-симбиозе, но при этом не являются специфическими для него (Manck-Götzenberger, Requena, 2016). В работе А. Kafle (Kafle et al., 2019) показано, что SWEET1 ортологи (*MtSWEET1.2* и *PsSWEET1.2*) могут экспрессироваться как в микоризованных корнях, так и в корневых клубеньках.

Локализация и функции транспортеров семейства SWEET в клетках корней растений с грибом арбускулярной микоризы

Согласно данным транскрипционных профилей, не все транспортеры семейства SWEET обнаружены в настоящее время и не для всех известных транспортеров этой группы определена локализация в растительной клетке и установлена точная функция (Hennion et al., 2019). Локализация большинства SWEET транспортеров сахаров только выявляется (см. Прил. 1 и 2), и для каждого отдельного транспортера у каждого вида растения необходимо отдельное исследование. Их функции и локализация требуют повторных проверок. С другой стороны, весьма актуален вопрос участия SWEET белков в специфическом транспорте сахаров от растения-хозяина к микосимбионтам – грибам АМ, поскольку знание механизмов активного углеводного питания микосимбионта позволит понять механизмы формирования и развития эффективного взаимодействия партнеров АМ-симбиоза.

Из литературных данных следует, что большинство SWEET транспортеров клады I, II, III локализовано на плазматической мембране (см. рисунок). На рисунке представлена клетка корня растения-хозяина с арбускулой. Арбускула является наиболее распространенным видом симбиотической структуры, формируемой при развитии АМ. Это впячивание плазмалеммы растения в растительную клетку в месте проникновения гифы АМ-гриба с последующим множественным ветвлением ствола арбускулы с формированием между периабускулярной мембраной (ПАМ) и арбускулярной мембраной (АрМ) с клеточной стенкой арбускулы (КА) нового интерфейса взаимодействия партнеров симбиоза – периабускулярного пространства (ПАП), образованного на месте клеточной стенки растения-хозяина.

Специфичность транспортных процессов в условиях АМ анализируют посредством сравнения клеток с арбускулами и без арбускул (Gaude et al., 2012). Так, в работе (Manck-Götzenberger, Requena, 2016) впервые было показано, что основной транспорт сахаров у *Solanum tuberosum* от растения-хозяина к АМ-грибу *Rhizophagus irregularis* может происходить за счет фасилитаторов сахарозы и глюкозы – StSWEET12 и StSWEET7a соответственно (1, см. рисунок; Manck-Götzenberger, Requena, 2016; Hennion et al., 2019), работающих на ПАМ и транспортирующих сахара из цитоплазмы в ПАП и обратно. Затем глюкоза транспортируется через АрМ из ПАП в арбускуле посредством грибного транспортера моносахаров RiMST2 (*R. irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot)) (Hennion et al., 2019) либо в результате работы GpMST1 (*Geosiphonomyces pyriformis* Cif. & Tomas) (Schübler et al., 2006). Транспорт сахарозы через АрМ, возможно, происходит посредством грибного транспортера сахарозы RiSUC1 (Helber et al., 2011). Далее сахар транспортируется по внутрикорневому мицелию в виде гликогена во внекорневой мицелий АМ-гриба (Hennion et al., 2019). В то же время содержание сахаров в цитоплазме клеток коры корня может регулироваться их переносом из вакуоли тонопластными переносчиками, к которым отно-

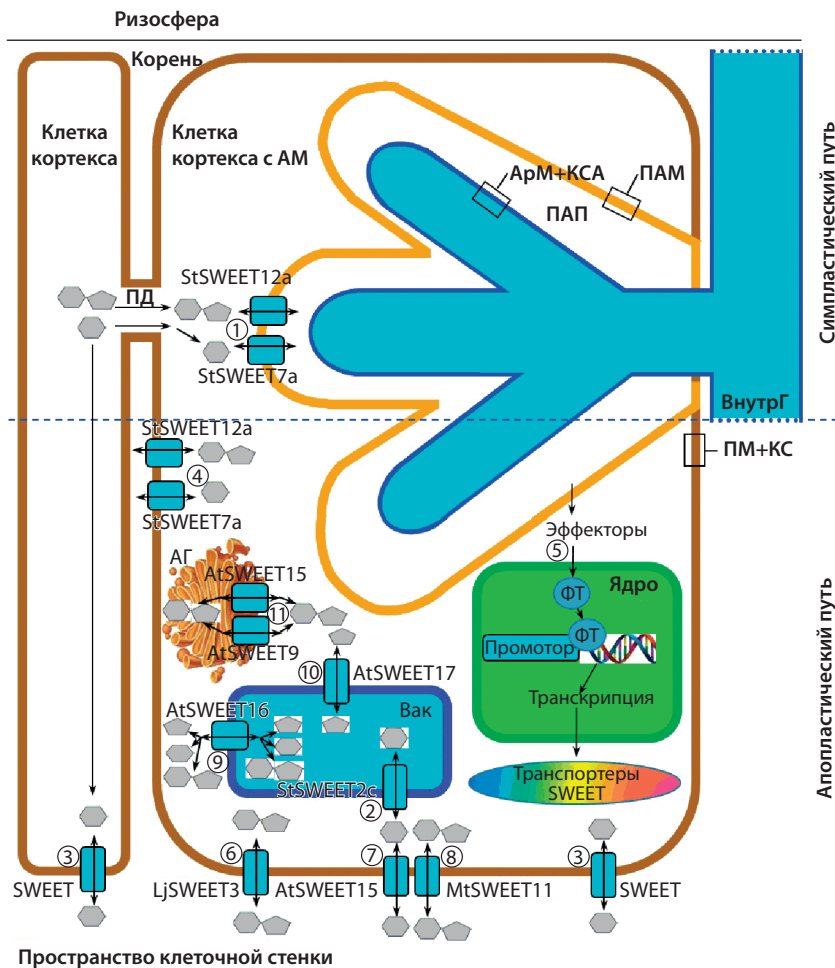


Схема локализации транспортеров семейства SWEET в клетке с арбускулой (Guo et al., 2014; Lin et al., 2014; Chandran, 2015; Chen et al., 2015; Ait Lahmidi et al., 2016; Kryvoruchko et al., 2016; Manck-Götzenberger, Requena, 2016; Sugiyama et al., 2017; Юрков и др., 2019; Hennion et al., 2019; Jeena et al., 2019).

ПМ+КС – плазмалемма и клеточная стенка клетки коры корня; ПАМ – периабускулярная мембрана; ПАП – периабускулярное пространство; АрМ+КСА – арбускулярная мембрана и клеточная стенка арбускулы; ВнутрГ – межклеточная внутрикорневая гифа AM-гриба; ФТ – фактор транскрипции; АГ – аппарат Гольджи; Вак – растительная вакуоль; ПД – плазмодесмы. Пояснения см. в тексте.

сится глюкозный фасилитатор StSWEET2c (2), см. рисунок; Hennion et al., 2019).

Апопластический путь транспорта сахаров осуществляется как до клеток с AM, так и без AM-гриба посредством транспортеров гексоз семейства SWEET (3, см. рисунок; Chardon et al., 2013; Ludwig, Flügge, 2013). Предполагается, что могут существовать и специфические фасилитаторы SWEET для AM-симбиоза. Так, например, кандидатами на специфический транспорт сахарозы и глюкозы у *S. tuberosum* через плазмалемму клеток коры корня, содержащих арбускулы, могут быть те же белки StSWEET12 и StSWEET7a (4; Manck-Götzenberger, Requena, 2016; Hennion et al., 2019). При этом секретируемые AM-грибами эффекторы активируют экспрессию генов SWEET либо непосредственно, либо косвенно – через активацию факторов транскрипции (5; Chandran, 2015; Jeena et al., 2018). На роль специфического фасилитатора претендует также белок LjSWEET3, ответственный за транспорт сахарозы в клетки с арбускулами у *Lotus japonicus* (6; Sugiyama et al., 2017; Hennion et al., 2019). Среди неспецифических для AM транспортеров семейства SWEET известны белки AtSWEET15 (ранее называемый SAG29; Seo et al., 2011)

и MtSWEET11 (Kryvoruchko et al., 2016), локализованные на плазмалемме клетки корня (7 и 8 соответственно).

Обсуждение локализации SWEET белков на органеллах клетки корня носит дискуссионный характер. По некоторым данным, транспортеры клады IV (AtSWEET16 и AtSWEET17) могут быть локализованы в тонопласте растительной вакуоли (9 и 10 соответственно; Chardon et al., 2013; Guo et al., 2014; Jeena et al., 2019). По другим, транспортеры клады III AtSWEET9 и AtSWEET15, переносчики сахарозы, предположительно могут быть локализованы на мембране сети транс-Гольджи (11, см. рисунок).

Таким образом, обобщая сведения о локализации транспортеров семейства SWEET в AM, можно сделать вывод, что ни для одного из транспортеров не было показано специфической локализации одновременно у двух и более видов растений либо специфической экспрессии генов на тех же условиях, как, например, для фосфатного транспортера (PT4) у *M. truncatula* и ряда других видов растений. Первыми кандидатами для проверки являются StSWEET12 и StSWEET7a.

Функции транспортеров в AM можно предполагать на основе общих сведений о кладах белков семейства SWEET, но надо отметить, что детальные исследования одновременно и локализации, и функции этих белков в AM-симбиозе не проводились. Имеются лишь предположения об их роли в AM. Так, например, в недавней работе J. An с коллегами показано, что MtSWEET1b, возможно, снабжает грибы AM глюкозой (An et al., 2019). Согласно атласу экспрессии генов *M. truncatula* (MtGEA; <http://mtgea.noble.org/v3/>), MtSWEET1b и MtSWEET6 высоко экспрессируются в клетках с арбускулами, а их предполагаемые ортологи StSWEET1a, StSWEET1b и StSWEET7a (*S. tuberosum* L.) также демонстрируют высокие уровни транскрипции в микорризных корнях (Manck-Götzenberger, Requena, 2016). SWEET транспортеры клады I с наибольшей вероятностью могут участвовать в снабжении сахарами симбиотических систем, в том числе AM (Doody et al., 2019). Опираясь на вышеперечисленные сведения, полагаем, что исследования функции белков семейства SWEET по-прежнему весьма фрагментарны (см. Прил. 1). Их точное подтверждение на нескольких видах растений остается актуальной задачей.

Заключение

Белки SWEET являются наиболее важными транспортерами углеводов у растений. Среди них можно обнаружить специфические белки для различных видов симбиозов, в первую очередь среди белков клады I и клады III. SWEET транспортеры весьма вариабельны; при изменении внешних условий может возникать множество изоформ, обладающих различными функциями. Необходимо с осторожностью относиться к идентификации SWEET белков и подбору праймеров для амплификации их генов: с одной стороны, близкие паралоги могут оказаться очень похожими, а с другой – высокая вариабельность между кладами не позволяет построить достоверное филогенетическое древо с вытекающими из этого последствиями. Возможно, именно с последним замечанием связан разброс данных по различным функциям SWEET белков (см. Прил. 1), хотя можно выдвинуть гипотезу об универсальности ряда SWEET генов, особенно тех, что схожи по структуре. Также есть основания считать, что пока идентифицированы не все гены семейства SWEET для *M. truncatula*. Все это свидетельствует в пользу того, что в ближайшие годы представления о функциях этих транспортеров будут расширены.

Список литературы / References

- Юрков А.П., Крюков А.А., Горбунова А.О., Афонин А.М., Кирпичникова А.А., Добрякова К.С., Мачс Э.М., Шишова М.Ф. Молекулярно-генетические механизмы транспорта сахаров у растений в отсутствие и при развитии арбускулярной микоризы. *Экол. генетика*. 2019;17(1):81-99. DOI 10.17816/ecogen17181-99. [Yurkov A.P., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Afonin A.M., Kirpichnikova A.A., Dobryakova K.S., Machs E.M., Shishova M.F. Molecular genetic mechanisms of sugar transport in plants in the absence and during arbuscular mycorrhiza development. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2019;17(1):81-99. DOI 10.17816/ecogen17181-99.]
- Ait Lahmidi N., Courty P.E., Brulé D., Chatagnier O., Arnould C., Doidy J., Berta G., Lingua G., Wipf D., Bonneau L. Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel *Rhizophagus irregularis* monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiol. Biochem.* 2016;107:354-363. DOI 10.1016/j.plaphy.2016.06.023.
- An J., Zeng T., Ji C., de Graaf S., Zheng Z., Xiao T.T., Deng X., Xiao S., Bisseling T., Limpens E., Pan Z. A *Medicago truncatula* SWEET transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 2019;224:396-408. DOI 10.1111/nph.15975.
- Cao Y., Liu W., Zhao Q., Cao Y., Liu W., Zhao Q., Long H., Li Z., Liu M., Zhou X., Zhang L. Integrative analysis reveals evolutionary patterns and potential functions of SWEET transporters in Euphorbiaceae. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;139:1-11. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.102.
- Chandran D. Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. *IUBMB Life*. 2015;67(7):461-471. DOI 10.1002/iub.1394.
- Chardon F., Bedu M., Calenge F., Klemens P.A.W., Spinner L., Clement G., Chietera G., Léran S., Ferrand M., Lacombe B., Loudet O., Dinant S., Bellini C., Neuhaus H.E., Daniel-Vedele F., Krapp A. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2013;23(8):697-702. DOI 10.1016/j.cub.2013.03.021.
- Chen L.-Q., Cheung L.S., Feng L., Tanner W., Frommer W.B. Transport of sugars. *Annu. Rev. Biochem.* 2015;84(1):865-894. DOI 10.1146/annurev-biochem-060614-033904.
- Chen L.-Q., Hou B.-H., Lalonde S., Takanao H., Hartung M.L., Qu X.-Q., Guo W.-J., Kim J.-G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*. 2010;468:527-532. DOI 10.1038/nature09606.
- Chen L.-Q., Qu X.-Q., Hou B.-H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*. 2012;335:207-211. DOI 10.1126/science.1213351.
- Chong J., Piron M.C., Meyer S., Merdinoglu D., Bertsch C., Mestre P. The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* 2014;22:6589-6601. DOI 10.1093/jxb/eru375.
- Cohn M., Bart R.S., Shybut M., Dahlbeck D., Gomez M., Morbitzer R., Hou B.H., Frommer W.B., Lahaye T., Staskawicz B.J. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2014;27(11):1186-1198. DOI 10.1094/MPMI-06-14-0161-R.
- Doidy J., Vidal U., Lemoine R. Sugar transporters in Fabaceae, featuring SUT MST and SWEET families of the model plant *Medicago truncatula* and the agricultural crop *Pisum sativum*. *PLoS One*. 2019;14(9):e0223173. DOI 10.1371/journal.pone.0223173.
- Engel M.L., Holmes-Davis R., McCormick S. Green sperm. Identification of male gamete promoters in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2005;138(4):2124-2133. DOI 10.1104/pp.104.054213.
- Feng C.Y., Han J.X., Han X.X., Jiang J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. *Gene*. 2015;573:261-272. DOI 10.1016/j.gene.2015.07.055.
- Gamas P., Nebel F.D.C., Lescure N., Cullimore J.V. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1996;9(4):233-242. DOI 10.1094/mpmi-9-0233.
- Gaude N., Bortfeld S., Duensing N., Lohse M., Krajinski F. Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *Plant J.* 2012;69:510-528. DOI 10.1111/j.1365-3113.2011.04810.x.
- Gautam T., Saripalli G., Gahlaut V., Kumar A., Sharma P.K., Balyan H.S., Gupta P.K. Further studies on sugar transporter (SWEET) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Biol. Rep.* 2019;46:2327-2353. DOI 10.1007/s11033-019-04691-0.
- Guo W.J., Nagy R., Chen H.Y., Pfrunder S., Yu Y.C., Santelia D., Frommer W.B., Martinoia E. SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiol.* 2014;164:777-789. DOI 10.1104/pp.113.232751.
- Helber N., Wipfel K., Sauer N., Schaarschmidt S., Hause B., Requena N. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell*. 2011;23:3812-3823. DOI 10.1105/tpc.111.089813.
- Hennion N., Durand M., Vriet C., Doidy J., Maurousset L., Lemoine R., Pourtau N. Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiol. Plant*. 2019;165:44-57. DOI 10.1111/ppl.12751.
- Ho L.H., Klemens P.A.W., Neuhaus H.E., Ko H.Y., Hsieh S.Y., Guo W.J. SISWEET1a is involved in glucose import to young leaves in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 2019;70(12):3241-3254. DOI 10.1093/jxb/erz154.
- Hu B., Wu H., Huang W., Song J., Zhou Y., Lin Y. SWEET gene family in *Medicago truncatula*: genome-wide identification, expression and substrate specificity analysis. *Plants*. 2019;8(9):338. DOI 10.3390/plants8090338.
- Hu L.P., Zhang F., Song S.H., Tang X.W., Xu H., Liu G.M., Wang Y., He H.J. Genome-wide identification, characterization, and expres-

- sion analysis of the SWEET gene family in cucumber. *J. Integr. Agric.* 2017;16(7):1486-1501. DOI 10.1016/s2095-3119(16)61501-0.
- Hu W., Hua X., Zhang Q., Wang J., Shen Q., Zhang X., Wang K., Yu Q., Lin Y.R., Ming R., Zhang J. New insights into the evolution and functional divergence of the SWEET family in *Saccharum* based on comparative genomics. *BMC Plant Biol.* 2018;18:270. DOI 10.1186/s12870-018-1495-y.
- Jeena G.S., Kumar S., Shukla R.K. Structure, evolution and diverse physiological roles of SWEET sugar transporters in plants. *Plant Mol. Biol.* 2019;100:351-365. DOI 10.1007/s11103-019-00872-4.
- Jia B., Zhu X.F., Pu Z.J., Duan Y.X., Hao L.J., Zhang J., Chen L.Q., Jeon C.O., Xuan Y.H. Integrative view of the diversity and evolution of SWEET and SemiSWEET sugar transporters. *Front. Plant Sci.* 2017;8:2178. DOI 10.3389/fpls.2017.02178.
- Kafle A., Garcia K., Wang W., Pfeffer P.E., Strahan G.D., Bücking H. Nutrient demand and fungal access to resources control the carbon allocation to the symbiotic partners in tripartite interactions in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ.* 2019;42:270-284. DOI 10.1111/pce.13359.
- Kanno Y., Oikawa T., Chiba Y., Ishimaru Y., Shimizu T., Sano N., Koshiba T., Kamiya Y., Ueda M., Seo M. AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat. Commun.* 2016;7:13245. DOI 10.1038/ncomms13245.
- Klemens P.A., Patzke K., Deitmer J., Spinner L., Le H.R., Bellini C., Bedu M., Chardon F., Krapp A., Neuhaus H.E. Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth and stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 2013;63:1338-1352. DOI 10.1104/pp.113.224972.
- Kryvoruchko I.S., Sinharoy S., Torres-Jerez I., Sosso D., Pislariu C.I., Guan D., Murray J., Benedict V.A., Frommer W.B., Udvardi M.K. MtSWEET11, a nodule-specific sucrose transporter of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 2016;171(1):554-565. DOI 10.1104/pp.15.01910.
- Le H.R., Spinner L., Klemens P.A., Chakraborti D., de Marco F., Vilaine F., Wolff N., Lemoine R., Porcheron B., Géry C., Téoulé E., Chabout S., Mouille G., Neuhaus H.E., Dinant S., Bellini C. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* 2015;8:1687-1690. DOI 10.1016/j.molp.2015.08.007.
- Lee J., Lee H., Kim J., Lee S., Kim D.H., Kim S., Hwang I. Both the hydrophobicity and a positively charged region flanking the C-terminal region of the transmembrane domain of signal-anchored proteins play critical roles in determining their targeting specificity to the endoplasmic reticulum or endosymbiotic organelles in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell.* 2011;23(4):1588-1607. DOI 10.1105/tpc.110.082230.
- Li M., Xie H., He M., Su W., Yang Y., Wang J., Ye G., Zhou Y. Genome wide identification and expression analysis of the StSWEET family genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Genes Genomics.* 2019;42:135-153. DOI 10.1007/s13258-019-00890-y.
- Li X., Si W., Qin Q., Wu H., Jiang H. Deciphering evolutionary dynamics of SWEET genes in diverse plant lineages. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):13440. DOI 10.1038/s41598-018-31589-x.
- Li Y., Wang Y., Zhang H., Zhang Q., Zhai H., Liu Q., He S. The plasma membrane-localized sucrose transporter IbSWEET10 contributes to the resistance of sweet potato to *Fusarium oxysporum*. *Front. Plant Sci.* 2017;14(8):197. DOI 10.3389/fpls.2017.00197.
- Lin I.W., Sosso D., Chen L.-Q., Gase K., Kim S.-G., Kessler D., Klinkenberg P.M., Gorder M.K., Hou B.-H., Qu X.-Q., Carter C.J., Baldwin J.T., Frommer W.B. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature.* 2014; 508:546-549. DOI 10.1038/nature13082.
- Ludewig F., Flügge U.I. Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front. Plant Sci.* 2013;4:231. DOI 10.3389/fpls.2013.00231.
- Manck-Götzenberger J., Requena N. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* 2016;7:487. DOI 10.3389/fpls.2016.00487.
- Patil G., Valliyodan B., Deshmukh R., Prince S., Nicander B., Zhao M., Sonah H., Song L., Lin L., Chaudhary J., Liu Y., Joshi T., Xu D., Nguyen H.T. Soybean (*Glycine max*) SWEET gene family: insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequence analysis. *BMC Genomics.* 2015;16:520. DOI 10.1186/s12864-015-1730-y.
- Schübler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. Characterization of a carbohydrate transporters form symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature.* 2006;444:933-936. DOI 10.1038/nature05364.
- Seo P.J., Park J.M., Kang S.K., Kim S.G., Park C.M. An *Arabidopsis* senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta.* 2011;233:189-200. DOI 10.1007/s00425-010-1293-8.
- Sugiyama A., Saida Y., Yoshimizu M., Takanashi K., Sosso D., Frommer W.B., Yazaki K. Molecular characterization of LjSWEET3, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(2):298-306. DOI 10.1093/pcp/pcw190.
- Sun M.X., Huang X.Y., Yang J., Guan Y.F., Yang Z.N. Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reprod.* 2013;26:83-91. DOI 10.1007/s00497-012-0208-1.
- Wei Y., Xiao D., Zhang C., Hou X. The expanded SWEET gene family following whole genome triplication in *Brassica rapa*. *Genes.* 2019;10(9):722. DOI 10.3390/genes10090722.
- Xuan Y.H., Hu Y.B., Chen L.Q., Sosso D., Ducat D.C., Hou B.H., Frommer W.B. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(39):E3685-E3694. DOI 10.1073/pnas.1311244110.
- Zhao D., You Y., Fan H., Zhu X., Wang Y., Duan Y., Xuan Y., Chen L. The role of sugar transporter genes during early infection by root-knot nematodes. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(1):E302. DOI 10.3390/ijms19010302.

ORCID ID

A.A. Kryukov orcid.org/0000-0002-8715-6723
T.R. Kudriashova orcid.org/0000-0001-5120-7229
O.I. Yakhin orcid.org/0000-0001-9039-7969
A.A. Lubyakov orcid.org/0000-0002-6134-0290
M.F. Shishova orcid.org/0000-0003-3657-2986
A.P. Kozhemyakov orcid.org/0000-0002-9657-2454
A.P. Yurkov orcid.org/0000-0002-2231-6466

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-016-00245-A (разделы «Общие представления о транспортерах семейства SWEET», «Функции белков семейства SWEET») и № 19-29-05275-МК (раздел «Филогенетика SWEET, их изоформы»), а также в рамках государственного задания № 0482-2021-0004 (раздел «Локализация и функции транспортеров семейства SWEET в клетках корней растений с грибом арбускулярной микорризы»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.07.2021. После доработки 01.09.2021. Принята к публикации 02.09.2021.

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

Разработка панели маркеров для генотипирования отечественных сортов сои по генам, контролирующим срок вегетации и реакцию на фотопериод

Р.Н. Перфильев , А.Б. Щербань, Е.А. Салина


Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 Perfil'evRN@bionet.nsc.ru

Аннотация. Соя (*Glycine max* L.) – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, выращиваемая в большом диапазоне географической широты. В связи с этим в селекции сои необходимо обращать внимание на набор генов, контролирующих переход к фазе цветения, что позволит максимально точно адаптировать генотипы к локальным условиям произрастания. В настоящее время возможности селекции сои по данному признаку значительно расширились благодаря идентификации в ее геноме основных генов (*E1–E4*, *GmFT2a*, *GmFT5a*), контролирующих процессы цветения и созревания в зависимости от длины дня. Целью нашей работы являлось создание панели маркеров к этим генам, которая может быть использована для быстрого и эффективного генотипирования отечественных сортов сои и отбора растительного материала по признакам чувствительности к длине дня и продолжительности вегетационного периода. Проведено тестирование 10 комбинаций праймеров (как ранее разработанных, так и собственных) для выявления различных аллельных состояний генов *E1–E4*, *GmFT2a* и *GmFT5a* на выборке из 10 сортов сои из различных групп спелости. В итоге выявлено пять комбинаций доминантных и рецессивных аллелей по генам *E1–E4*: 1) *e1-nl(e1-as)/e2-ns/e3-tr(e3-fs)/e4*; 2) *e1-as/e2-ns/e3-tr/E4*; 3) *e1-as/e2-ns/E3-Ha/e4*; 4) *E1/e2-ns/e3-tr/E4*; 5) *e1-nl/e2-ns/E3-Ha/E4*. Проанализированные сорта содержали наиболее распространенные аллели генов *GmFT2a* и *GmFT5a*, за исключением сорта Кассиди, у которого был обнаружен редкий доминантный аллель *GmFT5a-H4*. Степень скороспелости сортов положительно коррелировала с количеством рецессивных генов *E1–E4*, что согласуется с данными зарубежных авторов, полученными на выборках сортов из Японии и Северного Китая. Таким образом, разработанная панель маркеров может успешно использоваться в селекции сои на скороспелость и чувствительность к фотопериоду. Ключевые слова: фотопериод; срок цветения; маркер гена; аллель-специфичные праймеры; несинонимичная замена; индель; сорт; соя; группа спелости.

Для цитирования: Перфильев Р.Н., Щербань А.Б., Салина Е.А. Разработка панели маркеров для генотипирования отечественных сортов сои по генам, контролирующим срок вегетации и реакцию на фотопериод. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):761-769. DOI 10.18699/VJ21.087

Development of a marker panel for genotyping of domestic soybean cultivars for genes controlling the duration of vegetation and response to photoperiod

R.N. Perfil'ev , A.B. Shcherban, E.A. Salina

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 Perfil'evRN@bionet.nsc.ru

Abstract. Soybean, *Glycine max* L., is one of the most important agricultural crops grown in a wide range of latitude. In this regard, in soybean breeding, it is necessary to pay attention to the set of genes that control the transition to the flowering stage, which will make it possible to adapt genotypes to local growing conditions as accurately as possible. The possibilities of soybean breeding for this trait have now significantly expanded due to identification of the main genes (*E1–E4*, *GmFT2a*, *GmFT5a*) that control the processes of flowering and maturation in soybean, depending on the day length. The aim of this work was to develop a panel of markers for these genes, which could be used for a rapid and efficient genotyping of domestic soybean cultivars and selection of plant material based on sensitivity to photoperiod and the duration of vegetation. Combinations of 10 primers, both previously developed and our own, were tested to identify different alleles of the *E1–E4*, *GmFT2a*, and *GmFT5a* genes using 10 soybean cultivars from different maturity groups. As a result, 5 combinations of dominant and recessive alleles for the *E1–E4* genes were identified: (1) *e1-nl(e1-as)/e2-ns/e3-tr(e3-fs)/e4*; (2) *e1-as/e2-ns/e3-tr/E4*; (3) *e1-as/e2-ns/E3-Ha/e4*; (4) *E1/e2-ns/e3-tr/E4*; (5) *e1-nl/e2-ns/E3-Ha/E4*. The studied cultivars contained the most common alleles of the *GmFT2a* and *GmFT5a* genes, with the exception of the 'Cassidi' cultivar having a rare dominant allele *GmFT5a-H4*. The degree of earliness of cultivars positively correlated with the number of recessive genes *E1–E4*, which is consistent with the data of foreign authors on different sets of

cultivars from Japan and North China. Thus, the developed panel of markers can be successfully used in the selection of soybean for earliness and sensitivity to photoperiod.

Key words: photoperiod; flowering period; gene marker; allele-specific primers; nonsynonymous substitution; indel; cultivar; soybean; maturity group.

For citation: Perfil'ev R.N., Shcherban A.B., Salina E.A. Development of a marker panel for genotyping of domestic soybean cultivars for genes controlling the duration of vegetation and response to photoperiod. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):761-769. DOI 10.18699/VJ21.087

Введение

Род *Glycine* объединяет два подрода – *Soja* и *Glycine*. К первому относятся вид *Glycine soja* ($2n = 4x = 40$), или уссурийская соя, – дикорастущее однолетнее растение из Юго-Восточной Азии, и произошедший от него культурный вид *Glycine max* L. ($2n = 4x = 40$) (Вавилов, 1926; Жуковский, 1964).

Сою выращивают во многих странах мира для пищевых, кормовых и технических целей благодаря ее особым питательным свойствам, в том числе высокому содержанию белка (30–52 %). По этому показателю соя превосходит все возделываемые культуры, за исключением люпина: пшеница – 9–26 %, рис – 7 %, кукуруза – 10 % и др. Ценность белка сои определяется содержанием незаменимых аминокислот, сумма которых составляет ~20 % от массы суммарного белка, тогда как у пшеницы – 18 % (Gorissen et al., 2018). По степени усвояемости белок сои имеет наивысший индекс – 1, соответствующий белкам молока, яиц, казеину и в несколько раз превышающий аналогичный показатель у зерновых культур (0.25–0.4) (Hoffman, Falvo, 2004).

Первые сведения о возделывании сои в Китае относятся к шестому тысячелетию до н. э. Как основное сырье для получения растительного белка и масла она распространилась в других странах Юго-Восточной Азии: Индии, Корее, Японии, Индонезии, где были разработаны разнообразные способы ее употребления в пищу. В конце VIII в. соя была интродуцирована в Европу. На Дальний Восток сою завезли из Китая, в СССР эта культура была внедрена в производство в 1927 г.

По мировой площади посевов соя занимает первое место среди зернобобовых культур – 122 млн га по данным 2019 г. (<https://www.kleffmann.com/>). Мировыми лидерами производства сои являются Бразилия и США. Площадь посевов в этих странах составляет 37 и 31 млн га соответственно, средняя урожайность – 3.3 т/га. По данным Федеральной службы государственной статистики (Росстат, <https://rosstat.gov.ru/>), в России в 2019 г. общая площадь посевов достигала ~3 млн га, урожайность – 1.0–2.0 т/га. За пять лет площадь посевов сои в России увеличилась на 51 %. При этом валовой сбор бобов возрос в 1.6 раза: с 2.64 млн т в 2015 г. до 4.36 млн т в 2019 г.

Потенциал повышения урожайности сои в России довольно высок и может быть реализован как модернизацией агротехнических приемов возделывания, так и селекцией новых сортов, более адаптированных к специфическим климатическим условиям конкретных регионов (приоритетное направление). Важную роль в адаптации играет совместимость фаз развития с оптимальными для каждой фазы режимами температуры. Соя относится к теплолюбивым растениям, поскольку оптимальная температура

для ее роста в фазу вегетации составляет +20...+25 °С, для прорастания семян – +12...+14 °С. Всходы способны выдерживать заморозки до –3 °С. Наибольшая потребность в тепле отмечается в период цветения и созревания бобов, оптимальная температура в этот период +18...+20 °С.

Соя возделывается в значительном широтном диапазоне – от 55° с. ш. до 35° ю. ш. Однако площадь возделывания каждого сорта, как правило, ограничена очень узким диапазоном, не более 1° (Агаркова и др., 2016). Связано это с сильной реакцией на фотопериод. Для перехода к цветению соя, как южное растение, требует короткого дня. В северных широтах, при длинном дне, у чувствительных к фотопериоду сортов цветение задерживается и бобы не успевают созреть до наступления осенних заморозков. Снижение чувствительности к фотопериоду позволяет растениям начинать цветение раньше и проходить процесс созревания в оптимальный период. С другой стороны, в южных широтах, при коротком дне и теплой погоде, соя зацветает слишком рано и не успевает сформировать достаточную вегетационную массу, необходимую для получения высокого урожая.

Модуляция вегетационного периода в зависимости от широты местности достигается подбором эффективной для этой местности комбинации аллелей генов, которые отвечают за фотопериодическую реакцию и переход растения к процессам цветения и созревания. К настоящему времени идентифицирована серия генов *E1–E11*, влияющих на указанные признаки (Jia et al., 2014; Tsubokura et al., 2014; Zhai et al., 2014; Samanfar et al., 2017; Wang et al., 2019). Наиболее детально установлена функция генов *E1–E4*, которые непосредственно вовлечены в регуляцию как самого процесса цветения, так и следующего за ним процесса созревания под действием фотопериода (Xu et al., 2013). Комбинации аллелей этих четырех генов объясняют 62–66 % вариаций в длине вегетационного периода у сортов сои (Tsubokura et al., 2014). Ген *E1* является репрессором цветения и кодирует транскрипционный фактор, содержащий предполагаемый сигнал ядерной локализации и ДНК-связывающий домен В3 (Watanabe et al., 2012; Xu et al., 2015). Ген *E2* – ортолог гена-регулятора цветения *GIGANTEA* арабидопсиса (Watanabe et al., 2011). Гены *E3* и *E4* кодируют белки фитохрома А: *GmPHYA3* и *GmPHYA2* соответственно (Liu et al., 2008). Рецессивные аллели генов *E1–E4* возникли в результате мутаций (сдвиги рамки считывания, несинонимичные замены, делеции), приводящих к нарушению функции белков, что вызывает нечувствительность к фотопериоду (Xu et al., 2013).

У сои были идентифицированы 12 генов *GmFT*, гомологичных гену-активатору цветения *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) арабидопсиса (Kong et al., 2010; Wu et al., 2017). Гены этого семейства *GmFT2a* и *GmFT4* были картирова-

ны как гены созревания *E9* и *E10* соответственно (Zhao et al., 2016; Samanfar et al., 2017). Наиболее сильное влияние на время цветения оказывают гены *GmFT2a* и *GmFT5a* (Guo et al., 2015; Takeshima et al., 2016). Было предложено несколько сигнальных путей регуляции цветения сои в зависимости от фотопериода, в том числе специфический для бобовых регуляторный путь с участием гена *E1*. Согласно этому пути, на длинном световом дне фоторецепторы *E3* и *E4* обеспечивают чувствительность к свету и индуцируют экспрессию гена *E1* и его гомолога *E1L*, которые подавляют экспрессию *GmFT5a* и *GmFT2a*, что приводит к задержке цветения (Zhu et al., 2019).

Таким образом, ранее проведенный анализ основных генов, участвующих в регуляции вегетационного периода у сои, позволил выявить различные доминантные и рецессивные аллели этих генов, обуславливающие различную чувствительность к фотопериоду, и разработать аллель-специфичные маркеры. Целью настоящей работы было создание панели данных маркеров, которую можно использовать для быстрого и эффективного генотипирования отечественных сортов сои и отбора растительного материала по признакам чувствительности к длине дня и продолжительности вегетационного периода.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили 10 сортов сои с различной длиной вегетационного периода. Семена четырех сортов были предоставлены ФГБНУ СибНИИ кормов

СФНЦА РАН (г. Новосибирск), шести сортов – компанией «ЭФКО» (пос. Алексеевка, Белгородская область). Названия, генотипы и сроки вегетации сортов приведены в табл. 1.

Тотальную ДНК выделяли из 4-дневных индивидуальных проростков, выращенных на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Выделение ДНК выполняли согласно методике, описанной в работе (Kiseleva et al., 2016). Количество ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Для анализа различных аллелей исследуемых генов использовали аллель-специфичные праймеры, синтезированные в компании «Биоссет» (Новосибирск) (табл. 2). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси с помощью коммерческого набора для ПЦР с HS-Taq («Биолабмикс», Новосибирск). Реакционная смесь содержала 50–100 нг ДНК-матрицы, 1× ПЦР-буфер, 2 mM MgCl₂, по 0.2 mM каждого dNTP, по 0.5 mM каждого праймера, 1 е. а. HS-Taq ДНК-полимеразы. Условия ПЦР: 5 мин при 95 °C; 35–40 циклов (95 °C, 10 с; 55–60 °C, 20 с; 72 °C, 30–40 с); 5 мин при 72 °C. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Для анализа гена *E2* использовали CAPS-маркер, описанный в статье (Watanabe et al., 2011). Продукт ПЦР, полученный с помощью *E2*-специфических праймеров, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Dra* I («Сиб-Энзим», Новосибирск). Для этого в ПЦР-смесь, содер-

Таблица 1. Генотипы проанализированных сортов сои по генам *E1–E4*, *GmFT*

Сорт, регион	Генотип						Группа спелости (диапазон вегетационного периода/ среднее значение*)
	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E9</i> (<i>GmFT2a</i>)	<i>GmFT5a</i>	
Аннушка, Белгородская область	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Ультраскороспелый/очень скороспелый (75–85/80)
Бара, Белгородская область	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Ультраскороспелый/очень скороспелый (85–95/90)
Горинская, Западная Сибирь	<i>e1-nl</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-fs</i> <i>e3-tr</i>	<i>e4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Скороспелый (92)
СибНИИК-9, Западная Сибирь	<i>e1-nl</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-fs</i>	<i>e4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Скороспелый (90–98/94)
СибНИИК-315, Западная Сибирь	<i>e1-nl</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-fs</i>	<i>e4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Скороспелый (98–105/102)
Чера-1, Белгородская область	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-fs</i>	<i>E4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Скороспелый (94–116/105)
Персона, Западная Сибирь	<i>E1</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Скороспелый (103–109/106)
Белгородская 48, Белгородская область	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>e4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Скороспелый/среднескороспелый (98–119/108)
Малага, Белгородская область	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H1</i>	Среднескороспелый (110–115/112)
Кассиди, Белгородская область	<i>e1-nl</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	<i>E9</i>	<i>GmFT5a-H4</i>	Среднескороспелый (110–120/115)

* Сроки вегетации сортов на длинном дне взяты на сайте Государственного реестра селекционных достижений (<https://reestr.gossortrf.ru/>). Группы спелости приведены согласно общепринятой отечественной классификации (Корсаков, 1973).

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Ген/аллель	Последовательности праймеров	Длина ПЦР-продуктов, п. н.	T отжига, °C	Источник
<i>E1/e1-fs/e1-nl*</i>	E1F1:CACTCAAATTAAGCCCTTTCA E1R1:TCCGATCTCATCACCTTTCC	547	55	Xia et al., 2012
<i>e1-as</i>	e1asF:GGGAGCAGTGTCAAAAGAAGAC e1asR:GTGCTATCCCTTAGTTAATTAAT	<i>e1-as</i> : 1403 <i>e1-nl</i> : – <i>E1</i> : –	60	Разработаны авторами
<i>E1</i>	E1F: GGGAGCAGTGTCAAAAGAAGAG E1R: GTGCTATCCCTTAGTTAATTAATA	<i>E1</i> : 1403 <i>e1-as</i> : – <i>e1-nl</i> : –	60	
<i>E2**</i>	E2F:GAAGCCCATCAGAGGCATGTCTTATT E2R: AAGCCTATGCCAGCTAGGTATTT	<i>E2</i> : 130 <i>e2</i> : 107+23	55	Watanabe et al., 2011
<i>E3</i>	E3F: TGGAGGGTATTGGATGATGC E3R1: CTAAGTCCGCCTCTGGTTTCAG E3R2: CCGTCAAGAGCCAACATGAG E3R3:GTCCTATACAATTCTTTACGACG	<i>E3-Mi</i> : 1339 <i>E3-Ha</i> : 558 <i>e3-tr</i> : 275	58	Watanabe et al., 2009
<i>E3/e3-fs*</i>	E3fsF:GGGATAGTCTGATGCTGTTCAA E3fsR:CCTTGATCGATAGCATATGTGCT	<i>E3</i> : 758 <i>e3-fs</i> : 759	55	Xu et al., 2013
<i>E4</i>	E4F: AGACGTAGTGCTAGGGCTAT E4R1: GCATCTCGCATCACCAGATCA E4R2: GCTCATCCCTTCGAATTCAG	<i>E4</i> : 1229 <i>e4-SORE-1</i> : 837	58	Liu et al., 2008
<i>E9</i> (<i>GmFT2a</i>)	E9F1:GCTCTCTCTTCCACTCTCTAGATGG E9F2: ACCCTCTCAAGTGGACATGT E9R: CTAGGTGCATCGGGATCAAC	<i>E9</i> : 440 <i>e9</i> : 307	60	Zhao et al., 2016
<i>GmFT5a-H1/</i> <i>GmFT5a-H4*</i>	FT5aF: GCATGGTTCATACATACTACAGGG FT5aR: AACTCAGTTGCGTACACATGCTG	<i>GmFT5a-H1</i> : 379 <i>GmFT5a-H4</i> : 330	60	Разработаны авторами

* Комбинации, использованные для секвенирования.

** CAPS-маркер с рестриктазой *Dra* I.

жащую продукт ПЦР, добавляли 1 е.а. фермента и инкубировали при 37 °C в течение ночи. Для разделения продуктов рестрикции применяли 2 % агарозный гель. Фрагменты ДНК после электрофореза в агарозном геле визуализировали и фотографировали в УФ-свете с помощью Gel Doc™ XR+ (BioRad, США).

Для анализа первичной структуры продукты ПЦР вырезали из геля и очищали с помощью коммерческого набора для элюции ДНК из агарозного геля *diaGene* (ДиаМ, Россия) согласно протоколу производителя. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР определяли с использованием реактива BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, США) и соответствующих специфических праймеров. Секвенирование выполняли в ЦКП «Геномика» СО РАН на автоматическом капиллярном анализаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с помощью программы BLASTN с последовательностями из базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей ДНК проводили в программе CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Результаты

Ранее в ряде работ была детально проанализирована структурная организация генов, определяющих длину

вегетационного периода у сои, включая *E*-гены, а также гены *GmFT* семейства (Liu et al., 2008; Xu et al., 2013; Jiang et al., 2014, 2019; Tsubokura et al., 2014). Разработаны молекулярные маркеры (ПЦР, CAPS) для идентификации различных аллелей данных генов, включая доминантные аллели *E1–E4* у чувствительных к фотопериоду образцов и рецессивные, обуславливающие нечувствительность к фотопериоду и укороченный срок вегетации. В нашем исследовании мы апробировали эти маркеры на выборке из допущенных к использованию в РФ сортов сои для создания панели, позволяющей проводить ускоренный скрининг сортов по признаку чувствительности к фотопериоду, а также их генотипирование по всем указанным генам.

Для анализа гена *E1* мы изначально применили комбинацию общих для доминантных и рецессивных аллелей праймеров E1F1/E1R1 (см. табл. 2), ограничивающих короткий участок кодирующей последовательности. Этот участок содержит SNP, специфичные для двух распространенных рецессивных аллелей *E1*: *e1-fs* и *e1-as* (Xia et al., 2012). После ПЦР у 6 сортов был выявлен интенсивный продукт длиной 547 п. н, а у других 4 сортов продукт ПЦР не обнаруживался (результат не представлен). Далее мы провели анализ первичной структуры полученного ПЦР-продукта у 6 сортов, который показал наличие у 5 сортов аллеля *e1-as*, а у сорта Персона – аллеля *E1*. Рецессивный аллель *e1-as* характеризуется присутствием


```
e1-as (AB552966)  GTCAAAAAGAAGACGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
Belgorodskaya 48 GTCAAAAAGAAGACGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
Annushka         GTCAAAAAGAAGACGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
Chera-1          GTCAAAAAGAAGACGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
Malaga           GTCAAAAAGAAGACGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
E1 (AB552962)    GTCAAAAAGAAGAGGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
Persona          GTCAAAAAGAAGAGGAAATCCACCATATGCGAAGCCTCTAACTTTAGGACATCAAGGAGAA
*****
```

Рис. 1. Множественное выравнивание участка гена *E1*, содержащего однонуклеотидную замену, характерную для рецессивного аллеля *e1-as*.

E1 и *e1-as* – последовательности гена *E1* сорта Harosoy *G. max* (AB552962 и AB552966 соответственно).

нуклеотидной замены G→C относительно доминантного аллеля *E1* (рис. 1). На основе известных последовательностей гена *E1* из баз данных нами были разработаны аллель-специфичные праймеры *e1asF/e1asR*, позволяющие идентифицировать аллель *e1-as* по наличию продукта длиной 1403 п.н. (см. табл. 2). Результат ПЦР с этими праймерами представлен на рис. 2, а. Другая пара праймеров (*E1F/E1R*) на тот же участок гена, специфичная для доминантного аллеля *E1*, дала продукт амплификации только у сорта Персона, который может быть взят в качестве контроля *E1* (см. рис. 2, б). Отсутствие продукта амплификации во всех случаях использования праймеров к различным участкам гена *E1* у сортов Кассиди, СибНИИК-9, СибНИИК-315 и Горинская можно объяснить полной делецией гена, а именно наличием аллеля *e1-nl* (Xia et al., 2012).

По гену *E2* сорта были генотипированы с помощью CAPS-маркера (см. табл. 2). В случае доминантного аллеля ПЦР-продукт длиной 130 п.н. не подвергается рестрикции эндонуклеазой *Dra I*. У рецессивного аллеля *e2* из-за нуклеотидной замены A→T появляется сайт рестрикции *Dra I* и в результате гидролиза ПЦР-продукта образуются фрагменты ДНК длиной 27 и 103 п.н. Рецессивный аллель *e2* обнаружен во всех исследованных образцах (рис. 3).

У гена *E3* самый распространенный рецессивный аллель *e3-tr* характеризуется делецией в 13 т. п.н. после третьего экзона (Watanabe et al., 2009). Доминантные аллели *E3-Mi* и *E3-Ha* имеют одинаковый эффект на фенотип растения, но различаются инсерцией ретранспозона в третьем интроне у аллеля *E3-Ha*. Маркер (см. табл. 2) на данный ген позволяет одновременно определять оба доминантных и рецессивный аллели по гену *E3*. С использованием этого маркера у сортов Аннушка, Бара, Персона и Малага, а также у одного растения сорта Горинская был выявлен характерный для рецессивного аллеля продукт амплификации длиной 275 п.н. (рис. 4). У остальных образцов продукт ПЦР соответствовал доминантному аллелю *E3-Ha* (см. рис. 4).

Помимо делеции 13 т. п.н., для *E3* известны другие мутации, приводящие к образованию рецессивных аллелей. Среди них самый распространенный – аллель *e3-fs* с инсерцией нуклеотида Т в первом экзоне, приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белка (Xu et al., 2013). Данная мутация была

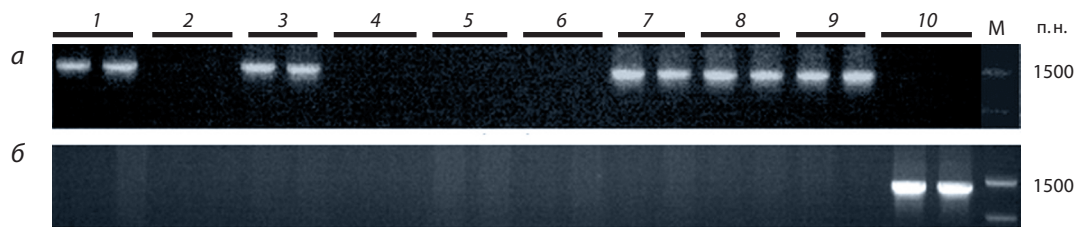


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймеров *e1-asF/e1-asR* (а) и *E1F/E1R* (б). Здесь и далее нумерация образцов: 1 – сорт Аннушка; 2 – Кассиди; 3 – Белгородская 48; 4 – СибНИИК-9; 5 – СибНИИК-315; 6 – Горинская; 7 – Чера-1; 8 – Бара; 9 – Малага; 10 – Персона; М – маркер длины. По каждому сорту анализировали два индивидуальных растения.

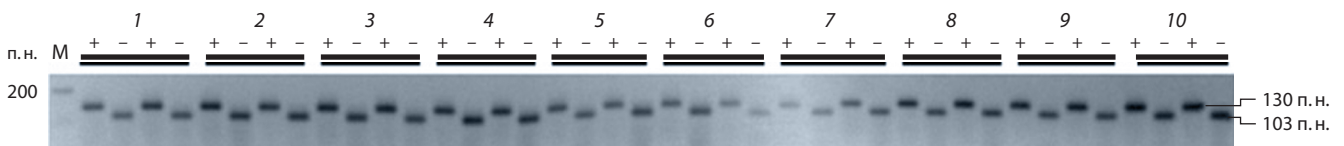


Рис. 3. Электрофореграмма CAPS-маркера гена *E2*. Каждый образец растений представлен ПЦР-продуктом до (+) и после (–) рестриктазной обработки.

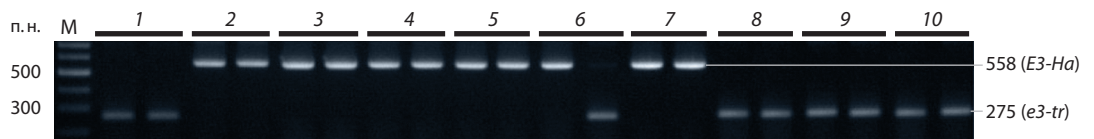


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *E3*. Продукт длиной 558 п.н. соответствует доминантному аллелю *E3-Ha*, длиной 275 п.н. – рецессивному аллелю *e3-tr*.

E3 (AB797201)	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTC-TTGTGTGATATGCT
Belgorodskaya 48	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTC-TTGTGTGATATGCT
Cassidi	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTC-TTGTGTGATATGCT
e3-fs (AB766210)	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTCTTTGTGTGATATGCT
Chera-1	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTCTTTGTGTGATATGCT
Gorinskaya	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTCTTTGTGTGATATGCT
SibНИИК-315	AGATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACCTCAAACACTCTTTGTGTGATATGCT

Рис. 5. Множественное выравнивание участка первого экзона гена *E3*, содержащего инсерцию Т, приводящую к сдвигу рамки считывания.

Референсные последовательности аллелей *e3-fs* (AB766210) и *E3* (AB797201).

проверена у всех сортов с продуктом, характерным для аллеля *E3-Ha* (см. выше), с помощью секвенирования ПЦР-продукта длиной 759/758 п. н., полученного с праймерами E3fsF/E3fsR (см. табл. 2, результат ПЦР не представлен). Выяснилось, что сорта СибНИИК-9, СибНИИК-315, Горинская и Чера-1 являются носителями аллеля *e3-fs*, а у сортов Кассиди и Белгородская 48 секвенированная последовательность полностью гомологична доминантному аллелю *E3-Ha* (рис. 5).

Наиболее распространенный из рецессивных аллелей гена *E4*, аллель *e4-SORE-1* возник вследствие инсерции *Tu1/copia*-ретротранспозона длиной 6238 п. н. в первый экзон (Liu et al., 2008). Маркер на данный ген позволяет выявить одновременно доминантный и рецессивный аллели *E4* по наличию ПЦР-продуктов длиной 1229 и 837 п. н. соответственно (см. табл. 2). ПЦР с использованием этого

маркера позволила выявить доминантный аллель у сортов Кассиди, Чера-1, Малага и Персона, тогда как у остальных сортов идентифицируется рецессивный аллель (рис. 6).

Ранее были разработаны маркеры к генам-активаторам цветения: *GmFT2a*, или гену *E9* (Zhao et al., 2016), и *GmFT5a* (Takeshima et al., 2016). Рецессивный аллель *e9* задерживает цветение за счет более низкой экспрессии гена, вызванной инсерцией ретротранспозона *SORE-1* в первый интрон (Zhao et al., 2016). Маркер (см. табл. 2) позволяет дискриминировать рецессивный и доминантный аллели *GmFT2a* по наличию ПЦР-продуктов длиной 440 и 307 п. н. соответственно. С использованием этого маркера у всех проанализированных образцов был выявлен характерный для доминантного аллеля *GmFT2a* продукт амплификации длиной 440 п. н. (рис. 7).

Существует доминантный аллель гена *GmFT5a* – *GmFT5a-H4*, сокращающий срок вегетации и отличающийся от рецессивного аллеля делецией 49 п. н. в составе 3'-UTR (Takeshima et al., 2016; Jiang et al., 2019). Для идентификации обоих аллелей *GmFT5a* нами разработана комбинация праймеров FT5aF/FT5aR, позволяющая амплифицировать участок делеции (см. табл. 2). Продукт 330 п. н., соответствующий доминантному аллелю, был обнаружен только у сорта Кассиди, у остальных сортов выявлен продукт длиной 379 п. н., соответствующий рецессивному аллелю (рис. 8). Для дополнительного уточнения установленных аллелей *GmFT5a* нами проведено секвенирование ПЦР-продукта у сортов Кассиди и Белгородская 48, согласно которому сорт Кассиди действительно содержал аллель *GmFT5a-H4* (данные не представлены).

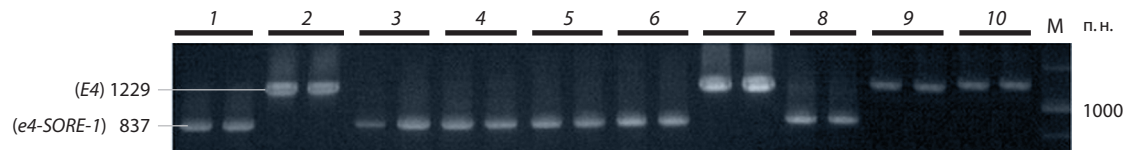


Рис. 6. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *E4*.

Продукт длиной 1229 п. н. соответствует доминантному аллелю *E4*, длиной 837 п. н. – рецессивному аллелю *e4-SORE-1*.

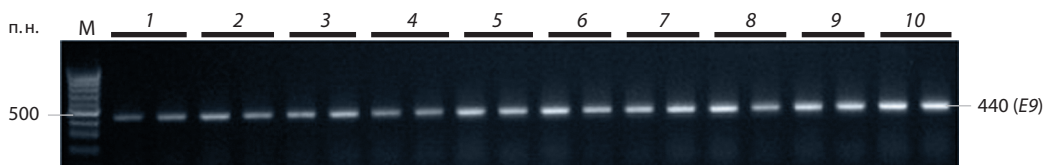


Рис. 7. Электрофореграмма ПЦР-продукта гена *GmFT2a*.

Продукт длиной 440 п. н. соответствует доминантному аллелю этого гена.

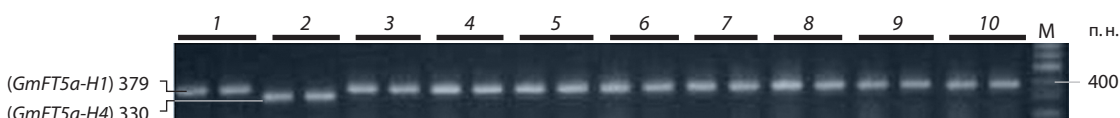


Рис. 8. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *GmFT5a*, полученного с праймерами GmFT5af2/r2.

Продукт длиной 379 п. н. соответствует рецессивному аллелю *GmFT5a-H1*, длиной 330 п. н. – доминантному аллелю *GmFT5a-H4*.

Обсуждение

Высокий потенциал адаптации сои позволяет успешно культивировать ее за пределами первичного ареала – в широком диапазоне климатических условий, включая высокоширотные регионы с умеренным климатом (Jia et al., 2014; Jiang et al., 2014). Такая адаптация во многом достигается за счет взаимодействия аллелей генов, контролирующих сроки цветения и созревания в зависимости от длины фотопериода (Saindon et al., 1989; Watanabe et al., 2012).

Период вегетации сои составляет от 75 до 170 дней. В зависимости от продолжительности этого периода сорта сои подразделяются на ультраскороспелые (менее 80 дней); очень скороспелые (81–90 дней); скороспелые (91–110 дней); среднескороспелые (111–120 дней); среднепоздние (120–130 дней); среднепоздние (131–150 дней); позднеспелые (151–160 дней); очень позднеспелые (161–170 дней) (Корсаков, 1973). В пределах России соя культивируется на Дальнем Востоке, в Центральном, Южном и Сибирском регионах. Каждый район произрастания характеризуется своими особенностями климата, следовательно, возникает необходимость отбора сортов, специфически адаптированных к той или иной территории с помощью эффективных методов маркер-опосредованной селекции. Для демонстрации ее возможностей и создания рабочей панели маркеров мы провели апробацию ранее разработанных комбинаций праймеров к основным генам ответа на фотопериод – *E1–E4*, и генам-активаторам цветения *GmFT* (Takeshima et al., 2016; Wu et al., 2017). Для этого использовали выборку из 10 сортов, различающихся по сроку созревания: от ультраскороспелого сорта Аннушка до среднескороспелого сорта Кассиди (средний период вегетации 80 и 115 дней соответственно). Установленные генотипы этих сортов по всем изученным генам представлены в табл. 1. Всего в данной выборке было выявлено пять комбинаций аллелей по генам *E1–E4*: 1) *e1-nl(e1-as)/e2-ns/e3-tr(e3-fs)/e4*; 2) *e1-as/e2-ns/e3-tr/E4*; 3) *e1-as/e2-ns/E3-Ha/e4*; 4) *E1/e2-ns/e3-tr/E4*; 5) *e1-nl/e2-ns/E3-Ha/E4*.

Все проанализированные сорта содержали наиболее распространенные доминантные и рецессивные аллели генов *GmFT2a* и *GmFT5a*, за исключением сорта Кассиди, у которого был обнаружен редкий доминантный аллель *GmFT5a-H4*. Первая комбинация *E1–E4* выявлена у двух ультраскороспелых и трех близких к ним по сроку вегетации скороспелых сортов. Она характеризуется присутствием рецессивных аллелей по каждому из четырех генов. Комбинация 2 с одним доминантным геном *E4* присутствует у сортов Чера-1 и Малага (срок вегетации 105 и 112 дней соответственно). Комбинация 3 с одним доминантным геном *E3-Ha* выявлена у сорта Белгородская 48 (108 дней). Комбинация 4, включающая доминантные гены *E1* и *E4*, характерна для сорта Персона со сроком вегетации 106 дней. Среднескороспелый сорт Кассиди содержит комбинацию 5 с двумя доминантными генами *E3-Ha* и *E4* и имеет самый продолжительный срок вегетации в данной серии сортов. У этого же сорта присутствует аллель *GmFT5a-H4*, который, согласно (Jiang et al., 2019), также может оказывать влияние на продолжительность вегетационного периода. Таким образом, нами показана преимущественная ассоциация генотипа, содержащего

рецессивные аллели генов *E1–E4*, с группой ультраскороспелых и очень скороспелых сортов, тогда как сорта с более поздним сроком вегетации характеризуются присутствием одного или двух доминантных аллелей по генам *E1*, *E3* или *E4* (см. табл. 1).

Структура установленных нами генотипов с преобладанием рецессивных аллелей по основным генам фотопериода характерна для большинства сортов из северных районов Китая (Jiang et al., 2014) и Японии (Xu et al., 2013). Так, в первой работе было установлено, что чувствительность к фотопериоду и срок вегетации снижаются обратно пропорционально количеству рецессивных аллелей *E1–E4*. Наименьшая чувствительность характерна для генотипа *e1/e2/e3/e4* у сортов, распространенных в северных широтах Китая. По международной классификации эти сорта относятся к группе MG000 очень ранних сортов, а согласно нашей отечественной классификации могут быть отнесены к группам ультраскороспелых и очень скороспелых сортов. Группы MG00 и MG0 ранних и среднеранних сортов имеют генотипы с одним или двумя доминантными генами, преимущественно *E3* и *E4*, на фоне рецессивных *e1* и *e2*. У этих групп срок вегетации составляет 91–110 и 111–120 дней соответственно, что соотносится с нашими скороспелыми и среднескороспелыми сортами. И наконец, группы сортов MGI–MGIV, как правило, имеют генотипы с тремя или четырьмя доминантными аллелями: *E1/e2/E3/E4*, *e1/E2/E3/E4* или *E1/E2/E3/E4*. Указанные генотипы распространены в средних и южных районах Китая, климатические условия которых способствуют более позднему сроку созревания (Jiang et al., 2014). Таким образом, проанализированные нами сорта относятся к группам MG000–MG0 по сроку вегетации и имеют сходный генотипический состав по генам фотопериода *E1–E4* с аналогичными сортами северных районов Юго-Восточной Азии, наиболее близких к территории Дальнего Востока – первичного ареала возделывания сои в нашей стране. Именно из этого региона селекционный материал сои распространился в Юго-Западную часть России, Сибирь и другие регионы.

Аллели *E1–E4* оказывают разное воздействие на чувствительность к фотопериоду и срок созревания. Предыдущие исследования показывают, что гены *E1* и *E2* оказывают большое влияние на фазу развития, непосредственно предшествующую стадии цветения, тогда как локусы *E3* и *E4* влияют не только на эту, но и на последующие фазы цветения и созревания (Xu et al., 2013; Jiang et al., 2014). Поэтому последние локусы очень важны в селекции по признаку продуктивности. Из них наибольший эффект на чувствительность к свету оказывает ген *E4*, рецессивная форма которого распространена в северных широтах, что также подтверждается нашими данными. Если же сравнивать два первых гена, то предполагается, что ген *E1* играет ключевую роль в детерминации цветения под действием фотопериода (Xia et al., 2012). Об этом свидетельствует и сравнение генотипов *E1/e2/E3/E4* и *e1/E2/E3/E4*, показавшее более значительное снижение реакции на фотопериод в случае генотипа с *e1* (Jiang et al., 2014). Почти все сорта в изученной нами выборке, за исключением сорта Персона, содержат нефункциональные аллели *e1-as* и *e1-nl*, которые, по-видимому, вносят основной вклад в сокращение

срока вегетации. Что касается рецессивного аллеля *e2*, то он присутствует во всех изученных нами сортах. Это согласуется с анализом сортов из Амурской области, который показал наличие доминантного аллеля *E2* только у одного сорта из восемнадцати (Jia et al., 2014).

Гены семейства *GmFT* являются активаторами цветения, и их транскрипция отрицательно коррелирует с экспрессией репрессора цветения *E1* (Xia et al., 2012). Наиболее сильные гены этого семейства – *GmFT2a* и *GmFT5a* (Takeshima et al., 2016). Несмотря на то что ген *GmFT2a* демонстрировал различные транскрипционные профили в разных условиях внешней среды и в отдельных сортах, различающихся по чувствительности к фотопериоду, его полиморфизм, как правило, не был ассоциирован со сроком вегетации (Jiang et al., 2013). В составе некоторых сортов была идентифицирована инсерция мобильного элемента *SORE-1* в первом интроне *GmFT2a*, которая подавляла транскрипцию данного гена и приводила к задержке цветения (Zhao et al., 2016). С использованием маркера на один из флангов инсерции (см. табл. 2) нами была установлена интактная форма гена *GmFT2a* у всех проанализированных сортов.

У ряда зарубежных сортов групп спелости MG000 и MG00 (к этим группам относятся и проанализированные нами сорта) была обнаружена делеция 49 п. н. в составе 3'-UTR гена *GmFT5a*, которая обуславливала уменьшение срока цветения относительно сортов с рецессивной формой гена (Takeshima et al., 2016; Jiang et al., 2019). Мы сконструировали праймеры, ограничивающие сайт делеции, и с помощью ПЦР и последующего секвенирования ПЦР-продукта показали наличие этой делеции у сорта Кассиди (см. рис. 8). Помимо указанной доминантной формы *GmFT5a*, потенциально сокращающей срок цветения, сорт Кассиди содержит два доминантных гена *E3* и *E4*, которые могут оказывать противоположное влияние на продолжительность вегетации. Однако механизм взаимодействия этих генов и их совместного влияния на срок вегетации еще предстоит выяснить.

Заключение

В настоящей работе впервые на материале сортов сои, допущенных к использованию в РФ, из регионов Западной Сибири и Белгородской области проведена апробация молекулярных маркеров к различным аллелям генов *E1–E4*, *GmFT*, отвечающим за реакцию на фотопериод и срок вегетации. Для сортов указанных регионов характерен укороченный срок вегетации и низкая чувствительность к фотопериоду. Эти особенности коррелируют с количеством рецессивных аллелей генов *E1–E4*: сорта с самым коротким сроком вегетации (ультраскороспелые) преимущественно имеют генотип *e1-nl(e1-as)/e2-ns/e3-tr(e3-fs)/e4*, тогда как сорта с более поздним сроком (скороспелые и среднескороспелые) характеризуются генотипами с наличием одного-двух доминантных аллелей, преимущественно по генам *E3* и *E4*. Этот результат генотипирования 10 сортов сои согласуется с данными зарубежных авторов, полученными на обширных выборках сортов из географических районов Японии и Северного Китая, приближенных по климатическим условиям Дальнему Востоку – району первичного возделывания сои в нашей

стране. Таким образом, апробированный набор молекулярных маркеров может быть использован для селекции отечественных сортов сои по признакам чувствительности к фотопериоду и сроку вегетации, от которых во многом зависит продуктивность этой культуры, особенно в условиях нетипичного для ее возделывания умеренного климата.

Список литературы / References

- Агаркова С.Н., Новикова Н.Е., Беляева Р.В., Головина Е.В., Беляева Ж.А., Цуканова З.Р., Митькина Н.И. Особенности формирования продуктивности и адаптивных реакций у сортов зернобобовых культур с рецессивными аллелями генов. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2016;177(2):22-39. DOI 10.30901/2227-8834-2016-2-22-39.
- [Agarkova S.N., Novikova N.E., Belyaeva R.V., Golovina E.V., Belyaeva Zh.A., Tsukanova Z.R., Mitkina N.I. Features of the formation of productivity and adaptive reactions in leguminous crop varieties with recessive alleles of genes. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2016;177(2):22-39. DOI 10.30901/2227-8834-2016-2-22-39. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1926;16(2):248.
- [Vavilov N.I. Centers of origin of cultivated plants. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1926;16(2):248. (in Russian)]
- Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. Л.: Колос, 1964.
- [Zhukovsky P.M. Cultivated Plants and Their Relatives. Leningrad: Kolos Publ., 1964. (in Russian)]
- Корсаков Н.И. Каталог генетической коллекции сои. Л., 1973.
- [Korsakov N.I. Soybean Genetic Collection Catalog. Leningrad, 1973. (in Russian)]
- Gorissen S.H.M., Crombag J.J.R., Senden J.M.G., Waterval W.A.H., Bieraau J., Verdijk L.B., Loon L.J.C. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*. 2018;50(12):1685-1695. DOI 10.1007/s00726-018-2640-5.
- Guo G., Xu K., Zhang X., Zhu J., Lu M., Chen F., Liu L., Xi Z.Y., Bachmair A., Chen Q., Fu Y.F. Extensive analysis of *GmFTL* and *GmCOL* expression in northern soybean cultivars in field conditions. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136601. DOI 10.1371/journal.pone.0136601.
- Hoffman J.R., Falvo M.J. Protein – which is best? *J. Sports Sci. Med*. 2004;3(3):118-130.
- Jia H., Jiang B., Wu C., Lu W., Hou W., Sun S., Yan H., Han T. Maturity group classification and maturity locus genotyping of early-maturing soybean varieties from high-latitude cold regions. *PLoS One*. 2014;9(4):e94139. DOI 10.1371/journal.pone.0094139.
- Jiang B., Nan H., Gao Y., Tang L., Yue Y., Lu S., Ma L., Cao D., Sun S., Wang J., Wu C., Yuan X., Hou W., Kong F., Han T., Liu B. Allelic combinations of soybean maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* result in diversity of maturity and adaptation to different latitudes. *PLoS One*. 2014;9(8):e106042. DOI 10.1371/journal.pone.0106042.
- Jiang B., Yue Y., Gao Y., Ma L., Sun S., Wu C., Hou W., Lam H.M., Han T. *GmFT2a* polymorphism and maturity diversity in soybeans. *PLoS One*. 2013;8(10):e77474. DOI 10.1371/journal.pone.0077474.
- Jiang B., Zhang S., Song W., Khan M., Sun S., Zhang C., Wu T., Wu C., Han T. Natural variations of *FT* family genes in soybean varieties covering a wide range of maturity groups. *BMC Genom*. 2019; 20(1):230. DOI 10.1186/s12864-019-5577-5.
- Kiseleva A.A., Shcherban A.B., Leonova I.N., Frenkel Z., Salina E.A. Identification of new heading date determinants in wheat 5B chromosome. *BMC Plant Biol*. 2016;16(8):35-46. DOI 10.1186/s12870-015-0688-x.

- Kong F., Liu B., Xia Z., Sato S., Kim B.M., Watanabe S., Yamada T., Tabata S., Kanazawa A., Harada K., Abe J. Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean. *Plant Physiol.* 2010; 154(3):1220-1231. DOI 10.1104/pp.110.160796.
- Liu B., Kanazawa A., Matsumura H., Takahashi R., Harada K., Abe J. Genetic redundancy in soybean photoreponses associated with duplication of phytochrome A gene. *Genetics.* 2008;180(2):995-1007. DOI 10.1534/genetics.108.092742.
- Saindon G., Voldeng H.D., Beversdorf W.D., Buzzell R.I. Genetic control of long daylength response in soybean. *Crop Sci.* 1989;29(6): 1436-1439. DOI 10.2135/cropsci1989.0011183X002900060021x.
- Samanfar B., Molnar S.J., Charette M., Schoenrock A., Dehne F., Golshani A., Belzile F., Cober E.R. Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, *E10*, in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130(2):377-390. DOI 10.1007/s00122-016-2819-7.
- Takeshima R., Hayashi T., Zhu J., Zhao C., Xu M., Yamaguchi N., Sayama T., Ishimoto M., Kong L., Shi X., Liu B., Tian Z., Yamada T., Kong F., Abe J. A soybean quantitative trait locus that promotes flowering under long days is identified as *FT5a*, a *FLOWERING LOCUS T* ortholog. *J. Exp. Bot.* 2016;67(17):5247-5258. DOI 10.1093/jxb/erw283.
- 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.
- Wang F., Nan H., Chen L., Fang C., Zhang H., Su T., Li S., Cheng Q., Dong L., Liu B., Kong F., Lu S. A new dominant locus, *E11*, controls early flowering time and maturity in soybean. *Mol. Breed.* 2019; 39(5):70. DOI 10.1007/s11032-019-0978.
- 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.
- Watanabe S., Hideshima R., Xia Z., Tsubokura Y., Sato S., Nakamoto Y., Yamana N., Takahashi R., Ishimoto M., Anai T., Tabata S., Harada K. Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3*. *Genetics.* 2009;182(4):1251-1262. DOI 10.1534/genetics.108.098772.
- Watanabe S., Xia Z., Hideshima R., Tsubokura Y., Sato S., Yamana N., Takahashi R., Anai T., Tabata S., Kitamura K., Harada K. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics.* 2011;188(2):395-407. DOI 10.1534/genetics.110.125062.
- Wu F., Sedivy E.J., Price W.B., Haider W., Hanzawa Y. Evolutionary trajectories of duplicated *FT* homologues and their roles in soybean domestication. *Plant J.* 2017;90(5):941-953. DOI 10.1111/tpj.13521.
- 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., Xu Z., Liu B., Kong F., Tsubokura Y., Watanabe S., Xia Z., Harada K., Kanazawa A., Yamada T., Abe J. Genetic variation in four maturity genes affects photoperiod insensitivity and PHYA-regulated post-flowering responses of soybean. *BMC Plant Biol.* 2013; 13:91. DOI 10.1186/1471-2229-13-91.
- 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., Liang S., Wu H., Zhang X., Liu B., Kong F., Yuan X., Li J., Xia Z. *GmFT4*, a homolog of *FLOWERING LOCUS T*, is positively regulated by *E1* and functions as a flowering repressor in soybean. *PLoS One.* 2014;9(2):e89030. DOI 10.1371/journal.pone.0089030.
- Zhao C., Takeshima R., Zhu J., Xu M., Sato M., Watanabe S., Kanazawa A., Liu B., Kong F., Yamada T., Abe J. A recessive allele for delayed flowering at the soybean maturity locus *E9* is a leaky allele of *FT2a*, a *FLOWERING LOCUS T* ortholog. *BMC Plant Biol.* 2016; 16(1):1-15. DOI 10.1186/s12870-016-0704-9.
- Zhu J., Takeshima R., Harigai K., Xu M., Kong F., Liu B., Kanazawa A., Yamada T., Abe J. Loss of function of the *E1-Like-b* gene associates with early flowering under long-day conditions in soybean. *Front. Plant Sci.* 2019;9:1867. DOI 10.3389/fpls.2018.01867.

ORCID ID

A.B. Shcherban orcid.org/0000-0003-1000-8228
E.A. Salina orcid.org/0000-0001-8590-847X

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта РНФ 21-76-30003. Размножение растений проводилось в ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» ИЦиГ СО РАН в рамках бюджетного проекта 0259-2021-0012.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.05.2021. После доработки 23.07.2021. Принята к публикации 27.07.2021.

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

Использование синтетической формы RS5 для получения новых интрогрессивных линий мягкой пшеницы

Р.О. Давоян¹✉, И.В. Бебякина¹, Э.Р. Давоян¹, Ю.С. Зубанова¹, Д.М. Болдаков¹, Д.С. Миков¹, В.А. Бибишев¹, А.Н. Зинченко¹, Е.Д. Бадаева²

¹ Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ davoyanro@mail.ru

Аннотация. Актуальной задачей селекции мягкой пшеницы является вовлечение генофонда диких сородичей, обладающих значительным запасом генетического разнообразия. Эффективный метод передачи ценного генетического материала от диких сородичей в культурную пшеницу – создание и использование в качестве «мостиков» синтетических форм. С этой целью в Национальном центре зерна им. П.П. Лукьяненко созданы геномно-замещенные, геномно-добавленные и рекомбинантные «вторичные» синтетические формы. Синтетическая форма RS5 (BBAASD⁵), у которой третий геном состоит из хромосом *Aegilops speltoides* (S) и *Aegilops tauschii* (D⁵), была получена от скрещивания синтетических форм Авродес (BBAASS) и M.it./*Ae. tauschii* (BBAAD⁵D⁵), у которой геном D от *Ae. tauschii* был добавлен к геномам BBAA твердой пшеницы Mutico italicum. От беккроссов с восприимчивыми к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе сортами мягкой пшеницы Краснодарская 99, Ростислав и Жировка были получены устойчивые к этим болезням интрогрессивные линии. Отобраны 12 линий, которые наряду с устойчивостью к болезням имеют высокие технологические характеристики зерна и муки. Цитологический анализ (C-banding) выявил хромосомные перестройки у шести из восьми исследуемых линий. Перестройки в основном затронули хромосомы генома D – 1D, 3D, 4D, 6D и 7D. Установлено, что генетический материал от синтетической формы RS5 в изученных линиях в большинстве случаев представлен в виде замещенных хромосом от *Ae. tauschii*. В линии 5791p17 обнаружено замещение хромосом 6D от *Ae. tauschii* и 7D от *Ae. speltoides*. Хромосомные замещения 4D(4D⁵), 6D(6D⁵) от *Ae. tauschii* и 7D(7S) от *Ae. speltoides* получены впервые. Молекулярный анализ 12 линий не выявил у них эффективных генов устойчивости к листовой ржавчине, предположительно присутствующих в синтетических формах M.it./*Ae. tauschii* и Авродес. Сделано предположение, что линии могут нести не идентифицированные ранее гены устойчивости к грибным болезням, в частности к листовой ржавчине, от видов *Ae. tauschii* и *Ae. speltoides*.

Ключевые слова: мягкая пшеница; синтетические формы; устойчивость к болезням; белок; клейковина; цитологический анализ; C-banding; замещенные хромосомы; транслокации.

Для цитирования: Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Миков Д.С., Бибишев В.А., Зинченко А.Н., Бадаева Е.Д. Использование синтетической формы RS5 для получения новых интрогрессивных линий мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):770-777. DOI 10.18699/VJ21.088

Using the synthetic form RS5 to obtain new introgressive lines of common wheat

R.O. Davoyan¹✉, I.V. Bebyakina¹, E.R. Davoyan¹, Y.S. Zubanova¹, D.M. Boldakov¹, D.S. Mikov¹, V.A. Bibishev¹, A.N. Zinchenko¹, E.D. Badaeva²

¹ National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ davoyanro@mail.ru

Abstract. The use of the gene pool of wild relatives, which have a significant reserve of genetic diversity, is of immediate interest for breeding common wheat. The creation and use of synthetic forms as “bridges” is an effective method of transferring valuable genetic material from wild relatives to cultivated wheat. For this purpose, genome addition, genome substitution and recombinant “secondary” synthetic forms have been created in the P.P. Lukyanenko National Center of Grain. The synthetic recombination form RS5 (BBAASD⁵), in which the third genome consists of chromosomes of *Aegilops speltoides* (S) and *Aegilops tauschii* (D⁵), was obtained from crossing the synthetic forms Avrodes (BBAASS) and M.it./*Ae. tauschii* (BBAAD⁵D⁵), in which the D genome from *Ae. tauschii* was added to the BBAA genomes of the durum wheat cultivar Mutico italicum. Introgression lines resistant to leaf rust, yellow rust and powdery mildew have been obtained from backcrosses with the susceptible common wheat cultivars Krasnodarskaya 99, Rostislav and Zhirovka. Twelve resistant lines that additionally have high technological characteristics of grain and flour have been selected. The cytological study (C-banding) has revealed chromosomal modifications in 6 of 8 lines under study. The rearrangements mainly affected the chromosomes of the D genome, 1D, 3D, 4D, 6D and 7D. It was found that in most cases the genetic material from the synthetic form RS5 in the studied lines was represented by substituted chromosomes from *Ae. tauschii*. In line 5791p17, the

substitution of chromosomes 6D from *Ae. tauschii* and 7D from *Ae. speltooides* was revealed. Substitutions 4D(4D⁵), 6D(6D⁵) from *Ae. tauschii* and 7D(7S) from *Ae. speltooides* were obtained for the first time. Molecular analysis of 12 lines did not reveal effective leaf rust resistance genes, presumably present in synthetic forms of M.it./*Ae. tauschii* and Avrodes. It is assumed that the lines may carry previously unidentified genes for fungal disease resistance, in particular for resistance to leaf rust, from *Ae. tauschii* and *Ae. speltooides*.

Key words: common wheat; synthetic forms; disease resistance; protein; gluten; cytological analysis; C-banding; substituted chromosomes; translocations.

For citation: Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Zubanova Y.S., Boldakov D.M., Mikov D.S., Bibishev V.A., Zinchenko A.N., Badaeva E.D. Using the synthetic form RS5 to obtain new introgressive lines of common wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):770-777. DOI 10.18699/VJ21.088

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) относится к числу главных продовольственных культур. Постоянно растущая потребность в повышении ее продуктивности на фоне глобальных климатических изменений требует дальнейшей интенсификации селекционного процесса. Одним из основных условий для этого является наличие достаточного генетического разнообразия и, в особенности, генов устойчивости к болезням. Актуальный и эффективный способ расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы – использование в качестве источников селекционно ценных признаков ее многочисленных родственных диких и культурных видов (Rasheed et al., 2018). Следует отметить, что почти все эффективные гены устойчивости к болезням мягкой пшеницы происходят из генофонда ее диких сородичей (McIntosh et al., 2015).

Использование синтетических форм признано эффективным методом передачи ценного генетического материала от диких сородичей мягкой пшенице. В Национальном центре зерна им. П.П. Лукьяненко был разработан оригинальный подход, позволивший создать геномно-замещенные, геномно-добавленные и рекомбинантные «вторичные» синтетические формы (Жиров, Терновская, 1984; Давоян Р.О. и др., 2012). С помощью геномно-замещенной формы Авродес (BBAASS) были выведены рекомбинантные синтетические формы (RS-формы), у которых на фоне геномов ВА третий геном рекомбинантный и состоит одновременно из геномов двух разных дикорастущих видов (Давоян Э.Р. и др., 2012). Эта форма, ввиду наличия у нее генома S от *Ae. speltooides*, обладает способностью стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenko et al., 1993), что должно было способствовать получению новых транслокаций и рекомбинаций между хромосомами различных видов.

Целью исследования было создание новых интрогрессивных линий мягкой пшеницы на основе синтетической формы RS5 (BBAASD⁵), у которой третий геном состоит из хромосом *Aegilops speltooides* (S) и *Ae. tauschii* (D⁵). Приведены результаты цитологического и молекулярного анализа, оценки по устойчивости к грибным болезням, компонентам продуктивности, технологическим качествам зерна и муки интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных с использованием данной синтетической формы.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили интрогрессивные линии мягкой пшеницы (BC₂F₆-BC₃F₅), производные от синтетической формы RS5. В качестве сортов-реципиен-

тов использовали восприимчивые к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе сорта мягкой пшеницы: Краснодарская 99 (линии 4942п17, 5038п17, 5658п19, 5714п18, 5766п19, 5791п17, 5845п18), Ростислав (линии 5001п17, 5656п19) и Жировка (линии 5725п18, 5733п19, 5785п18). Сорт Жировка имеет транслокацию 5BS.5BL-5GL, переданную от вида *T. militinae* через синтетическую форму *T. miguschovae*. У сорта Ростислав выявлена ржавая транслокация 1RS.1BL.

Изучение характера конъюгации хромосом в метафазе I мейоза проводилось в материнских клетках пыльцы на давленных препаратах, окрашенных уксуснокислым гематоксилином по общепринятой методике (Паушева, 1974). Количество изученных клеток у линий колебалось от 169 до 248 штук.

Устойчивость к листовой и желтой ржавчинам оценивали на стадии взрослых растений в полевых условиях, на фоне искусственного заражения. Для оценки устойчивости к желтой ржавчине применяли шкалу Гасснера и Штрайба (Gasner, Straib, 1934). Резистентность к листовой ржавчине определяли по шкале Майнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926). Растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые) относили к устойчивым. Устойчивость растений с промежуточным типом реакции, от 0 до 1 (единичные очень мелкие пустулы с некрозом), обозначали баллом 01. Растения с типом реакции 3–4 считались восприимчивыми. Устойчивость к мучнистой росе оценивалась на естественном инфекционном фоне по шкале Гешеле (Пересыпкин, 1979). К устойчивым относили растения со степенью поражения мучнистой росой 0–20 %.

Выделение ДНК проводили по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). Для идентификации генов *Lr* применяли праймеры, маркирующие гены *Lr28*, *Lr35*, *Lr39* и *Lr51*, – CS421570-R, CS421570-L; BCD260F1, 35R2; GDM35-L, GDM35-R и S30-13L, AGA7-759R соответственно (Seyfarth et al., 1999; Singh et al., 2004; Cherkuri et al., 2005; Helguera et al., 2005). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли согласно условиям, рекомендуемым авторами. Электрофорез фрагментов ПЦР проводили аналогично ранее описанной методике (Давоян Э.Р. и др., 2018).

Дифференциальное окрашивание хромосом (C-banding) выполнялось в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова согласно методике, разработанной Бадаевой с коллегами (Badaeva et al., 1994).

Технологические качества зерна и муки изучали в отделе технологии и биохимии зерна Национального центра

зерна им. П.П. Лукьяненко по методикам Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1988). Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе AGROS-2.10.

Результаты

Синтетическая форма RS5 проявляла высокую устойчивость к листовой и желтой ржавчине и умеренную устойчивость к мучнистой росе, при этом имела очень низкую фертильность. Для передачи устойчивости и восстановления фертильности форму RS5 скрещивали с восприимчивыми к этим болезням сортами мягкой пшеницы Краснодарская 99, Ростислав и Жировка. Первое поколение гибридных растений было частично фертильным и тоже проявляло устойчивость к комплексу болезней пшеницы. В зависимости от уровня фертильности растений проводили беккроссирование мягкой пшеницей от одного до трех раз, но в большинстве случаев для ее восстановления было достаточно двух беккроссов. Полученные от беккроссов растения имели от 40 до 42 хромосом. Результаты цитологического изучения хромосомных ассоциаций в метафазе I мейоза приведены в табл. 1.

В целом доля растений с мультивалентами не различалась по комбинациям скрещивания. На рис. 1 представлена конъюгация хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений.

У растений F₁, полученных от скрещивания рекомбинантной формы RS5 с мягкой пшеницей, наблюдалось большое количество мультивалентов (75 %), что объясняется непосредственным влиянием хромосом генома S, входящих в состав рекомбинантной стерильной формы, на конъюгацию хромосом различных геномов. Далее по мере увеличения числа беккроссов, которые проводились также с целью преодоления низкой фертильности гибридных растений F₁, количество растений с мультивалентами существенно уменьшается (до 9 %). Отбор растений по фертильности и устойчивости к болезням, самоопыление способствовали стабилизации мейоза и закреплению нужных признаков. В результате отбора растений по числу хромосом, близкому мягкой пшенице (42), из популяции гибридных растений на основе синтетика RS5 в настоящее время получено 82 линии. В данной статье представлены результаты изучения 12 линий, наиболее близких по фенотипу к сортам-реципиентам.

Основной целью при использовании формы RS5 была передача устойчивости к болезням мягкой пшеницы. В этой связи линии оценивались по устойчивости к наиболее распространенным и вредоносным болезням – листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.), желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) и мучнистой росе (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Характеристика интрогрессивных линий RS5 × *T. aestivum* по устойчивости к болезням за 2019–2021 гг. приведена в табл. 2.

Устойчивостью к листовой ржавчине обладали 11 линий. Высокую резистентность с типом реакции 01 и 1 проявили 8 линий: 4942п17, 5656п19, 5733п19, 5766п19, 5714п18, 5725п18, 5785п18 и 5845п18. Линия 5001п17 была восприимчива. Остальные линии имели умеренную устойчивость.

Таблица 1. Результаты изучения конъюгации хромосом в метафазе I мейоза поколения F₁ и BC₁F₁–BC₃F₁

Поколение	Изученные растения	
	Всего, шт.	В том числе с мультивалентами, шт.(%)
F ₁	12	9 (75)*
BC ₁ F ₁	31	16 (52)
BC ₁ F ₂ –BC ₂ F ₁	45	12 (27)
BC ₂ F ₂ –BC ₃ F ₁	80	7 (9)

* От общего числа растений, %.

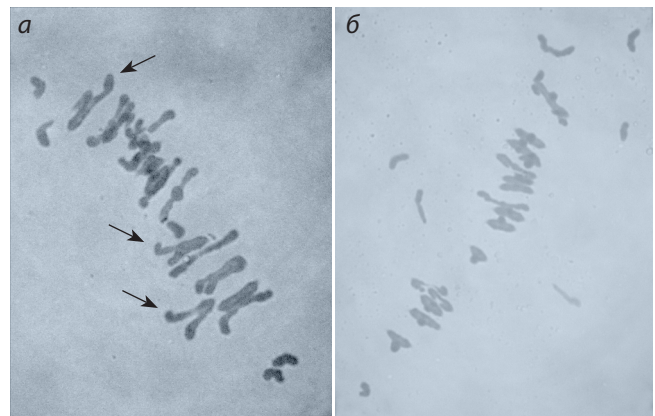


Рис. 1. Конъюгация хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений RS5 × Краснодарская 99: а – BC₁ (14^{II} + 4^I + 2^{III} + 1^{IV}); б – BC₂ (19^{II} + 4^I). Стрелками обозначены мультиваленты.

Таблица 2. Характеристика интрогрессивных линий RS5 × *T. aestivum* по устойчивости к комплексу болезней пшеницы (2019–2021 гг.)

Линия, сорт, синтетик	Устойчивость		
	к листовой ржавчине, тип реакции	к желтой ржавчине, тип реакции	к мучнистой росе, %
4942п17	1	2	15
5001п17	3	2	20
5038п17	2	2	25
5656п19	01	01	20
5658п19	2	2	15
5733п19	1	2	20
5766п19	1	2	15
5714п18	01	2	20
5725п18	1	1	20
5785п18	1	2	25
5791п17	2	01	15
5845п18	01	1	10
Краснодарская 99	4	3	25
Ростислав	4	4	30
Жировка	3	3	30
RS5	01	01	15

Таблица 3. Анализ мейоза в метафазе I в материнских клетках пыльцы у гибридов F₁, полученных от скрещивания цитологически стабильных линий RS5 × *T. aestivum* с сортом Краснодарская 99

Растительный материал	Изучено клеток	21 ^{II}	20 ^{II} +2 ^I	19 ^{II} +4 ^I	Клетки с мультивалентами
		%			
4942n17×K99*	214	77.4	16.6	4.7	1.3
5001n17×K99	185	80.7	10.3	6.4	2.6
5038n17×K99	190	67.4	32.6	–	–
5656n19×K99	237	80.5	15.4	3.3	1.8
5658n19×K99	248	65.4	30.4	4.2	–
5714n18×K99	185	48.7	38.4	10.7	2.2
5725n18×K99	210	56.2	29.5	12.4	1.9
5733n19×K99	317	68.6	19.2	9.8	2.4
5766n19×K99	262	67.2	23.7	8.4	1.7
5785n18×K99	247	77.4	12.8	7.5	2.3
5791n17×K99	169	44.7	43.1	12.2	–
5845n18×K99	223	58.3	36.8	4.9	–
Краснодарская 99	112	91.0	6.3	2.7	–

* Здесь и далее: K99 – сорт пшеницы Краснодарская 99.

Резистентность к желтой ржавчине несли все 12 линий. Четыре из них, 5656n19, 5725n18, 5791n17 и 5845n18, имеют тип реакции на заражение 01 и 1.

Устойчивость к мучнистой росе проявили 10 линий. Восприимчивыми оказались линии 5038n17 и 5785n18.

Особую ценность для селекции представляют линии, устойчивые к комплексу болезней. Три линии, 5001n17, 5038n17 и 5785n18, имели групповую устойчивость к двум болезням и девять линий – к трем болезням. Высокой резистентностью ко всем трем болезням обладала линия 5845n18. Разнообразие линий по устойчивости к болезням может свидетельствовать о различных интрогрессиях чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы.

Для того чтобы выяснить природу переданного материала от синтетической формы RS5, изучаемые линии были скрещены с одним из наиболее мейотически стабильных сортов мягкой пшеницы Краснодарская 99, после чего изучен мейоз у гибридных растений F₁ (табл. 3).

Ассоциация хромосом у гибридных растений F₁ 20^{II}+2^I и 19^{II}+4^I может свидетельствовать о замещении одной или двух пар пшеничных хромосом на чужеродные. Такие замещения могут быть у 4 линий из 12 анализируемых – 5038n17, 5658n19, 5791n17 и 5845n18. У гибридов сорта Краснодарская 99 с остальными линиями установлено наличие мультивалентов, что свидетельствует о том, что они могут нести транслокации от синтетика RS5 и сортов Ростислав и Жировка. Гибридные растения линий 5714n18, 5725n18, 5733n19, 5766n19 наряду с мультивалентами формируют значительное количество клеток (около 30 %) с ассоциацией хромосом 20^{II}+2^I и 19^{II}+4^I.

Таблица 4. Результаты анализа интрогрессивных линий RS5 × *T. aestivum* методом дифференциального окрашивания хромосом (C-banding)

Линия	Выявленные транслокации и замещения
5656n19	T1BL.1RS
5658n19	2A(2A ¹); 3D(3D ¹)
5714n18	T1BL.1RS; T2AL?; del.3BS; 4D(4D ¹)
5725n18	T1BL.1RS; T5BL.5GL; 4D(4D ¹); 6D(6D ¹)
5733n19	T5BS.5BL-5GL; 1D(1D ¹); 6D(6D ¹)
5785n18	T1BL.1RS; T5BL.5GL
5791n17	6D(6D ¹); 7D(7S)
5845n18	1D(1D ¹); 6D(6D ¹)

Вероятно, в этих линиях могут присутствовать и транслокации, и замещенные хромосомы.

Для идентификации генетического материала от синтетика RS5 и изменений в геноме у полученных линий применяли метод дифференциального окрашивания хромосом (C-banding). Из восьми проанализированных линий в шести выявлены интрогрессии от синтетика RS5 (табл. 4).

Перестройки в основном затронули хромосомы генома D. В большинстве случаев линии несут замещенные хромосомы от *Ae. tauschii*. Чаще всего в перестройках участвуют хромосомы 1D, 4D и 6D (рис. 2).

В линии 5658n19 были идентифицированы замещения 2A(2A¹) и 3D(3D¹). Линия 5791n17 имеет замещение хро-

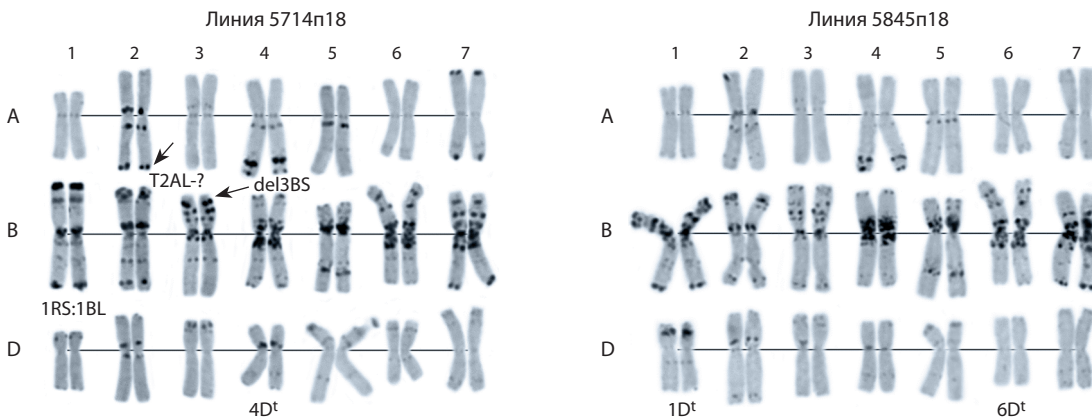


Рис. 2. Кариотипы интрогрессивных линий 5714n18 и 5845n18 с генетическим материалом рекомбинантной синтетической формы RS5.

мосом 6D от *Ae. tauschii* и 7D от *Ae. speltoides*. Следует отметить, что интрогрессивные линии с хромосомными замещениями 4D(4D^t), 6D(6D^t) от *Ae. tauschii* и 7D(7S) от *Ae. speltoides* идентифицированы впервые. В линии 5656п19 выявлена транслокация T1BL.1RS от сорта-реципиента Ростислав. В трех линиях – 5725п18, 5733п19 и 5785п18 – присутствует транслокация T5BL.5GL, полученная от сорта-реципиента Жировка. Интрогрессивные линии представляют особый интерес как возможные доноры новых генов устойчивости к болезням, в частности к листовой ржавчине, переданных от видов *Ae. tauschii* и *Ae. speltoides*. В настоящее время в каталог генных символов пшеницы внесено пять генов устойчивости от *Ae. tauschii*: *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*, *Lr39*, *Lr42* и шесть генов от *Ae. speltoides*: *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66* (McIntosh et al., 2015). Для идентификации генов устойчивости к листовой ржавчине у изучаемых нами линий использовали ДНК-маркеры. Ранее нами был проведен анализ синтетических форм Авродес и M.it./*Ae. tauschii* на присутствие эффективных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51* от *Ae. speltoides* и *Lr39* от *Ae. tauschii* (Давоян Э.Р. и др., 2012, 2018). Ген устойчивости *Lr36* в анализ не был включен в связи с отсутствием эффективного молекулярного маркера к нему. Идентификацию гена *Lr66* на данном этапе не проводили. Установлено, что синтетическая форма Авродес имеет из перечисленных генов только *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*, а синтетическая форма M.it./*Ae. tauschii* – ген *Lr39*. Исходя из этого интрогрессивные линии анализировали только на наличие у них эффективных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr39* и *Lr51*. Ни в одной из 12 линий искомые гены не обнаружены.

Для определения перспектив вовлечения выделенных интрогрессивных линий в селекционную практику мы оценивали их по технологическим качествам зерна и компонентам продуктивности. Здесь представлены результаты оценки шести фенотипически наиболее интересных линий урожая 2019 г.

Одними из наиболее важных агрономических признаков, в особенности для линий, несущих чужеродный генетический материал, являются технологические характеристики зерна и муки. Чужеродные интрогрессии

могут существенно влиять на технологические качества зерна и муки. Результаты анализа линий по некоторым технологическим показателям представлены в табл. 5. Содержание белка и клейковины у линий в значительной степени зависит от условий вегетационного периода. По этим характеристикам все исследуемые линии превышали лучший по технологическим показателям сорт-реципиент Краснодарская 99. Наивысшие показатели имели линии 5656п19 и 5725п18 – 18.6 и 17.9 % белка, 36.8 и 37.0 % клейковины соответственно. У сорта Краснодарская 99 содержание белка и клейковины составило 14.4 и 26 % (см. табл. 5).

Технологические характеристики зерна определяются не только содержанием белка и клейковины, но и качественными показателями клейковины, которые, в свою очередь, связаны с такими важными характеристиками, как объемный выход хлеба, цвет и пористость мякиша, вкусовые характеристики и т.д. Как правило, у линий, имеющих чужеродный генетический материал, наблюдается ухудшение качества клейковины. Так, все анализируемые линии имеют высокие показатели ИДК клейковины по сравнению с сортом-реципиентом Краснодарская 99. Однако у линий 5684п18 и 5733п19 качество клейковины соответствует первой группе качества по ГОСТ, а у линий 5656п19, 5658п19, 5725п18 и 5766п19 – второй группе, что считается неплохими показателями для интрогрессивных линий. Объемный выход хлеба у двух линий, 5658п19 и 5656п19, составил 820 и 950 мл соответственно, превысив объемный выход хлеба у сорта-реципиента Краснодарская 99 (800 мл). Значительные различия наблюдались между линиями по показателю общей хлебопекарной оценки. Три линии: 5658п19, 5684п18 и 5725п18 (4.5 балла) уступили по этому показателю сорту-реципиенту Краснодарская 99 (4.6 балла), а две линии: 5656п19 и 5766п19, получившие оценку 4.7 балла, незначительно превысили показатель сорта Краснодарская 99. Наилучшую хлебопекарную оценку имела линия 5733п19 – 4.8 балла.

Для изучения продуктивности применялись следующие показатели: масса 1000 зерен, масса зерна и количество колосьев с 1 м² (табл. 6). Масса 1000 зерен у линий варьировала от 38.0 г (линия 5733п19) до 43.9 г (5766п19) при

Таблица 5. Технологические характеристики зерна и муки интрогрессивных линий мягкой пшеницы RS5 × *T. aestivum*

Линия	Содержание, %		Показатель ИДК1, ед. падения	Объемный выход хлеба, мл	Общая оценка, баллов
	белка	клейковины			
5656п19	18.6	36.8	88	950	4.7
5658п19	15.8	29.3	82	820	4.5
5684п18	17.1	33.6	75	850	4.5
5725п18	17.9	37.0	81	860	4.5
5733п19	16.4	31.6	68	850	4.8
5766п19	14.9	27.9	80	860	4.7
K99	14.4	26.0	65	800	4.6
HCP ₀₅	0.3	1.4	2	19	–

Таблица 6. Компоненты урожайности интрогрессивных линий RS5 × *T. aestivum*

Линия	Масса 1000 зерен, г	Кол-во колосьев на 1 м ² , шт.	Масса зерна с 1 м ² , г
5656п19	40.3	307.7	483.5
5658п19	43.2	238.7	532.7
5684п18	42.3	223.5	486.5
5725п18	40.7	329.2	466.0
5733п19	38.0	305.8	583.5
5766п19	43.9	284.3	600.3
K99	37.4	321.7	603.7
HCP _{0.5}	0.62	16.9	16.5

среднем значении 37.4 г у сорта Краснодарская 99. Все линии, за исключением 5733п19, достоверно превышают по этому показателю сорт Краснодарская 99. Линии 5658п19, 5684п18 и 5766п19 формируют меньшее количество колосьев на 1 м² по сравнению с сортом Краснодарская 99. У остальных трех линий различия оказались несущественными. Наиболее высокую урожайность (600.3 г/м²), сравнимую с сортом Краснодарская 99 (603.7 г/м²), имела линия 5766п19. Остальные линии достоверно уступали сорту Краснодарская 99 по этому показателю.

Обсуждение

Создание синтетической формы RS5, прежде всего, было связано с возможностью передачи мягкой пшенице от *Ae. tauschii* и *Ae. speltooides* новых интрогрессий и, как следствие, новых генов устойчивости к болезням. Наряду с отбором устойчивых гибридных растений, важное значение в такой работе имеет их цитологическое изучение. Изучение конъюгации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений RS5 × *T. aestivum* выявило относительно большое количество растений с мультивалентами в ранних поколениях F₁ и BC₁F₁ – 75 и 52 % соответственно. Такие результаты объясняются способностью синтетической формы Авродес, полученной с участием *Ae. speltooides*, вызывать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenko et al., 1993). Существенное уменьшение

количества растений с мультивалентами в последующих поколениях BC₂F₁–BC₃F₁ (9 %) может быть связано со стабилизацией числа хромосом и их ассоциации в мейозе в сторону мягкой пшеницы, а также с уменьшением в них генетического материала *Ae. speltooides*.

Отобранные для изучения 12 линий RS5 × *T. aestivum* поколения BC₂F₆–BC₃F₅ различались по устойчивости к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. Выявлены линии с типами реакции к листовой ржавчине 01, 1 и 2, к желтой ржавчине 01, 1 и 2, со степенью поражения мучнистой росой 10, 15 и 20 %. Линии различаются также по устойчивости к комплексу перечисленных болезней. Разнообразие линий по устойчивости к болезням может свидетельствовать о различных интрогрессиях генетического материала RS5 в геноме мягкой пшеницы и возможной передаче нового гена(ов) устойчивости.

Цитологический анализ (C-banding) выявил хромосомные перестройки у шести из восьми исследуемых линий. Перестройки в основном затронули хромосомы генома D – 1D, 3D, 4D, 6D и 7D. Установлено, что генетический материал от синтетической формы RS5 в изученных линиях в большинстве случаев представлен в виде замещенных хромосом от *Ae. tauschii*. В одной линии, 5791п17, выявлено замещение хромосом 6D от *Ae. tauschii* и 7D от *Ae. speltooides*. Следует отметить, что хромосомные замещения 4D(4D^d), 6D(6D^d) от *Ae. tauschii* и 7D(7S) от *Ae. speltooides* получены впервые. Активное участие в перестройках хромосом генома D объясняется, во-первых, тем, что *Ae. tauschii* является донором генома D, а во-вторых, что в синтетической форме Авродес (BBAASS) геном D мягкой пшеницы замещен на геном S от *Ae. speltooides*. В линии 5656п19 выявлена транслокация T1BL.1RS от сорта-реципиента Ростислав. При этом, в отличие от сорта Ростислав, линия обладает устойчивостью к листовой ржавчине (01) и желтой ржавчине (01) и высокими показателями содержания белка и клейковины (18.6 и 35.8 % соответственно). Вероятно, передача генетического материала от RS5 этой линии произошла посредством рекомбинации, которая не определяется методом C-banding. В трех линиях – 5725п18, 5733п19 и 5785п18 – выявлена транслокация T5BL.5GL, полученная от сорта-реципиента Жировка. В настоящее время эта транслокация не обеспечивает устойчивость к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе.

От вида *Ae. tauschii* мягкой пшенице переданы гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*, *Lr39*, *Lr42*, от *Ae. speltooides* – *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66*, *LrASP5* (Адолина и др., 2012; McIntosh et al., 2015). Эти гены были перенесены от *Ae. tauschii* в хромосомы мягкой пшеницы 1D, 2D, 3D, 2D и 1D соответственно; от *Ae. speltooides* – в 4A, 2B, 6B, 7A, 1B, 3A и 5B соответственно (Friebe et al., 1996; Helguera et al., 2000, 2005; Marais et al., 2010). Несмотря на большое число переданных генов, не исключено, что у этих видов могут присутствовать другие гены устойчивости к листовой ржавчине, о чем свидетельствуют также предыдущие результаты (Давоян и др., 2017).

На основании маркерного анализа ранее было сделано предположение, что синтетическая форма M.it/*Ae. tauschii* имеет из перечисленных генов *Lr39*, а Авродес – только *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*. Ни в одной из 12 анализируемых линий искомые гены не установлены. Вероятно, эти линии могут иметь новые гены устойчивости к листовой ржавчине от *Ae. tauschii* и *Ae. speltooides*.

Генетический материал диких сородичей в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы наряду с положительными признаками может нести и нежелательные, такие как удлинение вегетационного периода, ухудшение хлебопекарных качеств, склонность к полеганию, снижение урожайности и др. (Knott, 1989; Brevis et al., 2008; Тимонова и др., 2012; Леонова, Будашкина, 2016).

Изучение шести наиболее интересных по фенотипу линий выявило их разнообразие по продуктивности и технологическим характеристикам зерна и муки. Исследуемые линии превосходили сорт-реципиент Краснодарская 99 по содержанию белка и клейковины. Наивысшие показатели имели линии 5656п19 и 5725п18 – 18.6 и 17.9 % белка, 36.8 и 37.0 % клейковины соответственно. Несмотря на то что у всех анализируемых линий более высокие показатели ИДК клейковины по сравнению с сортом Краснодарская 99, они формируют клейковину, соответствующую первой и второй группе ГОСТ, и имеют либо равную с Краснодарской 99, либо более высокую общую хлебопекарную оценку. Таким образом, наряду с устойчивостью к болезням, изученные линии могут быть использованы как доноры для улучшения технологических качеств зерна и муки.

Все линии, за исключением 5733п19, достоверно превышали по массе 1000 зерен сорт Краснодарская 99. По количеству колосьев на 1 м² линии имеют равные (5656п19, 5725п18, 5733п19) или более низкие показатели (5658п19, 5684п18 и 5766п19) по сравнению с сортом Краснодарская 99. По показателю «масса зерна с 1 м²» все линии, кроме 5766п19, достоверно уступали сорту Краснодарская 99. Пониженную продуктивность линий по сравнению с Краснодарской 99 предварительное можно связать с тем, что на фоне существенно высокого содержания белка (за исключением линии 5766п19), что, как правило, отрицательно коррелирует с урожайностью, они формируют либо равное, либо значительно меньшее количество колосьев на 1 м². Отметим также, что Краснодарская 99 относится числу высокоурожайных сортов озимой мягкой пшеницы.

Заключение

Представленные результаты свидетельствуют о широком разнообразии полученных интрогрессивных линий и эффективности использования синтетической формы RS5 для передачи мягкой пшенице генетического материала от *Ae. tauschii* и *Ae. speltooides*.

Список литературы / References

- Адолина И.Г., Петраш Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание и изучение устойчивых к листовой ржавчине линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltooides* Tauch. *Генетика*. 2012;48(4):488-494.
- [Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Y.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltooides* Tausch. *Genetic material. Russ. J. Genet.* 2012;48(4):404-409. DOI 10.1134/S1022795412020020.]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зинченко А.Н., Давоян Э.Р., Кравченко А.М., Зубанова Ю.С. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):44-51.
- [Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zubanova Y.S. The use of synthetic forms in preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2(6):480-485. DOI 10.1134/S2079059712060044.]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Бадаева Е.Д., Адолина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С. Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltooides* мягкой пшенице. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284.
- [Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N., Zubanova Y.S. Use of a synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltooides* to common wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017; 21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284. (in Russian)]
- Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зубанова Ю.С., Зинченко А.Н., Кравченко А.М. Идентификация генов устойчивости к листовой ржавчине в видах *Aegilops* L., синтетических формах и интрогрессивных линиях мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):116-122.
- [Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Yu.S., Kravchenko A.M., Zinchenko A.N. Identification of a leaf rust-resistance gene in species of *Aegilops* L., synthetic forms, and introgression lines of common wheat. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2(4):325-329. DOI 10.1134/S2079059712040041.]
- Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Бибишев В.А. Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops tauschii* по устойчивости к листовой ржавчине. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):97-101. DOI 10.18699/VJ18.336.
- [Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Y.S., Boldakov D.M., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Bibishev V.A. Study of introgressive lines of common wheat with *Aegilops tauschii* genetic material for resistance to leaf rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):97-101. DOI 10.18699/VJ18.336. (in Russian)]
- Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. *Вестн. с.-х. науки*. 1984;10:58-66.
- [Zhiron E.G., Ternovskaya T.K. Genome engineering in wheat. *Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Science*. 1984;10:58-66. (in Russian)]

- Леонова И.Н., Будашкина Е.Б. Изучение признаков продуктивности у интрогрессивных линий *Triticum aestivum/Triticum timopheevii*, устойчивых к грибным болезням. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(3):311-319. DOI 10.18699/VJ16.120.
[Leonova I.N., Budashkina E.B. The study of agronomical traits determining the productivity of the *Triticum aestivum/Triticum timopheevii* introgression lines with resistance to fungal diseases. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(3):299-307. DOI 10.1134/S2079 059717030091.]
- Методика Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1988.
[Methods of State Crop Variety Trial. Moscow, 1988. (in Russian)]
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974.
[Pausheva Z.P. Laboratory Manual on Plant Cytology. Moscow: Kolos Publ., 1974. (in Russian)]
- Пересыпкин В.Ф. Болезни зерновых культур. М.: Колос, 1979; 251-260.
[Peresipkin V.F. Diseases of Grain Cultures. Moscow: Kolos Publ., 1979;251-260. (in Russian)]
- Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Росеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):142-159.
[Timonova E.M., Leonova I.N., Belan I.A., Rosseeva L.P., Salina E.A. The influence of particular chromosome regions of *Triticum timopheevii* on the formation of resistance to diseases and quantitative traits in common wheat. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012; 2(4):330-343.]
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Interspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum*. *Plant Syst. Evol.* 1994;192(1):117-145. DOI 10.1007/BF00985912.
- Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A., Jackson L., Morris C.F., Dubcovsky J. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47*. *Crop Sci.* 2008;48:1441-1451. DOI 10.2135/cropsci2007.09.0537.
- Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Haq Q.M.R. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica*. 2005; 143:19-26. DOI 10.1007/s10681-005-1680-6.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277.
- Gasner G., Straib U.W. Weitere Untersuchungen über die Spezialisierung sverhältnissesdes Gelbrostes *Puccinia glumarum* (Schm.) Erikss. u. Henn. *Arb. Boil. Reichsanstalt*. 1934;21:121-145.
- Helguera M., Khan I.A., Dubcovsky J. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. *Theor. Appl. Genet.* 2000; 100:1137-1143. DOI 10.1007/s001220051397.
- Helguera M., Vanzetti L., Soria M., Khan I.A., Kolmer J., Dubcovsky J. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci.* 2005;45(2):728-734. DOI 10.2135/cropsci2005.0728.
- Knott D.R. The effect of transfers of alien genes for leaf rust resistance on the agronomic and quality characteristics of wheat. *Euphytica*. 1989;44(1-2):65-72. DOI 10.1007/BF00022601.
- Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. *Phytopathology*. 1926;16:89-120.
- Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A., Mccallum B., Fetch T., Marais A.S. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides*. *Euphytica*. 2010;171(1):71-85. DOI 10.1007/s10681-009-9996-2.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2013–2014 Supplement. KOMUGI Integrated Wheat Science Database, 2015. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2013.pdf>
- Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912.
- Rasheed A., Mujeeb-Kazi A., Ogbonnaya F.C., He Z., Rajaram S. Wheat genetic resources in the post-genomics era: promise and challenges. *Ann. Bot.* 2018;121:603-616. DOI 10.1093/aob/mcx148.
- Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. Development of molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1999;99:554-560. DOI 10.1007/s001220051268.
- Singh S., Franks C.D., Huang L., Brown-Guedira G.L., Marshall D.S., Gill B.S., Fritz A. *Lr41*, *Lr39* and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108:586-591. DOI 10.1007/s00122-003-1477-8.
- Tsatsenco L.V., Zhiron E.G., Davoyan R.O. Hybrids between wheat and genome-substituted form Avrodes. Cytogenetics and agronomy investigations. *Cereal Res. Commun.* 1993;21(1):45-50.

ORCID ID

R.O. Davoyan orcid.org/0000-0002-6771-5161

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.08.2021. После доработки 27.08.2021. Принята к публикации 27.08.2021.

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

Субкомпартаментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий

И.В. Уколова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ irina@sifibr.irk.ru

Аннотация. Система окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) митохондрий поддерживает все жизненно важные энергозатратные процессы в клетках эукариот, обеспечивая их энергией в форме АТФ. Ферменты ОКСФОС (комплексы I–V) локализуются во внутренней мембране митохондрий, преимущественно в кристном субкомпарменте. К настоящему времени получен значительный объем данных, указывающих на то, что дыхательные комплексы I, III₂ и IV в условиях *in vivo* могут физически взаимодействовать друг с другом в различной стехиометрии, образуя суперкомплексы. Несмотря на активное накопление знаний о структуре основных суперкомплексов системы ОКСФОС, ее физическая и функциональная организация *in vivo* остается неясной. Современные модели организации ОКСФОС во внутренней мембране митохондрий противоречивы и предполагают существование либо высокоорганизованных дыхательных цепочек, либо, наоборот, набора случайно расположенных дыхательных суперкомплексов и комплексов. При этом предполагается, что АТФ-синтаза (комплекс V) не образует ассоциаций с дыхательными ферментами и работает автономно. Наши последние данные, полученные на митохондриях этиолированных побегов гороха, указывают на возможность физической ассоциации дыхательных суперкомплексов и димерной АТФ-синтазы. Эта информация позволила пересмотреть существующие представления об организации фосфорилирующей системы и предложить новую субкомпартаментационную оксфосомную модель. Согласно новой модели, значительная часть комплексов ОКСФОС формирует оксфосомы, которые в определенной стехиометрии включают комплексы I–V и располагаются преимущественно в кристном субкомпарменте митохондрий в виде высокоорганизованных цепочек или «патчей», представляющих собой «мини-фабрики» по производству АТФ. Предполагается, что такая организация способствует увеличению эффективности работы системы ОКСФОС; открывает новые возможности для регуляции ее активности и в той или иной степени может определять морфологию внутренней мембраны митохондрий. В обзоре подробно обсуждается предлагаемая модель. Для лучшего понимания вопроса кратко рассмотрена история развития представлений об организации системы ОКСФОС с акцентом на современные модели, а также приведены накопленные за последние сорок лет основные экспериментальные данные, подтверждающие обоснованность оксфосомной гипотезы.

Ключевые слова: система окислительного фосфорилирования; митохондрии; оксфосома; модели организации ОКСФОС; суперкомплексы.

Для цитирования: Уколова И.В. Субкомпартаментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):778-786. DOI 10.18699/VJ21.089

The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria

I.V. Ukolova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ irina@sifibr.irk.ru

Abstract. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system of mitochondria supports all the vitally important energy-consuming processes in eukaryotic cells, providing them with energy in the form of ATP. OXPHOS enzymes (complexes I–V) are located in the inner mitochondrial membrane, mainly in the cristae subcompartment. At present, there is a large body of data evidencing that the respiratory complexes I, III₂ and IV under *in vivo* conditions can physically interact with each other in diverse stoichiometry, thereby forming supercomplexes. Despite active accumulation of knowledge about the structure of the main supercomplexes of the OXPHOS system, its physical and functional organization *in vivo* remains unclear. Contemporary models of the OXPHOS system's organization in the inner membrane of mitochondria are contradictory and presume the existence of either highly organized respiratory strings, or, by contrast, a set of randomly dispersed respiratory supercomplexes and complexes. Furthermore, it is assumed that ATP-synthase (complex V) does not form associations with respiratory enzymes and operates autonomously. Our latest data obtained on mitochondria of etiolated shoots of pea evidence the possibility of physical association between the respiratory supercomplexes and dimeric ATP-synthase. These data have allowed us to reconsider the contemporary concept of the phosphorylation system organization and propose a new subcompartmented oxphosomic model. According to this

model, a substantial number of the OXPHOS complexes form oxphosomes, which in a definite stoichiometry include complexes I–V and are located predominantly in the cristae subcompartment of mitochondria in the form of highly organized strings or patches. These suprastructures represent “mini-factories” for ATP production. It is assumed that such an organization (1) contributes to increasing the efficiency of the OXPHOS system operation, (2) involves new levels of activity regulation, and (3) may determine the inner membrane morphology to some extent. The review discusses the proposed model in detail. For a better understanding of the matter, the history of development of concepts concerning the OXPHOS organization with the emphasis on recent contemporary models is briefly considered. The principal experimental data accumulated over the past 40 years, which confirm the validity of the oxphosomic hypothesis, are also provided.

Key words: system of oxidative phosphorylation; mitochondria; oxphosome; models of the OXPHOS organization; supercomplexes.

For citation: Ukolova I.V. The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):778-786. DOI 10.18699/VJ21.089

Введение

Система окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) митохондрий является основным источником энергии, производимой в виде АТФ, которая необходима для поддержания всех жизненно важных метаболических процессов, протекающих в клетках аэробных эукариотических организмов. Ферменты ОКСФОС локализованы во внутренней мембране митохондрий и включают пять функциональных комплексов (I–V), каждый из которых представляет собой сложно организованную молекулярную машину: комплекс I – НАДН-дегидрогеназа; комплекс II – сукцинатдегидрогеназа; комплекс III – цитохром-*bc1*-комплекс; комплекс IV – цитохром *c* оксидаза; комплекс V – АТФ-синтаза. Четыре первых фермента образуют дыхательную цепь и последовательно вовлечены в процесс переноса электронов от окисляемого субстрата на молекулярный кислород. Этот процесс в комплексах I, III и IV сопряжен с транслокацией протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, в результате чего образуется электрохимический протонный градиент, который используется АТФ-синтазой для синтеза АТФ. Кроме того, к системе ОКСФОС относят мобильные переносчики электронов, убихинон и цитохром *c* (Enríquez, 2016), и сопряженные с АТФ-синтазой переносчики адениновых нуклеотидов и неорганического фосфата (Лужиков, 2009).

Компоненты системы трансформации энергии составляют основную массу белков внутренней мембраны митохондрий и, по разным данным, занимают от половины до двух третей ее гидрофобного объема (Vonck, 2012; Schlame, 2021). К настоящему времени накопилось много данных, указывающих на более высокую, чем предполагалось ранее, степень организации ферментов ОКСФОС в условиях *in vivo*, а именно на существование дыхательных суперкомплексов различной стехиометрии, включающих комплексы I, димер III₂ и IV, и олигомерных рядов АТФ-синтазы (Vonck, 2012; Chaban et al., 2014). Считается, что такая компактная надмолекулярная организация позволяет избежать неспецифической агрегации ферментов и деформации липидного бислоя (Guigas, Weiss, 2016), повышает эффективность дыхания и защищает клетку от окислительного стресса (Lenaz, Genova, 2012).

Однако, несмотря на то что структура основных суперкомплексов хорошо изучена, физическая и функциональная организация системы ОКСФОС *in vivo* остается неизвестной и до сих пор является предметом споров.

Активный интерес к данному вопросу объясняется тем, что правильное представление о нативной организации энергетической системы митохондрий не только открывает новые возможности для дальнейшего развития митохондриологии, но и определяет новые пути решения таких жизненно важных задач человечества, как терапия болезней, связанных с митохондриальными дисфункциями.

Возможные варианты расположения суперкомплексов во внутренней митохондриальной мембране активно обсуждаются в современных моделях организации фосфорилирующей системы, которые порой противоречивы и предполагают существование либо высокоорганизованных дыхательных цепочек, либо, наоборот, свободно диффундирующих в плоскости мембраны суперкомплексов и комплексов дыхательной цепи. При этом предполагается, что АТФ-синтаза не образует ассоциаций с дыхательными ферментами и функционирует автономно.

На основании новых данных, полученных нами с использованием митохондрий побегов гороха, недавно была предложена субкомпарментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы (Ukolova et al., 2020). В отличие от существующих моделей, она постулирует, что значительная часть дыхательных суперкомплексов взаимодействует с димерной АТФ-синтазой *in vivo*, формируя оксфосомы, которые располагаются преимущественно в кристном субкомпарменте митохондрий в виде высокоорганизованных цепочек или «патчей» (рис. 1, *e*). Предполагается, что такая организация существенно увеличивает эффективность и обеспечивает дополнительные уровни контроля за работой системы ОКСФОС. Новая модель подробно рассматривается ниже. Для лучшего понимания вопроса и оценки ее обоснованности в статье представлены краткая история эволюции взглядов на организацию ОКСФОС, а также литературные данные, поддерживающие оксфосомную гипотезу.

Краткий экскурс в историю развития представлений об организации системы ОКСФОС митохондрий *in vivo*

Физическая целостность дыхательной цепи (т. е. объединенность ее компонентов) предполагалась еще Д. Кейлином в его работах 1930–1940-х гг. (Keilin, 1930; Keilin, Hartree, 1939, 1949). Долгое время считалось, что все ферменты дыхательной цепи стабильно взаимодействуют, образуя «дыхательные ансамбли» (Chance, Williams, 1956;

Lehninger, 1959). Такое агрегатное состояние дыхательной цепи называли «твердым» (Lehninger, 1959; Rich, 1981) (см. рис. 1, а). По мере получения новых данных на смену «твердой» модели пришла «жидкостная» (Hackenbrock et al., 1986) (см. рис. 1, б). Эта модель исключала физическую ассоциацию компонентов ОКСФОС и постулировала, что все редокс-компоненты, участвующие в переносе электронов, и белки, необходимые для синтеза АТФ, являются «независимыми латеральными диффузантами», которые взаимодействуют в результате множественных столкновений.

Несмотря на большой объем данных, свидетельствующих в пользу «жидкостной» модели, продолжали накапливаться факты, указывающие на существование *in vivo* ассоциаций комплексов дыхательной цепи, а также олигомерной АТФ-синтазы. Поворотным стал 2000 г., когда Г. Шэггер с коллегами, используя разработанный ими метод голубого нативного электрофореза (BN-PAGE), получили убедительные доказательства физического взаимодействия дыхательных комплексов с образованием суперкомплексов и фактически обновили и вернули «твердую» модель, предложив концепцию респирасомы (Schägger, Pfeiffer, 2000) (см. рис. 1, в). Согласно этой модели, обнаруженные суперкомплексы являются строительными блоками, которые могут взаимодействовать и формировать сеть дыхательных суперкомплексов, т. е. респирасому. Позднее авторы стали называть респирасомой также отдельный суперкомплекс, включающий дыхательные комплексы I, III₂ и IV, который мог самостоятельно «дышать», т. е. выполнять весь цикл переноса электронов от окисляемого субстрата на молекулярный кислород (Schägger, 2002). В результате термин прижился и сейчас используется именно в этом контексте.

Современное представление об организации энергетической системы митохондрий *in vivo*

Филогенетическая консервативность организации компонентов ОКСФОС

С появлением BN-PAGE и успешным сочетанием этого метода с криоэлектронной микроскопией и энзимографией, а также другими методами, изучение надмолекулярной организации системы ОКСФОС в митохондриях различных организмов вышло на новый уровень. Дальнейшие исследования системы ОКСФОС в митохондриях млекопитающих, растений, грибов, дрожжей, водорослей и некоторых простейших выявили схожий состав суперкомплексов (Krause et al., 2004; Chaban et al., 2014). Все изученные надмолекулярные ассоциации компонентов ОКСФОС, полученные в результате солиubilизации митохондрий мягкими детергентами, можно разделить на четыре основные группы: 1) суперкомплекс I₁III₂; 2) суперкомплексы III₂IV₁₋₂; 3) респирасомы I₁III₂IV₁₋₄; 4) димерная АТФ-синтаза. В некоторых видах дополнительно были обнаружены дыхательные суперкомплексы с другим составом и стехиометрией (Ukolova et al., 2020). Димеры АТФ-синтаз *in vivo* ассоциируют друг с другом, образуя длинные олигомерные цепочки, расположенные вдоль сильно изогнутых краев крист внутренней мембраны (Kühlbrandt, 2019). Имеются убедительные данные,

указывающие на то, что именно димеризация АТФ-синтазы с последующей олигомеризацией способствует формированию крист.

В настоящее время существуют две альтернативные модели расположения дыхательных суперкомплексов и комплексов ОКСФОС во внутренней мембране митохондрий, которые фактически представляют собой современные версии «твердой» и «жидкостной» моделей, – это модель высокоорганизованных дыхательных цепочек и «патчей» (Nübel et al., 2009; Wittig, Schägger, 2009) и «пластичная» модель (Acín-Pérez et al., 2008; Enríquez, 2016). Первая описывает цепочки ассоциированных друг с другом дыхательных суперкомплексов (см. рис. 1, з), тогда как вторая постулирует случайное распределение суперкомплексов и комплексов в мембране (см. рис. 1, д). При этом обе модели предполагают раздельное расположение и автономное функционирование дыхательных суперкомплексов и олигомерных рядов АТФ-синтаз.

Дыхательные цепочки и «патчи»

Модель возникла в результате дальнейшего развития модели респирасомы (Schägger, Pfeiffer, 2000). На основании новых данных, полученных с использованием BN-методов, Г. Шэггер с коллегами (Nübel et al., 2009; Wittig, Schägger, 2009) предположили, что дыхательные суперкомплексы во внутренней мембране митохондрий могут быть «строительными блоками» для более крупных структур, а именно дыхательных цепочек и даже «патчей». Дыхательные цепочки представляют собой линейные ряды ассоциированных друг с другом суперкомплексами (см. рис. 1, з). Связующими звеньями между суперкомплексами выступают, в зависимости от вида и организма, димеры или тетрамеры комплекса IV (Wittig, Schägger, 2009). По мнению авторов, дыхательные цепочки могут располагаться параллельно друг другу в плоскости мембраны и взаимодействовать через мономеры комплекса I с образованием структур более высокого порядка, называемых «патчами» (Nübel et al., 2009).

Убедительным доводом в пользу этой модели стала идентификация (при помощи модифицированных нативных гелей с большими порами) мультимерных дыхательных суперкомплексов с видимыми массами от 4–8 до 35–45 МДа (Strecker et al., 2010). Исследователи опирались также на более ранние пионерные работы Р.Д. Аллена с коллегами (Allen et al., 1989), в которых при помощи криоэлектронной микроскопии удалось зафиксировать не только олигомерные ряды АТФ-синтаз на внешнем изгибе тубулярных крист *Paramecium multimicronucleatum*, но и дополнительный ряд крупных частиц на их внутреннем изгибе, расположенных на одинаковом расстоянии друг от друга и соответствующих по размеру димерному комплексу I. Г. Шэггер и И. Виттиг (Wittig, Schägger, 2009) предположили, что этот дополнительный ряд представляет собой дыхательную цепочку, и предложили ее вариант для митохондрий млекопитающих (см. рис. 1, з). Варианты дыхательных цепочек для картофеля и *Polytomella* sp. были разработаны и другими исследователями (Bultema et al., 2009; Miranda-Astudillo et al., 2018). При этом цепочки располагались параллельно олигомерным рядам АТФ-синтаз (Miranda-Astudillo et al., 2018).

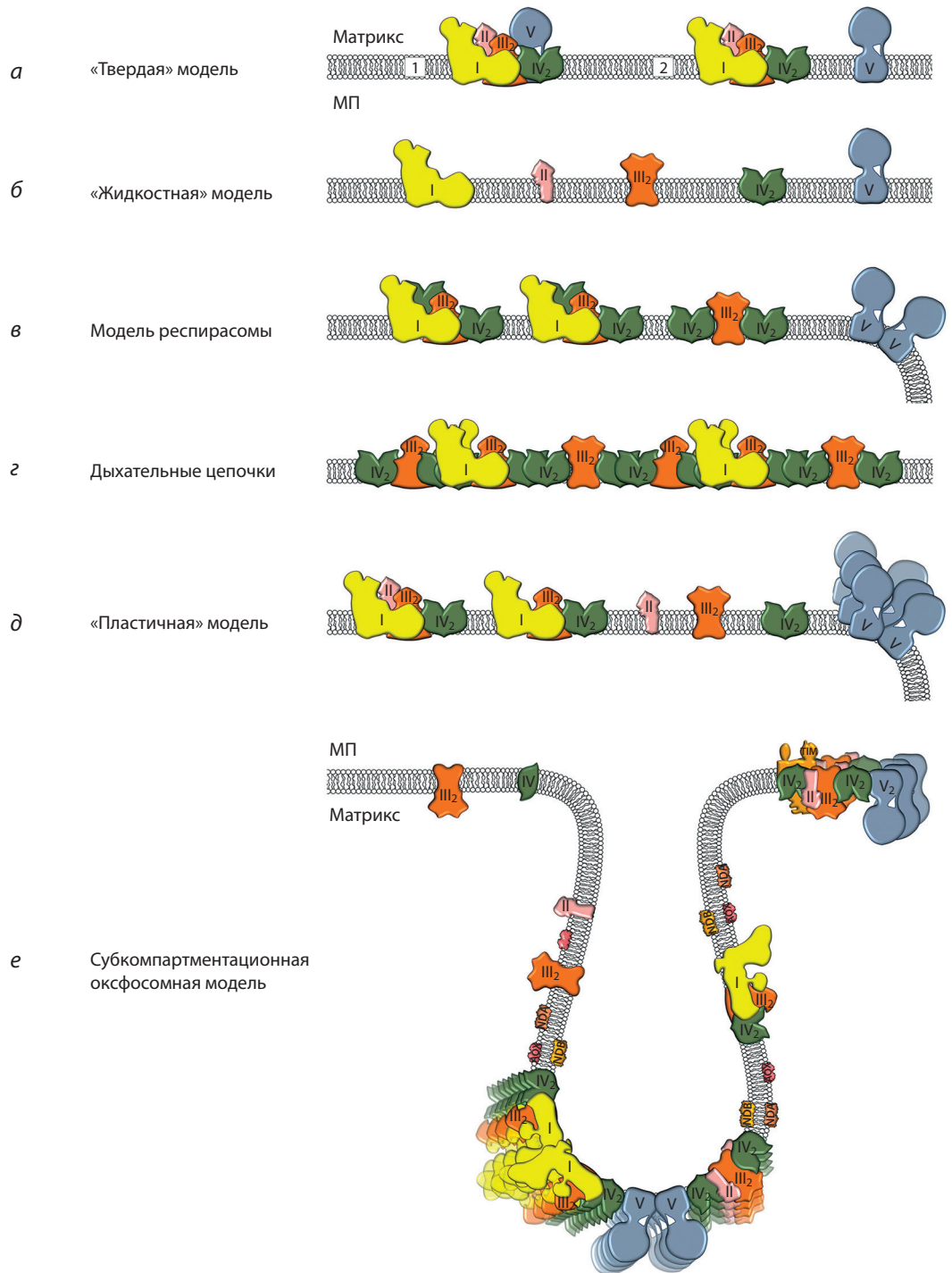


Рис. 1. Развитие представлений об организации системы ОКСФОС митохондрий от первоначальной «твердой» до новой субкомпарментационной оксфосомной модели.

Интерпретация моделей представлена с учетом современных данных о структуре комплексов ОКСФОС млекопитающих (а–д) и растений (е). Согласно литературным источникам, все основные модели, за исключением последней (е), приведены для митохондрий млекопитающих. Обозначения: первоначальная (1) и более поздняя (2) «твердые» модели; матрикс и МП – матрикс и межмембранное пространство митохондрий; комплексы I, II, III₂, IV и IV₂ дыхательной цепи и АТФ-синтаза (комплекс V) обозначены желтым, розовым, оранжевым, темно-зеленым и голубым цветом соответственно. На более современных схемах показано, что димерная АТФ-синтаза способствует загибу мембраны и, таким образом, участвует в формировании крист (в, д, е). Описание моделей приведено в тексте. Модель респирасомы (в) изображена согласно схемам Г. Шэггера (Schägger, Pfeiffer, 2000; Schägger, 2002) и отражает ее основной постулат, определяющий соотношение большого суперкомплекса I₁III₂IV₄ и маленького суперкомплекса III₂IV₄ как 2:1. В этой модели в обоих суперкомплексах димеры комплекса IV (IV₂) располагаются с противоположных сторон димера III₂. Модель дыхательных цепочек (г) приведена по схеме Г. Шэггера и И. Виттиг (Wittig, Schägger, 2009), но, в отличие от оригинала, представлен вид сбоку (в плоскости мембраны). Существуют и другие варианты дыхательных цепочек (Bultema et al., 2009; Miranda-Astudillo et al., 2018). В оксфосомной модели (е), разработанной для митохондриальной системы ОКСФОС побегов гороха (Ukolova et al., 2020), помимо основных комплексов ОКСФОС присутствуют свободно расположенные альтернативные ферменты, что подчеркивает более сложную организацию фосфорилирующей системы у растений.

«Пластичная» модель

Изучение состава ОКСФОС у различных видов с использованием BN-PAGE показало, что после солиubilизации митохондрий детергентами часть популяции дыхательных комплексов находится в свободном состоянии, а часть присутствует в составе суперкомплексов (Enríquez, 2016). Более того, в ряде исследований отмечено, что относительное количество свободных и ассоциированных дыхательных ферментов, а также соотношение суперкомплексов различной стехиометрии меняется в зависимости от типа клеток и физиологического состояния организма (этапа развития, стрессового воздействия, болезни). На основании этих данных Ж.А. Энрикес с коллегами (Acín-Pérez et al., 2008; Acín-Pérez, Enríquez, 2014) предложили «пластичную» модель, которая постулирует сбалансированное сосуществование свободных дыхательных комплексов и суперкомплексов разного состава и стехиометрии, соответствующее физиологическому статусу клетки (см. рис. 1, *д*). Данная модель рассматривается автором преимущественно как «усовершенствованная версия жидкостной модели» (Enríquez, 2016), поскольку отдельные дыхательные комплексы и суперкомплексы свободно диффундируют в плоскости внутренней митохондриальной мембраны.

Новая субкомпартаментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий

Новая модель постулирует, что существенная часть дыхательных суперкомплексов физически взаимодействует с димерной АТФ-синтазой с образованием оксфосом, которые располагаются преимущественно в кристном субкомпартаменте митохондрий в виде высокоорганизованных участков, «мини-фабрик» по производству АТФ (Ukolova et al., 2020) (см. рис. 1, *е*). При этом остальная часть дыхательных суперкомплексов и комплексов, по видимому, остается в свободной форме. Предполагается, что соотношение между ассоциированными оксфосомами и свободными дыхательными суперкомплексами и комплексами зависит от типа, физиологического статуса и энергетических потребностей клетки. Фактически модель объединяет современные «твердую» и «жидкостную» модели (см. рис. 1, *з, д*), добавляя дополнительный уровень сложности, связанный с оксфосомной организацией и структурным и функциональным разделением внутренней мембраны на субкомпартаменты.

Экспериментальные данные, определившие появление модели

Как отмечалось выше, предлагаемая модель была разработана на основании данных, полученных нами недавно при изучении организации фосфорилирующей системы в митохондриях этиолированных побегов гороха (Ukolova et al., 2020). Использование свежeweделенных митохондрий для солиubilизации дигитонином суперкомплексов и комплексов ОКСФОС, применение мультимерной электрофорезной системы на основе BN-PAGE и мягкой электрофорезной системы на основе BN-PAGE и мягкой электрофорезной системы позволили идентифицировать суперкомплекс IV_1Va_2 и показать возможность физического взаимодействия между АТФ-син-

тазой и комплексом IV дыхательной цепи. Кроме того, в дополнение к каноническим ассоциациям I_1III_2 , $I_1III_2IV_n$ и III_2IV_{1-2} , димеру V_2 , а также свободным комплексам I–V нам удалось обнаружить и другие новые структуры, которые не детектировались ранее, а именно: вторую форму АТФ-синтазы Va с более высокой молекулярной массой, респирасому $I_2III_4IV_n$ с двумя копиями комплекса I и двойным димерным комплексом III_2 , а также высокомолекулярный мегакомплекс $(II_xIII_yIV_z)_n$. Одновременное выделение суперкомплекса IV_1Va_2 , респирасом $I_{1-2}III_{2-4}IV_n$ и мегакомплекса $(II_xIII_yIV_z)_n$, в которых комплекс IV был связан либо с АТФ-синтазой, либо с дыхательными комплексами, позволило предположить, что все комплексы ОКСФОС *in vivo* могут физически взаимодействовать в определенной стехиометрии с образованием более крупной структуры – оксфосомы. Таким образом, оксфосома представляет собой структуру, в которой комплексы I (и/или, возможно, II), III_2 , IV и V ассоциированы в строго определенной стехиометрии и которая может автономно выполнять весь цикл реакций от окисления субстрата до фосфорилирования АДФ, т. е. может «дышать» и производить АТФ (рис. 2).

Связующим звеном между дыхательной и фосфорилирующей частями в оксфосоме являются димеры или тетрамеры комплекса IV (см. рис. 2). Потенциальная способность комплекса IV связывать суперкомплексы (правда только дыхательные) между собой через формирование димеров и тетрамеров уже рассматривалась ранее в моделях дыхательных цепочек (Bultema et al., 2009; Wittig, Schägger, 2009; Miranda-Astudillo et al., 2018). Учитывая большое количество свободных форм комплекса IV (IV_a/b и IV_2) после солиubilизации детергентом как в нашей (Ukolova et al., 2020), так и в других работах (Eubel et al., 2003; Krause et al., 2004; Acín-Pérez et al., 2008), можно предположить, что это связующее звено чувствительно к действию детергента и является местом разлома оксфосомы при солиubilизации. Чувствительны к действию детергента и димеры комплекса V, которые распадаются при солиubilизации митохондрий многих видов до мономеров (Schägger, Pfeiffer, 2000; Eubel et al., 2003). Такая чувствительность объясняет минорное содержание обнаруженного нами нового суперкомплекса IV_1Va_2 в митохондриях побегов гороха (Ukolova et al., 2020).

На существование подобной ассоциации в других видах и организмах указывают некоторые косвенные литературные данные. Так, в работе (Qiu et al., 1992) была показана возможность реконструкции ассоциации комплексов IV–V в протеолипосомах из высокоочищенных комплексов IV и V, изолированных из бычьего сердца. В исследованиях на дрожжах продемонстрировано, что отсутствие димер-специфичных субъединиц АТФ-синтазы в мутантных штаммах (т. е. отсутствие димеров АТФ-синтазы) уменьшает активность комплекса IV, снижает скорость синтеза АТФ, изменяет кинетический контроль комплекса IV над окислительным фосфорилированием (Boyle et al., 1999) и снижает стабильность суперкомплекса III_2IV_2 (Saddar et al., 2008). Эти факты позволяют предположить, что оксфосомная организация фосфорилирующей системы может иметь консервативные черты и являться универсальной для различных видов, но при

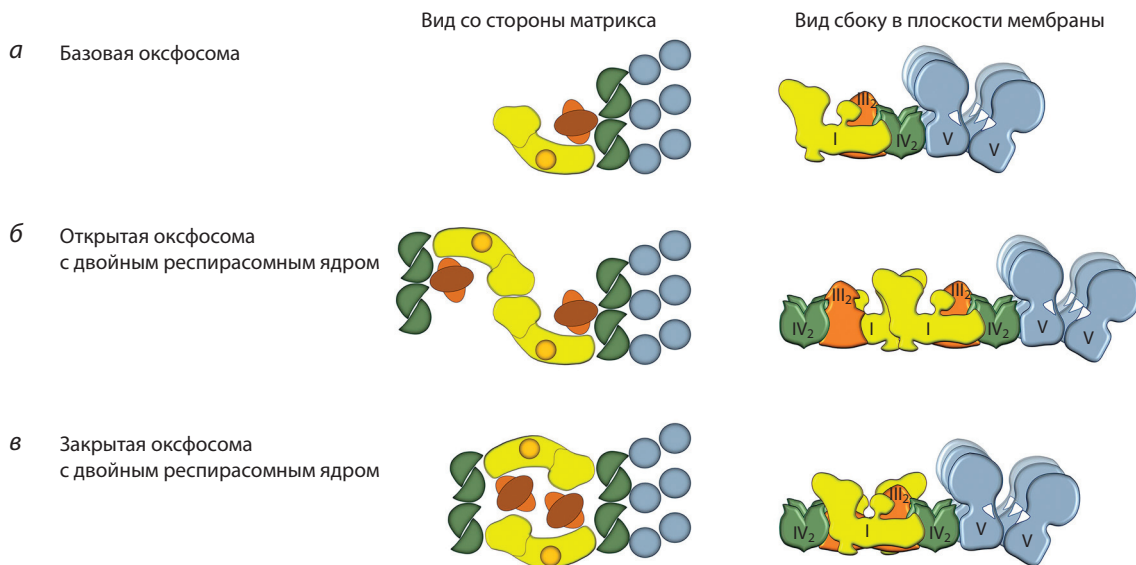


Рис. 2. Организация базовой оксфосомы и оксфосом с двойным респирасомным ядром открытого и закрытого типов.

Представлен схематический вид предполагаемых оксфосом митохондрий побегов гороха: с матриксной стороны внутренней мембраны митохондрий и профильная проекция (вид сбоку в плоскости мембраны). Цветовое обозначение см. на рис. 1. Мономеры комплекса IV на проекции со стороны матрикса представлены в виде темно-зеленых «половинок», последовательно связанных друг с другом в димеры и затем тетрамеры. На профильной проекции димеры расположены друг за другом. Светло-коричневый круг на матриксной стороне комплекса I и выступающая «ножка» на его боковой проекции представляют собой карбоангидразный домен, специфичный для растительного фермента.

этом, по-видимому, должна обладать и таксоноспецифичными особенностями.

Предполагаемая организация оксфосом

Все известные на сегодняшний день надмолекулярные структуры системы ОКСФОС имеют строго определенную стехиометрию и пространственную организацию. Для расчета стехиометрии оксфосом и разработки модели их организации *in vivo* необходимо учитывать количественное соотношение комплексов ОКСФОС и имеющиеся данные о структуре и пространственной организации дыхательных комплексов и суперкомплексов, а также димеров АТФ-синтазы.

Анализ литературных данных показывает, что соотношение комплексов может меняться в зависимости от организма, типа и физиологического статуса клетки (Schägger, 2002; Dubinin et al., 2011; Peters et al., 2012). Это означает, что модель организации системы ОКСФОС в каждом конкретном случае может иметь свои особенности. Тем не менее, учитывая высокую консервативность изученных суперструктур ОКСФОС, можно предположить, что основные принципы организации системы, а именно формирование оксфосом, оксфосомных цепочек и свободных суперкомплексов с определенными стехиометрией и пространственной архитектурой, должны сохраняться.

Точное соотношение комплексов I:II:III:IV:V определено пока только для митохондрий бычьего сердца и составляет округленно 1:1.5:3:6:3 (Schägger, 2002). При таком соотношении на каждые два комплекса I приходится три комплекса II, три димера III₂, шесть димеров IV₂ (или три тетрамера IV₄) и три димера V₂. На основании этих данных модель респирасомы для бычьих митохондрий, рассматривающая ассоциации только дыхательных

комплексов I, III и IV, постулирует, что строительными блоками для сети дыхательных суперкомплексов митохондрий млекопитающих являются большая суперкомплекс I₁III₂IV₄ (называемый сейчас респирасомой) и маленький суперкомплекс III₂IV₄, присутствующие во внутренней мембране в соотношении 2:1 (см. рис. 1, в). Точное соотношение комплексов ОКСФОС для митохондрий побегов гороха пока не определено, но, по нашим данным, две трети популяции комплекса III входят в состав респирасом (Ukolova et al., 2020), что согласуется с моделью Г. Шэггера. Это позволило разработать модель организации системы ОКСФОС на примере митохондрий проростков гороха, опираясь на соотношение комплексов, определенное для органелл бычьего сердца (см. рис. 1, е). Дальнейшее изучение содержания и соотношения ферментов энергетической системы побегов гороха позволит уточнить представленную модель организации.

Таким образом, используя приведенные выше данные, можно предположить, что основными структурными компонентами, или строительными блоками, системы ОКСФОС в митохондриях проростков гороха являются: базовая оксфосома I₁III₂IV₄V₆, респирасома I₁III₂IV₄ и суперкомплекс III₂IV₄. Базовая оксфосома представляет собой респирасому I₁III₂IV₄, связанную с тремя димерами АТФ-синтазы (см. рис. 2, а). Вторая респирасома I₁III₂IV₄ и суперкомплекс III₂IV₄ могут также ассоциировать с базовой оксфосомой, образуя структуры более высокого порядка (см. рис. 1, е и рис. 2, б, в). Учитывая результаты Д.Б. Бултемы с коллегами (Bultema et al., 2009), которые при помощи электронной микроскопии показали наличие открытой и закрытой конформаций суперкомплекса I₁III₂ из митохондрий клубней картофеля, а также наши электрофоретические данные, указывающие на различие в

структуре двух высокомолекулярных суперкомплексов с составом $I_2III_4IV_n$, можно предположить возможность формирования «открытых» и «закрытых» оксфосом с двойным респирасомным ядром (см. рис. 2, б, в). Эти две формы, вероятно, переходят одна в другую и таким образом участвуют в регуляции активности системы ОКСФОС. Маленький суперкомплекс III_2IV_4 , по-видимому, *in vivo* может ассоциировать с комплексом II или альтернативными НАД(Ф)Н-дегидрогеназами, поставляющими электроны от окисляемых субстратов на комплекс III₂ (см. рис. 1, е). Пространственная организация предполагаемых оксфосом разработана с учетом имеющихся данных криоэлектронной микроскопии о структуре индивидуальных комплексов и суперкомплексов ОКСФОС в митохондриях растений (см. рис. 2).

Пока неясно, насколько ассоциировано состояние энергетической системы у проростков гороха и какую долю занимают оксфосомные участки в митохондриях этого, а также других видов и организмов. Соотношение и состав свободных и ассоциированных с олигомерными рядами АТФ-синтазы дыхательных суперкомплексов и комплексов могут зависеть от физиологического статуса и энергетических потребностей клетки. Например, в клетках с более высокой потребностью в энергии (клетки мышц, сердца, мозга млекопитающих) логично ожидать более ассоциированное «оксфосомное» состояние энергетической системы митохондрий, нацеленное на производство большего количества АТФ.

Субкомпартаментационная локализация компонентов ОКСФОС

Внутренняя мембрана митохондрий подразделяется на два морфологически и предположительно функционально различных субкомпартамента: кристный и домен внутренней пограничной мембраны. Показано, что комплексы ОКСФОС преимущественно локализуются в кристном отделе (Gilkerson et al., 2003; Vogel et al., 2006). Так, по данным Р.В. Гилкерсона с соавторами (Gilkerson et al., 2003), около 94 % комплекса III дыхательной цепи и АТФ-синтазы находится в кристах, и лишь 6 % – в пограничной мембране. Имеющиеся литературные сведения позволяют предположить преимущественную локализацию оксфосом в кристном отделе, где они могут образовывать высокоорганизованные оксфосомные цепочки или «патчи» (см. рис. 1, е). В то же время результаты Ф. Вогеля с коллегами (Vogel et al., 2006) указывают на то, что во внутренней пограничной мембране АТФ-синтаза тоже присутствует в виде димеров, что предполагает формирование оксфосом и в этом субкомпарменте. Оксфосомы и отдельные суперкомплексы внутренней пограничной мембраны могли бы эффективно поддерживать потенциал- и АТФ-зависимые процессы, протекающие наиболее активно в этом отделе, например транслокацию и сборку белка.

Факты, подтверждающие функциональную обоснованность оксфосомной модели

Первой гипотезой, предложившей механизм протонного сопряжения окисления и фосфорилирования в «жестко» фиксированной ассоциации ферментов ОКСФОС и получившей в дальнейшем экспериментальные подтвержде-

ния, была гипотеза локального сопряжения Р. Вильямса (Williams, 1961). Согласно этой концепции, упорядоченная «сборка» ферментов в мембране создает условия для формирования протонов в высокой локальной концентрации и их прямого (без пересечения гидрофобного мембранного барьера) переноса к АТФ-синтазе (Williams, 1961; Skulachev, 1982). Любопытно, что концепция Р. Вильямса была предложена в том же году, что и хемиосмотическая гипотеза П. Митчелла (ставшая впоследствии теорией), и явилась альтернативой последней. Гипотеза П. Митчелла (Mitchell, 1961) постулировала, что протоны H^+ транспортируются протонными помпами через внутреннюю мембрану митохондрий в основную водную фазу и не связываются с мембраной, формируя делокализованный электрохимический потенциал, который и используется АТФ-синтазой (Skulachev, 1982). Впоследствии этот механизм трактовался в пользу свободного, диссоциированного, распределения ферментов в мембране, т. е. в пользу «жидкостной» модели организации.

Несмотря на огромный объем экспериментальных данных, подтверждающих хемиосмотическую гипотезу, постепенно накапливались аргументы и в пользу концепции локального сопряжения, а следовательно, в пользу физической ассоциации дыхательных ферментов и АТФ-синтазы, а именно: 1) была показана взаимозависимая регуляция между митохондриальной АТФ-синтазой и комплексами дыхательной цепи (Tu et al., 1981; Krasinskaya et al., 1984); 2) получено доказательство существования неравновесно связанной с мембраной фракции ионов водорода, образующейся локально в результате работы протонных помп дыхательной цепи (Antonenko et al., 1993; Motovilov et al., 2009); 3) выявлено участие фракции мембраносвязанных протонов в синтезе АТФ (Солодовникова и др., 2004; Еремеев, Ягужинский, 2015); 4) обнаружены катализаторы высвобождения мембраносвязанных протонов с внешней поверхности внутренней мембраны, с их помощью показана возможность переключения фосфорилирующей системы из режима локального сопряжения в режим трансмембранного переноса протонов (Yaguzhinsky et al., 2006). Представленные данные поддерживают оксфосомную гипотезу и предполагают, что система ОКСФОС может использовать как локализованный, так и делокализованный электрохимические потенциалы ионов водорода.

Заключение

Новые открытия в отношении физической и функциональной организации фосфорилирующей системы митохондрий периодически заставляют пересматривать имеющиеся представления, что приводит к переходу нашего понимания ее устройства и функционирования на новый уровень. Появляющиеся модели либо полностью отрицают предыдущие, как это было в конце 1970-х – начале 1980-х гг., в период смены «твердой» модели на «жидкостную» (см. рис. 1, а, б), либо базируются на них, дополняя и уточняя их, как, например, в случае модели дыхательных цепочек, которая возникла в результате развития модели респирасомы (см. рис. 1, в, г).

В настоящее время, несмотря на активное получение данных о пространственной организации, структуре и

функциональной активности дыхательных суперкомплексов и олигомерной АТФ-синтазы, надмолекулярная организация системы ОКСФОС *in vivo* остается не до конца ясной. Последние результаты, полученные нами на митохондриях этиолированных побегов гороха, указывают на возможность физической ассоциации дыхательных суперкомплексов и димерной АТФ-синтазы (Ukolova et al., 2020). Эта информация привела к пересмотру имеющихся современных представлений об организации системы ОКСФОС (Wittig, Schägger, 2009; Acín-Pérez, Enríquez, 2014; Miranda-Astudillo et al., 2018) и разработке новой субкомпаратментационной оксфосомной модели (см. рис. 1, e).

Модель предполагает существование *in vivo* высокоорганизованных ассоциаций между олигомерными рядами АТФ-синтазы и дыхательными суперкомплексами, которые представляют собой оксфосомные цепочки или «патчи», преимущественно локализованные в кристном субкомпаратменте. Такая оксфосомная организация позволяет расширить функциональные возможности системы и значительно увеличить эффективность ее работы. Во-первых, ассоциация олигомерной АТФ-синтазы с дыхательными суперкомплексами дает возможность использовать не только протоны, находящиеся в общей водной фазе межмембранного пространства, но и мембраносвязанные протоны, образующиеся в высокой локальной концентрации в результате работы дыхательных ферментов оксфосом. Во-вторых, такая организация предполагает новые возможности для регуляции активности системы (например, путем перехода открытой, возможно более активной формы оксфосомы в закрытую или посредством изменения соотношения ассоциированных с АТФ-синтазами и свободных суперкомплексов). В-третьих, «заякоренность» дыхательных суперкомплексов на олигомерных рядах АТФ-синтазы может в той или иной степени определять морфологию мембраны. Дальнейшие исследования позволят уточнить и визуализировать надмолекулярную структуру системы ОКСФОС в митохондриях различных изучаемых объектов *in vivo*.

Список литературы / References

Еремеев С.А., Ягузинский Л.С. О локальном сопряжении систем электронного транспорта и синтеза АТФ в митохондриях. Теория и эксперимент. *Биохимия*. 2015;80(5):682-688.
[Eremeev S.A., Yaguzhinsky L.S. On local coupling of electron transport and ATP-synthesis system in mitochondria. Theory and experiment. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;80(5):576-581. DOI 10.1134/S0006297915050089.]

Лузиков В.Н. Принципы контроля за формированием структур, осуществляющих дыхательные функции митохондрий. *Ученые биол. химии*. 2009;49:77-106.
[Luzikov V.N. Principles of control over formation of structures responsible for respiratory functions of mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(13):1443-1456. DOI 10.1134/s0006297909130021.]

Солодовникова И.М., Юрков В.И., Тоньшин А.А., Ягузинский Л.С. О локальном сопряжении процессов дыхания и фосфорилирования в митохондриях печени крысы. *Биофизика*. 2004;49(1):47-56.
[Solodovnikova I.M., Iurkov V.L., Ton'shin A.A., Yaguzhinskiĭ L.S. Local coupling of respiration processes and phosphorylation in rat liver mitochondria. *Бифизика = Biophysics*. 2004;49(1):47-56. (in Russian)]

Acín-Pérez R., Enríquez J.A. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1837(4):444-450. DOI 10.1016/j.bbabi.2013.12.009.

Acín-Pérez R., Fernández-Silva P., Peleato M.L., Pérez-Martos A., Enríquez J.A. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell*. 2008;32(4):529-539. DOI 10.1016/j.molcel.2008.10.021.

Allen R.D., Schroeder C.C., Fok A.K. An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J. Cell Biol*. 1989;108(6):2233-2240. DOI 10.1083/jcb.108.6.2233.

Antonenko Y.N., Kovbasnjuk O.N., Yaguzhinsky L.S. Evidence in favor of the existence of a kinetic barrier for proton transfer from a surface of bilayer phospholipid membrane to bulk water. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993;1150(1):45-50.

Boyle G.M., Roucou X., Nagley P., Devenish R.J., Prescott M. Identification of subunit g of yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem*. 1999;262(2):315-323. DOI 10.1046/j.1432-1327.1999.00345.x.

Bultema J.B., Braun H.P., Boekema E.J., Kouril R. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1787(1):60-67. DOI 10.1016/j.bbabi.2008.10.010.

Chaban Y., Boekema E.J., Dudkina N.V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1837(4):418-426. DOI 10.1016/j.bbabi.2013.10.004.

Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem*. 1956;17:65-134. DOI 10.1002/9780470122624.ch2.

Dubinín J., Braun H.P., Schmitz U., Colditz F. The mitochondrial proteome of the model legume *Medicago truncatula*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1814(12):1658-1668. DOI 10.1016/j.bbapap.2011.08.008.

Enríquez J.A. Supramolecular organization of respiratory complexes. *Annu. Rev. Physiol*. 2016;78:533-561. DOI 10.1146/annurev-physiol-021115-105031.

Eubel H., Jansch L., Braun H.P. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol*. 2003;133(1):274-286. DOI 10.1104/pp.103.024620.

Gilkerson R.W., Selker J.M., Capaldi R.A. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*. 2003;546(2-3):355-358. DOI 10.1016/s0014-5793(03)00633-1.

Guigas G., Weiss M. Effects of protein crowding on membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016;1858(10):2441-2450. DOI 10.1016/j.bbamem.2015.12.021.

Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupte S.S. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr*. 1986;18(5):331-368. DOI 10.1007/BF00743010.

Keilin D. Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 1930;106(746):418-444. Available at: <http://www.jstor.org/stable/81448>.

Keilin D., Hartree E. Cytochrome and cytochrome oxidase. *Proc. R. Soc. B*. 1939;127(847):167-191. DOI 10.1098/rspb.1939.0016.

Keilin D., Hartree E.F. Activity of the succinic dehydrogenase-cytochrome system in different tissue preparations. *Biochem. J*. 1949;44(2):205-218. DOI 10.1042/bj0440205.

Krasinskaya I.P., Marshansky V.N., Dragunova S.F., Yaguzhinsky L.S. Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria. *FEBS Lett*. 1984;167(1):176-180. DOI 10.1016/0014-5793(84)80856-x.

Krause F., Reifschneider N.H., Vocke D., Seelert H., Rexroth S., Dencher N.A. "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J. Biol. Chem*. 2004;279(46):48369-48375. DOI 10.1074/jbc.M406085200.

- Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 2019;88:515-549. DOI 10.1146/annurev-biochem-013118-110903.
- Lehninger A. Respiratory-energy transformation. *Rev. Mod. Phys.* 1959;31:136-146. DOI 10.1103/RevModPhys.31.136.
- Lenz G., Genova M.L. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;748:107-144. DOI 10.1007/978-1-4614-3573-0_5.
- Miranda-Astudillo H., Colina-Tenorio L., Jiménez-Suárez A., Vázquez-Acevedo M., Salin B., Giraud M.F., Remacle C., Cardol P., González-Halphen D. Oxidative phosphorylation supercomplexes and respirasome reconstitution of the colorless alga *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2018;1859(6):434-444. DOI 10.1016/j.bbabi.2018.03.004.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191:144-148. DOI 10.1038/191144a0.
- Motovilov K.A., Yurkov V.I., Volkov E.M., Yaguzhinsky L.S. Properties and new methods of non-equilibrium membrane bound proton fraction research under conditions of proton pump activation. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* 2009;3(4):478-487. DOI 10.1134/S1990747809040163.
- Nübel E., Wittig I., Kerscher S., Brandt U., Schägger H. Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics.* 2009;9(9):2408-2418. DOI 10.1002/pmic.200800632.
- Peters K., Nießen M., Peterhänsel C., Späth B., Hölzle A., Binder S., Marchfelder A., Braun H.-P. Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 2012;79(3):273-284. DOI 10.1007/s11103-012-9911-4.
- Qiu Z.H., Yu L., Yu C.A. Spin-label electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry studies of the interaction between mitochondrial cytochrome *c* oxidase and adenosine triphosphate synthase complex. *Biochemistry.* 1992;31(12):3297-3302. DOI 10.1021/bi00127a036.
- Rich P.R. A generalised model for the equilibration of quinone pools with their biological donors and acceptors in membrane-bound electron transfer chains. *FEBS Lett.* 1981;130(2):173-178. DOI 10.1016/0014-5793(81)81113-1.
- Saddar S., Dienhart M.K., Stuart R.A. The F₁F₀-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome *bc*₁-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery. *J. Biol. Chem.* 2008;283(11):6677-6686. DOI 10.1074/jbc.M708440200.
- Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002;1555(1-3):154-159. DOI 10.1016/s0005-2728(02)00271-2.
- Schägger H., Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000;19(8):1777-1783. DOI 10.1093/emboj/19.8.1777.
- Schlame M. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2021;1862(1):148305. DOI 10.1016/j.bbabi.2020.148305.
- Skulachev V.P. The localized $\Delta\mu/H^+$ problem. The possible role of the local electric field in ATP synthesis. *FEBS Lett.* 1982;146(1):1-4. DOI 10.1016/0014-5793(82)80692-3.
- Strecker V., Wumaier Z., Wittig I., Schägger H. Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics.* 2010;10(18):3379-3387. DOI 10.1002/pmic.201000343.
- Tu S.L., Okazaki H., Ramirez F., Lam E., Marecek J.F. Mutual regulation between mitochondrial ATPase and respiratory chain activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981;210(1):124-131. DOI 10.1016/0003-9861(81)90172-7.
- Ukolova I.V., Kondakova M.A., Kondratov I.G., Sidorov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2020;1861(11):148264. DOI 10.1016/j.bbabi.2020.148264.
- Vogel F., Bornhövd C., Neupert W., Reichert A.S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 2006;175(2):237-247. DOI 10.1083/jcb.200605138.
- Vonck J. Supramolecular organization of the respiratory chain. In: Sazanov L. (Ed.). *A Structural Perspective on Respiratory Complex I*. Dordrecht: Springer, 2012;247-277. DOI 10.1007/978-94-007-4138-6_12.
- Williams R.J. Possible functions of chains of catalysts. *J. Theor. Biol.* 1961;1:1-17. DOI 10.1016/0022-5193(61)90023-6.
- Wittig I., Schägger H. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(6):672-680. DOI 10.1016/j.bbabi.2008.12.016.
- Yaguzhinsky L.S., Yurkov V.I., Krasinskaya I.P. On the localized coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1757(5-6):408-414. DOI 10.1016/j.bbabi.2006.04.001.

Благодарности. Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01233а.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2021. После доработки 17.09.2021. Принята к публикации 18.09.2021.

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

Использование биоинформационного анализа для определения вероятной причины перекрестного взаимодействия антител к антигенному белку ВПЧ16 L1 с белком ВПЧ6 L1

А.С. Столбиков^{1,2}✉, Р.К. Салаяев¹, Н.И. Рекославская¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

✉ valkir5@yandex.ru

Аннотация. С помощью биоинформационных ресурсов (программ и баз данных) предпринята попытка проанализировать вероятную причину перекрестного взаимодействия антител против ВПЧ16 L1 с антигенными белками ВПЧ6 L1, которое было выявлено при изучении кандидатной вакцины, полученной на основе растительной экспрессионной системы (растений томата). По нашему мнению, наиболее вероятной причиной перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам вируса папилломы человека (ВПЧ), является сходство антигенных детерминант. В ходе исследования были проанализированы аминокислотные последовательности ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1, которые использовались при разработке бинарной вакцины против цервикального рака и аногенитальных папилломатозов. Для анализа антигенных детерминант использовались программы BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor, DiscoTope 2.0 Server, SYFPEITHI. В результате исследования вероятных линейных детерминант для В-клеток установили, что у обоих типов ВПЧ белки имеют примерно одинаковое расположение и размер линейных антигенных детерминант, отличие наблюдается только в виде небольших сдвигов в несколько аминокислотных остатков. Однако выявлено некоторое различие в аминокислотном составе эпитопов, поэтому потенциал перекрестного взаимодействия антител с антигенами за счет сходства линейных антигенных детерминант для В-клеток незначителен. Анализ потенциальных трехмерных эпитопов для В-клеток показал, что по сумме различий белки ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1 не имеют предпосылок для перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к двум разным патогенным типам ВПЧ. Анализ вероятных линейных эпитопов для Т-клеток обнаружил у двух белковых последовательностей общую антигенную детерминанту. Согласно рейтингу, составленному программой SYFPEITHI, аминокислотная последовательность AQL(I)FNKPYWL представляет собой вторую, по вероятности, антигенную детерминанту для Т-клеток. При этом аминокислотная последовательность данной детерминанты у ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1 практически идентична. Отличие имеется лишь по одной позиции, но оно не является критичным в силу сходства физико-химических свойств аминокислот, по которым наблюдается замена в аминокислотной последовательности антигенных детерминант. Исходя из этого можно ожидать умеренно выраженное перекрестное взаимодействие антител к ВПЧ16 L1 с антигенами ВПЧ6 L1.

Ключевые слова: вирус папилломы человека; ВПЧ6 L1; ВПЧ16 L1; биоинформационный анализ.

Для цитирования: Столбиков А.С., Салаяев Р.К., Рекославская Н.И. Использование биоинформационного анализа для определения вероятной причины перекрестного взаимодействия антител к антигенному белку ВПЧ16 L1 с белком ВПЧ6 L1. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):787-792. DOI 10.18699/VJ21.090

A bioinformatics approach for identifying the probable cause of the cross-interaction of antibodies to the antigenic protein HPV16 L1 with the HPV6 L1 protein

A.S. Stolbikov^{1,2}✉, R.K. Salyaev¹, N.I. Rekoslavskaya¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

✉ valkir5@yandex.ru

Abstract. This paper describes an attempt to analyze, with the aid of bioinformatics resources (programs and databases), the probable cause of the cross-interaction of antibodies against HPV16 L1 with antigenic protein HPV6 L1, which has been revealed in the investigation of the candidate vaccine obtained on the base of a plant expression system (tomato plants). In our opinion, the most likely reason for the cross-interaction of antibodies with antigens of different pathogenic HPV types is the similarity of their antigenic determinants. In this work, the amino acid sequences of HPV16 L1 and HPV6 L1 used for the development of a binary vaccine against cervical cancer and anogenital papillomatosis have been analyzed. For the analysis of antigenic determinants, the programs BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor, DiscoTope 2.0 Server and SYFPEITHI have been used. As a result of the analysis of probable B-cell linear determinants (epitopes), it has been found that in both types of HPV the proteins have approximately the same location and size of linear antigenic determinants; the difference is observed only in the form of small shifts in the size of several amino acid residues. However, there are some

differences in the amino acid composition of epitopes; therefore, the possibility for cross-interaction of the antibodies with the antigens due to the similarity of linear antigenic determinants for B-cells is very small. The analysis of potential three-dimensional epitopes for B-cells has shown that due to little difference between them the HPV16 L1 and HPV6 L1 proteins have no prerequisites for cross-interaction of the antibodies with the antigens belonging to the two different pathogenic HPV types. The analysis of probable linear epitopes for T-cells has revealed a common antigenic determinant in the two protein sequences. According to the rank made with the SYFPEITHI program, the amino acid sequence AQL(I)FNKPYWL is the second most likely antigenic determinant for T-cells. Meanwhile, the amino acid sequences of this determinant in HPV16 L1 and HPV6 L1 are virtually identical. There is a difference in only one position, but it is not critical due to the similarity of the physicochemical properties of amino acids, for which there is a replacement in the amino acid sequence of antigenic determinants. Consequently, some moderate cross-interaction of the antibodies to HPV16 L1 with the antigens of HPV6 L1 may be expected.

Key words: human papillomavirus; HPV6 L1; HPV16 L1; bioinformatics analysis.

For citation: Stolbikov A.S., Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I. A bioinformatics approach for identifying the probable cause of the cross-interaction of antibodies to the antigenic protein HPV16 L1 with the HPV6 L1 protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):787-792. DOI 10.18699/VJ21.090

Введение

Ежегодно инфицированию различными типами вируса папилломы человека (ВПЧ) подвергаются десятки миллионов людей, и это только в регионах мира, где ведутся соответствующие медицинские наблюдения и статистика (McLaughlin-Drubin, Münger, 2009). Поэтому создание профилактических вакцин против ВПЧ – одна из актуальных задач по сдерживанию роста числа заболеваний, вызываемых данным типом инфекционных агентов.

Разработка кандидатных вакцин на основе растительных экспрессионных систем является относительно новым направлением биофарминга. Растительные экспрессионные системы имеют определенные преимущества по сравнению с другими системами. Прежде всего эти преимущества связаны с безопасностью вследствие отсутствия прионов, патогенов млекопитающих, транспозонов и опасных вирусов в латентном состоянии, а также с относительной дешевизной получения вакцин, что в целом способствует более широкой коммерциализации и масштабированию. В предыдущих исследованиях нами была предпринята попытка создания кандидатной четырехвалентной пероральной вакцины на базе трансгенных растений против четырех типов ВПЧ (16, 18, 31, 45), способных вызывать цервикальный рак. В данной работе планировалось получить вакцину, обеспечивающую максимальную защиту от цервикального рака за счет использования основного антигенного белка L1 вирусной оболочки четырех высокоонкогенных типов папилломавирусов человека (ВПЧ16, ВПЧ18, ВПЧ31 и ВПЧ45), которые отвечают за большинство случаев возникновения рака шейки матки.

В ходе исследования выявлено, что антитела к антигенному белку ВПЧ16 L1 успешно взаимодействуют с антигенами ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 (Salyaev et al., 2017). Исходя из полученных данных сделано предположение, что перекрестное взаимодействие антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ, может быть обусловлено сходством антигенных детерминант. Это предположение было проверено с помощью биоинформационного исследования, в ходе которого обнаружены общие линейные детерминанты для Т- и В-клеток у всех четырех типов вирусных белков L1. Кроме того, найдены сходные трехмерные антигенные детерминанты для В-клеток у ВПЧ16 L1 и ВПЧ18 L1

(Столбиков и др., 2020). При работе над бинарной вакциной, содержащей антигенные белки ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1, с помощью вестерн-блот гибридации было выявлено перекрестное взаимодействие сывороточных антител против ВПЧ16 L1 с антигенными белками ВПЧ6 L1 (Salyaev et al., 2017; Рекославская и др., 2021). Папилломавирус человека 6-го типа не вызывает рак, но может приводить к развитию аногенитальных и респираторных папилломатозов. Несмотря на то что эти заболевания редко приводят к летальному исходу, они очень распространены и имеют высокую контагиозность (ВОЗ, 11 января 2020).

Широкий диапазон перекрестного взаимодействия между антигенами и антителами, выходящий за пределы вирусов, вызывающих цервикальный рак и относящихся к другому семейству, показался нам крайне интересным. В связи с этим мы подвергли сравнительному биоинформационному анализу антигенные детерминанты ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1. Полученные в ходе исследования данные могут быть полезны для оптимизации работ при создании кандидатных вакцин с использованием меньшего количества типов ВПЧ за счет перекрестного взаимодействия между антителами и антигенами неродственных типов, что, в свою очередь, снизит трудоемкость и себестоимость производства вакцин против опасных типов папилломавирусов человека.

Материалы и методы

Выравнивание аминокислотных последовательностей ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1. В качестве первого этапа анализа антигенных детерминант ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1 проводилось парное выравнивание изолятов ВПЧ каждого типа. В базе данных NCBI (GenBank) были найдены и обработаны их полноразмерные аминокислотные сиквенсы, кодируемые нуклеотидными последовательностями, ранее использованными нами в генетических конструкциях при разработке бинарной вакцины против цервикального рака и аногенитальных папилломатозов (Salyaev et al., 2017). Это было необходимо для последующего определения различий в антигенных детерминантах двух типов ВПЧ. Из базы GenBank извлекался также весь массив полноразмерных аминокислотных последовательностей ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью редактора множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных после-

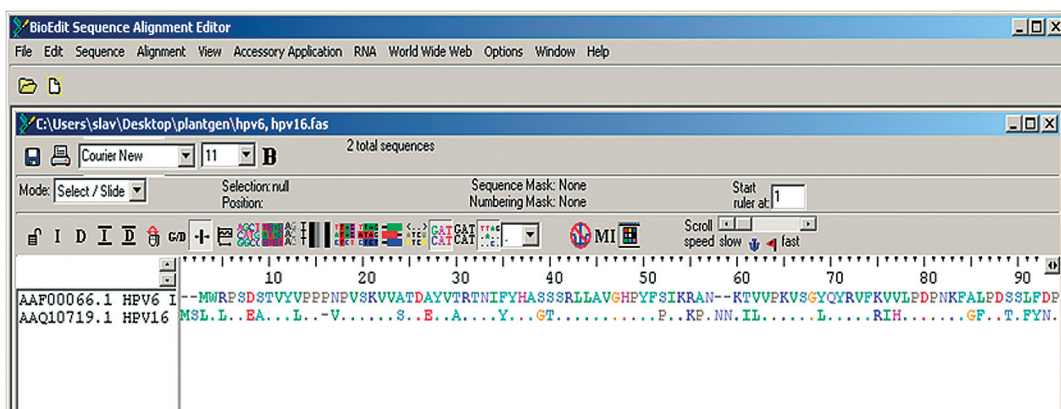


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1.

довательностей BioEdit. Филогенетическое древо строили в программе Simple Phylogeny (EMBL-EBI) методами ближайшего соседа (neighbour-joining) и невзвешенного парного среднего (UPGMA).

Выявление потенциальных антигенных детерминант. Для второго этапа анализа антигенных детерминант использовали программу BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) (Jespersen et al., 2017). Данный биоинформационный ресурс позволяет выявить потенциальные линейные антигенные детерминанты для В-клеток. Для определения трехмерных антигенных детерминант для В-клеток применяли программу DiscoTope 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) (Kringelum et al., 2012). При работе с этой программой задавались максимально строгие условия: чувствительность 47 %, специфичность 75 %. Трехмерные модели белков, которые анализировались с помощью программы DiscoTope 2.0 Server, находили в базе данных Protein Data Bank (PDB). Программы BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor и DiscoTope 2.0 Server были в открытом доступе на сервере Датского технического университета (DTU). Поиск потенциальных антигенных детерминант для Т-клеток производили с помощью программы SYFPEITHI, находящейся в открытом доступе (<http://www.syfpeithi.com>). Этот биоинформатический ресурс ранжирует все возможные варианты антигенных детерминант согласно вероятности их взаимодействия с Т-клетками (Rammensee et al., 1999).

Результаты

Аминокислотное выравнивание

Аминокислотные последовательности капсидных белков L1 вирусов ВПЧ16 и ВПЧ6 были извлечены из международной базы данных NCBI и выровнены в программе BioEdit (рис. 1).

По результатам выравнивания построены филограммы. Для акцентирования эволюционных отличий между 6-м и 16-м типами ВПЧ, в сравнительном анализе использовали ВПЧ 31, который относится к тому же виду *Alphapapillomavirus 9*, что и ВПЧ16 (рис. 2). Филогенетическое сравнение выявило существенные различия между ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1.

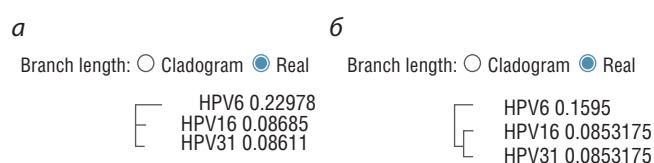


Рис. 2. Филограмма, построенная с помощью программы Simple Phylogeny (EMBL-EBI): а – методом ближайшего соседа (neighbour-joining); б – методом UPGMA.

Анализ линейных антигенных детерминант для В-клеток

Аминокислотные последовательности двух вирусных белков ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1 анализировались на предмет потенциальных линейных антигенных детерминант для В-клеток с помощью программы BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor. Исследование показало, что у белка ВПЧ6 L1 имеются следующие антигенные детерминанты: 14–25, 79–83, 85–91, 120–141, 162–177, 208–216, 230–238, 260–283, 308–314, 345–358, 391–439, 447–457, 468–497 (рис. 3).

Ранее у ВПЧ16 L1 были выявлены следующие антигенные детерминанты: 8–28, 83–95, 123–143, 166–177, 213–220, 234–243, 264–286, 350–369, 396–421, 426–444, 452–462, 473–502 (Столбиков и др., 2020).

Таким образом, у обоих типов ВПЧ белки имеют примерно одинаковое расположение и размер линейных антигенных детерминант, отличие наблюдается только в виде небольших сдвигов в несколько аминокислотных остатков. Существенное различие заключается в присутствии у белка ВПЧ6 L1 линейных детерминант 79–83, 308–314, которых нет у ВПЧ16 L1. Кроме того, в белке 16-го типа ВПЧ присутствовала антигенная детерминанта 426–444, которой не обнаружено в белке 6-го типа вируса.

Для того чтобы сделать вывод о наличии сходных линейных антигенных детерминант у двух рассматриваемых типов ВПЧ, необходимо было сравнить аминокислотный состав предполагаемых эпитопов. Разница в аминокислотном составе может приводить к уменьшению степени сходства с антителами. Отсутствие замен в аминокислотных последовательностях или замены близкими по свойствам аминокислотами может сохранять уровень аффинности антител. Поэтому важно определить наличие и оце-

Name	Sequence Markup
Sequence	Epitopes :E.....EEEEEEEEEEEE.....EEEE.EEEEEEE..... Predictions: HWIPSDSYVPPPNVSKVAATDAVYTRTNIFVHASSRLLAVGHVPYFSIKRANKTWPKVSGYQYRVKWLDPDKFALPDSSLFDPTTQRLVHACTGLEVGKQ 1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----80-----90-----100-----
	..E.....EEEEEEEEEEEEEEEE.E.....EEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEE.....EEEEEEEE..... PLGVGSGHPFLNKYDDVENSQSGGNPQDNRVWGHGDKYQQLCIVGCAAPLGEHIGKQKCTNTPVQAGDCPPELITSVIQDGDIVDTGFGAMNFADLQTNKSDVPIYICGTTCYKPYDYLHAAADPYGI --110-----120-----130-----140-----150-----160-----170-----180-----190-----200-----210-----220-----230-----
EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....E.....EEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEE.E..... IDRLFFLRKEQHFARHFFNRAGEVGEPPDTLLIKGSGNRTSVGSSIYVNTPSGLVSSAQFLNKPYYLQKAGHNGTCIGNQLFVWDTTRSTNITLCASVTTSSYTYNSDYKEYHHRHVEEYDLQF .240-----250-----260-----270-----280-----290-----300-----310-----320-----330-----340-----350-----360-----
EE.....EEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE..... IFQLCSITLSAEVMAYIHTNPSVLEDINFLSPPNGTLEDYRYVQSAITCQKPTPEKEKPPDYKLSFHEVNLKEKFSSELQVPLGRKFLQSGYGRSSIRTVKRPVSKASAAPKRAKTKR -370-----380-----390-----400-----410-----420-----430-----440-----450-----460-----470-----480-----490-----500-----

Рис. 3. Вероятные антигенные детерминанты белка ВПЧ6 L1 (BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor). Epitope Threshold = 0.5; E – антигенные детерминанты.

нить качество аминокислотных замен в предполагаемых эпитопах белков ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1.

Парное выравнивание последовательностей белков показало существенное различие по аминокислотному составу в большинстве антигенных детерминант. Однако между некоторыми аминокислотными последовательностями, находящимися в границах сходных для обоих белков антигенных детерминант, было обнаружено определенное сходство. Так, в детерминанте 166–177 для ВПЧ16 L1 наблюдается различие по двум аминокислотам: лизин заменен на серин, глутамин – на пролин (рис. 4). Серин является полярной незаряженной оксикарбоновой аминокислотой, а лизин – полярной положительно заряженной. Пролин является гетероциклической неполярной аминокислотой, а глутамин – полярной незаряженной. Учитывая разницу в физико-химических свойствах аминокислот, по которым наблюдаются различия в предполагаемых антигенных детерминантах, а также различие в протяженности линейных эпитопов, можно предположить слабое перекрестное взаимодействие с антителами.

В детерминанте 213–220 для ВПЧ16 L1 установлено отличие в две аминокислоты относительно последовательности ВПЧ6 L1: треонин заменен на аланин, аспарагиновая кислота – на глутаминовую (рис. 5). Поскольку

HPV6 L1 162–177	GEHWGK GKQCTNTPVQ
HPV16 L1 166–177	GEHWGKGS PCTN----

Рис. 4. Результат аминокислотного выравнивания предполагаемой антигенной детерминанты 166–177.

HPV6 L1 208–216	DLQTNKSDV
HPV16 L1 213–220	-LQANKSEV

Рис. 5. Результат аминокислотного выравнивания предполагаемой антигенной детерминанты 213–220.

треонин существенно отличается по физико-химическим свойствам от аланина, такая замена может сказаться на антигенных свойствах белка L1. В случае со второй заменой мы имеем дело с полярными отрицательно заряженными аминокислотами с практически одинаковыми физико-химическими свойствами. Учитывая это, а также расположение аминокислотных замен в последовательностях на некотором удалении друг от друга, можно предположить сходные антигенные свойства этого региона у двух вирусных белков.

Поиск антигенных детерминант для Т-клеток

Чтобы получить дополнительные доказательства влияния сходства антигенных детерминант вирусных белков ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1 на перекрестное взаимодействие антител с антигенами, принадлежащими к двум патогенным типам вируса папилломы человека, был осуществлен поиск потенциальных антигенных детерминант для Т-клеток с помощью биоинформационного ресурса SYFPEITHI. Данная программа ранжирует возможные варианты антигенных детерминант согласно вероятности их взаимодействия с Т-клетками.

Анализ белковых последовательностей двух исследуемых вирусных белков выявил общую вероятную антигенную детерминанту для Т-клеток, которая располагается у ВПЧ6 L1 в позиции 300–309, а у ВПЧ16 L1 – в позиции 304–313 аминокислотного сиквенса. Согласно рейтингу, составленному программой SYFPEITHI, аминокислотная последовательность AQL(I)FNKPYWL представляет собой вторую, по вероятности, антигенную детерминанту для Т-клеток (рис. 6).

При сравнении аминокислотной последовательности этой детерминанты у двух белков было выявлено различие всего в одну аминокислоту: в ВПЧ16 L1 лейцин заменен на изолейцин. Подобная замена не должна приводить к изменению антигенных свойств детерминанты, так как лейцин и изолейцин относятся к одному классу амино-

а											б												
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	Score	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	Score
86	S	L	F	D	P	T	T	Q	R	L	23	12	Y	L	P	P	V	P	V	S	K	V	22
300	A	Q	L	F	N	K	P	Y	W	L	22	304	A	Q	I	F	N	K	P	Y	W	L	22
101	G	L	E	V	G	R	G	Q	P	L	21	372	L	Q	F	I	F	Q	L	C	K	I	22
455	D	Q	Y	P	L	G	R	K	F	L	21	460	D	Q	F	P	L	G	R	K	F	L	21
65	Y	Q	Y	R	V	F	K	V	V	L	20	68	L	Q	Y	R	V	F	R	I	H	L	20
209	L	Q	T	N	K	S	D	V	P	I	20	213	L	Q	A	N	K	S	E	V	P	L	20

Рис. 6. Вероятные антигенные детерминанты для Т-клеток (HLA-B13 decamers) в белковых последовательностях ВПЧ6 L1 (а) и ВПЧ16 L1 (б), согласно программе SYFPEITHI.

кислот и обладают сходными физико-химическими свойствами. В целом надо отметить, что данная антигенная детерминанта у белков ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1 должна обладать близкими антигенными свойствами. Кроме того, множественное выравнивание всех представленных в NCBI полноразмерных аминокислотных последовательностей ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1 показало, что этот отрезок сиквенса, вероятно, высококонсервативен и практически одинаков у обоих белков.

Исследование потенциальных трехмерных эпитопов для В-клеток

В базе данных PDB была найдена лишь одна трехмерная модель белка ВПЧ6 L1 (6L31, DOI 10.2210/pdb6l31/pdb). К сожалению, модель оказалась не информативна для программы DiscoTope 2.0 Server, поэтому мы провели сравнительный анализ трехмерных антигенных детерминант, используя литературные данные.

Согласно некоторым публикациям, у белка ВПЧ6 L1 выделяют следующие регионы, формирующие трехмерные эпитопы, которые могут взаимодействовать с В-клетками: F49, R53, A54; K52, R53, A54, N55; Y123, N128; G130, S131, G132; K169, T172, N173, P175, V176, Q177, A178; E262, V263, E265, P266; V344, T345, T346; S353. Критически важными для распознавания паратопами являются области F49, R53, A54 и K169, T172, N173, P175, V176, Q177, A178 (McClements et al., 2001).

В нашей предыдущей работе было показано, что белок ВПЧ16 L1 имеет пространственный эпитоп в регионе K53–L61, который по расположению частично совпадает с критически важной областью F49, R53, A54 белка ВПЧ6 L1. Кроме того, наблюдается совпадение расположения эпитопа S353 белка ВПЧ6 L1 с трехмерной антигенной детерминантой T350–Y355 белка ВПЧ16 L1 (Столбиков и др., 2020). Для определения уровня сходства иммунологических свойств этих двух белков мы проанализировали парное выравнивание аминокислотных последовательностей в районах их предполагаемых трехмерных антигенных детерминант. В предполагаемых эпитопах антигенных белков были обнаружены несоответствия в аминокислотных остатках. В положении 53 аминокислотного сиквенса у ВПЧ16 L1 наблюдается замена аргинина на лизин, а в положении 353 – серина на глутаминовую кислоту. Хотя эти аминокислотные замены можно считать несущественными в силу сходства физико-химических свойств соответствующих аминокислот, по сумме разли-

чий можно предположить, что белки ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1 не имеют возможности перекрестного взаимодействия с антителами при иммунном ответе посредством трехмерных антигенных детерминант.

Обсуждение

Полученные нами результаты позволяют говорить о наличии умеренного сходства антигенных детерминант белков ВПЧ16 L1 и ВПЧ6 L1. При этом потенциал перекрестного взаимодействия антител с антигенами за счет сходства линейных антигенных детерминант для В-клеток очень незначителен. Анализ трехмерных эпитопов и вовсе свидетельствует об отсутствии предпосылок для перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к двум разным патогенным типам ВПЧ. Однако у двух типов (16 и 6) вирусных белков L1 наблюдается существенное сходство линейных антигенных детерминант для Т-клеток. Согласно программе SYFPEITHI, эти детерминанты находятся на второй позиции, но, тем не менее, имеют достаточно высокий балл (Score) вероятности. Аминокислотные последовательности этих эпитопов практически идентичны. Отличие имеется только по одной позиции, но оно не является критичным в силу сходства физико-химических свойств аминокислот, по которым наблюдается замена в аминокислотной последовательности антигенных детерминант. Исходя из вышесказанного, при иммунизации ВПЧ16 L1 можно ожидать умеренно выраженного перекрестного взаимодействия антител с антигенами ВПЧ6 L1.

Наши результаты дают некоторое объяснение причины эффекта перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ, выявленного ранее. Однако для более полного понимания перекрестного взаимодействия следует изучить также явление полиморфного распределения эпитопов и процесс индукции синтеза антител *de novo* (Brown et al., 2009; Kemp et al., 2011; Scherpenisse et al., 2013; Nakagawa et al., 2015).

Заключение

Эффективность и целесообразность используемых нами подходов и методов подтверждаются работами иностранных ученых. Так, коллективу авторов (Namvar et al., 2019) удалось, используя сходные с нами биоинформатические ресурсы (BepiPred-2, SYFPEITHI), провести исследование перекрестного иммунного ответа на поверхностные

белки L1 и L2 папилломавирусов человека высокоонкогенных типов 16 и 18. При этом большое внимание уделялось сравнению аминокислотных свойств, таких как гидрофобность, площадь поверхности, доступной для растворителя, заряд и вторичная структура, у выявленных сходных антигенных детерминант двух различных типов ВПЧ. В итоге была создана кандидатная мультиэпитопная вакцина, испытания которой на лабораторных мышках показали высокие результаты. Применение данной рекомбинантной вакцины способствовало индуцированию достаточно сильного иммунного ответа и защищало мышей от опухолевых клеток с эффективностью 66.67 % (Namvar et al., 2019).

В заключение следует сделать вывод о том, что использование подобных методов исследования может значительно ускорить создание эффективных вакцин широкого спектра действия против высокоопасных типов ВПЧ. На сегодняшний день существует вакцина «Гардасил-9», дающая защиту от девяти типов онкогенных ВПЧ. Однако она уже содержит максимально допустимое количество антигенных белков (270 мкг белка в одной дозе) и при этом не обеспечивает защиту примерно в 10 % случаев (Li et al., 2018). Поэтому исследование перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ, с привлечение биоинформационных методов анализа может дать возможность для создания мультиэпитопных вакцин самого широкого действия без увеличения количества антигенных белков в вакцинном препарате.

Список литературы / References

Рекоslавская Н.И., Салыев Р.К., Столбиков А.С. Синтез белка оболочки папилломавируса L1 аногенитального типа ВПЧ6 в растительной экспрессионной системе на основе плодов томата. *Докл. РАН. Науки о жизни*. 2021;498(1):268-274. DOI 10.31857/S2686738921030124.
[Rekoslavskaya N.I., Salyaev R.K., Stolbikov A.S. The synthesis of main capsid protein of anogenital type HPV6 L1 in plant expression system on the basis of tomato fruits. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021;498(1):193-198. DOI 10.1134/S160767292103008X].
Столбиков А.С., Салыев Р.К., Рекоslавская Н.И. Биоинформатический анализ возможной причины перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам вируса папилломы человека. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(4):695-706. DOI 10.15789/2220-7619-TBA-1263.
[Stolbikov A.S., Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I. Bioinformatics analysis of putative causes for cross-reactive antibodies interacting with antigens derived from various pathogenic human papillomaviruses. *Infektsiya i Immunitet = Infection and Immunity*. 2020;10(4):695-706. DOI 10.15789/2220-7619-TBA-1263. (in Russian)]
Brown D.R., Kjaer S.K., Sigurdsson K., Iversen O.E., Hernandez-Avila M., Wheeler C.M., Perez G., Koutsky L.A., Tay E.H., Garcia P., Ault K.A., Garland S.M., Leodolter S., Olsson S.E., Tang G.W., Fer-

ris D.G., Paavonen J., Steben M., Bosch F.X., Dillner J., Joura E.A., Kurman R.J., Majewski S., Muñoz N., Myers E.R., Villa L.L., Taddeo F.J., Roberts C., Tadesse A., Bryan J., Lupinacci L.C., Giacoletti K.E., Sings H.L., James M., Hesley T.M., Barr E. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16–26 years. *J. Infect. Dis.* 2009;199(7):926-935. DOI 10.1086/597307.
Jespersen M.C., Peters B., Nielsen M., Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W24-W29. DOI 10.1093/nar/gkx346.
Kemp T.J., Hildesheim A., Safaeian M., Dauner J.G., Pan Y., Porras C., Schiller J.T., Lowy D.R., Herrero R., Pinto L.A. HPV16/18 L1 VLP vaccine induces cross-neutralizing antibodies that may mediate cross-protection. *Vaccine*. 2011;29(11):2011-2014. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.01.001.
Kringelum J.V., Lundegaard C., Lund O., Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput. Biol.* 2012;8(12):e1002829. DOI 10.1371/journal.pcbi.1002829.
Li Z., Song S., He M., Wang D., Shi J., Liu X., Li Y., Chi X., Wei S., Yang Y., Wang Z., Li J., Qian H., Yu H., Zheng Q., Yan X., Zhao Q., Zhang J., Gu Y., Li S., Xia N. Rational design of a triple-type human papillomavirus vaccine by compromising viral-type specificity. *Nat. Commun.* 2018;9(1):5360. DOI 10.1038/s41467-018-07199-6.
McClements W.L., Wang X.M., Ling J.C., Skulsky D.M., Christensen N.D., Jansen K.U., Ludmerer S.W. A novel human papillomavirus type 6 neutralizing domain comprising two discrete regions of the major capsid protein L1. *Virology*. 2001;289(2):262-268. DOI 10.1006/viro.2001.1146.
McLaughlin-Drubin M.E., Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 2009;143(2):195-208. DOI 10.1016/j.virusres.2009.06.008.
Nakagawa M., Greenfield W., Moerman-Herzog A., Coleman H.M. Cross-reactivity, epitope spreading, and *de novo* immune stimulation are possible mechanisms of cross-protection of nonvaccine human papillomavirus (HPV) types in recipients of HPV therapeutic vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015;22(7):679-687. DOI 10.1128/CVI.00149-15.
Namvar A., Bolhassani A., Javadi G., Noormohammadi Z. *In silico/in vivo* analysis of high-risk papillomavirus L1 and L2 conserved sequences for development of cross-subtype prophylactic vaccine. *Sci. Rep.* 2019;9(1):15225. DOI 10.1038/s41598-019-51679-8.
Rammensee H.G., Bachmann J., Emmerich N.P.N., Bacho O.A., Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999;50:213-219. DOI 10.1007/s002510050595.
Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S. Cross-reactivity of antigens and antibodies belonging to different pathogenic types of human papillomaviruses. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;477(1):372-376. DOI 10.1134/S1607672917060084.
Scherpenisse M., Schepp R.M., Mollers M., Meijer C.J.L.M., Berbers G.A.M. Characteristics of HPV-specific antibody responses induced by infection and vaccination: cross-reactivity, neutralizing activity, avidity and IgG subclasses. *PLoS One*. 2013;8(9):e74797. DOI 10.1371/journal.pone.0074797.

ORCID ID

A.S. Stolbikov orcid.org/0000-0002-6392-9365
R.K. Salyaev orcid.org/0000-0002-7602-7301
N.I. Rekoslavskaya orcid.org/0000-0003-3480-9855

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.07.2021. После доработки 23.08.2021. Принята к публикации 24.08.2021.

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”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен 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, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: 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.

.....
Подписано в печать 19.11.2021. Выход в свет 30.11.2021. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 12.32.

Уч.-изд. л. 14.1. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–53 экз.) Заказ № 71. Цена свободная.

.....
Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

