

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2022 • 26 • 6

Генетика растений / Селекция растений на иммунитет и продуктивность / Генетика микроорганизмов /
Генетические коллекции



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





КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ АКТУАЛЬНЫХ ЗАДАЧ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Онлайн-симпозиум «Клеточные технологии для решения актуальных задач биологии и медицины» 18 октября 2022 года Академгородок, Новосибирск, Россия

Глубокоуважаемые коллеги!

Приглашаем вас к участию в онлайн-симпозиуме «Клеточные технологии для решения актуальных задач биологии и медицины», который пройдет в рамках сотрудничества ИЦиГ СО РАН, Фонда научно-технологического развития ХМАО – Югры и Сургутского государственного университета 18 октября 2022 года.

В настоящее время успехи развития клеточных технологий выводят на новый уровень подходы для решения актуальных задач биологии и медицины. Современные работы в области моделирования и исследования молекулярно-генетических основ заболеваний, совершенствование клеточных моделей, разработка методов их безопасного использования требуют внимательного осмысления, анализа и обсуждения.

Предстоящий симпозиум станет площадкой для консолидированного взаимодействия ведущих исследователей, врачей, а также молодых ученых, аспирантов, студентов биологических и медицинских специальностей.

Будем рады видеть вас на симпозиуме!

Информационный сайт симпозиума: <https://conf.icgbio.ru/crispr2022/>

На обложке:

К 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. Фотографии из альбомов «Абиссиния» и «Эритрея» (приведены в сетевом издании «Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции». 2022. Т. 8, № 1–3, <https://pismavavilov.ru/>)

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJGB-22-61

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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/VJGB-22-61

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

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

Editorial board

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

L.A. 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),
RussiaD.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.), BelarusS.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaV.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaI.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),
RussiaN.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS,
Dr. Sci. (Biology), Russia

Генетика растений

- 507 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля.
А.В. Кулакова, Г.И. Ефремов, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

- 515 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Комбинационная способность количественных признаков, связанных с продуктивностью твердой пшеницы.
Р.Г. Драгов (на англ. языке)

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

- 524 **ОБЗОР**
Голозерный ячмень: систематика, селекция и перспективы использования.
К.А. Лукина, О.Н. Ковалева, И.Г. Лоскутов

- 537 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы.
С.Н. Сибикеев, Е.И. Гульятеева, А.Е. Дружин, Л.В. Андреева

- 544 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Молекулярно-генетическое выявление и дифференциация возбудителей бактериальной полосатости листьев риса *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*.
М.Л. Королева, С.А. Блинова, А.А. Шварцев, В.Е. Курочкин, Я.И. Алексеев

Генетика микроорганизмов

- 553 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Редкие генотипы *Wolbachia* в лабораторных линиях *Drosophila melanogaster*. А.С. Рябинин, О.Д. Шишкина, Ю.Ю. Илинский, Р.А. Быков

- 560 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов.
Е.А. Анисимова, Н.А. Фахрутдинов, Д.А. Миргазов, Е.А. Додонова, И.А. Елизарова, М.Е. Горбунова, Н.И. Хаммадов, Л.И. Зайнуллин, К.А. Осянин

- 568 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние колхицина на физиолого-биохимические свойства *Rhodococcus qingshengii*. Ю.А. Маркова, Л.А. Беловежец, В.Н. Нурминский, И.С. Капустина, Н.В. Озолина, В.В. Гурина, А.Л. Ракевич, А.В. Сидоров

- 575 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Активность гена алканмонооксигеназы *alkB* у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов.
Т.Н. Шапиро, Н.А. Манучарова, Е.С. Лобакова

Генетические коллекции

- 583 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Особенности видового состава патогенных грибов рода *Fusarium* в биоценозах кукурузы Воронежской области. Т.М. Коломиец, М.И. Киселева, Н.С. Жемчужина, Л.Ф. Панкратова, С.А. Елизарова

Plant genetics

- 507 ORIGINAL ARTICLE
Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of β -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers.
A.V. Kulakova, G.I. Efremov, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

- 515 ORIGINAL ARTICLE
Combining ability for quantitative traits related to productivity in durum wheat.
R.G. Dragov

Plant breeding for immunity and performance

- 524 REVIEW
Naked barley: taxonomy, breeding, and prospects of utilization.
K.A. Lukina, O.N. Kovaleva, I.G. Loskutov

- 537 ORIGINAL ARTICLE
The effect of the 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S translocation on the productivity and quality of spring bread wheat grain.
S.N. Sibikeev, E.I. Gulyaeva, A.E. Druzhin, L.V. Andreeva

- 544 ORIGINAL ARTICLE
Molecular genetic detection and differentiation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, bacterial leaf streak agents of rice. M.L. Koroleva, S.A. Blinova, A.A. Shvartsev, V.E. Kurochkin, Ya.I. Alekseev

Microbial genetics

- 553 ORIGINAL ARTICLE
Rare *Wolbachia* genotypes in laboratory *Drosophila melanogaster* strains.
A.S. Ryabinin, O.D. Shishkina, Yu.Yu. Ilinsky, R.A. Bykov

- 560 ORIGINAL ARTICLE
Bacillus anthracis strain differentiation based on SNP and VNTR loci.
E.A. Anisimova, N.A. Fakhruddinov, D.A. Mirgazov, E.A. Dodonova, I.A. Elizarova, M.E. Gorbunova, N.I. Khammadoev, L.I. Zainullin, K.A. Osyanin

- 568 ORIGINAL ARTICLE
Effect of colchicine on physiological and biochemical properties of *Rhodococcus qingshengii*. Yu.A. Markova, L.A. Belovezhets, V.N. Nurminsky, I.S. Kapustina, N.V. Ozolina, V.V. Gurina, A.L. Rakevich, A.V. Sidorov

- 575 ORIGINAL ARTICLE
Activity of alkanmonooxygenase *alkB* gene in strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from petroleum products.
T.N. Shapiro, N.A. Manucharova, E.S. Lobakova

Genetic collections

- 583 ORIGINAL ARTICLE
A characteristic of the species composition of pathogenic fungi of the genus *Fusarium* in corn biocenoses of the Voronezh region.
T.M. Kolomiets, M.I. Kiseleva, N.S. Zhemchuzhina, L.F. Pankratova, S.A. Elizarova

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

Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля

А.В. Кулакова, Г.И. Ефремов , А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

 gleb_efremov@mail.ru

Аннотация. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – первая по важности незерновая крахмалоносная культура с уровнем потенциальной урожайности 38–48 т/га и содержанием крахмала 13.2–18.7%. Клубни картофеля хранятся при низкой температуре (2–4 °С), что обеспечивает состояние физиологического покоя. Недостатком такого хранения являются распад крахмала и, как следствие, накопление редуцирующих сахаров (холодовое осахаривание), в том числе за счет роста активности β -амилаз, гидролизующих крахмал до мальтозы. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ динамики экспрессии генов β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*), а также содержания крахмала и редуцирующих сахаров в процессе длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель) клубней пяти сортов картофеля (Надежда, Барин, Красавчик, Утро и Северное сияние). Гены β -амилаз – *StBAM9* и один из двух гомологов *StBAM1* (с наибольшей степенью гомологии с *AtBAM1*) – выбраны на основе данных филогенетического анализа. Оценка экспрессии этих генов, а также гена ингибитора амилаз показала тенденцию к снижению уровня транскрипции для всех анализируемых сортов. Обнаружено, что содержание крахмала в процессе хранения клубней также существенно падает. В то же время количество редуцирующих сахаров увеличивается в период сентябрь–апрель, тогда как в период февраль–апрель их содержание не меняется (Красавчик), снижается (Барин, Северное сияние) или продолжает расти (Утро, Надежда). Можно предположить, что активность генов *StBAM1* и *StBAM9* коррелирует с количеством крахмала (положительно) и моносахаридов (отрицательно). А уровень экспрессии *StAI*, в свою очередь, находится в прямой зависимости от уровня экспрессии *StBAM1*. При этом зависимость между степенью предрасположенности сорта к холодovому осахариванию и профилем экспрессии генов *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI* отсутствует.


Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; сорта картофеля; хранение клубней; катаболизм крахмала; экспрессия гена; β -амилаза.

Для цитирования: Кулакова А.В., Ефремов Г.И., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость содержания крахмала и редуцирующих сахаров от уровня экспрессии генов β -амилаз *StBAM1* и *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):507-514. DOI 10.18699/VJGB-22-62

Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of β -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers

A.V. Kulakova, G.I. Efremov , A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

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

 gleb_efremov@mail.ru

Abstract. *Solanum tuberosum* L. is the most important non-grain starch crop with a potential yield of 38–48 t/ha and a starch content of 13.2–18.7%. Potato tubers are stored at a low temperature (2–4 °C) in a state of physiological dormancy. A disadvantage of this type of storage is the degradation of starch and the accumulation of reducing sugars (cold-induced sweetening), including due to an increase in the activity of β -amylases that hydrolyze starch to maltose. In this study, a comparative analysis of the β -amylase (*StBAM1*, *StBAM9*) and amylase inhibitor (*StAI*) gene expression, as well as starch and reducing sugar content in tubers during long-term low-temperature storage (September, February, April) was performed using potato cultivars Nadezhda, Barin, Krasavchik, Severnoe siyanie and

Utro. The β -amylase genes, *StBAM9* and one of the two *StBAM1* homologs (with the highest degree of homology with *AtBAM1*), were selected based on phylogenetic analysis data. Evaluation of the expression of these genes and the amylase inhibitor gene showed a tendency to decrease in transcription for all analyzed cultivars. The starch content also significantly decreased during tuber storage. The amount of reducing sugars increased in the September–April period, while in February–April, their content did not change (Krasavchik), decreased (Barin, Severnoe siyanie) or continued to grow (Utro, Nadezhda). It can be assumed that the gene activity of *StBAM1* and *StBAM9* correlates with the amount of starch (positively) and monosaccharides (negatively). The level of *StAI* expression, in turn, may be directly dependent on the level of *StBAM1* expression. At the same time, there is no relationship between the degree of cultivar predisposition to cold-induced sweetening and the expression profile of the *StBAM1*, *StBAM9*, and *StAI* genes. Key words: *Solanum tuberosum*; potato cultivars; tuber storage; starch catabolism; gene expression; β -amylase.

For citation: Kulakova A.V., Efremov G.I., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of the content of starch and reducing sugars on the level of expression of the genes of β -amylases *StBAM1* and *StBAM9* and the amylase inhibitor *StAI* during long-term low-temperature storage of potato tubers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):507-514. DOI 10.18699/VJGB-22-62

Введение

Крахмал представляет собой гомополисахарид глюкозы и входит в число трех основных природных полисахаридов. В отличие от структурных биополимеров целлюлозы и хитина, крахмал является основным запасным углеводом и содержится в больших количествах в пластидах гетеротрофных органов растений: клубней и корней (клубне- и корнеплодные), зерен (злаковые и бобовые), зрелых и/или незрелых плодов (Benkeblia et al., 2008; Bello-Perez et al., 2020).

Наличие крахмала в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) – четвертой (после зерновых) по значимости культуры в мире, определяет ее универсальное использование как продовольственной, кормовой и технической культуры. Несмотря на то что возделываемые злаки также имеют высокое содержание этого полисахарида в зернах, преимущество использования картофельного крахмала обеспечивается его физико-химическими свойствами (структура гранул, физико-химические свойства, соотношение полисахаридов амилозы и амилопектина, степень полимеризации молекул и др.). Сорта картофеля различаются количеством крахмала в клубнях, однако в пищу употребляются сорта практически с любым содержанием крахмала и характеристиками, от которых зависят выбор способа приготовления, а также усвояемость и гликемический ответ (Bello-Perez et al., 2020).

Содержание крахмала в клубнях определяется в первую очередь генетической составляющей, а именно активностью более 70 генов, включая гены ключевых ферментов биосинтеза (крахмалсинтаза и др.) и распада (крахмалфосфоорилаза, аденилаткиназа, амилаза и др.) (Van Harsselaar et al., 2017). На количество полисахарида также влияет послеуборочное хранение клубней в картофелехранилище при пониженных положительных температурах (2–4 °C). Таким образом, поддерживается состояние физиологического покоя, замедляется прорастание, высушивание и развитие инфекций. При этом к концу срока хранения (ближе к сезону посадки) происходит распад части крахмала с образованием глюкозы, необходимой для стимулирования роста побегов (Benkeblia et al., 2008). Однако для ряда сортов характерно так называемое холодное осахаривание (CIS) – значительное увеличение содержания редуцирующих сахаров в ответ на низкие температуры (Fischer et al., 2013), что приводит к ухудшению питательных и диетических качеств, в частности за счет образования акрил-

амида при жарке (Sonnevald S., Sonnevald U., 2014; Hou et al., 2019; Tai et al., 2020). Вместе с тем существуют CIS-устойчивые сорта, которые используются для производства картофеля «фри».

Катаболизм крахмала важен как для роста растения, так и с точки зрения потребительских свойств. Степень подверженности крахмала к деградации зависит от состава и структуры гранул, обуславливает усвояемость крахмала и гликемический ответ (Bello-Perez et al., 2020). Под действием α -глюкоанов водной дикиназы (GWD; EC 2.7.9.4) и фосфоглюкоанов водной дикиназы (PWD; EC 2.7.9.5) крахмал разлагается на разветвленные и линейные глюканы (Fettke et al., 2007; Shoaib et al., 2021). Разложение до олигосахаридов и молекул мальтозы катализируется фосфоролитическими (фосфоорилазы крахмала, EC 2.4.1.1) и гидролитическими (α -амилазы, или 1,4- α -D-глюкоан-глюкогидролазы, AMY, EC 3.2.1.1; β -амилазы, или 1,4- α -D-глюкоан-мальтогидролазы, BAM или Bmy, EC 3.2.1.2) ферментами (Solomos, Mattoo, 2005; Zeeman et al., 2007; Shoaib et al., 2021). AMY гидролизует эндо- α -1,4-гликозидные связи, образуя олигосахариды различной длины, тогда как BAM отщепляет вторую с конца α -1,4-гликозидную связь, высвобождая дисахариды (Zeeman et al., 2007; Shoaib et al., 2021). Выход молекул глюкозы происходит под экзодействием α -глюкозидаз (1,4- α -d-глюкоан-глюкогидролаза, EC 3.2.1.20), которые разрывают крайние α -1,4- и α -1,6-гликозидные связи (Taylor et al., 2000). Пониженная активность как α -амилаз, так и α -глюкозидаз существенно снижает скорость гидролиза крахмала, что является позитивным эффектом как для предотвращения холодного осахаривания клубней при хранении, так и для повышения диетической ценности картофеля (Riyaphan et al., 2018).

Согласно исследованиям β -амилаз у различных видов растений, данные гидролазы также высоко значимы для гидролиза крахмала. У модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. охарактеризовано семейство β -амилаз, состоящее из девяти ферментов с разной локализацией и функциональной нагрузкой (Mongro, Storm, 2018). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей β -амилаз 136 различных видов водорослей и наземных растений показал, что современные покрытосеменные содержат восемь клад β -амилаз, а также кладу неактивных ферментов BAM10, отсутствующую у *Arabidopsis* (Thalman et al., 2019). При этом гомологи BAM4 *Arabidopsis*

отсутствуют у многих крахмалистых сельскохозяйственных культур, что предполагает видоспецифичное регулирование расщепления крахмала (Thalmann et al., 2019).

Функциональная активность отдельных ферментов семейства ВАМ выяснили с помощью различных подходов и методов. Так, продемонстрирована важность уровня экспрессии генов специфичной для эндосперма β-амилазы (*Bmy1*) и конститутивной *Bmy2* во время развития зерна ячменя для определения качества соложения (Vinje et al., 2019). Показана значимая роль гена *PbrBAM3* (груша березоволистная *Pyrus betulaefolia* Bunge) в устойчивости растения к холоду за счет повышения уровня растворимых сахаров (Zhao et al., 2019). Больше всего работ (в основном 1990-х годов) опубликовано по β-амилазам батата (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), результаты которых свидетельствуют о важности этого фермента для модуляции свойств крахмала сладкого картофеля с целью повышения потребительских качеств (Guo et al., 2019).

Несмотря на показанное на примере других растений участие β-амилаз в распаде крахмала, в случае картофеля работы по их изучению немногочисленны. Показано, что данные ферменты способны без остатка гидролизовать до мальтозы амилозу клубней картофеля (Hopkins et al., 1948). Активность β-амилаз значительно растет при снижении температуры хранения клубней с 20 до 3–5 °С (Nielsen et al., 1997), а также при прорастании клубней, вышедших из состояния физиологического покоя (Vajrajayan et al., 2018). Транскриптомный и протеомный анализы клубней картофеля, хранящихся при 15, 4 и 0 °С, подтвердили, что регуляция накопления редуцирующих сахаров положительно связана с экспрессией β-амилаз (Lin et al., 2019).

С накоплением редуцирующих сахаров в клубнях, хранящихся при низких температурах, положительно коррелирует уровень генной экспрессии *StBAM1* и *StBAM9* (Zhang et al., 2014a). Фермент *StBAM1* может быть инактивирован при взаимодействии с ингибитором амилаз *SbAI* (Zhang et al., 2014b), а также путем убиквитинирования и деградации *StBAM1*, запускаемых транскрипционным фактором *SbRFP1* (Zhang et al., 2019).

В связи с этим целью настоящей работы были изучение динамики экспрессии генов β-амилаз *StBAM1*, *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI* и оценка изменения содержания крахмала и редуцирующих сахаров в клубнях пяти сортов картофеля (Надежда, Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние) в условиях длительного низкотемпературного хранения. Выбор сортов был обусловлен различиями по количеству крахмала в клубнях.

Материалы и методы

В работе задействовали клубни пяти сортов картофеля (Надежда, Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние), различающихся, по данным оригинаторов (<https://reestr.gossortrf.ru/>), содержанием крахмала в клубнях и назначением (табл. 1). Растения выращивали в 2021 г. в полевых условиях Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (Московская область, Россия). В конце августа по два растения каждого сорта переносили в условия экспериментальной установки искусственного климата (Институт биоинжене-

Таблица 1. Сорта картофеля, использованные в работе

| Сорт | Код сорта* | Содержание крахмала*, % | Назначение* |
|-----------------|------------|-------------------------|-----------------|
| Надежда | 9463920 | 13.9–17.9 | Картофель «фри» |
| Красавчик | 9553926 | 12.4–17.8 | |
| Северное сияние | 8558886 | 14.7–15.7 | |
| Барин | 8854151 | 13.4–14.6 | Столовый |
| Утро | 9253216 | 15.0–18.0 | |

* Согласно <https://reestr.gossortrf.ru/>.

Таблица 2. Праймеры, использованные для РВ-ПЦР

| Ген | Праймер | Последовательность (5'→3') |
|----------------------------|----------|---------------------------------------------------|
| <i>StBAM1</i> ³ | Forw/Rev | CCGGGAGAGTATAATTGGGG ACAACCCACCTTGAAGAGG |
| <i>StBAM9</i> ³ | Forw/Rev | GATGGAAGACTCCGGTTCAAG ATGGATTGTGATGAGAAGGATAGC |
| <i>StAI</i> ¹ | Forw/Rev | TTGTAACATGGCTCGCGTTC TGTTGGTGAAGCACTTGGAG |
| <i>ef1</i> ² | Forw/Rev | ATTGGAACCGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA |
| <i>SEC3A</i> ² | Forw/Rev | GCTTGCACACGCCATATCAAT TGGATTTTACCACCTTC-CGCA |

¹ Dyachenko et al., 2021; ² Lopez-Pardo et al., 2013; Tang et al., 2017;

³ праймеры для анализа экспрессии разработаны в настоящем исследовании.

рии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук). В сентябре отделяли клубни, гомогенизировали и использовали (вместе кожура и мякоть) для последующего анализа экспрессии генов β-амилаз (*StBAM1* и *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*), а также для определения содержания крахмала и редуцирующих сахаров (глюкоза и фруктоза).

Суммарную РНК выделяли из 50–100 мг ткани клубней (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия), дополнительно очищали от примесей ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия) и применяли для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США), согласно протоколам производителей. Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле. Концентрацию РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США)).

Анализ экспрессии генов *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI* в клубнях картофеля осуществляли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с нормализацией данных по референсным генам *elongation factor 1-alpha* (*ef1*; LOC102600998) и *SEC3A* (LOC102599118) (Lopez-Pardo et al., 2013; Tang et al., 2017) (табл. 2). Для РВ-ПЦР использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (см. табл. 2),

набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 5 мин при 95 °С, 40 циклов (15 с при 95 °С; 50 с при 62 °С).

Последовательности генов β-амилаз *S. tuberosum* (*BAM1*, gene ID 102598794; *BAM1*, 102584887; *BAM8*, 102598339; *PCT-BMY1*, 102577806; *BAM3*, 102594291; *BAM-like*, 102584563; *BAM7*, 102593066; *BAM9*, 102590483) и модельного вида *A. thaliana* (*BAM1*, 821975; *BAM2*, At2g45880, 827959; *BMY2* (*BAM8*), 834566; *CT-BMY* (*BAM3*), 827419; *BAM4*, AT5G55700, 835664; *BAM5*, 827185; *BAM6*, 817789; *BAM7*, AT2G45880, 819196; *BAM9* (*BMY3*), At5g18670, 831985) извлекали из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогению последовательностей кодируемых ими белков оценивали для определения гомологов β-амилаз *Arabidopsis*, наиболее значимых в процессе деградации крахмала, у *S. tuberosum*. Анализ проводили с помощью MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) методом максимального правдоподобия (maximum likelihood), основанным на модели JTT; бутстрэп – 1000 реплик. Используя последовательности транскриптов генов β-амилаз *S. tuberosum*, разрабатывали праймеры для анализа экспрессии *StBAM1* (gene ID 102584887) и *StBAM9* (gene ID 102590483) (см. табл. 2) таким образом, чтобы прямой и обратный праймеры были разделены как минимум одним интроном. Специфичность праймеров к соответствующему гену проверяли посредством сравнительного выравнивания их последовательностей с транскриптами *S. tuberosum* в программе NCBI-primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Содержание крахмала (мг/г свежей ткани) определяли с помощью спектрофотометра Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия; λ = 340 нм) и ферментного теста Starch (Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG, Швейцария) с некоторыми модификациями протокола производителя.

Материал клубней (вместе мякоть и кожура, ~0.02 г; количество определяли, основываясь на известных данных о среднем содержании крахмала в клубнях картофеля (13–20 %) и требованиях теста по количеству крахмала в пробе) гомогенизировали, суспендировали в 1 мл диметилсульфоксида, добавляли 0.25 мл концентрированной соляной кислоты и инкубировали при 60 °С в течение 60 мин при постоянном встряхивании. Затем охлаждали до 25 °С, добавляли 2.5 мл воды (milliQ), перемешивали и доводили pH до 4.5 с использованием 2N гидроксида натрия. Суспензию отстаивали или фильтровали через Miracloth (Merck, США). Аликвоту надосадочной жидкости разводили в 5, 10, 20 и 100 раз; 0.05 мл получившегося раствора применяли для ферментного теста и последующей спектрофотометрии. В расчет брали значения, соответствующие ΔA = 0.115 ± 0.035 (по рекомендациям производителя теста). Анализ выполняли в двух биологических и трех технических повторах.

Содержание редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) (мг/г свежей ткани) измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по-

средством хроматографа Varian ProStar (Varian Inc., США), дифференциального рефрактометрического детектора 102 M для хроматографа (модель Стайер, ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) и колонки Agilent Pursuit 200Å PFP (4.6 × 150 mm, 5 μm HPLC Column, A3050150X046, Agilent, США). Для этого 1 г материала клубней (вместе мякоть и кожура) растирали в жидком азоте, суспендировали в 10 мл 80 % этанола и центрифугировали при 16000 г в течение 15 мин. Супернатант использовали для ВЭЖХ анализа. Изократическое элюирование выполняли со смесью ацетонитрил:вода (75:25 v/v) в качестве подвижной фазы; скорость потока – 1.5 мл/мин, температура – 30 °С. Анализ проводили в двух биологических и трех технических повторах.

Для статистической обработки результатов РВ-ПЦР и анализа содержания крахмала и сахаров применяли программу GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение (M) со стандартным отклонением (± SD) на основе двух биологических и трех технических повторов для каждого варианта измерения. Для оценки различий в экспрессии генов и содержании углеводов использовали *t*-критерий Уэлча (unequal variance, Welch's *t*-test) ($p < 0.05$ указывает на статистическую значимость различий).

Результаты

Исследование сфокусировано на характеристике экспрессии трех генов, *StBAM1*, *StBAM9* и *StAI*. Ген ингибитора амилаз (*StAI*, gene ID 102591697) присутствует в геноме картофеля в одной копии (Zhang et al., 2014b; Dyachenko et al., 2021), тогда как семейство β-амилаз состоит из нескольких членов (Van Harselaar et al., 2017). С помощью анализа базы данных NCBI и сопутствующих литературных данных были экстрагированы доступные последовательности генов β-амилаз *S. tuberosum* и *A. thaliana*. Аминокислотные последовательности кодируемых ими ферментов были использованы для сравнительного структурно-филогенетического анализа, в результате которого последовательности β-амилаз *S. tuberosum* классифицировали по гомологии с белками *A. thaliana*, образующими девять клад (AtBAM1–AtBAM9) (рис. 1).

Для семи клад β-амилаз *A. thaliana* (исключение AtBAM2 и AtBAM4) были обнаружены гомологи из *S. tuberosum*. В том числе в геноме картофеля идентифицированы два гомолога *StBAM1* и один гомолог *StBAM9* (gene ID 102590483). На основе полученной дендрограммы из двух β-амилаз клады *BAM1* для работы была выбрана *StBAM1* (gene ID 102584887) с наибольшей степенью гомологии с AtBAM1 (см. рис. 1). Для отобранных генов *StBAM1* (gene ID 102584887) и *StBAM9* (gene ID 102590483) были разработаны праймеры, которые использовали для изучения их экспрессии.

Клубни пяти сортов картофеля, Надежда, Красавчик, Северное сияние, Барин, Утро (см. табл. 1), собраны в сентябре и заложены на хранение в картофелехранилище при температуре 3 °С. Ткани клубней отобраны на анализ (экспрессионный и биохимический) в сентябре (свежий урожай), феврале (5–6 мес. хранения) и апреле (8 мес. хранения).

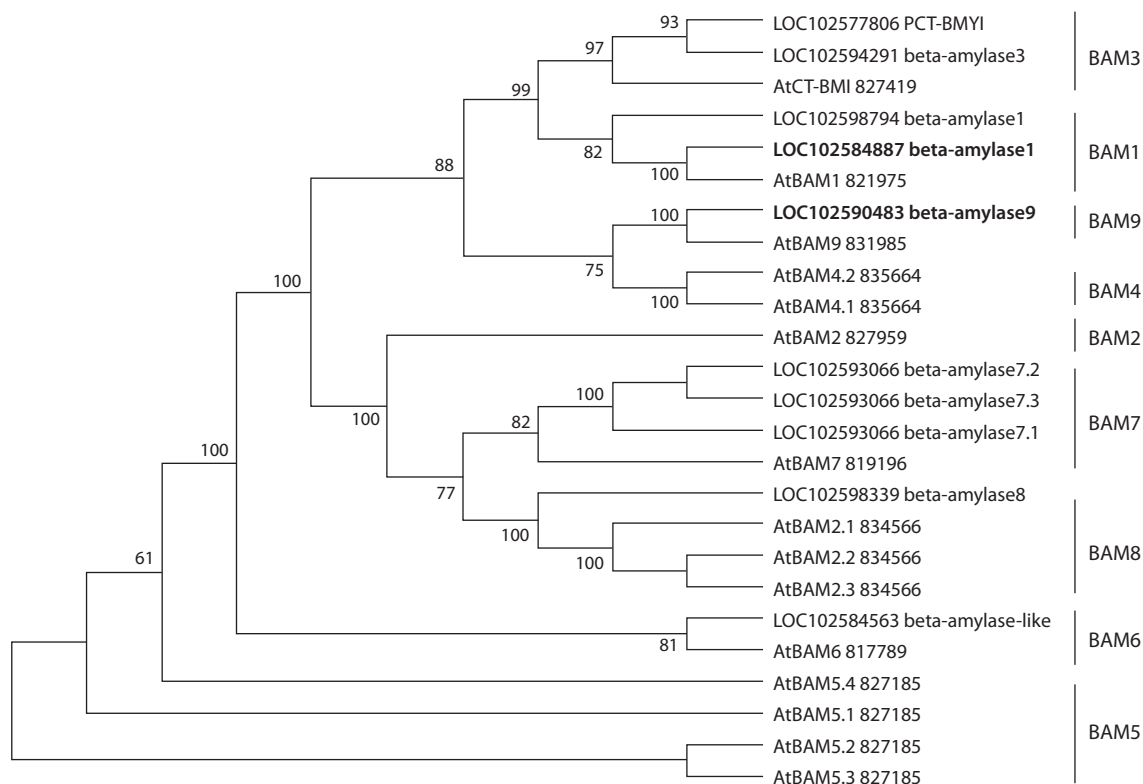


Рис. 1. Неукорененная консенсусная дендрограмма на основе выравнивания 25 аминокислотных последовательностей β-амилаз *S. tuberosum* (BAM1, gene ID 102598794; BAM1, 102584887; BAM8, 102598339; PCT-BMY1, 102577806; BAM3, 102594291; BAM-like, 102584563; BAM7, 102593066; BAM9, 102590483, включая изоформы) и модельного вида *A. thaliana* (BAM1, 821975; At2g45880 BAM2, 827959; BMY2 (BAM8), 834566; CT-BMY (BAM3), 827419; AT5G55700 BAM4, 835664; BAM5, 827185; BAM6, 817789; AT2G45880 BAM7, 819196; At5g18670 BAM9 (BMY3), включая изоформы).

Анализ проведен в программе MEGA 7.0 методом максимального правдоподобия, основанным на модели JTТ. Ветви, соответствующие кластерам, воспроизведенным менее чем в 50 % реплик начальной загрузки, свернуты. Процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показан рядом с ветвями.

С целью прояснить профиль активности *StBAM1* и *StBAM9*, а также ингибитора амилаз *StAI*, которые кодируют ключевые ферменты деградации крахмала (Zhang et al., 2014a, b), проведен анализ экспрессии этих генов в клубнях в динамике низкотемпературного хранения (3 °С; сентябрь, февраль, апрель) (рис. 2). Показано, что экспрессия гена *StBAM1* значительно снижается в апреле по сравнению с сентябрем (наиболее выражено у сортов Красавчик и Утро). При этом различия между февральским и апрельским значениями не столь существенны: уровень экспрессии гена продолжает незначительно снижаться или не меняется (см. рис. 2).

Экспрессия гена *StBAM9* также значительно снижается в феврале по сравнению с сентябрем, но не так резко, как экспрессия *StBAM1*. Исключение составляет сорт Красавчик, где уровень транскрипции не меняется. В апреле, по сравнению с февралем, экспрессия *StBAM9* немного вырастает (Надежда), не меняется (Утро, Барин, Северное сияние) или падает (Красавчик) (см. рис. 2).

Сходная динамика наблюдается и для гена ингибитора амилаз *StAI*. Его экспрессия резко падает в апреле, по сравнению с сентябрем, в клубнях сортов Северное сияние, Барин и Утро. В клубнях сортов Надежда и Красавчик уровень транскрипции *StAI* снижается плавно. В апреле, по сравнению с февралем, экспрессия *StAI* слегка выра-

стает (Утро), не меняется (Надежда, Красавчик и Барин) или резко падает (Северное сияние) (см. рис. 2).

Таким образом, прослеживается похожая тенденция к снижению уровня экспрессии для всех трех анализируемых генов по мере хранения клубней картофеля при низких температурах.

Для определения возможных корреляций уровней экспрессии генов β-амилаз и ингибитора амилаз с содержанием крахмала и редуцирующих сахаров в тех же тканях клубней проведен биохимический анализ профиля содержания крахмала, глюкозы и фруктозы в динамике холодового хранения (сентябрь, февраль, апрель) (рис. 3).

Как и ожидалось, в сравнении с сентябрем, в апреле содержание крахмала существенно снижается в клубнях всех сортов (см. рис. 3). В то же время содержание редуцирующих сахаров в феврале и апреле существенно больше, чем в сентябре, для всех сортов. В сравнении с февралем в апреле в клубнях сортов Утро, Надежда и Красавчик содержание глюкозы и фруктозы продолжает расти, тогда как у сортов Барин и Северное сияние – резко падает (см. рис. 3). При этом в феврале клубни сорта Барин отличаются самым высоким содержанием фруктозы и глюкозы – в 1.5–3.0 и 1.5–4.0 раза выше, чем у остальных сортов. Самые низкие показатели – в клубнях сорта Надежда. В апреле существенных межсортных различий не

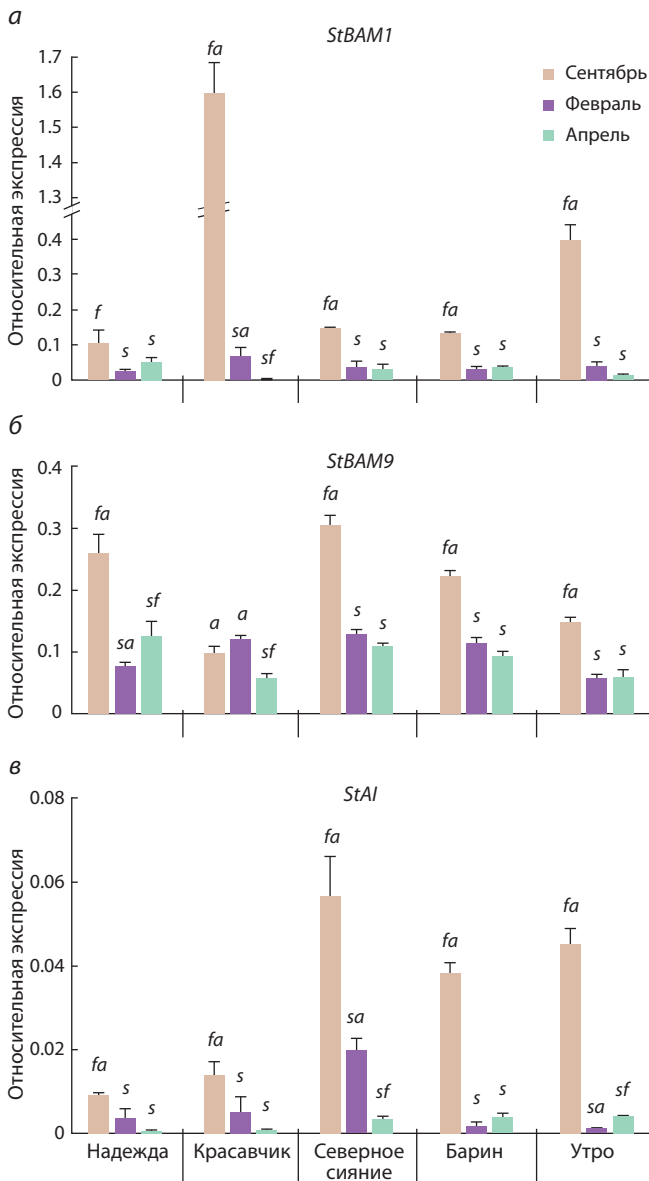


Рис. 2. Профиль экспрессии генов *StBAM1* (а), *StBAM9* (б) и *StAI* (в) в клубнях пяти сортов картофеля (Надежда, Красавчик, Северное сияние, Барин, Утро) в динамике низкотемпературного (3 °С) хранения (сентябрь, февраль, апрель).

Буквами *s*, *f* и *a* над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения экспрессии гена от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (*s* – сентябрь, *f* – февраль, *a* – апрель).

отмечено, за исключением пониженного (в сравнении с другими сортами) содержания глюкозы в клубнях сорта Северное сияние.

Таким образом, при низкотемпературном хранении с сентября по апрель содержание крахмала снижается в разной степени в клубнях всех сортов, в то время как содержание редуцирующих сахаров растет в клубнях сортов Надежда и Утро. Для сортов Красавчик, Барин и Северное сияние характерно повышение содержания редуцирующих сахаров с сентября по февраль, тогда как в апреле их содержание не меняется (в сравнении с февралем (Красавчик) или значительно снижается (Барин, Северное сияние)).

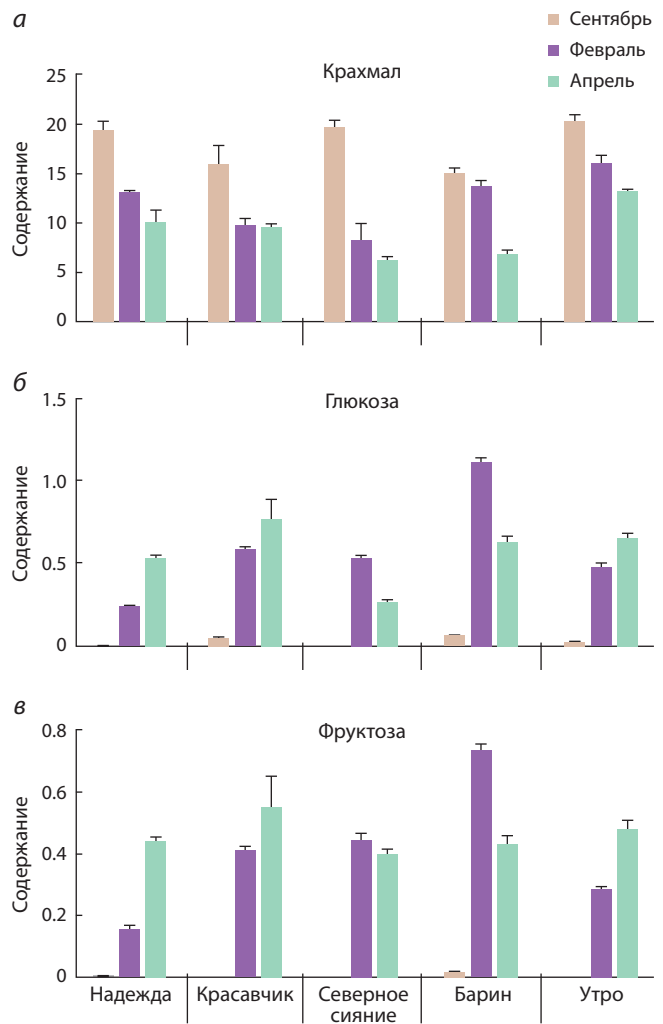


Рис. 3. Содержание крахмала и редуцирующих сахаров (глюкоза, фруктоза, мг/г свежей ткани) в клубнях картофеля пяти сортов – Надежда, Красавчик, Северное сияние, Барин, Утро, в динамике низкотемпературного, 3 °С, хранения (сентябрь, февраль, апрель).

Обсуждение

Клубни картофеля, хранящиеся при низкой температуре (3 °С), были охарактеризованы в динамике (сбор урожая, 5–6 и 8 мес. хранения) по профилю экспрессии генов β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*), а также по содержанию крахмала и редуцирующих сахаров. Выбранные для анализа пять сортов делятся на две группы, в зависимости от назначения: столовое (Барин и Утро) и картофель «фри» (Надежда, Красавчик, Северное сияние) (см. табл. 1). Такое деление связано со степенью чувствительности каждого сорта к холодовому осахариванию клубней – чем выше устойчивость, тем больше сорт подходит для производства картофеля «фри», поскольку у CIS-неустойчивых сортов жарка сопровождается повышенным образованием редуцирующих сахаров, приводящих к синтезу акриламида (Sonnwald S., Sonnwald U., 2014; Hou et al., 2019; Tai et al., 2020).

Известно, что накопление редуцирующих сахаров, свойственное как для холодового осахаривания, так и для выхода клубней из состояния покоя, положительно коррелирует с экспрессией генов β -амилаз (Zhang et al.,

2014a; Lin et al., 2019). Выбранные для анализа *StBAM1* и *StBAM9* являются гомологами генов *A. thaliana* *BAM1* и *BAM9* (см. рис. 1), для которых была показана пластидная локализация, а также наличие (*BAM1*) и отсутствие (*BAM9*) каталитической активности (Mongee, Storm, 2018). Предполагаемое функциональное сходство *StBAM1* и *StBAM9* с соответствующими ферментами у *A. thaliana* подкреплено и детализировано данными других исследований. Так, показано, что *StBAM1* и *StBAM9* вносят разный вклад в холодовое осахаривание клубней: *StBAM1* локализуется в строме амилопласта и гидролизует растворимый крахмал (Hou et al., 2017), *StBAM9* – неактивный фермент (Zhang et al., 2014b), однако играет доминантную роль в осахаривании (Hou et al., 2017). Локализуясь на поверхности гранулы крахмала, *StBAM9* образует белковый комплекс с *StBAM1*, привлекая, таким образом, активную амилазу *StBAM1* к высвобождению молекул растворимого глюкоана с поверхности гранул (Hou et al., 2017). Фермент *StBAM1* может быть инактивирован при взаимодействии с ингибитором амилаз *SbAI* (Zhang et al., 2014b), а также путем убиквитинирования и деградации *StBAM1*, запускаемых транскрипционным фактором *SbRFP1* (Zhang et al., 2019).

С учетом подобных функциональных данных ожидалось рост уровня экспрессии генов *StBAM1* и *StBAM9* и снижение транскрипции гена *StAI* при долговременном воздействии (5–6 и 8 мес.) низких температур на клубни. Однако было определено, что экспрессия всех трех генов существенно снижается по мере хранения (см. рис. 2). Тем не менее при этом падает и содержание крахмала, а количество редуцирующих сахаров растет (см. рис. 3). Можно предположить, что генная активность *StBAM1* и *StBAM9* коррелирует с количеством крахмала (положительно) и моносахаридов (отрицательно). А уровень экспрессии *StAI*, в свою очередь, находится в прямой зависимости от уровня экспрессии *StBAM1* и генов α -амилаз.

Кроме того, показанный ранее рост экспрессии *StBAM1* и *StBAM9* наблюдался после 30 дней воздействия низких температур (Zhang et al., 2014a), тогда как в данном исследовании анализ проводился спустя 7 и 9 мес. после закладки на хранение. Вероятно, в случае хранения клубней, находящихся в состоянии физиологического покоя, 30 дней можно рассматривать как кратковременное воздействие низких температур, в процессе которого клубни накапливают достаточное для устойчивости к холоду количество редуцирующих сахаров, после чего устанавливается равновесие между содержанием крахмала/дисахаридов и активностью деградирующих крахмал ферментов. Необходимо также учитывать активное участие в деградации запасаемого крахмала α -амилаз (гидролиз) (Zhang et al., 2014a) и пластидной фосфоорилазы крахмала (фосфоролит) (Slugina et al., 2020).

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод об отсутствии какой-либо зависимости между степенью предрасположенности сорта к холодовому осахариванию и профилем экспрессии генов β -амилаз (*StBAM1*, *StBAM9*) и ингибитора амилаз (*StAI*).

Список литературы / References

- Bello-Perez L.A., Flores-Silva P.C., Agama-Acevedo E., Tovar J. Starch digestibility: past, present, and future. *J. Sci. Food Agric.* 2020;100(14):5009-5016. DOI 10.1002/jsfa.8955.
- Benkeblia N., Alexopoulos A.A., Passam H.C. Physiology and biochemistry regulation of dormancy and sprouting in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Fruit Vegetable Cereal Sci. Biotechnol.* 2008;2(1):54-68.
- Dyachenko E.A., Kulakova A.V., Meleshin A.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Amylase inhibitor *SbAI* in potato species: structure, variability and expression pattern. *Russ. J. Genet.* 2021;57(1):36-46. DOI 10.1134/S102279542101004X.
- Fettke J., Eckermann N., Kötting O., Ritte G., Steup M. Novel starch-related enzymes and carbohydrates. *Cell. Mol. Biol.* 2007;52: 883-904.
- Fischer M., Schreiber L., Colby T., Kuckenberger M., Tacke E., Hoffert H.R., Schmidt J., Gebhardt C. Novel candidate genes influencing natural variation in potato tuber cold sweetening identified by comparative proteomics and association mapping. *BMC Plant Biol.* 2013;13:113. DOI 10.1186/1471-2229-13-113.
- Guo L., Tao H., Cui B., Janaswamy S. The effects of sequential enzyme modifications on structural and physicochemical properties of sweet potato starch granules. *Food Chem.* 2019;277:504-514. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.11.014.
- Hopkins R.H., Jelinek B., Harrison L.E. The action of β -amylase on potato amylose. *Biochem. J.* 1948;43(1):32-38. DOI 10.1042/bj0430032.
- Hou J., Liu T., Reid S., Zhang H., Peng X., Sun K., Du J., Sonnewald U., Song B. Silencing of α -amylase *StAmy23* in potato tuber leads to delayed sprouting. *Plant Physiol. Biochem.* 2019;139:411-418. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.03.044.
- Hou J., Zhang H., Liu J., Reid S., Liu T., Xu S., Tian Z., Sonnewald U., Song B., Xie C. Amylases *StAmy23*, *StBAM1* and *StBAM9* regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways. *J. Exp. Bot.* 2017;68:2317-2331. DOI 10.1093/jxb/erx076.
- Lin Q., Xie Y., Guan W., Duan Y., Wang Z., Sun C. Combined transcriptomic and proteomic analysis of cold stress induced sugar accumulation and heat shock proteins expression during postharvest potato tuber storage. *Food Chem.* 2019;297:124991. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.124991.
- Lopez-Pardo R., de Galarreta J.I.R., Ritter E. Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. *31(1):39-45.* DOI 10.1007/s11032-012-9766-z. *Mol. Breed.* 2013;
- Monroe J.D., Storm A.R. Review: The Arabidopsis β -amylase (BAM) gene family: Diversity of form and function. *Plant Sci.* 2018;276: 163-170. DOI 10.1016/j.plantsci.2018.08.016.
- Nielsen T.H., Deiting U., Stitt M. A [β]-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol.* 1997;113(2): 503-510. DOI 10.1104/pp.113.2.503.
- Riyaphan J., Jhong C.H., Lin S.R., Chang C.H., Tsai M.J., Lee D.N., Sung P.J., Leong M.K., Weng C.F. Hypoglycemic efficacy of docking selected natural compounds against α -glucosidase and α -amylase. *Molecules.* 2018;23(9):2260. DOI 10.3390/molecules23092260.
- Shoab N., Liu L., Ali A., Mughal N., Yu G., Huang Y. Molecular functions and pathways of plastidial starch phosphorylase (PHO1) in starch metabolism: current and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10450. DOI 10.3390/ijms221910450.
- Slugina M.A., Meleshin A.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. The opposite effect of low temperature on the *Pho1a* starch phosphorylase gene expression in *Solanum tuberosum* L. tubers and *Petota* species leaves. *Am. J. Potato Res.* 2020;97:78-87. DOI 10.1007/s12230-019-09758-z.
- Solomos T., Mattoo A.K. Starch-sugar metabolism in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers in response to temperature variations. In: Razdan M.K., Mattoo A.K. (Eds.). *Gene Improvement of Solanaceous Crops.* New York: Sci. Publ. Inc., 2005;1:209-234.
- Sonnewald S., Sonnewald U. Regulation of potato tuber sprouting. *Planta.* 2014;239(1):27-38. DOI 10.1007/s00425-013-1968-z.

- Tai H.H., Lagüe M., Thomson S., Aourousseau F., Neilson J., Murphy A., Bizimungu B., Davidson C., Deveaux V., Bègue Y., Wang H.Y., Xiong X., Jacobs J.M.E. Tuber transcriptome profiling of eight potato cultivars with different cold-induced sweetening responses to cold storage. *Plant Physiol. Biochem.* 2020;146:163-176. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.11.001.
- Tang X., Zhang N., Si H., Calderón-Urrea A. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress. *Plant Methods.* 2017;13(85):85. DOI 10.1186/s13007-017-0238-7.
- Taylor M.A., Ross H.A., McRae D., Stewart D., Roberts I., Duncan G., Wright F., Millam S., Davies H.V. A potato alpha-glucosidase gene encodes a glycoprotein-processing alpha-glucosidase II-like activity. Demonstration of enzyme activity and effects of down-regulation in transgenic plants. *Plant J.* 2000;24(3):305-316. DOI 10.1046/j.1365-3113x.2000.00873.x.
- Thalman M., Coiro M., Meier T., Wicker T., Zeeman S.C., Santelia D. The evolution of functional complexity within the β -amylase gene family in land plants. *BMC Evol. Biol.* 2019;19(1):66. DOI 10.1186/s12862-019-1395-2.
- Vajravijayan S., Pletnev S., Mani N., Pletneva N., Nandhagopal N., Gunasekaran K. Structural insights on starch hydrolysis by plant β -amylase and its evolutionary relationship with bacterial enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;113:329-337. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.138.
- Van Harselaar J.K., Lorenz J., Senning M., Sonnewald U., Sonnewald S. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics.* 2017;18(1):37. DOI 10.1186/s12864-016-3381-z.
- Vinje M.A., Walling J.G., Henson C.A., Duke S.H. Comparative gene expression analysis of the β -amylase and hordein gene families in the developing barley grain. *Gene.* 2019;693:127-136. DOI 10.1016/j.gene.2018.12.041.
- Zeeman S.C., Delatte T., Messerli G., Umhang M., Stettler M., Mettler T., Streb S., Reinhold H., Kötting O. Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Funct. Plant Biol.* 2007;34(6):465-473. DOI 10.1071/FP06313.
- Zhang H., Hou J., Liu J., Xie C., Song B. Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting. *Potato Res.* 2014a;57:47-58. DOI 10.1007/s11540-014-9252-6.
- Zhang H., Liu J., Hou J., Yao Y., Lin Y., Ou Y., Song B., Xie C. The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity. *Plant Biotechnol. J.* 2014b;12(7):984-993. DOI 10.1111/pbi.12221.
- Zhang H., Yao Y., Chen S., Hou J., Yu Y., Liu T., Du J., Song B., Xie C. *SbRFP1* regulates cold-induced sweetening of potato tubers by inactivation of *StBAM1*. *Plant Physiol. Biochem.* 2019;136:215-221. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.01.019.
- Zhao L., Yang T., Xing C., Dong H., Qi K., Gao J., Tao S., Wu J., Wu J., Zhang S., Huang X. The β -amylase *PbrBAM3* from pear (*Pyrus betulaefolia*) regulates soluble sugar accumulation and ROS homeostasis in response to cold stress. *Plant Sci.* 2019;287:110184. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110184.

ORCID ID

A.V. Kulakova orcid.org/0000-0002-3124-525X
G.I. Efremov orcid.org/0000-0002-2943-5118
A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.03.2022. После доработки 30.05.2022. Принята к публикации 30.05.2022.

Combining ability for quantitative traits related to productivity in durum wheat

R.G. Dragov 

Agricultural Academy, Field Crops Institute, Chirpan, Bulgaria

 dragov1@abv.bg

Abstract. The present study was to determine the nature of gene action and combining ability of six quantitative traits related to productivity of five varieties and ten hybrid combinations of durum wheat. Five modern durum wheat varieties were used in diallel crosses as parents. The study includes three F_1 and two F_2 generations. The experiments were done in a randomized block design in three replications during three years. Significant differences between the genotypes in both generations was found for all the traits. The general combining ability and specific combining ability showed reliability in both generations. Obtained results suggests that breeding schemes should include both types of genetic effects in order to improve productivity components. The ratio of variances showed that general combining ability has a greater influence on the inheritance of plant height, spike length and thousand kernels weight. For productivity tillering capacity, number of spikelets per spike and kernels weight per spike, specific combining ability has a great impact in inheritance. For thousand kernels weight a re-determination of the genetic formula was established in both generations. Durum wheat varieties Deni, Superdur and Progres were found to be the best general combiners for studied productivity elements. The most valuable cross combinations were Deni \times Superdur, Superdur \times Predel and Progres \times Predel. Parental wheat varieties and progenies from these crosses can be used for improving productivity components and for increasing yields in durum wheat breeding programs.


Key words: gene action; combining ability; quantitative traits; durum wheat; diallel cross.

For citation: Dragov R.G. Combining ability for quantitative traits related to productivity in durum wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):515-523. DOI 10.18699/VJGB-22-63

Комбинационная способность количественных признаков, связанных с продуктивностью твердой пшеницы

Р.Г. Драгов 

Сельскохозяйственная академия, Институт полевых культур, Чирпан, Болгария

 dragov1@abv.bg

Аннотация. Настоящее исследование направлено на определение характера действия генов и комбинационной способности твердой пшеницы по шести количественным признакам для пяти сортов и десяти гибридных комбинаций. В исследование были включены пять современных сортов твердой пшеницы в качестве родителей при диаллельном скрещивании. Изучены три поколения F_1 и два поколения F_2 . Эксперименты выполнены в рандомизированном блочном дизайне в трех повторениях в течение трех лет. Выявлены достоверные различия между генотипами по всем изучаемым признакам в обоих поколениях. Общая комбинационная способность и специфическая комбинационная способность показали достоверные отличия в обоих поколениях. Полученные результаты позволяют предположить, что селекционная схема должна учитывать оба типа генетических эффектов для улучшения элементов продуктивности. Соотношение дисперсий демонстрирует, что общая комбинационная способность больше влияет на наследуемость признаков «высота растения», «длина колоса» и «масса 1000 зерен». Для признаков «продуктивная кустистость», «число колосков в колосе» и «масса зерен в колосе» большее влияние на наследование оказывает специфическая комбинационная способность. Для массы 1000 зерен в обоих поколениях установлено переопределение генетических формул. Лучшими общими комбинаторами по элементам продуктивности одновременно по нескольким признакам являются сорта Дени, Супердур и Прогрес. Самые ценные комбинации скрещиваний по нескольким признакам – Дени \times Супердур, Супердур \times Предел и Прогрес \times Предел. Эти сорта и комбинации можно использовать для улучшения признаков продуктивности и повышения урожайности в программах селекции твердой пшеницы.

Ключевые слова: действие генов; комбинационная способность; количественные признаки; твердая пшеница; диаллельное скрещивание.

Introduction

Breeding strategy of durum wheat is based on genetic information on the inheritance of the main quantitative traits related to productivity. To obtain such information, it is necessary to apply a genetic model corresponding to the source material to be used. In a regular breeding program, it is important to identify the best parents for hybridization and crosses to select valuable genotypes (Inamullah et al., 2006). Diallel crosses have been used for a long time in genetic research to determine the inheritance of a trait among a set of genotypes and to identify superior parents for hybrid or varieties development.

Information on additive gene effects i. e. general combining ability effects (GCA) is of great importance, because it successfully predicts the genetic potential of parents who give desired results in segregating generations. In determining the specific combining ability effects (SCA), a relationship is established with the non-additive gene effects (dominance and epistasis components). The identification of a good hybrid combination with high SCA on a given trait makes it possible to expect a more probable transgressive form for the trait. Combining ability describes the breeding value of parental varieties to produce better hybrids as well as their crosses (Griffing, 1956).

The importance of combining ability is related to the evaluation of parental lines and their hybrids by their respective additive and non-additive genetic effects in relation to a certain trait. Diallel crosses give a more general view of combining ability, where general and specific combining ability are indicators for nature of gene action (Farooq et al., 2010). Assessment of GCA effects show that it is not possible to choose a good general combiner for all traits of the productivity. This is due to the inability to combine in one genotype high GCA on all traits (Kashif et al., 2008). However, some parents show desired GCA effects for several traits. It is obvious that high-yielding varieties included in crosses are mainly responsible for increasing productivity (Adel, Ali, 2013).

A number of authors, using schemes of full and half diallel crosses, have established the breeding value of a large number of varieties and the gene action for traits related to productivity. In the publications cited below, the authors found that both additive and non-additive gene effects played a role in the inheritance of tested traits. According to J. Yao et al. (2011) and M. Singht et al. (2018) plant height and spike length mainly controlled by additive gene effects. It was reported that in the inheritance of thousand kernels weight the non-additive gene effects play an essential role (Akinci, 2009; Pansuriya et al., 2014), while A. Hannachi et al. (2017) and A. Hassan et al. (2018) establish inverse. Plant height, tillering capacity and number of spikelets per spike were mainly controlled by non-additive gene effects (Adel, Ali, 2013; Pansuriya et al., 2014; Kandil et al., 2016), when A. Hannachi et al. (2017) reported that plant height and productivity tillering capacity were additive. The inheritance of the spike length, number of spikelets per spike, and kernel weight per spike are controlled by non-additive gene effects and they have a major role (Patel et al., 2016; Tiwari et al., 2017), also A. Pansuriya et al. (2014) for these traits and for spike length. Productivity tillering capacity and number of spikelets per spike are controlled by non-additive gene effects, on the other hand, for spike length

and thousand kernel weight additive gene effects dominate in inheritance (Farooq et al., 2019).

It can be concluded from the published data that parental varieties have a great influence on both types of combining ability. On the other hand, they are carried out in different growing conditions, which gives additional confirms to this statement of diversity.

The present investigation was undertaken to determine the nature and magnitude of gene action and general and specific combining ability for five modern durum wheat varieties and for six quantitative traits related to productivity in diallel cross of durum wheat.

Materials and methods

Parents and crosses. Five modern durum wheat varieties were included in the study as the parental varieties in the half diallel crosses. The varieties are selected among the new Bulgarian varieties of durum wheats, including the old and the new variety-standard and the Austrian variety Superdur, which has recently become widespread in Bulgaria. Victoria – Bulgaria, Deni – Bulgaria, Superdur – Austria, old variety-standard Progres – Bulgaria and new variety-standard Predel – Bulgaria. The choice of varieties is based on their previous observation. They are created in Field Crops Institute, Chirpan and are genetically distant. Progres and Deni are created by experimental mutagenesis combined with hybridization and Victoria and Predel are created by hybridization. A diallel cross was performed in which all the described varieties were crossed with each other without reciprocal combinations. The crosses was carried out handmade at the beginning of heading time in field condition. The following ten combinations were performed: Victoria × Deni, Victoria × Superdur, Victoria × Progres, Victoria × Predel, Deni × Superdur, Deni × Progres, Deni × Predel, Superdur × Progres, Superdur × Predel, Progres × Predel. From each combination, 30 spikes were castrated and pollinated. From the harvested F₁ plants, the seeds necessary for sowing of F₂ generation were randomly selected.

Management. The parents are sown in each replication in two rows, the F₁ hybrids in two rows, and the F₂ hybrids in five rows. Genotypes are sown handmade in the field in beds. Row length – two meters, row spacing – twenty cm and inside the row – five cm in a randomized block design with three replications. After the full maturity phenophase, the necessary plants from each replication are harvested and collected for biometric research. Twenty plants were selected from the parents and F₁ generation and thirty plants from F₂ generation at random. The diallel cross was performed in three consecutive years. Thus, generation F₁ for three years and F₂ for two years are provided. The experiments was conducted in three harvest years 2014, 2015 and 2016. The experiments was carried out in the breeding field of the Field Crops Institute – Chirpan according to the adopted technology for growing durum wheat. The predecessor is spring peas. The soil type is Chernozems compact Eutric Vertisols (by FAO). The three years meteorological condition are characterized by higher temperatures compared to the multi-year period (Fig. 1). The first year have 18.5 % and the second 58.2 % precipitation over the multi-year period during the growing season, while in the third year precipitation are 17.5 % less than in the multi-year period (Fig. 2).

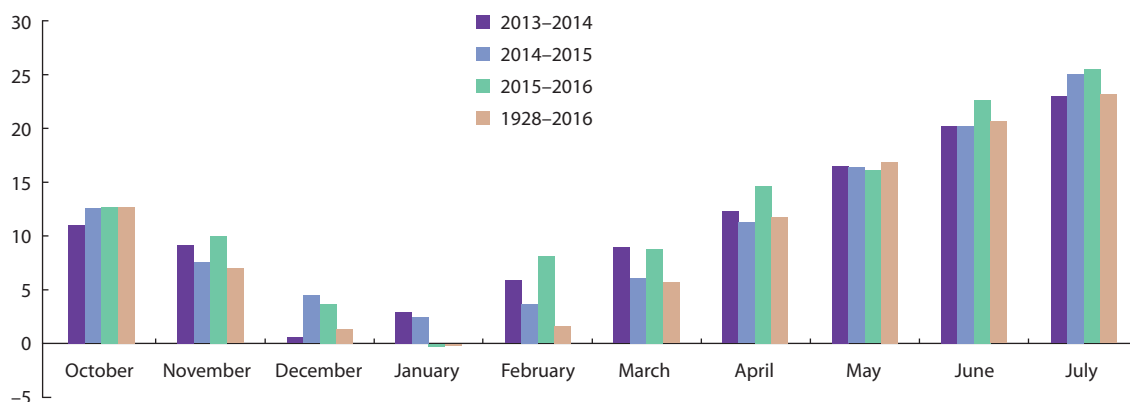


Fig. 1. Average monthly and multiyear air temperature during 2013–2016 harvest years.

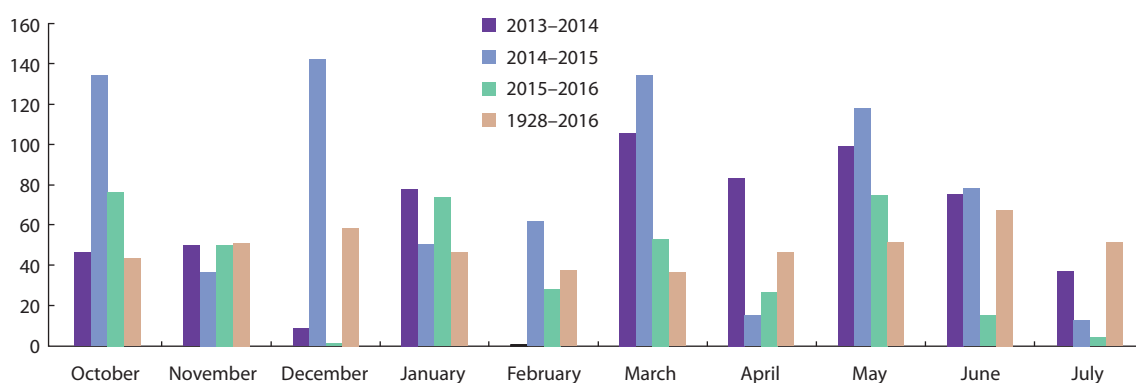


Fig. 2. Average monthly and multiyear amount of precipitation during 2013–2016 harvest years.

The following traits were observed. Plant height (cm) – it is measured from the ground surface to the end of the spike without the awns on the main stem in centimeters. Productivity tillering capacity (pcs.) – the fertile spikes of one plant are counted. Spike length (cm) – measured on the main stem from the base of the spike to the top of the uppermost spikelet. Number of spikelets per spike (pcs.) – the spikelets in the main spike are counted. Number of kernels per spike (pcs.) – all kernels of the main spike are counted after handmade threshing. Thousand kernels weight (g) – five hundred kernels are weighed and multiplied by two. All traits are determined by methodology by Y. Enchev et al. (1976).

Statistical analysis. The data from the three years F_1 and the two years F_2 are averaged and on them are conducted statistical processing. In the processing of the experimental data, mathematical and statistical methods were used on the results according to the set goal of the research. To perform diallel analysis was used combining ability analysis in diallel crosses – by method II model I (Griffing, 1956) with the program software of M. Burow and J. Coors (1994). Analysis of variance (ANOVA) by traits is derived through the same program on M. Burow and J. Coors (1994).

Results

The results of analysis of variance showed statistically significant differences between the genotypes for all studied traits in both generations. The values of the variances for GCA and SCA were significant in both generations (Table 1). Therefore,

both additive and non-additive gene effects (dominance and epistasis) were of significant importance in the inheritance of the traits. The studied traits related to durum wheat productivity show that they are controlled by both additive and non-additive gene effects.

The ratio of GCA and SCA variances (σ_g^2/σ_s^2) for F_1 and F_2 are presented in Table 1. For plant height, spike length, number of spikelets per spike and thousand kernel weight, the sum of squares indicates that additive gene effects have a greater influence in inheritance. For the other two traits, the sum of the squares indicates that non-additive gene effects have a greater impact. This is proved by the ratio of the variances of GCA and SCA, respectively. The preponderance of additive gene effects ($\sigma_g^2/\sigma_s^2 > 1$) was found in the inheritance of plant height, spike length and thousand kernel weight. The spike length in F_2 generation showed a significant increase, which indicates that the additivity increases. Domination of additive gene effects allow application of classical breeding methods. For these traits selection can start in early segregating generations (F_2 – F_3).

Domination of non-additive gene effects ($\sigma_g^2/\sigma_s^2 < 1$) is observed for the productivity tillering capacity, number of spikelets per spike and kernels weight per spike. Non-additive gene effects (dominance and epistasis) prevalence in their expression.

This analysis does not allow to determine or dominance or epistasis are responsible for the inheritance of the traits. It is well known that when inheritance is determined by non-

Table 1. ANOVA for general combining ability (GCA), specific combining ability (SCA) and relation to variance of GCA and SCA (σ_g^2/σ_s^2) for six traits related to productivity

| Traits | Source of variance | F ₁ | | | F ₂ | | |
|---------------------------------|-------------------------|----------------|--------------|--------------------------|----------------|--------------|--------------------------|
| | | Sum of squares | Mean squares | Significant (*, **, ***) | Sum of squares | Mean squares | Significant (*, **, ***) |
| Plant height | Genotype | 1965.8 | 140.4 | *** | 2032.0 | 145.1 | *** |
| | GCA | 1695.3 | 423.8 | *** | 1515.8 | 378.9 | *** |
| | SCA | 270.4 | 27.0 | *** | 516.3 | 51.6 | *** |
| | Error | 78.9 | 2.8 | | 92.7 | 3.3 | |
| | σ_g^2/σ_s^2 | 2.32 | | | 1.08 | | |
| Productivity tillering capacity | Genotype | 30.299 | 2.164 | *** | 12.83 | 0.91 | *** |
| | GCA | 9.987 | 2.497 | *** | 2.22 | 0.55 | *** |
| | SCA | 20.311 | 2.031 | *** | 10.6 | 1.06 | *** |
| | Error | 2.75 | 0.098 | | 2.89 | 0.10 | |
| | σ_g^2/σ_s^2 | 0.03 | | | 0.06 | | |
| Spike length | Genotype | 20.97 | 1.49 | *** | 19.19 | 1.37 | *** |
| | GCA | 17.26 | 4.31 | *** | 18.22 | 4.55 | *** |
| | SCA | 3.71 | 0.37 | *** | 0.97 | 0.09 | * |
| | Error | 1.29 | 0.04 | | 2.2 | 0.08 | |
| | σ_g^2/σ_s^2 | 1.8 | | | 42 | | |
| Number of spikelets per spike | Genotype | 27.78 | 1.98 | *** | 16.15 | 1.15 | ** |
| | GCA | 15.12 | 3.78 | *** | 10.95 | 2.73 | *** |
| | SCA | 12.67 | 1.26 | *** | 5.2 | 0.52 | * |
| | Error | 5.68 | 0.20 | *** | 7.42 | 0.26 | |
| | σ_g^2/σ_s^2 | 0.31 | | | 0.12 | | |
| Kernels weight per spike | Genotype | 2.64 | 0.189 | *** | 1.80 | 0.12 | *** |
| | GCA | 0.08 | 0.20 | * | 0.66 | 0.17 | *** |
| | SCA | 2.55 | 0.25 | *** | 1.13 | 0.11 | *** |
| | Error | 0.47 | 0.01 | | 0.33 | 0.01 | |
| | σ_g^2/σ_s^2 | 0.14 | | | 0.06 | | |
| Thousand kernels weight | Genotype | 445.8 | 31.8 | *** | 626.6 | 44.7 | *** |
| | GCA | 334.6 | 83.6 | *** | 456.3 | 114.1 | *** |
| | SCA | 111.2 | 11.1 | *** | 169.3 | 16.9 | *** |
| | Error | 82.5 | 2.94 | | 56.8 | 2.03 | |
| | σ_g^2/σ_s^2 | 1.26 | | | 1.02 | | |

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; σ_g^2 – GCA variance; σ_s^2 – SCA variance.

additive genetic effects, selection in early segregating generations will be difficult. In this case effective selection must start in the later segregating generations F₄–F₅.

Although the preponderance of additive genetic effects for the thousand kernel weight in the individual years and generations has been established, there is a change in the genetic effects controlling the trait. This is due to the genotype-environment interaction and is explained by the phenomenon of redetermination of the genetic formula. In F₁ in 2014 the non-additive genetic effects preponderance, and in 2015 and 2016 the additive ones. In F₂ in 2015 the non-additive genetic

effects preponderance and in 2016 the additive ones (data not shown). In the individual years in both generations, all other traits show a one-way ratio of variances that determine the influence of genetic effects.

The analysis for GCA of parents and SCA of hybrids for the studied traits in F₁ and F₂ is presented in the next two tables (Tables 2 and 3). From a breeding point of view, genotypes with a negative value for plant height due to the connection with lodging are more valuable. For all other traits, positive values are preferable, as their increase will lead to an increase in productivity.

Table 2. General combining ability of parents and specific combining ability of crosses for three traits related to productivity

| Genotype | Plant height | | Productivity tillering capacity | | Spike length | |
|--------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ |
| Parents/error of parents | ±0.51 | ±0.56 | ±0.096 | ±0.099 | ±0.06 | ±0.08 |
| Victoria | 6.69* | 5.82* | -0.58* | -0.06 n.s. | -0.79* | -0.79* |
| Deni | -0.26 n.s. | -1.46* | 0.23* | 0.19* | 0.32* | 0.35* |
| Superdur | -4.8* | -3.55* | 0.16* | -0.10* | 0.11* | 0.15* |
| Progres | 1.58* | 2.99* | -0.04 n.s. | 0.15* | 0.25* | 0.29* |
| Predel | -3.2* | -3.79* | 0.23* | -0.17* | 0.09* | -0.004 n.s. |
| Hybrid combinations | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ |
| Crosses/error of crosses | ±1.15 | ±1.25 | ±0.216 | ±0.22 | ±0.14 | ±0.19 |
| Victoria × Deni | 0.12 n.s. | 2.59* | -0.60* | 0.23* | 0.04 n.s. | 0.14 n.s. |
| Victoria × Superdur | 3.30* | 5.51* | 0.36* | -0.01 n.s. | 0.25* | -0.01 n.s. |
| Victoria × Progres | 1.37* | -1.07 n.s. | -0.42* | 0.13 n.s. | 0.31* | -0.15 n.s. |
| Victoria × Predel | 0.37 n.s. | 2.29* | 0.03 n.s. | -0.17 n.s. | 0.26* | 0.07 n.s. |
| Deni × Superdur | 5.42* | 3.58* | 0.01 n.s. | -0.20 n.s. | 0.30* | 0.26* |
| Deni × Progres | -1.40* | 0.45 n.s. | 1.12* | 0.10 n.s. | 0.29* | -0.003 n.s. |
| Deni × Predel | -0.10 n.s. | 0.05 n.s. | 0.41* | -0.77* | 0.31* | -0.27* |
| Superdur × Progres | -1.59* | 4.11* | 0.09 n.s. | -0.13 n.s. | -0.15* | 0.13 n.s. |
| Superdur × Predel | 0.26 n.s. | 1.8* | 1.41* | -1.10* | -0.03 n.s. | -0.13 n.s. |
| Progres × Predel | -3.28* | -1.88* | 0.22* | 0.33* | 0.15* | 0.22* |

* $p \leq 0.05$; n.s. – no significant.**Table 3.** Values for general combining ability of parents and specific combining ability of crosses for three quantitative traits related to productivity

| Genotype | Number of spikelets per spike | | Kernels weight per spike | | Thousand kernels weight | |
|--------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ |
| Parents/error of parents | ±0.13 | ±0.15 | ±0.04 | ±0.03 | ±0.52 | ±0.43 |
| Victoria | 0.15* | 0.23* | 0.03 n.s. | 0.01 n.s. | 1.00* | -0.15 n.s. |
| Deni | 0.64* | 0.49* | -0.02 n.s. | -0.01 n.s. | 0.86* | -0.49* |
| Superdur | -0.29* | -0.13 n.s. | -0.03 n.s. | -0.05* | -2.06* | -2.00* |
| Progres | -0.43* | -0.40* | 0.02 n.s. | 0.12* | 2.32* | 3.96* |
| Predel | -0.06 n.s. | -0.18* | 0.01 n.s. | 0.04* | -2.12* | -1.3* |
| Hybrid combinations | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ |
| Crosses/error of crosses | ±0.31 | ±0.35 | ±0.08 | ±0.07 | ±1.18 | ±0.98 |
| Victoria × Deni | 0.67* | 0.62* | 0.18* | 0.04 n.s. | -0.79 n.s. | 0.24 n.s. |
| Victoria × Superdur | 0.44* | 0.54* | 0.12* | -0.08* | 1.87* | -0.47 n.s. |
| Victoria × Progres | 0.89* | 0.12 n.s. | 0.07 n.s. | 0.04 n.s. | -0.28 n.s. | -0.24 n.s. |
| Victoria × Predel | 0.32* | -0.12 n.s. | 0.16* | -0.06 n.s. | 1.46* | 0.79 n.s. |
| Deni × Superdur | 0.42* | 0.12 n.s. | 0.32* | 0.15* | 2.61* | -0.70 n.s. |
| Deni × Progres | -0.16 n.s. | -0.01 n.s. | 0.10* | 0.01 n.s. | 1.22* | 0.85 n.s. |
| Deni × Predel | 0.09 n.s. | -0.58* | 0.19* | 0.16* | 0.7 n.s. | 2.36* |
| Superdur × Progres | -0.76* | -0.14 n.s. | 0.21* | 0.28* | 0.29 n.s. | 3.83* |
| Superdur × Predel | -0.36* | -0.22 n.s. | 0.16* | 0.17* | 1.5* | 2.71* |
| Progres × Predel | -0.25 n.s. | 0.01 n.s. | 0.01 n.s. | 0.09* | 0.34 n.s. | 0.61 n.s. |

* $p \leq 0.05$; n.s. – no significant.

Plant height. Table 2 presents the values for plant height. The varieties Victoria and Progres has a significant and positive values for GCA in F_1 and F_2 . They increase the plant height in the hybrids in which he participated as parents. The varieties Superdur and Predel have negative significant values of GCA in both generations. These varieties reducing the plant height in the hybrids in which they participate. They can be used successfully in the breeding program for obtaining dwarf durum wheats. In terms of SCA, valuable are the hybrid combination Progres \times Predel, with significant negative values in both generations. The other crosses have different values for SCA, and in different generations they are differently significant and change their signs according to the generation.

Productivity tillering capacity. Table 2 presents the values for GCA and SCA for the productivity tillering capacity. Significant values of GCA to increase the trait of productivity tillering capacity have Deni variety in both generations. The varieties Superdur and Predel have positive and significant values in F_1 generation, while in F_2 generation the values are significant but negative. Variety Victoria has a significant and negative GCA in F_1 and a negative and nonsignificant in F_2 and reduces the values of the trait. Of greater interest are hybrid combinations and their SCA values (see Table 2), as non-additive effects have been found to preponderance. The results show that one of the crosses Progres \times Predel has significant and positive values in both generations for SCA. The other crosses occupy an intermediate position.

Spike length. Table 2 presents the values for the general and specific combining ability of parents and hybrids for spike length. We define the varieties Deni, Superdur and Progres as good general combiners to increase spike length, as they have positive and significant values for GCA in both generations. Victoria variety has significant and negative values in both generations and it decreases the spike length in the hybrids in which it participates. The SCA values of the hybrids show that two crosses showed significant and positive values in F_1 and F_2 are Deni \times Superdur and Progres \times Predel.

Number of spikelets per spike. The values for GCA and SCA for the trait number of spikelets per spike are presented in Table 3. The Victoria and Deni varieties in both generations have significant values to increasing number of spikelets per spike and they are good general combiners for this trait. Variety Progres has negative GCA and reducing the values of the trait. The other varieties have nonsignificant values, which shows their insignificant role. The greatest interest is in hybrid combinations, as non-additive gene effects have been shown to play a major role in inheritance. The hybrid combinations Victoria \times Deni and Victoria \times Superdur show significant and positive SCA effects in both generations. With the highest SCA value is the cross Victoria \times Deni.

Kernels weight per spike. Table 3 represents the values for parental GCA and hybrid SCA. In F_1 there are no varieties with significant GCA effects. No good general combiners have been reported to increase kernels weight per spike in both generations. In the F_2 generation, the Progres and Predel varieties increase the values of the kernels weight per spike, and the Superdur variety decreases it.

These results are very contradictory and it is difficult to define any of the varieties as a good general combiner on this

trait. We can consider that the varieties Progres and Predel are good general combiners on the basis of showing significant and positive GCA effects in F_2 generation. Greater attention should be paid to hybrid combinations, as SCA effects preponderance. Four significant good hybrid combinations are observed in terms of SCA effects. They are positive and significant in both generations. The most promising hybrid combinations are Deni \times Superdur, Deni \times Predel, Superdur \times Progres and Superdur \times Predel.

Thousand kernels weight. The variety Progres (see Table 3) is good general combiners for increasing the values of the trait thousand kernels weight. Variety Progres has positive and significant values in both generations. On the other hand, general combiners that have been significant to reduce grain size are the Predel and Superdur varieties in both generations. In Table 3 can be seen that the cross Superdur \times Predel, which in both generations shows positive and significant values for the SCA effects, is interesting in terms of breeding. The remaining crosses in most cases have a significant value in only one of the generations. For all traits the values for GCA and SCA in most cases are in one-way direction and can be relied on their reliability.

For the possibilities of heterosis in the breeding of durum wheat and obtaining transgressive forms, it is necessary to consider the crosses with significant SCA effects on several traits. Of the studied hybrid combinations (see Tables 2 and 3) as the most promising with significant SCA effects are Progres \times Predel for plant height; Progres \times Predel for productivity tillering capacity; Deni \times Superdur and Progres \times Predel for spike length; Victoria \times Deni and Victoria \times Superdur for the number of spikelets per spike; Deni \times Superdur, Deni \times Predel, Superdur \times Progres and Superdur \times Predel for grains weight per spike; Superdur \times Predel for the thousand kernels weight.

Discussion

Development of wheat varieties possessing improved yield related characters had been the major objective of durum wheat breeders. Thus availability of genetically based variation for traits like plant height, productivity tillering capacity, spike length, number of spikelets per spike, kernels weight per spike and thousand grain weight breeding population is essential. Present genetic material used here to generate information on genetic nature of these traits. A number of studies by other investigations are in line with the results obtained by us for GCA and SCA. Many researchers have also found significant GCA and SCA effects for the plant height (Topal et al., 2004; Pansuriya et al., 2014; Ali et al., 2018; Singh et al., 2018; Sharma et al., 2019; Ayoob, 2020); for productivity tillering ability (Topal et al., 2004; Akinci, 2009; Adel, Ali, 2013; Parveen et al., 2018; Talha et al., 2018; Bajaniya et al., 2019; Farooq et al., 2019; Hammam et al., 2020); for spike length (Topal et al., 2004; Yao et al., 2011; Pansuriya et al., 2014; Patel et al., 2016; Rajput, Kandalkar, 2018; Sadeghzadeh-Ahari et al., 2018; Khaled et al., 2020; Shamsabadi et al., 2020); for number of spikelets per spike (Adel, Ali, 2013; Pansuriya et al., 2014; Kandil et al., 2016; Patel et al., 2016; Saeed, Khalil, 2017; Parveen et al., 2018; Khaled et al., 2020); for kernels weight per spike (Topal et al., 2004; Adel, Ali, 2013; Mandal, Madhuri, 2016; Patel et al., 2016; Talha et al., 2018; Amin, Towfiq, 2019; Shamsabadi

et al., 2020); for thousand kernels weight (Topal et al., 2004; Akinci, 2009; Desale, Mehta, 2013; Brahim, Mohamed, 2014; Motawea, 2017; Ali et al., 2018; Hassan et al., 2018; Ali, 2019; Khokhar et al., 2019; Sharma et al., 2019).

The obtained results for the GCA and SCA give a very clear idea of the control in the inheritance of the traits elements of the yield. The impact of additive and non-additive gene action in the inheritance of the structural elements of the yield shows that in order to maximize the productivity of durum wheat, a system should be used that includes both variances in simultaneously.

Plant height and spike length are used for an individual selection by the classical methods. In both generations they are controlled by additive gene effects. In most cases thousand kernels weight is also controlled by additive genetic effects. This shows that it is possible for breeders to obtain better results in improving these traits. It should be noted that in the case of plant height, spike length and in most cases for thousand kernels weight, the selection may start in the earlier segregating generations F_2 – F_3 . Because they are controlled by additive genetic effects. It should be noted that the main structural elements of yield – spike length and in most cases thousand kernels weight are controlled by additive gene effects. Preponderance of additive gene effects in inheritance of plant height has been reported by a number of other researchers (Yao et al., 2011; Motawea, 2017; Ali et al., 2018; Hassan et al., 2018; Rajput, Kandalkar, 2018; Singh et al., 2018; Talha et al., 2018; Sharma et al., 2019; Ayoob, 2020); for spike length (Kandil et al., 2016; Motawea, 2017; Parveen et al., 2018; Rajput, Kandalkar, 2018; Sadeghzadeh-Ahari et al., 2018; Singh et al., 2018; Farooq et al., 2019; Sharma et al., 2019; Khaled et al., 2020; Shamsabadi et al., 2020); for thousand kernels weight (Hannachi et al., 2017; Motawea, 2017; Ali et al., 2018; Hassan et al., 2018; Ali, 2019; Amin, Towfiq, 2019; Farooq et al., 2019; Khokhar et al., 2019; Sharma et al., 2019).

For other three traits preponderance non-additive gene effect in this investigation was observed. Therefore, selection in early segregating generations will be difficult. In this case, it is recommended that an effective selection must start in the later segregating generations F_4 – F_5 when the influence of the non-additive effects (dominance) decreases and the additivity increases. The results from this study for productivity tillering capacity are in line with those obtained by other authors (Desale, Mehta, 2013; Mostafa et al., 2014; Kandil et al., 2016; Ahmad et al., 2017; Saeed, Khalil, 2017; El-Gammaal, Morad, 2018; Parveen et al., 2018; Talha et al., 2018; Amin, Towfiq, 2019; Bajaniya et al., 2019; Farooq et al., 2019; Ayoob, 2020; Hammam et al., 2020); for number of spikelets per spike (Mostafa et al., 2014; Kandil et al., 2016; Ahmad et al., 2017; Saeed, Khalil, 2017; Tiwari et al., 2017; Parveen et al., 2018; Talha et al., 2018; Farooq et al., 2019; Ayoob, 2020; Khaled et al., 2020); for kernels weight per spike (Padhar et al., 2013; Mostafa et al., 2014; Kandil et al., 2016; Mandal, Madhuri, 2016; Tiwari et al., 2017; Talha et al., 2018; Amin, Towfiq, 2019, Shamsabadi et al., 2020).

For thousand kernel weight, a redetermination of the genetic formula of the trait was found. This is due to the genotype-environment interaction. Redetermination of the genetic formula

is especially evident in the case of quantitative traits that are controlled by a large number of small polygens significantly influenced by environmental conditions (Dragavtsev, Averyanova, 1983). The presence of this phenomenon makes it difficult to lead an effective selection on the thousand kernel weight in different years and generations and the selection must be conducted longer (Dragavtsev, Averyanova, 1983; Dragavtsev et al., 1984). When the phenomenon of redetermination of the genetic formula is observed in the individual years, different forms are selected, controlling the trait in the breeding process. This means that in different years valuable forms are selected in which the trait is controlled by both additive and non-additive genetic effects.

The deepening of the research allows to specify the methods of the applied breeding strategy and to optimize and increase the efficiency of the selection. The possibility of evaluating genotypes and their breeding value as a starting material for increasing productivity is also important. With the conducted research it is possible to get information about two of the most important moments in a successful breeding program – choosing parents for hybridization and leading a purposeful selection. The selection on a separate trait can increase the yield, but a more significant increase would be obtained by simultaneously comprehensively improving its elements.

Varieties that have significant GCA effects for more than one trait are of great interest for breeding. The results for the respective traits are presented in Tables 2 and 3. Tables show which varieties are good combiners on the studied traits. Variety Victoria is a good general combiner on the trait number of spikelets per spike and a bad combiner for the traits plant height and spike length. The Deni variety is a good general combiner in terms of productivity tillering capacity, spike length and number of spikelets per spike. The Superdur variety is defined as a good combiner for plant height and spike length and a bad combiner for thousand kernels weight. Variety Progres shows significant and positive values for GCA for the traits spike length and thousand kernels weight, and is a bad combiner for number of spikelets per spike and plant height. Variety Predel is a good combiner for the trait plant height and a bad combiner for thousand kernels weight. A good general combiner at the same time on three traits is the Deni variety. Good general combiners on two traits at the same time are the varieties Superdur and Progres. Good general combiners on one trait are the varieties Victoria and Predel. Varieties Victoria and Progres are bad combiners on two traits. Varieties Superdur and Predel are bad combiners on one trait. The only exception is the Deni variety, which has no traits like a bad combiner. The varieties Deni, Superdur and Progres emerge as the best general combiners for the elements of the productivity on several traits at the same time. To increase the yield, it is necessary to simultaneously improve several valuable traits. The certain general combining abilities are a prerequisite for the correct selection of parental forms and their crossing for the purposes of the durum wheat breeding program.

As can be seen, the varieties bearing high GCA most often enter the crosses with high SCA. According to the various traits, there are good crosses, such as combined parents with high X high GCA and those who have combined parents with low X low GCA. Some with high SCA values are also

a combinations of high X low GCA. As the most valuable hybrid combination with significant SCA effects on several traits its define Deni × Superdur, Superdur × Predel and Progres × Predel.

Determining the combining ability shows that it is not possible to have one variety can good combinator for all traits. Not all crosses with high SCA effects were obtained from the crosses of a good X good GCA parent (Kumar, Maloo, 2012). Rather, crosses with high SCA effects are obtained from crosses between bad X bad and bad X good combiner. They argue that such manifestations are due to the involvement of dominant or epistatis gene effects. Crosses with high SCA may be more likely to be sources of transgression (Gami et al., 2011; Tiwari et al., 2015). Transgressive lines on a certain traits can be a source for creating highly efficient durum wheat varieties. Evaluations of gene action explain the genetic potential of breeding materials and contribute to the targeted management of breeding progress in durum wheat productivity.

Conclusion

The study found that both additive and non-additive gene effects are of significant importance in the nature of gene action of the productivity traits. This implies a breeding system that includes both gene effects for improving the elements of productivity. Inheritance of plant height, spike length and thousand kernels weight is mainly controlled by additive gene effects and it is possible to start selection of genotypes in the early segregating generations F_2 – F_3 . Inheritance of productivity tillering capacity, number of spikelets per spike and kernels weight per spike is controlled by non-additive gene effects. Therefore, the selection on these traits should start in the later segregating generations F_4 – F_5 . There is obtained a change in the genetic effects affecting the expression of the trait thousand kernels weight, which indicates the presence of the redetermination of the genetic formula.

References

- Adel M., Ali E. Gene action and combining ability in a six parent diallel cross of wheat. *Asian J. Crop Sci.* 2013;5(1):14-23. DOI 10.3923/ajcs.2013.14.23.
- Ahmad E., Akhtar M., Badoni S., Jaiswal J. Combining ability studies for seed yield related attributes and quality parameters in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Genet. Genom. Plant Breed.* 2017; 1(1):21-27.
- Akinci C. Heterosis and combining ability estimates in 6 × 6 half-diallel crosses of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Bulg. J. Agric. Sci.* 2009;15(3):214-221.
- Ali I., Khan A.M., Ayub M., Zafar A., Asad-ur-Rehman, Hussain M., Ullah H., Zubair M., Hafeez Z., Mahmood Kh., Kanwal N., Khetran A.S. Genetic analysis of various agronomic traits in some intra and inter-specific crosses of wheat. *Plant.* 2018;6(2):43-48. DOI 10.11648/j.plant.20180602.14.
- Ali M. Combining ability of physiological and yield traits of bread wheat diallel crosses under timely and late sowing dates. *Egypt. J. Agron.* 2019;41(2):159-181. DOI 10.21608/agro.2019.15182.1172.
- Amin T., Towfiq S. Inheritance of grain yield and its related characters for 5 × 5 diallel cross of F1 bread wheat. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2019;17(2):3013-3032. DOI 10.15666/aecr/1702_30133032.
- Ayoob M. Combining ability analysis, estimation of heterosis and some genetic parameters using half diallel cross in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Educ. Sci.* 2020;29(1):93-106. DOI 10.33899/edusj.2020.164365.
- Bajaniya N., Pansuriya A., Vekaria M., Singh C., Savaliya J. Combining ability analysis for grain yield and its components in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Ind. J. Pure Appl. Biosci.* 2019;7(4): 217-224. DOI 10.18782/2320-7051.7664.
- Brahim B., Mohamed B. Analysis of diallel crosses between six varieties of durum wheat in semi-arid area. *Afr. J. Biotechnol.* 2014;13(2): 286-293. DOI 10.5897/AJB2013.12281.
- Burow M., Coors J. Diallel: a microcomputer program for the simulation and analysis of diallel crosses. *Agron. J.* 1994;86(1):154-158. DOI 10.2134/agronj1994.00021962008600010028x.
- Desale C., Mehta D. Heterosis and combining ability analysis for grain yield and quality traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electron. J. Plant Breed.* 2013;4(3):1205-1213.
- Dragavtsev V., Averyanova A. Mechanisms of genotype-environment interaction and homeostasis of quantitative plant characteristics. *Genetika.* 1983;19(11):1806-1810. (in Russian)
- Dragavtsev V., Zilke R., Reuter B., Vorobiev V., Dobrovskaya A., Korobeinikov N., Novokhatin V., Maksimenko V., Babakishiev A., Ilyushchenko V., Kalashnik N., Zujkov Y., Fedotov A. Genetics of Productivity Traits of Spring Wheat in Western Siberia. Novosibirsk: Nauka Publ., 1984. (in Russian)
- El-Gammaal A., Morad A. Combining ability, heterosis and gene action estimation by using line × tester analysis in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Prod. Mansoura Univ.* 2018;9(12):1147-1155. DOI 10.21608/jpp.2018.36642.
- Enchev Y., Marinkova E., Rukmanski G. Guide for Exercises in Plant Breeding and Seedproduction. Sofia: Zemizdat Publ., 1976;99-100. (in Bulgarian)
- Farooq J., Khaliq I., Khan A., Pervez M. Studing the genetic mechanism of some yield contributing traits in wheat (*Triticum aestivum*). *Int. J. Agric. Biol.* 2010;12(2):241-246.
- Farooq M., Ishaq I., Maqboo R., Aslam I., Naqvi S., Mustafa S. Heritability, genetic gain and detection of gene action in hexaploid wheat for yield and its related attributes. *AIMS Agric. Food.* 2019;4(1): 56-72. DOI 10.3934/agrfood.2019.1.56.
- Gami R., Tank C., Chauhan R., Patel S., Thakor D. Heterosis for grain yield and quality components in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Res. Crops.* 2011;12(2):496-498.
- Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust. J. Biol. Sci.* 1956;9(4):463-493. DOI 10.1071/BI9560463.
- Hammam O., Zaher O., Haridy M., Allah O. Estimate of combining ability and correlation for yield and its components in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Arch. Agri. Sci. J.* 2020;3(3):1-12. DOI 10.21608/aasj.2021.54624.1047.
- Hannachi A., Fellahi Z., Rabti A., Guendouz A., Bouzerzour H. Combining ability and gene action estimates for some yield attributes in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *J. Fundam. Appl. Sci.* 2017;9(3):1519-1534. DOI 10.4314/jfas.v9i3.17.
- Hassan A., Ahmed M., Rashed M. Heterosis and combining ability of some bread wheat genotypes. *Arab. Univ. J. Agric. Sci.* 2018; 26(2A):1015-1027. DOI 10.21608/ajs.2018.28289.
- Inamullah A., Mohammad F., Din S., Hassan G., Gul R. Diallel analysis of the inheritance pattern of agronomic traits of bread wheat. *Pak. J. Bot.* 2006;38(4):1169-1175.
- Kandil A., Sharief A., Goma H. Estimates of gene action for yield and its components in bread wheat *Triticum aestivum* L. *Int. J. Agron. Agric. Res.* 2016;8(1):34-40.
- Kashif M., Khan A. Combining ability studies for some yield contributing traits of bread wheat under normal and late sowing condition. *Pak. J. Agric. Sci.* 2008;45(1):44-49.
- Khaled A., Elameen T., Elshazly I. Heterosis and combining ability under favorable and salinity stress in Egyptian bread wheat. *Asian J. Agric. Res. Rev. Agric.* 2020;2(1):35-51.
- Khokhar A., Nizamani F., Rind R., Nizamani M., Khokhar M., Shah A., Nizamani A., Rind M. Combining ability estimates in 6 × 6 half diallel crosses of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pure Appl. Biol.* 2019;8(3):1980-1990. DOI 10.19045/bspab.2019.80142.

- Kumar V., Maloo S. Parental molecular diversity and its concurrence to heterosis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Ind. J. Agric. Sci.* 2012;82(3):207-212.
- Mandal A., Madhuri G. Combining ability analysis for morphological and yield traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Sci. Res.* 2016;3(2):157.
- Mostafa M., Ismail A., Abo-Elwafa A., Tawfelis M. Genetical studies of yield and its components in durum wheat under heat stress. *Assiut J. Agric. Sci.* 2014;45(5):53-78.
- Motawea M. Estimates of heterosis, combining ability and correlation for yield and its components in bread wheat. *J. Plant Prod. Mansoura Univ.* 2017;8(7):729-737. DOI 10.21608/jpp.2017.40552.
- Padhar P., Chovatia V., Jivani L., Dobariya K. Combining ability analysis over environments in diallel crosses in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Agric. Sci.* 2013;9(1):49-53.
- Pansuriya A., Dhaduk L., Vanpariya L., Savaliya J., Patel M., Mehta D. Combining ability over environment for grain yield and its components in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *AGRES – Int. e-J.* 2014; 3(1):39-46.
- Parveen N., Kanwal A., Amin E., Shahzadi F., Aleem S., Tahir M., Younas A., Aslam R., Aslam N., Ghafoor I., Makhdoom M., Shakir M., Najeebullah M. Assessment of heritable variation and best combining genotypes for grain yield and its attributes in bread wheat. *Am. J. Plant Sci.* 2018;9(8):1688-1698. DOI 10.4236/ajps.2018.98122.
- Patel N., Bhatt J., Dave P., Chauhan S. Genetic analysis of grain yield, its components and quality characters in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) over environments. *Int. J. Agric. Sci.* 2016;8(32):1681-1686.
- Rajput R., Kandalkar V. Combining ability and heterosis for grain yield and its attributing traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2018;7(2):113-119.
- Sadeghzadeh-Ahari D., Sharifi P., Karimizadeh R., Mohammadi M. Estimation of genetic parameters of yield and yield components in rainfed durum wheat through diallel cross. *J. Crop Breed.* 2018; 10(25):176-184. DOI 10.29252/jcb.10.25.176.
- Saeed M., Khalil I. Combining ability and narrow-sense heritability in wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed environment. *Sarhad J. Agric.* 2017;33(1):22-29. DOI 10.17582/journal.sja/2017.33.1.22.29.
- Shamsabadi E., Sabouri H., Soughi H., Sajadi S. Genetic analysis of spike traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetika.* 2020;52(2): 559-569. DOI 10.2298/GENSR2002559S.
- Sharma V., Dodiya N., Dubey R., Khan R. Combining ability analysis in bread wheat (*Triticum aestivum* (L.) Em. Thell) under different environmental conditions. *Bangladesh J. Bot.* 2019;48(1):85-93. DOI 10.3329/bjb.v48i1.47419.
- Singh M., Kaur K., Kumar V., Kaur R., Kumar R. Genetic analysis in F₁ generation of diallel crosses for yield and yield components in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriways.* 2018;6(2): 17-26.
- Talha M., Swati, Negi A., Harsha. Identification of bread wheat lines with superior combining ability for yield contributing traits and yellow rust resistance suitable for NWPZ of India. *Electron. J. Plant Breed.* 2018;8(2):695-703. DOI 10.5958/0975-928X.2017.00105.3.
- Tiwari R., Marker S., Meghawal D. Combining ability estimates for spike characters in F₁ hybrids developed through diallel crosses among macaroni wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2017;6(2):237-241.
- Tiwari R., Marker S., Ramteke P. Gene action and combining ability analysis for quality traits macaroni wheat (*Triticum durum* Desf.). *Vegetos: Int. J. Plant Res.* 2015;28(1):130-133. DOI 10.5958/2229-4473.2015.00017.8.
- Topal A., Aydin C., Akgun N., Babaoglu M. Diallel cross analysis in durum wheat (*Triticum durum* Desf.): identification of best parents for some kernel physical features. *Field Crops Res.* 2004;87(1):1-12. DOI 10.1016/j.fcr.2003.08.015.
- Yao J., Ma H., Ren L., Zhang P., Yang X., Yao G., Zhang P., Zhou M. Genetic analysis of plant height and its components in diallel crosses of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust. J. Crop Sci.* 2011; 5(11):1408-1418.

ORCID ID

R.G. Dragov orcid.org/0000-0001-5764-7997

Acknowledgements. This work was supported by the Field Crops Institute, Chirpan, Bulgaria.**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Received March 2, 2022. Revised June 12, 2022. Accepted July 12, 2022.

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

Голозерный ячмень: систематика, селекция и перспективы использования

К.А. Лукина , О.Н. Ковалева, И.Г. Лоскутов

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
 k.lukina@vir.nw.ru


Аннотация. В обзоре освещены вопросы современного состояния систематики, происхождения и перспектив использования голозерного ячменя. Представлены положения систематики культурного ячменя *Hordeum vulgare* L., в которой выделяются группы многорядного (convar. *coeleste* (L.) A. Trof.) и двурядного (convar. *nudum* (L.) A. Trof.) голозерного ячменя. Группы включают разновидности согласно особенностям строения колоса, остей, цветковых и колосковых чешуй и цвету зерновок. Отражены вопросы очагов формообразования голозерного ячменя, по данным археологии, палеоэтноботаники, разнообразию форм и сортов, а также рассмотрены вопросы происхождения голозерного ячменя по результатам ДНК-маркирования. Приведены основные зоны возделывания и возможные причины такого преимущественного или исключительного распространения голозерных ячменей в районах высокогорья. Обсуждается вопрос наследования признака голозерности ячменя и механизмов его проявления в соответствии с новыми данными в области генетики. Представлены характеристики биохимического состава зерна по белку, некоторым заменимым и незаменимым аминокислотам, β-глюканам, витаминам, антиоксидантам. Показано, что голозерный ячмень – ценный источник уникальных комбинаций растворимых и нерастворимых пищевых волокон и полисахаридов. Подчеркнуто значение параметров голозерного ячменя, которые ограничивают широкое распространение этой культуры в мире, и выделены направления селекционной работы для устранения этих недостатков. Приведены примеры образцов голозерного ячменя, устойчивых к вредным организмам, которые являются перспективными источниками для повышения урожайности и качества зерна, а также сохранения экологической чистоты и безопасности продукции. Отражены этапы и направления селекционных работ с голозерным ячменем, показано значение мировой коллекции ВИР как основного источника генетического материала для развития селекции.

Ключевые слова: голозерный ячмень; систематика; происхождение; генетика; качество зерна; устойчивость к болезням; урожайность; селекция.

Для цитирования: Лукина К.А., Ковалева О.Н., Лоскутов И.Г. Голозерный ячмень: систематика, селекция и перспективы использования. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):524-536. DOI 10.18699/VJGB-22-64

Naked barley: taxonomy, breeding, and prospects of utilization

К.А. Lukina , O.N. Kovaleva, I.G. Loskutov

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
 k.lukina@vir.nw.ru

Abstract. This review surveys the current state of taxonomy, origin, and utilization prospects for naked barley. The cultivated barley *Hordeum vulgare* L. incorporates the covered and naked barley groups. Naked barleys are divided into six-row naked barley (convar. *coeleste* (L.) A. Trof.) and two-row naked barley (convar. *nudum* (L.) A. Trof.). The groups include botanical varieties differing in the structural features of spikes, awns, floret and spikelet glumes, and the color of kernels. The centers of morphogenesis for naked barley are scrutinized employing archeological and paleoethnobotanical data, and the diversity of its forms. Hypotheses on the centers of its origin are discussed using DNA marker data. The main areas of its cultivation are shown, along with possible reasons for such a predominating or exclusive distribution of naked barley in highland areas. Inheritance of nakedness and mechanisms of its manifestation are considered in the context of new data in genetics. The biochemical composition of barley grain in protein, some essential and nonessential amino acids, β-glucans, vitamins, and antioxidants is described. Naked barley is shown to be a valuable source of unique combinations of soluble and insoluble dietary fibers and polysaccharides. The parameters limiting wider distribution of naked barley over the world are emphasized, and breeding efforts that could mitigate them are proposed. Pathogen-resistant naked barley accessions are identified to serve as promising sources for increasing grain yield and quality. Main stages and trends of naked barley breeding are considered and the importance of the VIR global germplasm collection as the richest repository of genetic material for the development of breeding is shown.

Key words: naked barley; taxonomy; origin; genetics; grain quality; disease resistance; yield; breeding.

For citation: Lukina K.A., Kovaleva O.N., Loskutov I.G. Naked barley: taxonomy, breeding, and prospects of utilization. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):524-536. DOI 10.18699/VJGB-22-64

Введение

С древнейших времен ячмень – одна из важнейших зерновых культур, которая возделывается во всех земледельческих областях земного шара. Ячмень принадлежит к роду *Hordeum* семейства Triticaceae, является облигатным самоопылителем с диплоидным набором хромосом ($2n = 14$). Его по праву считают универсальной культурой как по широте распространения, так и по использованию. Это четвертая по значимости зерновая культура в мире после пшеницы, кукурузы и риса.

Широкий ареал распространения и длительная история возделывания ячменя определили большое внутривидовое разнообразие культурного вида *H. vulgare* L., который делится на два подвида: многорядный (*H. vulgare* L. subsp. *vulgare*) и двурядный (*H. vulgare* L. subsp. *distichon* (L.) Koern.). Они включают группы пленчатых и голозерных разновидностей. Среди голозерного ячменя выделены группа многорядного (convar. *coeleste* (L.) A. Trof.) и группа двурядного (convar. *nudum* (L.) A. Trof.) голозерного ячменя (Лукьянова и др., 1990).

Особенность групп голозерного ячменя – зерновки у них голые и не соединяются с цветковыми чешуями, вследствие чего при обмолоте зерновки легко отделяются от них. Голозерный ячмень – ценный источник для селекции на качество зерна. Различные формы голозерного ячменя отличаются повышенным содержанием белка и незаменимых аминокислот, в первую очередь лизина, фенилаланина, метионина, треонина и жиров, богаты β-глюканами, стеролами, токотринолами, флавонолами и фенолами, обладающими антиоксидантной активностью (Аниськов и др., 2015; Meints et al., 2021).

Голозерный ячмень имеет свои недостатки. Основным из них является выпячивание центрального зародышевого корешка за пределы сферы поверхности зерновки, что приводит к повреждению зародыша при обмолоте. Он отличается слабой адаптивной способностью к меняющимся условиям среды, низкой засухоустойчивостью, устойчивостью к полеганию и к различным болезням. Из этого следует, что селекционные работы с голозерным ячменем должны быть направлены не только на увеличение его положительных свойств, но и на устранение главных недостатков. В настоящее время активно ведется анализ генетических ресурсов с целью выделения источников и доноров по основным направлениям селекции.

Систематика

История классификации ячменя берет начало со времен глубокой древности. В 1747 г. К. Линней разработал принципы научной систематики растений с охватом огромного ботанического разнообразия, в том числе и ячменя. В основу классификации пошла число плодущих колосков в каждом сочленении колоса и плотность самого колоса. По этой классификации в роде *Hordeum* L. было четыре вида культурного ячменя, а в составе видов выделены ботанические разновидности голозерного ячменя var. *nudum* L. (двурядный) и var. *coeleste* L. (шестирядный), т.е. уже в то время существовало разделение ячменя на пленчатый и голозерный (Бахтеев, 1955; Трофимовская, 1972).

Большой вклад в развитие и создание внутривидовой классификации ячменя внесли такие ученые, как К.Б. Три-

ниус, Д.К. Долль, К. Кох, Р.Э. Регель, С.А. Невский, Н.И. Вавилов, А.А. Орлов, Ф.Х. Бахтеев. Голозерный ячмень выделен как отдельный подвид у Д.К. Долля. В классификациях А.А. Орлова и Ф.Х. Бахтеева голозерный ячмень отмечен наряду с пленчатым в виде разновидностей в различных видах и подвидах (Орлов, 1936; Бахтеев, 1955).

Современная классификация, которой пользуются во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), основанная на работах Н.И. Вавилова, Р. Мансфельда, С.А. Невского, Ф.Х. Бахтеева, А.А. Орлова, представлена А.Я. Трофимовской (1972). Культурный вид *H. vulgare* L. в ней делится на два подвида: многорядный (*H. vulgare* L. subsp. *vulgare*) и двурядный (*H. vulgare* L. subsp. *distichon* (L.) Koern.). Они включают группы пленчатых и голозерных разновидностей. Среди голозерного ячменя описаны группа многорядного (convar. *coeleste* (L.) A. Trof.) и группа двурядного (convar. *nudum* (L.) A. Trof.) голозерного ячменя (Трофимовская, 1972; Лукьянова и др., 1990). Группы голозерных ячменей характеризуются большим числом эндемичных разновидностей с различных предгорных и высокогорных территорий. Эта классификация отражает огромный полиморфизм видов и ботанических разновидностей данного рода, в том числе и голозерного ячменя.

Группа многорядного голозерного ячменя *H. vulgare* L. subsp. *vulgare* convar. *coeleste* (L.) A. Trof. включает 58 разновидностей (Лукьянова и др., 1990). Характеризуется тем, что все три колоска, сидящие в выемках колосового стержня, в большей части колоса плодovиты и имеют нормально развитые зерновки, при этом сами зерновки голые, т.е. свободно отделяются от цветковых чешуй. Внутри группы выделяются разновидности по ширине колосковых чешуй, наличию, длине и гладкости остей, цвету колоса, плотности колоса, а также по цвету зерновок.

По плотности колоса выделяются разновидности с плотным и рыхлым колосом. При этом плотный колос еще подразделяется на плотный и очень плотный. К очень плотному колосу относятся разновидности: var. *nudipyramidatum* Koern., var. *uljassutaicum* Vav. et Orl., var. *subnudipyramidatum* Orl., var. *micrurum* Vav. et Orl., var. *latitudipyramidatum* Vav. et Orl. Данные разновидности относятся к японской, китайской и монголо-тибетской агроэкологическим группам. Их характерная особенность, кроме плотного колоса, – низкорослость. С плотным колосом отмечаются разновидности: var. *revelatum* Koern., var. *ancoberense* Vav. et Orl., var. *brevisetum* Regel, var. *nanum* Vav. et Orl., var. *latirevelatum* Vav. et Orl. Разновидности распространены в Японии, Китае, Эфиопии, относятся к японской, китайской и абиссинской агроэкологическим группам.

Внутри группы многорядного голозерного ячменя описаны разновидности, имеющие вместо остей трехлопастные придатки – фурки: var. *trifurcatum* (Schlecht.) Wender., var. *pseudotrifurcatum* Langsd., var. *aethiops* Koern. Они получены из Китая, Монголии и Эфиопии, но некоторые разновидности с такой особенностью отобраны в гибридных питомниках. В этой группе также представлены разновидности с остями, или фурками, только на средних

колосках, боковые – безостые или только с небольшими зачатками остей: var. *cornutum* Schrad., var. *cornutiforme* Aoberg., var. *subaethiops* Koern., var. *nuditransiens* Koern., var. *nudijaponicum* Vav. et Orl. – из Японии, Южной Африки, Тибета, а также гибриды, полученные в гибридных питомниках.

Цветовые особенности зерновки служат характеристикой для разделения многих разновидностей между собой. Зерновки бывают различных цветов: желтые (var. *coeleste* L., var. *brevisetum* Regel), зеленые (var. *himalayense* (Ritt.) Koern., var. *urgaicum* Vav. et Orl., var. *kobdicum* Vav. et Orl.), фиолетовые (var. *violaceum* Koern., var. *gobicum* Vav. et Orl., var. *uhangaicum* Vav. et Orl.), черные (var. *duplinigrum* Koern., var. *aethiops* Koern.), коричневые (var. *tibetanum* Vav. et Orl.), и их различных оттенков, полученных в ходе расщепления при скрещивании. Разновидности с желтым цветом зерновки встречаются повсеместно, с зеленой зерновкой также широко распространены, но преимущественно относятся к агроэкологическим группам Азии. Фиолетовый цвет зерновки наблюдается у разновидностей монголо-тибетской и китайской агроэкологических групп. Разновидности с черным цветом зерновки относятся к абиссинской агроэкологической группе, с коричневым цветом зерновки – к тибетской.

Группа двурядного голозерного ячменя *H. vulgare* L. subsp. *distichon* (L.) Koern. convar. *nudum* (L.) A. Trof. характеризуется тем, что из трех колосков, сидящих в выемках колосового стержня, только один средний колосок всегда является плодовитым, с нормально развитым зерном; зерновки голые, т. е. не соединены прочно с цветковыми чешуями и при обмолоте свободно от них отделяются. Группа включает 38 разновидностей. Как и для группы многорядного голозерного ячменя, выделение разновидностей внутри группы происходит по морфологическим особенностям колоса и цвету зерновок. Все разновидности преимущественно относятся к абиссинской, дагестанской, японской и индийской агроэкологическим группам, а также большая часть разновидностей получена в процессе скрещивания в гибридных питомниках. Разновидности с плотным колосом, var. *gymnocrithum* Koern., var. *neogenes* Koern., var. *nudimelanocrithum* Giess. et al., относятся к абиссинской агроэкологической группе.

Внутри группы выделяют разновидности по наличию/отсутствию остей, их длине и наличию остевых придатков – фуруков. Разновидности, имеющие вместо остей трехлопастные придатки (фурки): var. *nudifurcatum* Regel, var. *zhukovskii* Chodk., var. *sublaxum* Koern., var. *gymnospermum* Koern. Разновидности без остей: var. *dupliatrum* Koern., var. *duplialbum* Koern., var. *subduplialbum* Koern., var. *subdupliatrum* Koern., относятся к агроэкологическим группам Азии или получены в результате скрещивания в гибридных питомниках.

У двурядной группы голозерного ячменя описаны образцы, у которых боковые колоски полностью редуцированы и представлены одними колосковыми чешуями: var. *nudideficiens* Koern., var. *daghestanicum* Vav. et Orl. Они встречаются в дагестанской агроэкологической группе.

Цвет также является отличительной особенностью многих разновидностей. Зерновки, как и у многорядного голозерного ячменя, бывают желтые (var. *nudum* L., var. *coloni-*

cum Orl.), зеленые (var. *viride* Vav. et Orl., var. *virideinermis* Giess. et al., var. *daghestanicum* Vav. et Orl.), фиолетовые (var. *nudidubium* Koern., var. *janthinum* Koern.), черные (var. *nigrinudum* Vav., var. *nudimelanocrithum* Giess. et al.) и других различных оттенков. Распределение разновидностей с разным цветом зерновки аналогично многорядной голозерной группе.

В коллекции ВИР представлено более 1230 образцов голозерного ячменя, собранного со всего мира. Образцы являются ценным генетическим материалом для селекции ячменя и могут послужить источником для создания высокоурожайных сортов голозерного ячменя с адаптивными свойствами для различных регионов РФ.

Происхождение и распространение голозерного ячменя

О происхождении голозерного ячменя известно еще очень мало, так как отдельные исследования не проводились, а данная тема рассматривалась только в контексте возникновения ячменя в целом. Впервые заговорили о временных рамках происхождения голозерного ячменя в результате обнаруженных в раскопках Али-Коша (Ali Kosh) многорядного голозерного и пленчатого ячменя. По результатам проведенного анализа радиоизотопным методом установлено, что голозерный ячмень появился примерно в период 7900 лет до н. э., значительно позднее пленчатого ячменя, который произрастал в докерамический неолит (9700–9300 лет до н. э.) (Helback, 1959). Сам процесс возникновения голозерного ячменя также еще не совсем понятен. Наиболее распространенная гипотеза заключается в появлении мутации гена, контролирующего процесс образования пленчатого покрытия зерновки.

Благодаря работам ученых ВИР, установлено, что голозерный ячмень имеет три основных очага формообразования (Вавилов, 1965; Лукьянова и др., 1990). Н.И. Вавилов воспринимал эти очаги как «локусы формообразования», «чрезвычайно малые пространства», в которых человек окультурировал дикие виды. Такие очаги выделяют на основе данных по археологии, палеоэтноботанике, но главным образом – по современному сортовому разнообразию культивируемых видов и форм. Важно понимать, что древние очаги могут возникать в разных частях континентов (т. е. полиотпно), одновременно (гетерохронно). Позднее стал известен и другой феномен – повторная доместикизация (редоместикизация) видов растений на фоне вполне сложившегося древнего сортимента.

Первый очаг – Юго-Восточная Азия, горный Центральный и Западный Китай с прилегающими к нему низменными районами. Здесь голозерный ячмень возделывается преимущественно в горных районах на высоте не ниже 2000 м. Второй очаг – Северо-Восточная Африка (горные районы Эфиопии), где голозерные разновидности ячменя представлены эндемичными формами. К третьему очагу относят Переднюю Азию: Турцию, Закавказье, Иран и Таджикистан (Вавилов, 1957).

В последнее время усиленно идет работа с ДНК-маркерами. Результаты могут вывести рассмотрение доместикизации голозерного ячменя на более высокий уровень, а также подтвердить или опровергнуть имеющиеся гипотезы происхождения и распространения голозерного ячменя.

Одна из гипотез возникновения голозерного ячменя – монофилитическое происхождение на территории Юго-Западного Ирана, откуда произошла миграция в другие регионы. Предположение основано на анализе доминантного маркера SCARsKT7, тесно связанного с локусом *nud* (Taketa et al., 2004). Горные районы Гималаев могут рассматриваться как возможный центр доместикации голозерного ячменя (Badr et al., 2000) из-за ряда отличительных признаков (Xifeng et al., 2013). Однако последние работы показывают противоположную точку зрения. На основе данных полного генома и опубликованных результатов ресеквенирования с захватом экзона для 437 образцов показано, что современный тибетский ячмень (*Hordeum vulgare* L., qingke) получен из одомашненного восточного ячменя и завезен в Южный Тибет, предположительно, через Северный Пакистан, Индию и Непал около 3500–4500 лет назад. Низкое генетическое разнообразие qingke позволяет предположить, что Тибет можно исключить как центр происхождения или одомашнивания ячменя. Быстрое уменьшение генетического разнообразия от одомашненного восточного ячменя до qingke можно объяснить эффектом изоляции в районе Тибета от 2000 до 4500 лет назад (Zeng et al., 2018).

Кроме гипотезы монофилитического происхождения голозерного ячменя из Юго-Западного Ирана, есть также гипотеза множественного независимого происхождения голозерного ячменя. Она основана на сравнительном морфологическом анализе разновидностей из разных очагов формообразования и заключается в независимом появлении голозерных ячменей в нескольких центрах разнообразия культурных растений (Helback, 1959).

Группы многозерного и двузерного голозерного ячменя встречаются во всех зонах возделывания ячменя. Наиболее распространены в Юго-Восточной Азии (Китай, Япония, Южная Корея), Северо-Восточной Африке (Эфиопия, Эритрея) и Средней Азии – в горных районах (Памир, Тибет, Таджикистан, Монголия и Индия) (Лукьянова и др., 1990). Самые распространенные разновидности этих групп – var. *coeleste* L., var. *himalayense* (Ritt.) Koern. и var. *nudum* L. Равномерность посевов в пределах этих стран различная, в одних странах посевы голозерного ячменя достигают 95 % площадей от общих посевов ячменя, а в других – только 50 % или меньше. В направлении с востока на запад площади с голозерным ячменем резко сокращаются. В России посевы голозерного ячменя незначительны из-за факторов, ограничивающих его распространение (Тетяников, Боме, 2020).

Существует два мнения о причинах распространения голозерного ячменя преимущественно на горных территориях. Одни исследователи связывают это явление с активным использованием голозерного ячменя на пищевые нужды (Helback, 1966; Nevo, 1992), другие же высказывают гипотезу о том, что голозерный ячмень лучше приспособлен к таким условиям (Harlan, 1979). Вторую точку зрения доказывают исследования А.А. Поморцева с коллегами (1996), в которых была изучена динамика генотипического состава популяций ячменя, полученных от скрещивания сортов Московский 121 (двузерный, пленчатый) и Джау Кабутак (шестизерный, голозерный, var. *himalayense*). Гибриды выращивали параллельно с

F₂ до F₉ на Памире (высота 2600 м над уровнем моря) и с F₂ до F₁₀ в Москве. Показано, что под действием естественного отбора динамика популяций по маркерным локусам при репродукции на Памире и в Москве различна и приводит к дивергенции популяций. В условиях высокогорья Памира отбор был направлен против растений с пленчатым зерном и двузерным колосом, а на территории Москвы – против голозерных растений, что подтверждает вторую точку зрения – голозерный ячмень более приспособлен к произрастанию в условиях высокогорья в сравнении с пленчатым (Поморцев и др., 1996).

Ген голозерности и механизм его действия

В настоящее время считается, что различие между пленчатым и голозерным ячменем контролируется одним локусом. Пленчатость зерновки относят к доминантному признаку, а голозерность – к рецессивному. Генетический локус отнесен к длинному плечу хромосомы 7Н ячменя и получил название *nud* (от *nudum*) (Gerasimova et al., 2020). Ген *nud* находится на расстоянии 0.3 сМ от проксимального и 1.2 сМ от дистального концов в районе (SCAR) КТ 2 и КТ 4 (Kikuchi et al., 2003). Структурная часть гена *nud* состоит из двух экзонов и одного интрона.

У пленчатого ячменя присутствует ген *Nud*, который кодирует транскрипцию семейства этиленового фактора (ERF – ethylene response factor), принадлежащий к группе Wax Inducer 1/Shine 1 (WIN1/SHN1)-подобных факторов транскрипции. Этот фактор контролирует биосинтез липидов и кодирует белок из 227 аминокислот (Taketa et al., 2008). В локусе *nud* есть три вариации аллеля, обозначенные как *nud 1.a*, *nud 1.b* и *nud 1.c*. Аллель *nud 1.a* является результатом делеции *Nud*. Аллель *nud 1.b* имеет нуклеотидную замену тимина на аденин во втором экзоне, который приводит к замене валина на аспарагиновую кислоту в положении 134. Аллель *nud 1.c* имеет делецию 1 п. н. второго экзона, который вызывает сдвиг рамки считывания и генерирует преждевременный стоп-кодон, приводящий к усеченной последовательности белка из 199 аминокислот.

Еще не до конца понятен механизм образования пленчатости и голозерности зерновок ячменя. Наиболее часто встречаемая в литературе версия заключается в том, что рецессивный ген *nud* находится в интактном состоянии и не образует склеивающий липидный слой между эпидермисом околоплодника зерновки и цветковыми чешуями, что позволяет им свободно разъединяться при обмолоте. А доминантный аллель *Nud* контролирует биосинтез липидов, которые способствуют склеиванию цветковых чешуй с зерновкой и образованию пленчатых сортов (Taketa et al., 2008; Hoard et al., 2016).

Последние работы по секвенированию локуса *nud* показали, что во всех голозерных образцах данный ген характеризуется делецией 17-kb (т. п. н.) или содержанием несинонимичного SNP T643A по сравнению с функциональным геном *Nud* (Yu et al., 2016). Анализ индуцированных рентгеновскими лучами мутантов голого зерна подтвердил, что ген *Nud* несет несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы во всех случаях. Продемонстрировано, что направленный мутагенез гена *Nud* вызывает появление голых зерен на первичных трансген-

ных растениях (Gasparis et al., 2018). Помимо нормальной делеционной мутации *Nud*, способствующей голозерности, обнаружен новый аллель *nud*, обозначенный как *nud1.g*, выделенный у трех сортов голозерного ячменя, собранных в Тибете. Аллель *nud1.g* содержит несинонимичный SNP T643A по сравнению с функциональным геном *Nud*. Генетический анализ показал, что SNP T643A *nud1.g* коассоциирует с голозерным фенотипом. Кроме того, предсказание *in silico* функционально консервативных сайтов и трехмерных структур выявило, что аминокислотная замена (валин на аспарат), вызванная SNP T643A, может привести к резкому структурному изменению *Nud*, которое может повлечь потерю функции. Это исследование предоставляет доказательства о возможном новом механизме происхождения голозерного фенотипа одомашненного ячменя в Тибете (Yu et al., 2016).

Все больше исследований направлено на работу с голозерным ячменем. В 2020 г. вышла статья, в которой авторы продемонстрировали целенаправленное изменение первого экзона гена *Nud* с помощью РНК-управляемой эндонуклеазы Cas9, что приводило к появлению голозерности зерновки. В качестве объекта исследования брали пленчатый ячмень сорта Golden Promise, изменения осуществляли путем опосредованного переноса ДНК агробактериями (Gerasimova et al., 2020).

Однако незначительное число исследований по этой тематике и большая вариабельность исходного материала, который еще не был до конца изучен, не позволяют выяснить молекулярные механизмы формирования голозерности и пленчатости в зерновках ячменя. Возможно, с использованием более широкого разнообразия голозерного ячменя со всего мира и современных методов будут обнаружены новые локусы, отвечающие за признак голозерности.

Химический состав зерна голозерного ячменя

Основная особенность голозерного ячменя в сравнении с пленчатым – биохимический состав зерна. Зерно ячменя содержит уникальные комбинации растворимых и нерастворимых пищевых волокон и полисахаридов вместе с низкомолекулярными биоактивными компонентами (Madakemohekar et al., 2018). Голозерный ячмень превосходит пленчатый по содержанию питательных веществ, таких как белок, некоторых заменимых и незаменимых аминокислот, β -глобулинов, витаминов, макро- и микроэлементов, фенольных и флавоноидных соединений. Установлено, что при переработке зерна ячменя сохраняются все его полезные компоненты, в том числе проантоцианидины – активные антиоксиданты (Железнов и др., 2013; Полонский и др., 2021).

Физиологически важным диетическим компонентом в зерне голозерного ячменя являются (1,3;1,4)- β -D-глюканы. Они способствуют снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний, поддержанию или понижению количества холестерина в крови и сокращают риск гипергликемического синдрома, улучшают функции печени и снижают избыточную массу тела (Wirkijowska et al., 2012; Vozbulut, Sanlier, 2019). В сухом веществе зерновки пленчатого ячменя содержится 4–8 % β -глюкана, а в

зерновке голозерного ячменя этот показатель может достигать 16 %. Его содержание в зерне ячменя определяется сортовыми особенностями и факторами окружающей среды (Huth et al., 2002). Голозерный ячмень характеризуется большим содержанием витамина Е (Moreau et al., 2007), считается хорошим источником фенольных соединений, таких как производные коричной и бензойной кислот, проантоцианидинов, флавонолов, флаванолов, флавонов (Shen et al., 2016; Ge et al., 2021), которые имеют антиоксидантное, противовоспалительное и антипролиферативное действие.

Параметры голозерного ячменя, ограничивающие его широкое распространение

К одним из основных факторов, ограничивающих широкое распространение голозерного ячменя, относится его низкая урожайность по сравнению с пленчатым. Это в основном происходит из-за низкой полевой всхожести, вызванной выпячиванием зародышевого корешка за пределы зерновки, что влияет на устойчивость зародыша к механическому воздействию молотильного оборудования, ведет к его травмированию и снижению полевой всхожести семян.

С целью преодоления данного недостатка голозерного ячменя в селекционных работах необходим контроль по морфологии формы зерновки и характера размещения зародыша (Тетяников, Боме, 2020). Уже создано достаточно много линий с овальной формой зерновки и даже округлым зерном, полученных от скрещиваний голозерных канадских сортов McGwire, BRL-6, с пленчатыми сортами Гетман, Вакула, Linus и др. (Кирдогло и др., 2013). В коллекции ВИР выделен очень перспективный образец голозерного ячменя 95683/73 (к-27730) из Германии. Он имеет укороченную (7.2 мм), но достаточно широкую (3.8 мм) и максимальной толщины (2.8 мм) зерновку. По этим показателям образец имеет уникальное значение для практического использования в селекции голозерного ячменя. Кроме того, выделены образцы с оптимальной формой зерновки: Алар-Эрд-Эне из Монголии, Нога из Нидерландов, 1218-524 из Чехии, S-257 из Мексики (Малашкина, 2008).

Уже давно установлено, что сорта пленчатого ячменя более продуктивны, чем голозерные. Однако многие исследователи, изучающие голозерные ячмени, отмечают, что на цветковые чешуи, которые плотно соединены с зерновкой, в общей массе собранного урожая пленчатого ячменя приходится не менее 12–14 %. Причем сами по себе цветковые чешуи – та же солома, поэтому при измерении реальной урожайности пленчатого ячменя надо учитывать этот факт (Грязнов, 2014).

Показана большая вариабельность урожайности от условий окружающей среды, особенно в засушливых зонах (Грязнов, 2014). Голозерный ячмень существенно различается по урожайности, в зависимости от сортовых особенностей. Изучение продуктивности голозерных форм ячменя проводили во многих регионах России: в Сибири – в Тюменской области (Тетяников, Боме, 2020), Омской (Аниськов и др., 2015) и Кемеровской областях (Заушинцева и др., 2007), Северном Кавказе (Дорошенко и др., 2019) и др. В этих регионах выделены образцы с наибольшей урожайностью и адаптивными свойствами.

Один из наиболее значимых хозяйственно ценных признаков – устойчивость к полеганию голозерного ячменя для различных зон. Т.М. Богданова с коллегами (2001) в условиях Северо-Западного региона выявили единичные образцы, устойчивые к полеганию: КМ 280 (к-29419, var. *nudum*, Чехия), Nacta (к-20928, var. *nudum*, Германия), сложные гибриды из Мексики (к-28019, var. *nudum* и к-28083, var. *neogenes*). Позже в этих же условиях были найдены устойчивые к полеганию образцы из двурядных: к-29863 (var. *neogenes*, Чехословакия) и к-28083 (var. *neogenes*, Мексика), а из многорядных – к-28961 (var. *coeleste*, Индия), к-4365 (var. *coeleste*, Беларусь), к-21319 (var. *subnudupyramidatum*, Япония) (Тяглый, 2007). В условиях Тюменской области устойчивость к полеганию в 9 баллов за период изучения продемонстрировали двурядные образцы: к-22308 (Н 2198 Uamer Vaco), к-23450 (Н 2866 Coll. Halle EP 80), к-25008 (Местный), к-25855 (Ra 6), из многорядных: к-30663 (С.І.11073) и к-30624 (С.І.10975) (Тетяников, Боме, 2020).

Немаловажный критерий для повышения урожайности голозерного ячменя в зонах возделывания с рискованным земледелием – его скороспелость. Например, при изучении скороспелости ячменя из стран Юго-Восточной Азии обнаружены две ультраскороспелые формы из Китая: к-15881 (var. *coeleste* L.) и к-15882 (var. *nudipyramidatum* Koern.) с межфазным периодом «всходы–колошение» по годам исследований 30–33 дня (Звейнек, Ковалева, 2017), что делает эти образцы перспективными для выращивания в зонах с неблагоприятными абиотическими факторами. По итогам изучения обширного материала из коллекции ВИР также выделено 16 скороспелых образцов, например из двурядных: к-25090 (Мексика, var. *nudum*), к-29820 (Эфиопия, var. *nigrinudum*), многорядных: к-5489 (Украина, var. *glabriduplinigrum*), к-24817 (Эфиопия, var. *tibetanum*) (Богданова и др., 2001).

Практика возделывания голозерных сортов, в том числе сорта Нудум 95, свидетельствует о необходимости разработки мер адаптации таких сортов к местным условиям, что позволит поднять их урожайность до уровня пленчатых ячменей. Такие технологии уже начали появляться, но только для определенных регионов (Грязнов, 2016; Гладких и др., 2019).

Устойчивость к различным заболеваниям

Устойчивость сортов – один из важных резервов повышения урожайности и качества зерна, а также сохранения экологической чистоты и безопасности продукции.

Грибные, бактериальные и вирусные заболевания и вредители ячменя обнаруживаются ежегодно в различных зонах страны, что вызывает резкое снижение урожайности и качества зерна. Они воздействуют на нормальный ритм развития растений, отрицательно влияют на налив зерна, тем самым снижают его крупность и выполненность, кроме того, повреждают стеблестой. Поэтому селекция на качество тесно связана с селекцией на устойчивость к болезням и вредителям. Самый выгодный и безопасный способ уменьшить заражение зерна – это создание сортов, обладающих генетической устойчивостью. Для решения селекционных задач необходим постоянный поиск новых источников и доноров устойчивости, поскольку в резуль-

тате возникновения и накопления мутаций вирулентности в популяциях патогена гены резистентности растений теряют свою эффективность (Лукьянова и др., 1990).

Известно, что ячмень может быть заражен широким спектром патогенных для растений грибов, многие из которых могут сохраняться в зерне. Роды *Bipolaris*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Alternaria*, *Ustilago*, *Puccinia*, *Blumeria* и *Fusarium* считаются наиболее часто поражающими грибами для зерна ячменя во всем мире (Chen et al., 2016). С целью уменьшения потери урожая и ценных качеств зерна необходимо тщательно подбирать исходный материал, использовать наиболее устойчивые источники для создания новых селекционных сортов.

Фузариоз – распространенное заболевание зерновых, таких как пшеница, кукуруза и ячмень, может привести к резкому снижению урожайности и качества продукции (Polisenska et al., 2020) за счет образования микотоксинов. Они вызывают в организме человека отсутствие аппетита, рвоту, диарею и в высоких дозах – кровотечение кишечника, а иногда приводят к дополнительным эффектам, таким как нарушение иммунной функции. В растениях микотоксины ингибируют синтез белков, а ферменты грибов обуславливают разрушение белка и тем самым вызывают механизмы защитной реакции растений (Martin et al., 2018).

Устойчивость растений к фузариозу и накопление микотоксинов – сложный механизм. Определено пять основных классов устойчивости для пшеницы, ячменя и кукурузы: устойчивость I типа действует против первоначального проникновения и заражения растений, II типа – ограничивает распространение инфекции внутри растения, III типа – устойчивость к заражению зерна, IV типа – устойчивость и способность поддерживать урожай и, наконец, V типа – объединяет все механизмы устойчивости к накоплению микотоксинов (Martin et al., 2018). Устойчивость V типа предлагают разделить на две составляющие. Первый, называемый типом V-1, представляет собой устойчивость к накоплению токсина, управляемую метаболической трансформацией, включающей биохимическую модификацию, катализируемую ферментами. Второй (V-2) тип соответствует устойчивости через ингибирование биосинтеза микотоксинов под действием эндогенных соединений самого растения (Martin et al., 2017).

Доказано, что решающую роль в устойчивости к фузариозу играет большое число разнообразных метаболитов растений: фенолкислоты, флавоноиды, каротиноиды, токоферолы, бензоксаиноиды, жирные кислоты, аминокислоты и их производные, углеводы, амины и полиамины, терпеноиды и др. (Gauthier et al., 2015; Atanasova-Penichon et al., 2016), которые подавляют активные формы кислорода, улавливают свободные радикалы в ходе перекисного окисления липидов и способствуют созданию физического барьера против патогенной инфекции, а некоторые из метаболитов могут мешать биосинтезу микотоксинов (Siranidou et al., 2002). Установлено, что высокое содержание β-глюкана в зерне также способствует устойчивости V типа (Martin et al., 2018).

При изучении пленчатых и голозерных форм ячменя одни исследователи показали, что пленчатый ячмень оказался более устойчивым (Warzecha et al., 2010), а другие обнаружили очень низкое содержание токсинов в

голозерных сортах ячменя, обосновывая это тем, что в цветковых чешуях остается значительное количество токсинов (Buerstmaier et al., 2004). По последним данным, необходимо отметить преимущество голозерных форм, по сравнению с пленчатыми, в отношении содержания групп метаболитов, способствующих усилению устойчивости V типа ячменя к фузариозу колоса.

При изучении устойчивости сортов к фузариозу, проведенном отечественными исследователями, выделено 14 высокоустойчивых образцов, 5 из которых (к-2946, к-11070, к-11073, к-11076, к-11082) относятся к голозерным формам, имеющим крупное зерно, но склонным к полеганию и восприимчивым к мучнистой росе (Гагкаева, Гаврилова, 2009).

Мучнистая роса (возбудитель – *Blumeria graminis* (DC.) Golovin ex Speerf. sp. *hordei* Marchal), **карликовая ржавчина** (*Puccinia hordei* G.H. Otth.) и **гельминтоспориоз** – одни из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний ячменя в России (Kusch, Panstruga, 2017). Длительную устойчивость к патогену мучнистой росы сортов ячменя практически во всем мире обеспечивают гены *mlo11* и отчасти *mlo9* (Радченко и др., 2020). Найдены образцы голозерного ячменя, которые проявляют устойчивость или слабую восприимчивость к мучнистой росе: Дублет (Беларусь), Омский голозерный 1 (РФ), K-26648 (Пакистан), Buck CDC, CDC VC Gwire, CDC Dawn (Канада), K-3038 (Дай-Май), Orgeniepetite (Франция), NB-OWA (Непал) и др. К гельминтоспориозным пятнистостям устойчивы образцы: Buck CDC, Bowman (Канада), 84469/70, K-3038 (Дай-Май), Дублет (Беларусь), Bgnee (Эфиопия), Orgeniepetite (Франция) и др. Комплексную устойчивость к обоим патогенам имеют образцы: Дублет, Омский голозерный 1, Омский голозерный 2, Юдинский 1, K-26648, 84469/70, Orgeniepetite, CDC Dawn, NB-OWA, K-3038, CDC VC Gwire, E.E.B.N.46, они рекомендуются для участия в селекционных программах на устойчивость к грибным заболеваниям (Дорошенко Е.С., Дорошенко Э.С., 2018).

На базе Пушкинских лабораторий ВИР при изучении образцов из Эфиопии выделены устойчивые к мучнистой росе образцы к-5448, к-8682, к-17554, которые могут быть источниками аллеля гена *mlo11* для создания устойчивых к мучнистой росе сортов. Образец к-5448 (Abun 8, var. *duplinigrum*, Эфиопия) также устойчив к сетчатой пятнистости, поражение растений не превышало 1 балла (Алпатъева и др., 2016). Во время изучения сортифта голозерного ячменя коллекции ВИР был выявлен фонд устойчивых образцов к грибным заболеваниям. Устойчивостью к мучнистой росе в течение 30 лет обладают местные формы: к-2930 (var. *violaceum*, Китай), к-5983 (var. *coeleste*, Афганистан) и к-3282 (var. *nigrinudum*, Эфиопия) (Богданова и др., 2001).

Кроме того, широкому распространению голозерного ячменя препятствует восприимчивость к **головневым грибам**. Эти грибы среди многочисленных возбудителей заболеваний зерновых культур имеют одно из наибольших значений, так как они повсеместно распространены, вызывают очень значительное снижение урожая и ухудшают качество зерна, также возможны снижение уровня накопления сухого вещества в зерне, уменьшение длины

колоса, снижение кустистости и числа зерен в колосе (Бехтольд, Орлова, 2018). При фитопатологическом анализе 40 коллекционных образцов голозерного ячменя на твердую головню обнаружено, что только три сорта имели абсолютную устойчивость (0.0 %) к патогену – Chugokuha-daka N2 (Япония), Buck CDC (Канада), к-30313 (Эфиопия).

Отмечено, что большему поражению головневыми грибами подвержены среднеспелые образцы голозерного ячменя в сравнении со среднепоздними и раннеспелыми сортами. При заражении пыльной головней семена имеют меньшую абсолютную массу (на 10–20 %) и ухудшается их полевая всхожесть (Жичкина, Столпивская, 2015). В результате проведенных исследований (2005–2007 гг.) выявлено 8 пленчатых и 4 голозерных сорта, не пораженных черной и каменной головней, включая стандарты Омский 85 и Омский голозерный 2. Обнаружены образцы, сочетающие устойчивость к черной, каменной и пыльной головне. Они рекомендованы селекционерам для включения в скрещивания с целью получения иммунных сортов (Мешкова, Сабаева, 2009). Образцы из коллекции ВИР к-23851 (var. *himalayense*, Горный Бадахшан) и к-21544 (var. *trifurcatum*, Боливия) устойчивы к пыльной головне в течение 12 лет (Богданова и др., 2001) и представляют интерес как перспективные источники.

Селекционная работа с голозерным ячменем

Начало изучения голозерного ячменя положено такими учеными, как Н.И. Вавилов, А.А. Орлов и Ф.Х. Бахтеев. Они обратили внимание селекционеров, генетиков и агрономов на разнообразие голозерных форм, имеющих в мировой коллекции, определили отличительные особенности и места распространения этих форм, дали их агроэкологическую характеристику и описали область их применения, а также положили начало сбору голозерных форм ячменя со всего мира (Ходьков, 1985).

В России голозерный ячмень выращивали на очень ограниченных территориях, первые сведения о посевах голозерного ячменя в Восточной Сибири относятся к началу XIX в. Преимущественно в те годы среди посевов ячменя появился так называемый гималайский ячмень, который был заимствован в 1826 г. вице-президентом Императорского Московского сельскохозяйственного общества С.И. Гагариным у австрийского герцога Иоанна (Сурин, 2011). По данным Л.Е. Ходькова (1985), в ранний период отечественной селекции лишь некоторые сельскохозяйственные учреждения интересовались голозерным ячменем. Например, на Запольской опытной станции в конце XIX в. изучали в течение ряда лет гималайский голый ячмень. В 1914 г. на Днепропетровской опытной станции был получен первый селекционный сорт голозерного ячменя в России, Нудум 155, выведенный путем индивидуального отбора из голозерного ячменя.

Однако это не первые сведения возделывания голозерного ячменя на территории России. Например, анализ ископаемых растительных остатков, обнаруженных экспедицией Дагестанского филиала АН СССР во время раскопок древних поселений в районе селения Гильяр в южном Дагестане, показал, что 4.5–5 тыс. лет назад (в эпоху древней бронзы) местные жители возделывали пшеницу и ячмень. Примечательно, что наиболее распространен

был именно голозерный ячмень (Омаров, 1981). Местные горцы даже выделяли голозерный ячмень как самостоятельную культуру, отличную от обычного культурного ячменя. Голозерный ячмень возделывали исключительно в горных и высокогорных районах Дагестана, где его зерно использовали на продовольственные цели.

В мировой коллекции ВИР голозерный ячмень появился с самого основания и сбора коллекции. Интересно то, что первым зарегистрированным номером (к-1) в каталоге ВИР был образец голозерного ячменя var. *himalayense* из Узбекистана, полученный в 1897 г. Первые образцы голозерного ячменя в коллекцию ВИР были предоставлены из совершенно разных мест со всего мира: из Узбекистана, Китая, Украины, Армении, Грузии, Германии, Румынии, Казахстана, Латвии, Франции, Киргизии и др., и со всей России: Саратовской, Ярославской, Тобольской, Вятской губерний, Дагестанской, Кубанской областей, Курской губернии, Донской, Черноморской областей, Енисейской губернии, Терской области и др., что показывает повсеместное произрастание голозерного ячменя в стране.

С 1927 г. Госсоргсеть испытывает голозерные ячмени почти регулярно, а исследования в этой области становятся систематическими. В 1920–1930-е гг. были выведены голозерные сорта ячменя Нудум Ростовский 0289 и 3001, Целесте 086, Нудум 021, Целесте 08, Былое, Колхозный 7, Нудум 92. По разным причинам почти все они не были районированы. Послевоенная селекция также не добилась выдающихся результатов в выведении новых голозерных форм ячменя. Таким образом, уже с конца прошлого века внимание как отдельных селекционеров, так и многих отечественных селекционных учреждений было обращено к проблеме выведения голозерных сортов ячменя и внедрения их в сельскохозяйственное производство, но почти все они не были успешны. Л.Е. Ходьков в своей работе «Голозерные и безостые ячмени» (1985) проанализировал опыт создания голозерных ячменей в стране и показал ряд перспективных селекционных форм собственной селекции.

Целенаправленные исследования по созданию сортов голозерного ячменя в настоящее время проводятся в Канаде, Японии, США, Швеции и Чехии, а также этой тематикой заинтересованы Россия, Украина и Белоруссия. В Канаде еще в конце 20-го века были созданы такие сорта, как Scout и Turper (1980 г.), Condor (1988 г.), Buck и Richard (1990 г.), которые в настоящее время высеваются на площади более 350 тыс. га (Аниськов и др., 2015). В 1997 г. в Канаде впервые был создан ячмень вакси (*waxy*), содержащий на 32–41 % больше β-глюканов по сравнению с обычным ячменем. В Белоруссии первые исследования над созданием голозерных сортов ячменя относят к 70-м годам XX столетия. Получены такие сорта, как Голозерный 76, Белорусский 76, Голозерный 94 и Дублет (Трофимовская, 1972). Значительные успехи достигнуты также в Швейцарии, где в конце 1980-х гг. в официальный каталог внесено несколько сортов голозерного ячменя.

В РФ работы по селекции голозерного ячменя активно проводятся в Сибирском НИИ сельского хозяйства, Красноярском НИИ сельского хозяйства, Сибирском НИИ растениеводства и селекции, Кемеровском НИИ сельского хозяйства. В настоящее время в «Государственном

реестре селекционных достижений...» РФ находится уже шесть сортов голозерного ячменя: Омский голозерный 1 (2004), Омский голозерный 2 (2008) и Омский голозерный 4 (2020), Оскар (2007), Нудум 95 (2010), Ергенинский голозерный (2020) (Государственный реестр..., 2021). Однако эти сорта адаптированы для определенных регионов, в других местах их количественные и качественные характеристики не проявляются. Например, сорт Ергенинский голозерный адаптирован для засушливых регионов черноземной зоны, что делает его востребованным на юге РФ и других засушливых регионах (Характеристики сортов..., 2020).

Современная селекция растений значительно изменилась. Эти изменения связаны с развитием технологии молекулярных маркеров и возможностями секвенирования (Хлесткина, 2013). Они позволяют проводить отбор по генотипу, что значительно ускоряет селекционный процесс (Jaganathan et al., 2020). В настоящее время для генотипирования широко используются SNP-маркеры (Agarwal et al., 2008; Jaganathan et al., 2020), которые применяются как для пленчатого, так и голозерного ячменя.

Применение NGS-технологий (next generation sequencing) для изучения голозерного ячменя распространено не так широко, как для пленчатого. J. Hernandez с коллегами связывают это с проблемой отсутствия модельного голозерного ячменя (Hernandez et al., 2020). X. Chen с коллегами изучили с помощью секвенирования РНК с парными концами на платформе Illumina HiSeq 2000 два местных сорта голозерного ячменя, XQ754 и Nimubai, из Тибета и получили их транскриптомы. Всего 13.1 и 12.9 млн парных прочтений длиной 90 п.н. были созданы из двух сортов. На основе баз данных описаны гены и консервативные белковые домены развивающегося зерна голозерного ячменя. Более того, проанализированы последовательности и уровни экспрессии генов, связанных с кодированием запасных белков и ферментов синтеза крахмала и β-глюканов. Их временные и пространственные закономерности выведены из данных транскриптома сорта пленчатого ячменя Morex (Chen et al., 2014). Эти результаты обеспечивают генетический потенциал, улучшение качественных признаков голозерного ячменя в будущих исследованиях.

В настоящее время результаты секвенирования в совокупности с технологиями высокопроизводительного генотипирования можно использовать для эффективного направленного отбора нужных генотипов среди селекционных линий, что существенно ускорит создание новых сортов ячменя с определенными характеристиками (Розанова, Хлесткина, 2020).

В мировой коллекции ячменя ВИР собран обширный генофонд голозерного ячменя. Группа многорядных голозерных составляет небольшую часть коллекции, по сравнению с пленчатыми, и насчитывает 827 образцов, включает 34 разновидности. Голозерная группа двурядного ячменя состоит из 303 образцов и включает 21 разновидность. Многие разновидности голозерного ячменя в коллекции ВИР являются эндемиками, встречаются очень редко и представлены в коллекции единичными образцами, что делает коллекцию ВИР уникальным источником ценного генетического материала.

Хозяйственное значение ячменя

В настоящее время активно развивается направление по производству продуктов питания из различных зерновых культур, которые удовлетворяют диетические нужды человека. Диетическое, профилактическое и лечебное действие таких продуктов питания на организм основано на биохимическом составе зерна. Селекционные работы последних лет направлены на создание высокоурожайных сортов в сочетании с максимальным содержанием биохимических компонентов и их оптимальным соотношением с другими качественными показателями зерна и устойчивостью к различным абиотическим и биотическим стрессорам (Loskutov, Khlestkina, 2021). К таким культурам относят ячмень, который является важной продовольственной, кормовой и технической культурой и имеет большое значение во многих странах мира. Ежегодно ячмень показывает стабильные сборы зерна: в 2020 г., по данным Продовольственной и сельскохозяйственной Организации Объединенных Наций (ФАО), сбор зерна составил более 151 млн т (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, дата обращения: 25.07.2021). Около 75 % мирового производства ячменя используется на фуражные цели, 20 % идет на производство солода для пивоваренной промышленности и всего 5 % – для производства пищевых продуктов (Blake et al., 2011).

Продовольственное использование ячменя

Ячмень обладает высокими адаптивными свойствами к климатическим условиям высокогорья, засухи и засолению почвы, что делает его важной и основной продовольственной культурой в Северной Африке и на Тибетском плато в Китае, где другие культуры, такие как пшеница и рис, не могут дать стабильных и высоких урожаев (Moza, Gujral, 2016).

Список пищевых продуктов из зерна голозерного ячменя в настоящее время все больше расширяется. Зерно ячменя идет на изготовление круп, таких как ячневая и перловая. Так как зерно голозерного ячменя свободно отделяется от цветковой чешуи, то выход крупы из голозерного ячменя больше, чем из пленчатого. Голозерные сорта обладают всеми ценными свойствами для получения крупы высокого качества. Поэтому целесообразно заменить часть пленчатых сортов ячменя на голозерные для изготовления круп (Борисоник, 1971).

Из голозерного ячменя изготавливают муку. В высокогорье мука голозерного ячменя в основном употребляется в виде сату (мука, приготовленная из жареных зерен ячменя), а также смешивается с мукой других культур, таких как пшеница, гречка, просо и горох, для приготовления лепешек, пельменей и тхукпа (тибетский суп с лапшой). Кроме муки, из зерен готовят специальный традиционный ферментированный напиток «Чанг» (“Chhyang”) и дистиллированный ликер для различных культурных и религиозных мероприятий.

В Канаде распространены продукты, изготовленные из смесей муки пшеницы и ячменя в различных пропорциях. Для сохранения биологической ценности зерна используется мука из цельномолотого зерна без отсева и технологических отходов (Трофимовская, 1972). В Италии

голозерный ячмень активно применяют для переработки в диетическую ячменную муку или таких продуктов, как быстрые завтраки и заменители кофе. Для изготовления ячменного кофе зерно обжаривают до темно-коричневого цвета, затем мелко перемалывают, а полученную порошкообразную массу употребляют как суррогат кофе.

Ведется работа по применению цельнозернового овса и ячменя для приготовления функциональных напитков, в том числе растительного молока. Такие напитки богаты витаминами группы В, сложными углеводами и различными минеральными компонентами. Цельное зерно, используемое в напитках, также содержит большое количество различных фенольных соединений, обладающих антиоксидантной активностью (Fernandes et al., 2018/19).

В нашей стране активно разрабатывается применение муки голозерного ячменя в смеси с мукой из мягкой пшеницы для хлебопечения с целью обогащения продуктов полезными для организма человека веществами и существенного повышения питательной и потребительской ценности хлебобулочных изделий.

На основе значительного числа экспериментов выявлено оптимальное соотношение пшеничной/ячменной муки (90/10 %) для хлеба. При таких соотношениях характеристики хлеба (органолептическая оценка поверхности и цвета корки, пористость и эластичность) не уступают продукции, изготовленной из муки пшеницы в чистом виде, однако нужно отметить, что увеличение доли ячменной муки для хлебопечения до 25 % и более ухудшает качество продукции (Летяго, Белкина, 2019). Ведутся исследования для получения хлебной продукции с повышенной антиоксидантной активностью. Установлены аналогичные оптимальные соотношения добавления муки из зерна голозерного пигментированного ячменя сорта Гранал 32, обладающего повышенной антиоксидантной активностью, а именно 10 % (Грязнов и др., 2019; Martínez-Subirà et al., 2020).

Включение голозерного ячменя, богатого β-глюканом и антоцианами, в сбалансированную диету дает множество преимуществ для здоровья, а такие диетические продукты с низким гликемическим индексом и богатые пищевыми волокнами могут помочь в регулировании уровня глюкозы в крови у здоровых людей и пациентов с диабетом (Shakib, Gabrial, 2010; Martínez-Subirà et al., 2020).

Кормовое использование ячменя

Большая часть мирового производства ячменя (> 70 %) направлена на удовлетворение нужд животноводства. Как кормовая культура, ячмень активно используется в России, странах СНГ, Восточной Европе и Канаде, где кукуруза, одна из самых популярных кормовых культур, не очень распространена (Авдейчик и др., 2009).

Зерно голозерного ячменя является ценным высокоэнергетическим кормом, богатым белком и целым рядом незаменимых аминокислот, с низким содержанием клетчатки. Многочисленные исследования с голозерным ячменем направлены на включение его с различными ферментными добавками в рацион для улучшения качественных показателей животных и уменьшения затрат на выращивание. Активное внедрение зерна голозерного

ячменя оказало положительное влияние в основном на куриц-несушек (Дадашко и др., 2010), свиней (Татаркина, 2019), бройлерных цыплят (Teimouri et al., 2018) и гусей (Торопова, Суханова, 2013).

Другие направления использования ячменя

Активно развивается направление, где не только пленчатый, но и голозерный ячмень идет на производство солода, используется в пивоваренной промышленности и производстве других алкогольных напитков. Водные вытяжки из ячменного солода также применяют в медицине, текстильной и кожевенной промышленности. Уже очень давно обсуждается возможность использования голозерного ячменя в качестве культуры для пивоварения, но необходимо внести корректировки в технологический процесс, например, заменив естественную фильтрацию через пленки искусственными фильтрами (Борисоник, 1971).

Голозерный ячмень используется также для приготовления диастатического солода, имеющего состав и ферментативную активность, сравнимые с составом пивоваренного и дистилляционного солода, но превосходящие состав пшеничного солода, приготовленного в идентичных условиях. Первое преимущество такого солода – более короткое время выдержки, чем в пивоваренном ячмене или пшенице, и второе – его можно использовать непосредственно в пищевых целях без необходимости приготовления солодовых экстрактов и сиропов, как это имеет место в пивоваренной и винокуренной промышленности (Bhatty, 1996). Кроме того, голозерный ячмень может выступать в качестве основного материала для производства топливного спирта (Ingledeu et al., 1995).

Последние исследования голозерного ячменя показывают его многогранность при использовании как для производства кормов и пищевых продуктов, так и для различных производственных нужд. Многие авторы отмечают целесообразность замены хотя бы части пленчатого ячменя на голозерный для повышения качества продукции и возможного уменьшения затрат на производство.

Заключение

Таким образом, голозерный ячмень, несомненно, имеет ряд преимуществ перед традиционным пленчатым ячменем, а именно: легкое отделение цветковых чешуй при обмолаоте, более сбалансированный биохимический состав, повышенное содержание белка, различных аминокислот, β-глюканов и веществ, обладающих антиоксидантной активностью, меньшим содержанием клетчатки, что повышает его ценность как кормовой культуры.

В коллекции ВИР сохраняется и поддерживается более 1230 образцов голозерного ячменя, собранных со всего мира. Она может послужить источником для создания высокоурожайных сортов голозерного ячменя с адаптивными свойствами. Это дало бы преимущество в получении урожая наивысшего качества, а легкое отделение зерновки от цветковой чешуи способствовало уменьшению затрат на переработку зерна ячменя.

Настоящее исследование представляет интерес для селекционеров, генетиков и специалистов по переработке ячменя.

Список литературы / References

- Авдейчик О., Гурецкая В., Семенова Т., Шишлов М., Шишлова А. Голозерный ячмень: создание, перспективы и использование. *Наука и инновации*. 2009;3:15-19.
- [Avdeichik O., Guretskaya V., Semenova T., Shishlov M., Shishlova A. Naked Barley: Creation, Prospects and Use. *Nauka i Innovatsii = Science and Innovation*. 2009;3:15-19. (in Russian)]
- Алпатьева Н.В., Абдуллаев Р.А., Анисимова И.Н., Губарева Н.К., Ковалева О.Н., Радченко Е.Е. Устойчивые к мучнистой росе образцы местного ячменя из Эфиопии. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2016;177(4):70-78. DOI 10.30901/2227-8834-2016-4-70-78.
- [Alpateva N.V., Abdullaev R.A., Anisimova I.N., Gubareva N.K., Kovaleva O.N., Radchenko E.E. Local barley accessions from Ethiopia resistant to powdery mildew. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2016;177(4):70-78. DOI 10.30901/2227-8834-2016-4-70-78. (in Russian)]
- Анисков Н.И., Поползухин П.В., Николаев П.Н., Сафонова И.В. Агробиологическая ценность сортов ярового ячменя Омский голозерный 1 и Омский голозерный 2. *Сиб. вестн. с.-х. науки*. 2015;6:24-29.
- [Aniskov N.I., Popolzukhin P.V., Nikolayev P.N., Safonova I.V. Agrobiological value of Omskiy Golozerny 1 and Omskiy Golozerny 2 cultivars of spring barley. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences*. 2015;6:24-29. (in Russian)]
- Бахтеев Ф.Х. Ячмень. М.; Л.: Сельхозгиз, 1955.
- [Bakhteev F.Kh. Barley. Moscow; Leningrad: Sel'khozgiz Publ., 1955. (in Russian)]
- Бехтольд Н.П., Орлова Е.А. Вредоносность возбудителя твердой головни ячменя в условиях лесостепи Приобья. *Достижения науки и техники АПК*. 2018;32(7):36-39. DOI 10.24411/0235-2451-2018-10708.
- [Bekhtol'd N.P., Orlova E.A. Injuriousness of the barley smut agent under conditions of the forest-steppe of the Ob region. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2018;32(7):36-39. DOI 10.24411/0235-2451-2018-10708. (in Russian)]
- Богданова Т.М., Терентьева И.А., Хохлова А.П., Иванова Н.Н. Селекционная ценность голозерных ячменей. В: Генетические ресурсы культурных растений. Тез. докл. междунар. научн.-практ. конф. СПб.: ВИР, 2001;215-217.
- [Bogdanova T.M., Terent'eva I.A., Khokhlova A.P., Ivanova N.N. Breeding value of naked barley. In: Abstracts from the international scientific and practical conference "Genetic Resources of Cultivated Plants", St.-Petersburg: VIR Publ., 2001;215-217. (in Russian)]
- Борисоник З.В. Особенности технологии возделывания ячменя. В: Селекция ячменя и овса. М.: Колос, 1971;218-230.
- [Borisonik Z.V. Features of the technology of barley cultivation. In: Breeding of Barley and Oats. Moscow: Kolos Publ., 1971;218-230. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Мировые ресурсы зерновых культур и льна. М.; Л.: АН СССР, 1957.
- [Vavilov N.I. World Resources of Cereals and Flax. Moscow; Leningrad: AN SSSR Publ., 1957. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. Избранные труды. М.; Л.: Наука, 1965.
- [Vavilov N.I. Centers of Origin of Cultivated Plants. Selected works. Moscow; Leningrad: Nauka Publ., 1965. (in Russian)]
- Гаргаева Т.Ю., Гаврилова О.П. Фузариоз колоса и зерна ячменя. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2009;165:39-44.
- [Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P. Fusarial head blight of barley ear and grain. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2009;165:39-44. (in Russian)]
- Гладких А.В., Рендов Н.А., Некрасова Е.В., Мозылева С.И. Влияние элементов технологии возделывания на урожайность зерна голозерного ячменя. *Вестн. Омск. ГАУ*. 2019;2(34):19-23.

- [Gladkikh A.V., Rendov N.A., Nekrasova E.V., Mozyleva S.I. Influence of elements of cultivation technology on the yielding capacity of hulless barley grain. *Vestnik Omskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Omsk State Agrarian University*. 2019;2(34):19-23. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорты растений (офф. изд.). М.: Росинформагротех, 2021.
- [State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2021. (in Russian)]
- Грязнов А.А. Ячмень голозерный в условиях неустойчивого увлажнения. Куртамыш: ООО «Куртамышская типография», 2014.
- [Gryaznov A.A. Naked Barley under Conditions of Unstable Moisture. Kurtamysh: Kurtamyshskaya Tipografiya Publ., 2014. (in Russian)]
- Грязнов А.А. Нудум 95 – высокобелковый сорт голозерного ячменя. *АПК России*. 2016;75(1):175-180.
- [Gryaznov A.A. Nudum 95: a high-protein variety of naked barley. *APK Rossii = The Russian Agroindustrial Complex*. 2016;75(1):175-180. (in Russian)]
- Грязнов А.А., Летяго Ю.А., Белкина Р.И., Пономарева Е.И. Получение хлеба с использованием смесей муки пшеничной высшего сорта и обойной из зерна пигментированного ячменя сорта Гранал 32. *Вестн. Воронеж. гос. ун-та инженерных технологий*. 2019;81(1):196-200. DOI 10.20914/2310-1202-2019-1-196-200.
- [Gryaznov A.A., Letyago J.A., Belkina R.I., Ponomareva E.I. Production of bread with the use of mixtures of wheat flour of the highest grade and wholemeal from pigmented barley variety Granal 32. *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta Inzhenernykh Tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2019;81(1):196-200. DOI 10.20914/2310-1202-2019-1-196-200. (in Russian)]
- Дадашко В.В., Ромашко А.К., Зинкевич Л.В. Продуктивные качества кур при использовании в комбикормах районированного сорта голозерного ячменя. *Изв. Национальной академии наук Беларуси. Сер. аграр. наук*. 2010;2:94-97.
- [Dadashko V.V., Romashko A.K., Zinkevich L.V. Productive qualities of hens with the use of hulless barley variety in mixed fodders. *Izvestiya Natsionalnoj Akademii Nauk Belarusi. Seriya Agrarnyykh Nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series*. 2010;2:94-97. (in Russian)]
- Дорошенко Е.С., Дорошенко Э.С. Иммунологическая оценка коллекций голозерного ячменя по устойчивости к листовым болезням в условиях южной зоны Ростовской области. *Зерновое хозяйство России*. 2018;4(58):66-69. DOI 10.31367/2079-8725-2018-58-4-66-69.
- [Doroshenko E.S., Doroshenko Ed.S. Immunological assessment of the hulled barley collection according to its resistance to leaf diseases in the southern part of the Rostov region. *Zernovoe Khozyajstvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2018;4(58):66-69. DOI 10.31367/2079-8725-2018-58-4-66-69. (in Russian)]
- Дорошенко Э.С., Филиппов Е.Г., Донцова А.А., Сидоренко В.С. Изучение голозерных сортов ярового ячменя в условиях Северного Кавказа. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2019;2(30):131-139. DOI 10.24411/2309-348X-2019-11103.
- [Doroshenko Ed.S., Filippov E.G., Doncova A.A., Sidorenko V.S. Study of naked spring barley varieties under the conditions of the North Caucasus. *Zernobobovye i Krupnyanye Kul'tury = Legumes and Groat Crops*. 2019;2(30):131-139. DOI 10.24411/2309-348X-2019-11103. (in Russian)]
- Железнов А.В., Кукоева Т.В., Железнова Н.Б. Ячмень голозерный: происхождение, распространение и перспективы использования. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(2):286-297.
- [Zheleznov A.V., Kukoeva T.V., Zheleznova N.B. Naked barley: origin, distribution and prospects of utilisation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(2):286-297. (in Russian)]
- Жичкина Л.Н., Столпивская Е.В. Устойчивость сортов ячменя к пыльной головне. *Изв. Самар. гос. с.-х. академии*. 2015;4:49-52.
- [Zhichkina L.N., Stolpivskaya E.V. Resistance of spring barley varieties to loose smut. *Izvestiya Samarskoj Gosudarstvennoj Sel'skokhozyaistvennoj Akademii = Bulletin of the Samara State Agricultural Academy*. 2015;4:49-52. (in Russian)]
- Заушинцева А.В., Чернова Е.В., Малашкина М.С. Сравнительная характеристика двурядных и многорядных сортов голозерного ячменя. *Вестн. КрасГАУ*. 2007;6:72-75.
- [Zaushintseva A.V., Chernova E.V., Malashkina M.S. Comparative characteristics of two-row and six-row varieties of naked barley. *Vestnik KrasGAU = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University*. 2007;6:72-75. (in Russian)]
- Звейнек И.А., Ковалева О.Н. Генетический контроль ультра-срокоспелости местных образцов ячменя из Китая. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(3):91-96. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-91-96.
- [Zveinek I.A., Kovaleva O.N. Genetic control of ultra-earliness in Chinese barley landraces. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(3):91-96. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-91-96. (in Russian)]
- Кирдогло Е.К., Полищук С.С., Червонис М.В. Методология и результаты селекции ячменя пищевого использования. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2013;171:240-253.
- [Kyrdoglo E.K., Polyshchuk S.S., Chervonis M.V. Methodology and results of breeding barley for food end-use. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2013;171:240-253. (in Russian)]
- Летяго Ю.А., Белкина Р.И. Разработка рецептов хлеба с добавлением муки из зерна ячменя и тритикале. *Вестн. КрасГАУ*. 2019;12:176-182. DOI 10.36718/1819-4036-2019-12-176-182.
- [Letyago Yu.A., Belkina R.I. The development of bread recipes with the addition of the flour from barley and triticale grain. *Vestnik KrasGAU = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University*. 2019;12:176-182. DOI 10.36718/1819-4036-2019-12-176-182. (in Russian)]
- Лукьянова М.В., Трофимовская А.Я., Гудкова Г.Н., Терентьева И.А., Ярош Н.П. Культурная флора СССР. Т. 2. Ч. 2. Ячмень. Л.: Агропромиздат, 1990.
- [Luk'yanova M.V., Trofimovskaya A.Ya., Gudkova G.N., Terent'eva I.A., Yarosh N.P. Flora of Cultivated Plants of the USSR. Vol. 2. Part 2. Barley. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1990. (in Russian)]
- Малашкина М.С. Морфологические параметры, биохимические и технологические свойства голозерного ячменя для селекции в условиях Кемеровской области: Дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 2008.
- [Malashkina M.S. Morphological parameters, biochemical and technological properties of naked barley for breeding in the Kemerovo region: Cand. Sci. (Agric.) Dissertation. St. Petersburg, 2008. (in Russian)]
- Мешкова Л.В., Сабаяева О.Б. Устойчивость ячменя к грибным заболеваниям в Омском Прииртышье. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2009;165:159-163.
- [Meshkova L.V., Sabaeva O.B. Resistance to fungous diseases in barley in the Irtysh river area of the Omsk region. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2009;165:159-163. (in Russian)]
- Омаров Д.С. Генетические ресурсы ячменя в Дагестане. В: Ботанические и генетические ресурсы флоры Дагестана. Махачкала: Даг. фил. АН СССР, 1981;104-115.
- [Omarov D.S. Genetic resources of barley in Dagestan. In: Botanical and Genetic Resources of Dagestan Flora. Makhachkala: Dag. FAN SSSR Publ., 1981;104-115. (in Russian)]
- Орлов А.А. Ячмень. В: Культурная флора СССР. Т. 2. М.; Л.: Госсельхозиздат, 1936;97-332.
- [Orlov A.A. Barley. In: Flora of Cultivated Plants of the USSR. Vol. 2. Moscow-Leningrad: Gossel'khozizdat Publ., 1936;97-332. (in Russian)]

- Полонский В.И., Сурин Н.А., Герасимов С.А., Липшин А.Г., Сумина А.В., Зюте С.А. Оценка образцов ячменя на содержание β -глобулинов в зерне и другие ценные признаки в условиях Восточной Сибири. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2021;182(1):48-58. DOI 10.30901/2227-8834-2021-1-48-58. [Polonskiy V.I., Surin N.A., Gerasimov S.A., Lipshin A.G., Sumina A.V., Zute S.A. Evaluation of barley genotypes for the content of β -glucans in grain and other valuable features in Eastern Siberia. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2021;182(1):48-58. DOI 10.30901/2227-8834-2021-1-48-58. (in Russian)]
- Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Бланк М.Л., Бахронов А. Изучение естественного отбора в искусственных гибридных популяциях ярового ячменя. *Генетика*. 1996;32(11):1536-1544. [Pomortsev A.A., Kalabushkin B.A., Blank M.L., Bakhrinov A. Investigation of natural selection in artificial hybrid populations of spring barley. *Russ. J. Genet.* 1996;32(11):1333-1341.]
- Радченко Е.Е., Абдуллаев Р.А., Анисимова И.Н. Генетическое разнообразие зерновых культур по устойчивости к мучнистой росе. *Экол. генетика*. 2020;18(1):59-78. DOI 10.17816/ecogen14530. [Radchenko E.E., Abdullaev R.A., Anisimova I.N. Genetic diversity of cereal crops for powdery mildew resistance. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2020;18(1):59-78. DOI 10.17816/ecogen14530. (in Russian)]
- Розанова И.В., Хлесткина Е.К. NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):348-355. DOI 10.18699/VJ20.627. [Rozanova I.V., Khlestkina E.K. NGS sequencing in barley breeding and genetic studies. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):348-355. DOI 10.18699/VJ20.627. (in Russian)]
- Сурин Н.А. Адаптивный потенциал сортов зерновых культур сибирской селекции и пути его совершенствования (пшеница, ячмень, овес). Новосибирск, 2011. [Surin N.A. Adaptive Potential of Varieties of Grain Crops Bred in Siberia and Ways of Improving it (Wheat, Barley, Oats). Novosibirsk, 2011. (in Russian)]
- Татаркина Н.И. Использование питательных веществ рационов ремонтным молодняком крупной белой породы свиней. *Вестн. Курган. ГСХА*. 2019;2:55-57. [Tatarkina N.I. Use of nutritional substances of rations by young repair large white breed of pigs. *Vestnik Kurganskoy GSKHA = Bulletin of the Kurgan State Agricultural Academy*. 2019;2:55-57. (in Russian)]
- Тетьяников Н.В., Боме Н.А. Источники ценных признаков для селекции голозерного ячменя. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2020;181(3):49-55. DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-49-55. [Tetyannikov N.V., Bome N.A. Sources of characters useful for breeding in hullless barley. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2020;181(3):49-55. DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-49-55. (in Russian)]
- Торопова Н.А., Суханова С.Ф. Использование голозерного ячменя при кормлении гусят-бройлеров. *Вестн. Курган. ГСХА*. 2013;1:36-39. [Tоропова N.A., Sukhanova S.F. The use of hull-less barley for feeding geese broilers. *Vestnik Kurganskoy GSKHA = Bulletin of the Kurgan State Agricultural Academy*. 2013;1:36-39. (in Russian)]
- Трофимовская А.Я. Ячмень (эволюция, классификация, селекция). Л.: Колос, 1972. [Trofimovskaya A.Ya. Barley: Evolution, Classification, and Breeding. Leningrad: Kolos Publ., 1972. (in Russian)]
- Тяглый С.В. Устойчивость к полеганию голозерного ячменя. В: Современные принципы и методы селекции ячменя. Краснодар: ООО «Просвещение-Юг», 2007;162-164. [Tyaglyi S.V. Resistant to lodging in naked barley. In: Modern Approaches and Methods in Barley Breeding. Krasnodar: Prosveshchenie-Yug Publ., 2007;162-164. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1044-1054. [Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1044-1054. (in Russian)]
- Ходьков Л.Е. Голозерные и безостые ячмени. Л.: ЛГУ, 1985. [Khod'kov L.E. Naked and Awnless Barley. Leningrad, 1985. (in Russian)]
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 2008;27(4):617-631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z.
- Atanasova-Penichon V., Barreau C., Richard-Forget F. Antioxidant secondary metabolites in cereals: potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. *Front. Microbiol.* 2016;7:566. DOI 10.3389/fmicb.2016.00566.
- Badr A., Muller K., Schafer-Pregl R., El Rabey H., Effgen S., Ibrahim H.H., Pozzi C., Rohde W., Salamini F. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Biol. Evol.* 2000;17(4):499-510. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330.
- Bhatty R.S. Production of food malt from hull-less barley. *Cereal Chem.* 1996;73(1):75-80.
- Blake T., Blake V., Bowman J., Abdel-Haleem H. Barley feed uses and quality improvement. In: Ullrich S.E. (Ed.). Barley: Production, Improvement and Uses. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011;522-531.
- Bozbulut R., Sanlier N. Promising effects of β -glucans on glycaemic control in diabetes. *Trends Food Sci. Technol.* 2019;83(1):159-166. DOI 10.1016/j.tifs.2018.11.018.
- Buerstmayr H., Legzdina L., Steiner B., Lemmens M. Variation for resistance to *Fusarium* head blight in spring barley. *Euphytica*. 2004; 137:279-290.
- Chen W., Turkington T.K., Levesque C.A., Bamforth J.M., Patrick S.K., Lewis C.T., Chapados J.T., Gaba D., Tittlemier S., Macleod A., Grafenhan T. Geography and agronomical practices drive diversification of the epiphytic mycoflora associated with barley and its malt end product in western Canada. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2016;226: 43-55. DOI 10.1016/j.agee.2016.03.030.
- Chen X., Long H., Gao P., Deng G., Pan Z., Liang J., Tang Y., Tashi N., Yu M. Transcriptome assembly and analysis of Tibetan hullless barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum*) developing grains, with emphasis on quality properties. *PLoS One*. 2014;9(5):e98144. DOI 10.1371/journal.pone.0098144.
- Fernandes G.C., Sonawane K.S., Arya S.S. Cereal based functional beverages: a review. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2018/19; 8(3):914-919. DOI 10.15414/jmbfs.2018-19.8.3.914-919.
- Gasparis S., Kała M., Przyborowski M., Łyżnik L.A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Methods*. 2018;14:111. DOI 10.1186/s13007-018-0382-8.
- Gauthier L., Atanasova-Penichon V., Chéreau S., Richard-Forget F. Metabolomics to decipher the chemical defense of cereals against *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol accumulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(10):24839-24872. DOI 10.3390/ijms161024839.
- Ge X., Jing L., Zhao K., Su C., Zhang B., Zhang Q., Han L., Yu X., Li W. The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color. *Food Chem.* 2021;335:127655. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.127655.
- Gerasimova S.V., Hertig C., Korotkova A.M., Kolosovskaya E.V., Otto I., Hiekel S., Kochetov A.V., Khlestkina E.K., Kumlehn J. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated

- knockout of the *NUD* gene. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1): 255. DOI 10.1186/s12870-020-02454-9.
- Harlan J.R. The origin of barley. In: Barley: Botany, Culture, Winter Hardiness, Genetics, Utilization, Pests. Agricultural Handbook No. 338. Washington: Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, 1979;10-36.
- Helback H. Domestication of food plants in the old world. *Science.* 1959;153:365-372.
- Helback H. Commentary on the phylogenesis of *Triticum* and *Hordeum*. *Econ. Bot.* 1966;20:350-360.
- Hernandez J., Meints B., Hayes P. Introgression breeding in barley: Perspectives and case studies. *Front. Plant Sci.* 2020;11:761. DOI 10.3389/fpls.2020.00761.
- Hoar S.P., Brennan M., Wilson G.W., Cochrane P.M. Hull to caryopsis adhesion and grain skinning in malting barley: identification of key growth stages in the adhesion process. *J. Cereal Sci.* 2016;68:8-15. DOI 10.1016/j.jcs.2015.10.007.
- Huth M., Dongowski G., Gebhart E., Flamme W. Functional properties of dietary fibre enriched exudates from barley. *J. Cereal Sci.* 2002;32:115-117.
- Inglelew W.M., Jones A.M., Bhatti R.S., Rosnagel B.G. Fuel alcohol production from hull-less barley. *Cereal Chem.* 1995;72(2): 147-150.
- Jaganathan D., Bohra A., Thudi M., Varshney R.K. Fine mapping and gene cloning in the post-NGS era: advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.* 2020;133(5):1791-1810. DOI 10.1007/s00122-020-03560-w.
- Kikuchi S., Taketa S., Ichii M., Kawasaki S. Efficient fine mapping of naked caryopsis gene (*nud*) by HEGS (High Efficiency Genome Scanning)/AFLP in barley. *Theor. Appl. Genet.* 2003;108(1):73-78. DOI 10.1007/s00122-003-1413-y.
- Kusch S., Panstruga R. *mlo*-based resistance: An apparently universal "weapon" to defeat powdery mildew disease. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2017;30(3):179-189. DOI 10.1094/MPMI-12-16-0255-CR.
- Loskutov I.G., Khlestkina E.K. Wheat, barley, and oat breeding for health benefit components in grain. *Plants.* 2021;10(1):86. DOI 10.3390/plants10010086.
- Madakemohekar A.H., Talekar N.S., Kamboj A.D., Thakur G. Scope of hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) as a nutritious and medicinal food: a review. *Acta Sci. Agric.* 2018;2(12):11-13.
- Martin C., Schöneberg T., Vogelgsang S., Morisoli R., Bertossa M., Mauch-Mani B., Mascher F. Resistance against *Fusarium graminearum* and the relationship to β -glucan content in barley grains. *Eur. J. Plant Pathol.* 2018;152:621-634. DOI 10.1007/s10658-018-1506-8.
- Martin C., Schöneberg T., Vogelgsang S., Vincenti J., Bertossa M., Mauch-Mani B., Mascher F. Factors of wheat grain resistance to fusarium head blight. *Phytopathol. Mediterr.* 2017;56:154-166. DOI 10.14601/Phytopathol.
- Martínez-Subirà M., Romero M.P., Puig E., Macià A., Romagosa I., Moralejo M. Purple, high β -glucan, hulless barley as valuable ingredient for functional food. *LWT Food Sci. Technol.* 2020;131(9): 109582. DOI 10.1016/j.lwt.2020.109582.
- Meints B., Vallejos C., Hayes P. Multi-use naked barley: A new frontier. *J. Cereal Sci.* 2021;102:103370. DOI 10.1016/j.jcs.2021.103370.
- Moreau R.A., Flores R.A., Hicks K.B. Composition of functional lipids in hulled and hulless barley in fractions obtained by scarification and in barley oil. *Cereal Chem.* 2007;84(1):1-5.
- Moza J., Gujral H.S. Starch digestibility and bioactivity of high altitude hulless barley. *Food Chem.* 2016;194:561-568. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.07.149.
- Nevo E. Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. In: Barley: Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. Wallingford: C.A.B. International, 1992;19-43.
- Polisenska I., Jirsa O., Vaculova K., Pospichalova M., Wawroszova S., Frydrych J. *Fusarium* mycotoxins in two hulless oat and barley cultivars used for food purposes. *Foods.* 2020;9(8):1037. DOI 10.3390/foods9081037.
- Shakib M.-C.R., Gabriel S.G.N. Post-prandial responses to different bread products based on wheat, barley and fenugreek or ginger or both in healthy volunteers and their effect on the glycemic index of such products. *J. Am. Sci.* 2010;6(10):89-96.
- Shen Y., Zhang H., Cheng L., Wang L., Qian H., Qi X. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chem.* 2016;194(1):1003-1012. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.08.083.
- Siranidou E., Kang Z., Buchenauer H. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to fusarium head blight. *J. Phytopathol.* 2002;150:200-208.
- Taketa S., Amano S., Tsujino Y., Sato T., Saisho D., Kakeda K., Nomura M., Suzuki T., Matsumoto T., Sato K., Kanamori H., Kawasaki S., Takeda K. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105:4062-4067. DOI 10.1073/pnas.0711034105.
- Taketa S., Kikuchi S., Awayama T., Yamamoto S., Ichii M., Kawasaki S. Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analyses of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*). *Theor. Appl. Genet.* 2004;108:1236-1242. DOI 10.1007/s00122-003-1560-1.
- Teimouri H., Zarghi H., Golian A. Evaluation of Hull-Less Barley with or without enzyme cocktail in the finisher diets of broiler chickens. *J. Agric. Sci. Technol.* 2018;20:469-483.
- Warzecha T., Adamski T., Kaczmarek Z., Surma M., Goliński P., Perkowski J., Chełkowski J., Wiśniewska H., Krystkowiak K., Kuczyńska A. Susceptibility of hulled and hulless barley doubled haploids to *Fusarium culmorum* head blight. *Cereal Res. Commun.* 2010;38(2):220-232. DOI 10.1556/CRC.38.2010.2.8.
- Wirkijowska A., Rzedzicki Z., Kasprzak M., Błaszczak W. Distribution of (1-3)(1-4)- β -d-glucans in kernels of selected cultivars of naked and hulled barley. *J. Cereal Sci.* 2012;56(2):496-503. DOI 10.1016/j.jcs.2012.05.002.
- Xifeng R., Eviatar N., Dongfa S., Genlou S. Tibet as a potential domestication center of cultivated barley of China. *PLoS One.* 2013;8(5): e62700. DOI 10.1371/journal.pone.0062700.
- Yu S., Long H., Deng G., Pan Z., Liang J., Zeng X., Tang Y., Tashi Y., Yu M. A single nucleotide polymorphism of *nud* converts the caryopsis type of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 2016;34:242-248. DOI 10.1007/s11105-015-0911-9.
- Zeng X., Guo Y., Xu Q., Mascher M., Guo G., Li S., Mao L., Liu Q., Xia Z., Zhou J., Yuan H., Tai S., Wang Y., Wei Z., Song L., Zha S., Li S., Tang Y., Bai L., Zhuang Z., He W., Zhao S., Fang X., Gao Q., Yin Y., Wang J., Yang H., Zhang J., Henry R.J., Stein N., Tashi N. Origin and evolution of qingke barley in Tibet. *Nat. Commun.* 2018; 9:5433. DOI 10.1038/s41467-018-07920-5.

ORCID ID

K.A. Lukina orcid.org/0000-0001-5477-8684
O.N. Kovaleva orcid.org/0000-0002-3990-6526
I.G. Loskutov orcid.org/0000-0002-9250-7225

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России «Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий» по соглашению № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.03.2022. После доработки 18.05.2022. Принята к публикации 20.05.2022.

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

Влияние транслокации 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы

С.Н. Сибикеев¹✉, Е.И. Гультяева², А.Е. Дружин¹, Л.В. Андреева¹

¹ Федеральное аграрное научное учреждение Юго-Востока, Саратов, Россия

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

✉ sibikeev_sergey@mail.ru

Аннотация. Транслокация 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S с геном *Lr29* от хромосомы 7Ae#1 пырея удлиненного ($2n = 70$) привлекает внимание селекционеров мягкой пшеницы эффективностью против возбудителя листовой ржавчины. Однако ее влияние на хозяйственно полезные показатели изучено недостаточно. В представленной статье исследована агрономическая ценность транслокации 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S у аналогов яровой мягкой пшеницы сортов Саратовская 68 и Саратовская 70 в течение 2019–2021 гг. Наличие гена *Lr29* у исследуемого материала было подтверждено с помощью ПЦР-анализа с маркером Lr29F24. Линии с геном *Lr29* характеризовались высокой устойчивостью к *Puccinia triticina* как на фоне естественной эпифитотии, так и в лабораторных условиях. Транслокация 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S у аналогов сорта Саратовская 68 снижала продуктивность зерна во все годы исследований. В среднем понижение составило 35 и 42 %, или в абсолютных цифрах 1163 и 1039 против 1802 кг/га у сорта-реципиента. В то же время у линий-аналогов сорта Саратовская 70 отмечено понижение урожайности зерна в 2019 и 2020 гг. и не было отличий в 2021 г. В среднем понижение урожайности было 18 и 32 %, или в абсолютных цифрах 1101 и 912 против 1342 кг/га у сорта-реципиента. У аналогов обоих сортов выявлено значимое понижение массы 1000 зерен, которое колебалось от 14 до 20 % на сорте Саратовская 68 и 17–18 % – на сорте Саратовская 70. Увеличение периода «всходы–колошение» обнаружено только у линий-аналогов сорта Саратовская 68, которое составило в среднем 1.3 суток. У аналога сорта Саратовская 70 различий по этому показателю не было. Транслокация 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S не влияла на высоту растений и устойчивость к полеганию у всего набора линий. Исследования качества муки и хлеба у линий с транслокацией 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S выявили значимое увеличение содержания зернового белка и клейковины. Однако наблюдались различия между линиями сортов Саратовская 68 и Саратовская 70 по влиянию на показатели альвеографа. Если у линий сорта Саратовская 68 отмечалось понижение упругости, отношения упругости теста к растяжимости, то у линий сорта Саратовская 70 эти показатели повышались. Все линии увеличивали силу муки и объем хлебцев, но если у линий сорта Саратовская 68 была повышенная хлебопекарная оценка, то линии сорта Саратовская 70 не отличались от реципиента.

Ключевые слова: мягкая пшеница; транслокация 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S; линии-аналоги; эффективность гена *Lr29*; влияние на продуктивность и качество зерна.

Для цитирования: Сибикеев С.Н., Гультяева Е.И., Дружин А.Е., Андреева Л.В. Влияние транслокации 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6): 537-543. DOI 10.18699/VJGB-22-65

The effect of the 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S translocation on the productivity and quality of spring bread wheat grain

S.N. Sibikeev¹✉, E.I. Gulyaeva², A.E. Druzhin¹, L.V. Andreeva¹

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

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

✉ sibikeev_sergey@mail.ru

Abstract. The 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S translocation with the *Lr29* gene attracts the attention of bread wheat breeders by its effectiveness against *Puccinia triticina*. However, its impact on useful agronomic traits has been little studied. In this report, the prebreeding value of 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S was studied in analogue lines (ALs) of spring bread wheat cultivars Saratovskaya 68 and Saratovskaya 70 during 2019–2021. The presence of the *Lr29* gene was confirmed by using molecular marker Lr29F24. The ALs with the *Lr29* gene were highly resistant to *P. triticina* against a natural epiphytotic background and in laboratory conditions. 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S in Saratovskaya 68 ALs reduced grain productivity in all years of research. On average, the decrease was 35 and 42 %, or in absolute figures 1163 and 1039 against 1802 kg/ha in the cultivar-recipient. In Saratovskaya 70 ALs, there was a decrease in grain yield in 2019 and 2020, and there were no differences in 2021. On average, the decrease was 18 and 32 %, or in absolute figures 1101 and 912 against 1342 kg/ha in the cultivar-recipient. The analogues of both cultivars showed a significant decrease in the weight of 1000 grains, which ranged from 14 to 20 % for Saratovskaya 68 and 17–18 % for Saratovskaya 70. An increase in the period of germination-earring

was noted only in Saratovskaya 68 lines, which averaged 1.3 days. ALs of Saratovskaya 70 had no differences in this trait. 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S did not affect plant height and lodging resistance in all ALs. Studies of the bread-making quality in lines with 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S revealed a significant increase in grain protein and gluten content. As for the effect on the alveograph indicators, there were differences between ALs of both cultivars. While Saratovskaya 68 ALs had a decrease in elasticity and in the ratio of dough tenacity to the extensibility, Saratovskaya 70 lines had an increase in these indicators. All lines increased the flour strength and the loaves volume, but while Saratovskaya 68 ALs had an increased porosity rating, Saratovskaya 70 ALs had the same rating as the recipient.

Key words: bread wheat; translocation 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S; analogue lines; efficiency of the *Lr29* gene; effect on grain productivity and bread-making quality.

For citation: Sibikeev S.N., Gulyaeva E.I., Druzhin A.E., Andreeva L.V. The effect of the 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S translocation on the productivity and quality of spring bread wheat grain. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):537-543. DOI 10.18699/VJGB-22-65

Введение

Нижнее Поволжье Российской Федерации является одним из основных регионов, выращивающих мягкую пшеницу. Большинство посевов сконцентрировано в Саратовской и Волгоградской областях. В 2020 г. общая площадь посевов под мягкой пшеницей (озимой и яровой) в Саратовской области составила 1 380 524 га, (<http://srtv.gks.ru/storage/mediabank/f2raAGzs>), в Волгоградской области – 1 528 000 га (https://volgastat.gks.ru/storage/mediabank/posev_21.pdf). По данным «Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию на 2021 г.», в Нижнем Поволжье зарегистрировано 90 сортов озимой и 27 сортов яровой мягкой пшеницы (gossortrf.ru/wp-content/uploads/2021/04/Итоговый-реестр-2021.pdf).

В этом регионе одним из основных грибных заболеваний пшеницы является листовая ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* Erikss.). Хотя для ряда зерносеющих регионов России в последнее десятилетие отмечается снижение значения этой болезни, потери от нее достаточно велики (Gulyaeva et al., 2021). В Нижнем Поволжье болезнь встречается ежегодно, а сильные эпифитотии наблюдаются раз в три-четыре года (Гуляева и др., 2020). Последняя сильная эпифитотия была в вегетационный сезон 2017 г. (Сибикеев и др., 2020). Несмотря на большое количество зарегистрированных в этом регионе сортов озимой и яровой мягкой пшеницы, значительная часть из них восприимчива к *P. triticina* (Gulyaeva et al., 2021). Так, в левобережной части Саратовской области преобладают сорта яровой мягкой пшеницы Саратовская 42, Саратовская 55 и Альбидум 32, которые не защищены никакими генами устойчивости или неэффективным геном *Lr10* (Гуляева и др., 2020; Gulyaeva et al., 2021).

В целом для каждого региона России имеется свой набор сортов мягкой пшеницы, имеющих гены устойчивости к листовой ржавчине (*Lr*-гены). Однако он не велик и ограничивается генами: *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37* и *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2*, *LrSp*. Эти гены используются в практической селекции в различных комбинациях, но в основном непреодоленные гены лишь *LrSp*, *Lr6Agi1*, *Lr6Agi2* (Gulyaeva et al., 2021). Причем можно предполагать, что два последних гена аллельны (Sibikeev et al., 2017). В связи с этим в большинстве селекционеров России происходят поиск и перенос в перспективный материал новых неидентифицированных *Lr*-генов от диких сородичей (Давоян и др., 2017; Davoyan et al., 2019, 2021; Гуляева и др., 2020) или привлечение эффективных ра-

нее не использованных *Lr*-генов (Сибикеев и др., 2019). К последним относится ген *Lr29*, высокоэффективный как в России (Gulyaeva et al., 2021), так и за рубежом (Labuschagne et al., 2002; Li et al., 2018; Atia et al., 2021).

Как известно, ген *Lr29* интрогрессирован в мягкую пшеницу сорта Chinese Spring из короткого плеча 7Ae#1 хромосомы *Agropyrum elongatum* (Host) Beauvois = *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Backworth and Dewey гомеологичной рекомбинацией (Sears, 1973). E.R. Sears (1973) выделил 7D/Ag#11-перенос, который отличался от других устойчивым типом реакции к возбудителю листовой ржавчины. В сравнении с другими генами устойчивости к листовой ржавчине (*Lr24*, *Lr19*), интродуцированными от *Ag. elongatum*, ген *Lr29* не имеет сцепления с генами устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины и желтого цвета муки (McIntosh et al., 1995). В каталоге генных символов пшеницы не указано ни одного коммерческого сорта с этим геном (McIntosh et al., 2013). Однако имеется информация о наличии *Lr29* в египетских сортах (Atia et al., 2021). Исходя из исследований Е.И. Гуляевой, в наборе российских сортов мягкой пшеницы, как озимой, так и яровой, его нет (Gulyaeva et al., 2021). Почему такое ограниченное использование в практической селекции гена *Lr29*, точнее 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S-транслокации, неизвестно.

Вопрос, связано ли это с тем, что она не компенсирует отсутствия пшеничного хроматина либо содержит нежелательные сцепления, открыт, так как мало информации о влиянии этой транслокации на хозяйственно полезные признаки. Из доступных источников к настоящему времени известно лишь о двух исследованиях транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S – в Канаде и ЮАР (Dyck, Lukow, 1988; Labuschagne et al., 2002), сконцентрированных в основном на изучении качества муки и хлеба и осуществленных в мелкочаечных посевах в один-два вегетационных сезона. В России такие исследования не проводили. Для определения влияния транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S с геном *Lr29* на продуктивность зерна и качество муки хлеба в лаборатории генетики и цитологии Федерального аграрного научного центра Юго-Востока были созданы линии-аналоги яровой мягкой пшеницы на сортах Саратовская 68 и Саратовская 70.

Цель наших исследований – по результатам изучения линий-аналогов яровой мягкой пшеницы выявить перспективность транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S с геном *Lr29* для практической селекции как по эффективности против *P. triticina*, так и по влиянию на продуктивность зерна и качество муки и хлеба.

Материалы и методы

Исследованы следующие генотипы: 1) сорта-реципиенты яровой мягкой пшеницы Саратовская 68 (С68) и Саратовская 70 (С70); 2) линии-аналоги яровой мягкой пшеницы Саратовская 68*4//TcLr29; 3) линии-аналоги яровой мягкой пшеницы Саратовская 70*4//TcLr29. Линии-аналоги получены скрещиванием сортов С68 и С70 с почти изогенной линией сорта Thatcher (TcLr29, RL-6080), содержащей транслокацию 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S с геном *Lr29*, с последующим четырехкратным беккроссированием с сортами-реципиентами. Всего получено 20 линий-аналогов от сорта С68 и 11 – от сорта С70. В дальнейшие исследования были взяты по две линии-аналоги от каждого сорта. Так как оба сорта-реципиента восприимчивы к возбудителю листовой ржавчины, то основным критерием при отборах в беккроссах была устойчивость к *P. triticina*.

Два различных сорта-реципиента были взяты в исследование для выявления возможного влияния генотипа реципиента на изучаемые признаки. Сорта С68 и С70 различаются между собой. Первый сорт – остистый, краснозерный, белоколосый, высокорослый, среднеспелый, восприимчив к возбудителю листовой ржавчины, содержит неэффективный ген *Lr10* (Гульяева и др., 2020), по качеству муки и хлеба относится к категории ценных пшениц. Второй сорт – безостый, белозерный, белоколосый, высокорослый, скороспелый, восприимчив к возбудителю листовой ржавчины, не содержит никаких *Lr*-генов (Гульяева и др., 2020), по качеству муки и хлеба относится к категории ценных пшениц.

Исследования включали три этапа. Первый этап – подтверждение наличия чужеродного материала у исследуемых линий-аналогов С68*4//TcLr29 (С68Lr29) и С70*4//TcLr29 (С70Lr29). Для этого была проведена идентификация *Lr*-генов с использованием молекулярного маркера *Lr29* (Lr29F24) (Procunier et al., 1995). ДНК выделяли из листьев 5-дневных проростков микрометодом по методике D.V. Dorokhov и E. Clocke (1997). Из каждой линии брали по три растения. Концентрация ДНК в рабочем растворе составляла 50–100 нг/мкл. Полимеразную цепную реакцию осуществляли в амплификаторе MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих условиях: 94 °С – 3 мин, 35 циклов (94 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин). Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1.5 % агарозном геле в 1×TBE-буфере, гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете. В качестве положительного контроля была линия TcLr29.

Второй этап – оценка восприимчивости линий к возбудителю листовой ржавчины на ювенильной стадии и стадии взрослых растений. Восприимчивость растительного материала на стадии взрослых растений (фаза молочно-восковой спелости) – в полевых условиях Федерального аграрного научного центра Юго-Востока при сильной эпифитотии патогена в 2017 г. (Сибикеев и др., 2020).

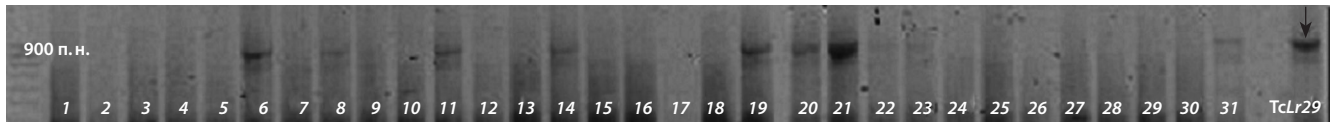
В полевых условиях тип инфекции оценивали по шкале А.Р. Roelfs с коллегами (1992), где *R* – устойчивость, *MR* – умеренная устойчивость, *MS* – умеренная восприимчивость и *S* – восприимчивость. Степень поражения ржавчиной (%) была определена согласно шкале R.F. Peterson

с коллегами (1948). Оценку линий на ювенильной стадии проводили в лабораторных условиях в фазе первого листа во Всероссийском институте защиты растений в 2018 г. Для лабораторной оценки использовали клоны *P. triticina*, маркированные вирулентностью к генам *Lr9* (K9), *Lr19* (K19), *Lr26* (K26) и сборную саратовскую популяцию патогена. Тест-клон K9 был выделен из уральской популяции, тест-клон K19 – из тамбовской, K26 – из краснодарской популяции. Саратовская популяция собрана на Лысогорском фитопитомнике Саратовской области в 2018 г. Используемые тест-клоны и популяция были авирулентными к линиям Thatcher (TcLr) с генами *Lr24*, *Lr23*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr39*(= 41), *Lr45*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr53* и вирулентными – с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr30*.

Клон K9 был вирулентным по отношению к линии TcLr9 и авирулентным – к TcLr19, TcLr26; клон K19 вирулентен к TcLr19 и авирулентен – к TcLr9, TcLr26; клон K26 вирулентен к TcLr26, авирулентен – к TcLr9, TcLr19. Эти тест-клоны *P. triticina* были выбраны для анализа, так как вирулентность к *Lr9* распространена в Уральском регионе, к *Lr19* – в Среднем и Нижнем Поволжье и к *Lr26* – во всех регионах Российской Федерации, где выращивается мягкая пшеница.

Саратовская популяция патогена была представлена смесью двух рас: вирулентные – к линии TcLr19, авирулентные – к TcLr9, TcLr26 и вирулентные – к линии TcLr26, авирулентные – к TcLr9, TcLr19. Для инфицирования использовали 10–12-дневные проростки (фаза первого листа) исследуемых линий-аналогов и сортов-реципиентов, выращенные в сосудах с почвой, их опрыскивали водной суспензией спор каждого тест-клона и популяцией с добавлением детергента Твин 80. После заражения растения помещали в светоустановку с контролируемыми условиями (температура 20 °С, фотопериод 16 ч день/8 ч ночь). Тип реакции пшеницы определяли по шкале Е.В. Mains и Н.С. Jackson (1926), где: 0 – отсутствие симптомов; 0 – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом и хлорозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом; 3 – пустулы среднего размера без некроза; 4 – крупные пустулы без некроза; X – пустулы на одном и том же листе разных типов; присутствуют хлорозы и некрозы. Растения, поражение которых составляло 0–2 балла, относили к устойчивым (*R*), а 3, 4 и X (*S*) – к восприимчивым (Mains, Jackson, 1926).

Третий этап – оценка показателей продуктивности зерна, физических и хлебопекарных свойств теста и хлеба у линий-аналогов С68Lr29 и С70Lr29 в сравнении с сортами-реципиентами С68 и С70. Исследования проводили в 2019–2021 гг. Гидротермический коэффициент за период вегетации мягкой пшеницы в 2019 г. составил 0.6 (очень засушливые условия), в 2020 г. – 0.8 (засушливые условия) и 2021 г. – 0.9 (засушливые условия). Основными отличиями погодных условий 2019 и 2021 гг. были высокие температуры в период цветения (выше средней многолетней на 4.2 и 8.0 °С соответственно) при пониженном количестве осадков (ниже среднего многолетнего на 13 мм), что резко снизило продуктивность зерна. В то же время в 2020 г. в период цветения наблюдалась пониженная температура (ниже средней многолетней на 1 °С) при повышенном



Электрофореграмма, иллюстрирующая амплификацию фрагментов в присутствии маркера Lr29F24/Lr29R24.

M – маркер длины 1000/100–500 (Диаэм). Стрелкой указан диагностический фрагмент длиной 900 п.н. Дорожки: 1–20 – линии-аналоги C68Lr29; 21–31 – C70Lr29.

количестве осадков (выше средней многолетней на 48 мм), что повысило урожайность зерна.

Экспериментальный материал рендомизированно высевали в 7 м² делянки в 3-кратной повторности. Норма высева – 400 зерен на 1 м². Качество муки и хлеба оценивали по содержанию сырой клейковины, крепость которой определяли на приборе ИДК-3, а также по показателям альвеографа Шопена с выпечкой опытных образцов хлебцев. Содержание белка в зерне урожая 2020 и 2021 гг. выявляли на анализаторе зерна Infratec™ 1241. Полученные данные по каждому набору линий-аналогов и соответствующему сорту-реципиенту подвергали однофакторному дисперсионному анализу со множественными сравнениями по Дункану с помощью пакета селекционно-генетических программ Agros-2.10.

Результаты

Идентификация генов устойчивости

Для подтверждения наличия транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S и, соответственно, гена *Lr29* у линий-аналогов C68Lr29 и C70Lr29 осуществлен ПЦР-анализ с маркером Lr29F24 (Procunier et al., 1995).

Всего проанализирован 31 образец, продукт амплификации размером 900 п. н. определен у линий № 6, 8, 11, 14, 19, 20 (C68Lr29), № 21 и 31 (C70Lr29) (см. рисунок). На основании проведенного молекулярного анализа с использованием маркера, разработанного для выявления транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S с геном *Lr29*, сделано предположение, что данные линии-аналоги несут транслокацию, а следовательно, ген *Lr29*. Для определения влияния транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на хозяйственно ценные признаки были взяты линии № 6 и 8 C68Lr29 и № 21, 31 – C70Lr29.

Фитопатологический анализ устойчивости к возбудителю листовой ржавчины

В условиях инфекционного фона 2017 г. все линии с геном *Lr29* показали устойчивый тип реакции (R) (пораженность 0 %, тип реакции – IT = 1), в то время как сорта-реципиенты C68 и C70 проявили восприимчивость к патогену (S) (пораженность 40 и 60 %, тип реакции IT = 3). Сходные результаты получены при инокуляции линий в фазе проростков (табл. 1).

Таким образом, фитопатологический анализ устойчивости к возбудителю листовой ржавчины у линий-аналогов C68Lr29 и C70Lr29 в полевых и лабораторных условиях показал высокий уровень их устойчивости и эффективность гена *Lr29* по сравнению с исходными сортами-реципиентами.

Таблица 1. Характеристика восприимчивости линий с транслокацией 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S и родительских сортов к патогену *P. triticina* в фазе проростков

| Сорт, линия | Тип реакции (IT), балл | | | Саратовская популяция <i>P. triticina</i> |
|-------------|------------------------|-----|-----|-------------------------------------------|
| | Тест-клоны K9 | K19 | K26 | |
| C68 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| C68Lr29-6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C68Lr29-8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C70 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| C70Lr29-21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C70Lr29-31 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Влияние транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на продуктивность зерна и качество муки и хлеба

Результаты изучения продуктивности зерна у линий с транслокацией 7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) продемонстрировали, что в среднем за период с 2019 по 2021 г. нет значимых различий по урожайности у линий по сравнению с сортами-реципиентами C68 и C70 (табл. 2), что ожидаемо, так как показатели по продуктивности в 2020 г. в три-пять раз превышают урожайность 2019 и 2021 гг. Схожие результаты были получены при определении влияния *Sr22+Sr25* и *Sr22+Sr35*-комбинаций генов на линиях яровой мягкой пшеницы по сравнению с сортами Л503 и Фаворит. Урожайность зерна у этих сортов и линий была в 2.3–2.7 раза выше в 2020 г. по сравнению с 2019 г. (Sibikeev et al., 2021). Тем не менее анализ продуктивности зерна отдельно по годам выявил, что у линий-аналогов C68Lr29 по всем трем годам изучения урожайность была существенно ниже, чем у сорта-реципиента C68. Схожие выводы были при сравнении продуктивности зерна у линий C70Lr29 по двум годам изучения (2019 и 2020) и лишь в вегетационный сезон 2021 г. урожайность зерна линий была на уровне сорта-реципиента C70.

Как упоминалось выше, сезоны 2019–2021 гг. характеризовались засухой, но при этом сезон 2020 г. выделялся распределением осадков в течение вегетационного периода. В этот год наблюдался избыток влаги от всходов до цветения, а затем отмечалась засуха с высокими температурами до полного созревания. Основным положительным моментом вегетационного периода 2020 г. было повышенное количество осадков в третьей декаде июня (фаза «цветение яровой мягкой пшеницы»). При этом превышение многолетних показателей составило 80 % при пониженной температуре воздуха, что в дальнейшем способствовало более высокой урожайности зерна.

Таблица 2. Показатели продуктивности зерна у линий яровой мягкой пшеницы с транслокацией 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) в 2019–2021 гг.

| Сорт, линия | Всходы–колошение, сут, среднее за 2019–2021 гг. | Урожайность зерна, кг/га | | | | Масса 1000 зерен, г, среднее за 2019–2021 гг. | Белок, %, среднее за 2020–2021 гг. |
|--------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------------------|------------------------------------|
| | | 2019 г. | 2020 г. | 2021 г. | Среднее | | |
| C68 | 41.0 | 684 | 3650 | 1073 | 1802 | 30.9 | 16.6 |
| C68 <i>Lr29-6</i> | 42.3 | 562 | 2578 | 348 | 1163 | 26.6 | 18.9 |
| C68 <i>Lr29-8</i> | 42.3 | 462 | 2344 | 340 | 1049 | 24.6 | 18.5 |
| HCP ₀₅ | 1.0 | 110 | 238 | 121 | NS | 2.7 | 0.5 |
| C70 | 40.0 | 562 | 3164 | 299 | 1342 | 36.0 | 16.7 |
| C70 <i>Lr29-21</i> | 40.7 | 352 | 2574 | 378 | 1101 | 29.4 | 17.5 |
| C70 <i>Lr29-31</i> | 40.0 | 307 | 2112 | 318 | 912 | 29.7 | 17.5 |
| HCP ₀₅ | NS | 152 | 250 | 115 | NS | 5.2 | 0.5 |

В среднем за 2019–2021 гг. анализ массы 1000 зерен как одного из важных элементов продуктивности зерна показал значимое понижение у обеих линий *C68Lr29* – 26.6 и 24.6 г, по сравнению с сортом-реципиентом – 30.9 г. Схожие результаты получили у линий-аналогов *C70Lr29* – 29.4 и 29.7 г против 36.0 г у *C70* (см. табл. 2).

Влияние транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на продолжительность периода «всходы–колошение» в среднем за 2019–2021 гг. было неоднозначным. Если наблюдались значимые различия между обеими линиями *C68Lr29* (42.3 сут) и сортом-реципиентом *C68* (41 сут), то у линий *C70Lr29* (40.7 и 40.0 сут) и сорта *C70* (40.0 сут) достоверных различий не было. Таким образом, установлено неодинаковое влияние транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S в разных генотипах сортов-реципиентов: у линий, созданных на среднеспелом сорте *C68*, период «всходы–колошение» удлинился, а на скороспелом *C70* он остался на уровне реципиента. По высоте растений и устойчивости к полеганию различий между исследуемыми линиями и сортами-реципиентами не было (данные не представлены).

К сожалению, для большого числа интрогрессивных линий мягкой пшеницы вовлечение чужеродной генетической изменчивости ухудшает ряд показателей качества муки и хлеба. Поэтому при изучении влияния интрогрессии фрагментов хромосом от родственных видов в мягкую пшеницу важным этапом является определение качества конечной продукции – муки и хлеба. В среднем за 2020–2021 гг. было обнаружено, что линии с транслокацией 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S значимо превысили по содержанию белка в зерне сорта-реципиенты (см. табл. 2). Причем на линиях-аналогах *C68Lr29* это превышение достигало 2 %, а на *C70Lr29* – 0.8 %.

По показателям клейковины получены следующие результаты: линии *C68Lr29* существенно превысили по содержанию клейковины сорт-реципиент *C68*, а именно: 41.7 и 41.4 против 31.4 % у реципиента, при HCP₀₅ = 2.5. По крепости клейковины у линий *C68Lr29* значимых различий с сортом-реципиентом не было. Но следует отметить, что по показателям ИДК-3 у линий *C68Lr29* клейковина была более слабая – 76 и 80 е. п., против 72 у сорта *C68*. У линий *C70Lr29* отмечалось значительное превышение по содержанию клейковины сорта-реципиента *C70*, а именно: 37.0 и 38.5 против 35.0 % у реципиента, при HCP₀₅ = 1.5. По крепости клейковины у линий больших

различий с сортом-реципиентом не было. Кроме того, по показателям ИДК-3 у линий *C70Lr29* клейковина первой группы – 71 и 75 е. п., как и у *C70* – 69 е. п.

При изучении показателей альвеографа выявлено, что линии *C68Lr29* отличались не только от сорта-реципиента, но и между собой. По упругости теста и отношению упругости теста к растяжимости (*P/L*) отмечено понижение, но у одной из линий *C68Lr29* понижение упругости (*P*) было незначимое. Линии *C68Lr29* продемонстрировали неоднозначное влияние транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на силу муки – одна линия незначимо снизила, а вторая значимо повысила этот показатель. По пористости мякиша и объему хлеба у линий *C68Lr29* по отношению к сорту-реципиенту *C68* наблюдалось повышение, но у одной из линий повышение объема хлеба было несущественным. В то же время у линий *C70Lr29* влияние транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на показатели альвеографа было однозначным: повышение упругости теста, равное отношение *P/L*, повышение силы муки, объема хлеба, по пористости хлеба высокая оценка на уровне сорта-реципиента *C70* (табл. 3).

Обсуждение

Как уже отмечалось выше, ген *Lr29* в составе транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S высокоэффективен против популяций возбудителя листовой ржавчины во многих странах мира. Известно только о двух патотипах *P. triticina* из Турции и одном из Пакистана, вирулентных к этому гену (Huerta-Espino, 1992, по McIntosh et al., 1995). В наших исследованиях эффективность гена *Lr29* была подтверждена как во время сильной эпифитотии листовой ржавчины в Саратовской области (*R*-тип устойчивости и тип реакции на патоген IT = 1), так и в лабораторных исследованиях. Линии с геном *Lr29* характеризовались устойчивостью при инокуляции изолятами *P. triticina*, вирулентными к *Lr9*, *Lr19*, *Lr26* (IT = 0;). Так как в полевых условиях оценивали взрослые растения в стадии начала налива зерна, а при лабораторных исследованиях – проростки в фазе одного листа, то можно утверждать об экспрессии защитного действия *Lr29* в течение всего вегетационного сезона.

При анализе влияния транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) необходимо отметить размер самой транслокации. Как видно из ее обозначения, она включает в себя

Таблица 3. Показатели качества муки и хлеба у линий яровой мягкой пшеницы с транслокацией 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) в среднем за 2020 г.

| Сорт, линия | Альвеограф* | | Хлеб** | | | |
|--------------------|---------------|------------|-------------------|----------------------------|------------------|-------------|
| | <i>P</i> , мм | <i>P/L</i> | <i>W</i> , ед. а. | <i>V</i> , см ³ | Пористость, балл | Цвет мякиша |
| C68 | 97 | 1.5 | 281 | 710 | 4.2 | Белый |
| C68 <i>Lr29-6</i> | 79 | 1.0 | 268 | 820 | 4.9 | Белый |
| C68 <i>Lr29-8</i> | 88 | 1.0 | 314 | 750 | 5.0 | Белый |
| HCP ₀₅ | 9 | 0.3 | 20 | 40 | 0.3 | |
| C70 | 91 | 1.5 | 222 | 820 | 4.9 | Белый |
| C70 <i>Lr29-21</i> | 103 | 1.6 | 327 | 875 | 4.8 | Белый |
| C70 <i>Lr29-31</i> | 110 | 1.8 | 280 | 870 | 5.0 | Белый |
| HCP ₀₅ | 9 | NS | 30 | 40 | NS | |

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

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

часть длинного плеча и все короткое плечо хромосомы 7Ae#1 пырея удлиненного и часть длинного плеча хромосомы 7D мягкой пшеницы. Точка разрыва указывается в дистальной части 7DL-7Ae#1L плеч (Friebe et al., 1996). Таким образом, есть основания ожидать большого влияния на агрономические показатели, в первую очередь на продуктивность зерна и качество муки и хлеба.

К сожалению, мало исследований по изучению влияния транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) на хозяйственно ценные признаки (пребридинговое изучение) (Dyck, Lukow, 1988; Labuschagne et al., 2002). Эти исследования проводили на почти изогенных линиях сорта Thatcher (Dyck, Lukow, 1988) и сортов Thatcher и Karee (Labuschagne et al., 2002). В основном они были сконцентрированы на определении влияния транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на показатели качества муки и хлеба. Осуществлено одногодичное исследование на продуктивность зерна, которое показало нейтральное влияние на урожайность зерна (Dyck, Lukow, 1988).

В нашей работе, по результатам трехлетних полевых испытаний в условиях дефицита влаги (засухи разной степени), на линиях C68*Lr29* установлено значимое снижение продуктивности зерна все три сезона. Схожее влияние обнаружено на линиях C70*Lr29*, у которых два сезона из трех было существенное снижение урожайности зерна. P.L. Dyck и O.M. Lukow (1988) и M.T. Labuschagne с коллегами (2002) выявили положительное влияние на содержание белка в зерне. Наши результаты согласуются с этим выводом. Повышение содержания белка в зерне линий-аналогов, по сравнению с сортами-реципиентами, составило от 0.8 до 2.0%. Наблюдалось также совпадение выводов о положительном влиянии на объем экспериментальных хлебцев. По результатам наших исследований, превышение составило от 40 до 110 см³. По отношению упругости теста к растяжимости (*P/L*) так же, как и в работе M.T. Labuschagne с коллегами (2002), нами был определен эффект сорта-реципиента. Так, на линиях C68*Lr29* отмечалось понижение на показатель *P/L*, а на линиях C70*Lr29* – нейтральный эффект. В работе P.L. Dyck и O.M. Lukow (1988) установлено положительное или нейтральное влияние на массу 1000 зерен. По нашим данным, присутствие транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S пони-

жает этот показатель, причем у двух наборов линий-аналогов – по трем годам изучения. Понижение составило от 4.3 до 6.6 г.

По остальному набору изучаемых признаков наши данные дополняют результаты P.L. Dyck и O.M. Lukow (1988) и M.T. Labuschagne с коллегами (2002). Так, в исследованиях (Dyck, Lukow, 1988) и (Labuschagne et al., 2002) показаны положительное или нейтральное влияние на водопоглотительную способность и выход муки и отрицательный эффект на время образования теста. Нами установлено положительное влияние на содержание клейковины и незначимое снижение ее крепости. Выявлен эффект сорта-реципиента на упругости теста. Так, у линий C68*Lr29* транслокация 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S понижает этот показатель, а у C70*Lr29* значительно повышает. По влиянию на силу муки у линий C70*Lr29* отмечено значимое повышение, в то время как у линий C68*Lr29* одна линия незначимо понизила, а вторая значимо повысила этот показатель. Возможно, что у набора линий C68*Lr29*, кроме эффекта транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S, оказал влияние отбор при создании линий. M.T. Labuschagne с коллегами (2002) также наблюдали эффекты отборов внутри набора почти изогенных линий сорта Karee с геном *Lr29*, которые имели неоднозначные показатели качества муки.

В наших исследованиях все линии-аналоги либо повышали оценку пористости хлеба (линии C68*Lr29*), либо имели высокую оценку на уровне сорта-реципиента (линии C70*Lr29*). Кроме того, выявлено различное влияние (в зависимости от сорта-реципиента) на длительность периода «всходы–колошение». Установлены значимые различия между линиями C68*Lr29* (42.3 сут) и сортом-реципиентом C68 (41 сут), а у линий C70*Lr29* (40.7 и 40.0 сут) и сортом C70 (40.0 сут) различий не было. Не обнаружено влияния транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S на высоту растений и устойчивость к полеганию.

Заключение

Подтверждена высокая эффективность гена *Lr29* к саратовской популяции возбудителя листовой ржавчины, а также патотипам, вирулентным к *Lr9*, *Lr19*, *Lr26*. По всему изучаемому комплексу хозяйственно ценных признаков

линии-аналоги с транслокацией 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) были более перспективны по показателям качества муки и хлеба, чем сорта-реципиенты, но уступали им по продуктивности зерна. Снижение урожайности зерна, по всей видимости, связано с понижением засухоустойчивости по сравнению с сортами-реципиентами Саратовская 68 и Саратовская 70. Для дальнейшего использования транслокации 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S (ген *Lr29*) в селекционных программах необходимо проведение дополнительных исследований по снижению отрицательного влияния на ряд агрономически важных признаков.

Список литературы / References

- Гультьева 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)]
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С. Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltoides* 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 speltoides* 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)]
- Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Гультьева Е.И., Андреева Л.В. Анализ влияния 4AS.4AL-7S#2S транслокации на продуктивность и качество зерна яровой мягкой пшеницы. *Усп. соврем. естествознания*. 2019;8:34-38. DOI 10.17513/use.37179.
- [Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Gulyaeva E.I., Andreeva L.V. Analysing effects of 4AS.4AL-7S#2S translocation upon yields and grain quality of spring milling wheat. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2019;8:34-38. DOI 10.17513/use.37179. (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.y2020pp40-44.
- [Sibikeev S.N., Konkova E.A., Salmova M.F. Characteristic of the bread wheat leaf rust pathogen virulence in the Saratov region conditions. *Agrarnyy Nauchnyy Zhurnal = Agrarian Scientific Journal*. 2020;9:40-44. DOI 10.28983/asj.y2020pp40-44. (in Russian)]
- Atia M.A.M., El-Khateeb E.A., Abd El-Maksoud R.M., Abou-Zeid M.A., Salah A., Abdel-Hamid A.M.E. Mining of leaf rust resistance genes content in Egyptian bread wheat collection. *Plants*. 2021;10:1378. DOI 10.3390/plants10071378.
- Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Y.S., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556.
- 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 Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):770-777. DOI 10.18699/VJ21.088.
- Dorokhov D.B., Clocke E. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ. J. Genet.* 1997;33(4):358-365.
- 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;68:633-639. 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;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277.
- Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Gannibal P.B. Leaf rust resistance genes in wheat cultivars registered in Russia and their influence on adaptation processes in pathogen populations. *Agriculture*. 2021;11:319. DOI 10.3390/agriculture11040319.
- Labuschagne M.T., Pretorius Z.A., Grobbelaar B. The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on bread making quality in wheat. *Euphytica*. 2002;124:65-70. DOI 10.1023/A:1015683216948.
- Li J., Shi L., Wang X., Zhang N., Wei X., Zhang L., Yang W., Liu D. Leaf rust resistance of 35 wheat cultivars (lines). *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2018;9:429. DOI 10.4172/2157-7471.1000429.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia triticina* Eriks. *Phytopathology*. 1926;16:89-120.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts. An Atlas of Resistance Genes. Melbourne: CSIRO, 1995.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. In: 12th Int. Wheat Genet. Symp., 8-13 September. 2013. Yokohama, Japan. 2013;29-30.
- 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.
- Procunier J.D., Townley-Smith T.F., Fox S., Prashar S., Gray M., Kim W.K., Czarnecki E., Dyck P.L. PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Genet. Breed.* 1995;49:87-92.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saaru E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1992.
- 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.
- 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.
- Sears E.R. Agropyron-wheat transfers induced by homoeologous pairing. In: Proceeding of the 4th International Wheat Genetic Symposium. Columbia. Missouri. USA, 1973:191-199.

ORCID ID

S.N. Sibikeev orcid.org/0000-0001-8324-9765
E.I. Gulyaeva orcid.org/0000-0001-7948-0307

A.E. Druzhin orcid.org/0000-0002-3968-2470
L.V. Andreeva orcid.org/0000-0002-3631-1084

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.02.2022. После доработки 23.05.2022. Принята к публикации 23.05.2022.

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

Молекулярно-генетическое выявление и дифференциация возбудителей бактериальной полосатости листьев риса *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

М.А. Королева¹, С.А. Блинова^{1, 2}✉, А.А. Шварцев¹, В.Е. Курочкин³, Я.И. Алексеев^{1, 3}

¹ ООО «Синтол», Москва, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

³ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ sofyablinova@yandex.ru

Аннотация. Бактерии рода *Xanthomonas* Dowson, 1939 поражают около 400 видов растений, в том числе важные сельскохозяйственные культуры. Бактериальная полосатость риса – одно из самых разрушительных заболеваний, вызвано бактериями вида *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al., 1957) Swings et al., 1990. Сильное сходство симптомов поражения с другим карантинным близкородственным патовариантом – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama, 1922) Swings et al., 1990, а также возможность совместного заражения делают визуальную идентификацию невозможной. Карантинный статус и высокая вредоносность патогена требуют высокоэффективного, быстрого и точного метода его диагностики. Целью исследования были разработка и апробация наборов реагентов для выявления бактерии *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, вызывающей бактериальную полосатость листьев риса, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также ПЦР с последующим секвенированием ампликонов. В работе изучены образцы ДНК *X. o. pv. oryzae* и *X. o. pv. oryzicola*, полученные из коллекции CIRN-CFBR (Франция). Для проверки аналитической чувствительности была создана конструкция на основе вектора pA12-T с целевой вставкой 290 п. н. Были подобраны и апробированы праймеры и зонд для специфической амплификации фрагмента гена *hpa1* методом ПЦР-РВ, позволяющие обнаруживать ДНК *X. o. pv. oryzicola*. Показана способность с помощью разработанных праймеров обнаруживать все штаммы *X. o. pv. oryzicola*, последовательности которых находились в базе данных GenBank NCBI на 11.11.2021. Аналитическая специфичность набора реагентов протестирована на выборке из ДНК, выделенных из 53 близкородственных и сопутствующих организмов, и составила на исследованной выборке 100 %. Ложноположительных и ложноотрицательных результатов не обнаружено. Проверка аналитической чувствительности показала, что стабильный специфичный сигнал ПЦР-РВ наблюдался при разведении контрольной плазмиды до 25 копий на реакцию. Работоспособность полученного набора реагентов была подтверждена тестированием на пяти приборах для ПЦР-РВ разных производителей, что дает возможность рекомендовать его для проведения диагностических и скрининговых исследований. Праймеры для секвенирования seqX.o.all были подобраны на последовательность кластера генов *hrp*, а именно на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Hrp1. Секвенирование выбранного участка позволяет эффективно дифференцировать бактерии вида *X. oryzae*.

Ключевые слова: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; *Xanthomonas*; полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ; бактериальная полосатость риса; специфичность; чувствительность; видовая диагностика.

Для цитирования: Королева М.А., Блинова С.А., Шварцев А.А., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. Молекулярно-генетическое выявление и дифференциация возбудителей бактериальной полосатости листьев риса *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):544-552. DOI 10.18699/VJGB-22-66

Molecular genetic detection and differentiation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, bacterial leaf streak agents of rice

M.L. Koroleva¹, S.A. Blinova^{1, 2}✉, A.A. Shvartsev¹, V.E. Kurochkin³, Ya.I. Alekseev^{1, 3}

¹ Limited Liability Company "Syntol", Moscow, Russia

² All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

³ Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Science, St. Petersburg, Russia

✉ sofyablinova@yandex.ru

Abstract. The genus *Xanthomonas* comprises phytopathogenic bacteria which infect about 400 host species, including a wide variety of economically important plants. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al., 1957) Swings et al., 1990 is the causal agent of bacterial leaf streak (BLS) being one of the most destructive bacterial diseases of rice. BLS symptoms are very similar to those of bacterial blight caused by closely related *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

X. o. pv. oryzae and *X. o. pv. oryzicola* and often occur in rice fields simultaneously, so separate leaves may show symptoms of both diseases. The quarantine status and high severity of the pathogen require a highly efficient, fast and precise diagnostic method. We have developed an assay for *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* detection using real-time polymerase chain reaction (qPCR) and PCR amplicon sequencing. The DNA samples of *X. o. pv. oryzae* and *X. o. pv. oryzicola* were obtained from the collection of CIRM-CFBR (France). To evaluate the analytical sensitivity of the assay, a vector construct based on the pAL2T plasmid was created through the insertion of *X. o. pv. oryzicola* target fragment (290 bp). Primers and a probe for qPCR were selected for the *hpa1* gene site. They allowed identifying all the strains the sequences of which had been loaded in the GenBank NCBI Nucleotide database before November 11, 2021. The SeqX.o.all sequencing primers were selected for the *hrp* gene cluster sequence, namely for the nucleotide sequence encoding the Hpa1 protein, the sequencing of which allows for efficient differentiation of *X. oryzae* species. The analytical specificity of the system was tested using the DNAs of 53 closely related and accompanying microorganisms and comprised 100 % with no false-positive or false-negative results registered. The system's analytical sensitivity was not less than 25 copies per PCR reaction. Its efficacy has been confirmed using five different qPCR detection systems from different manufacturers, so it can be recommended for diagnostic and screening studies.

Key words: *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*; *Xanthomonas*; polymerase chain reaction; qPCR; bacterial leaf streak; specificity; sensitivity; species diagnostics.

For citation: Koroleva M.L., Blinova S.A., Shvartsev A.A., Kurochkin V.E., Alekseev Ya.I. Molecular genetic detection and differentiation of *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*, bacterial leaf streak agents of rice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):544-552. DOI 10.18699/VJGB-22-66

Введение

Бактерии рода *Xanthomonas* Dowson, 1939 широко распространены во всем мире и могут поражать не менее 400 видов растений, в том числе большой спектр экономически важных сельскохозяйственных культур (Bogdanove et al., 2011; Ryan et al., 2011; Fang et al., 2019). На сегодняшний день подробно описано 27 видов рода *Xanthomonas*, многие из которых отличаются высокой степенью вирулентности и специфичности к определенным видам растений (Leyns et al., 1984; Ryan et al., 2011; An et al., 2020). Одно из самых разрушительных заболеваний риса – бактериальная полосатость листьев (bacterial leaf streak, BLS), вызываемая бактериями вида *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* (Fang et al., 1957), Swings et al., 1990 (Soto-Suárez et al., 2010).

Заражение бактериальной полосатостью листьев приводит к потере урожая от 8 до 32 %, что является серьезной проблемой, особенно для стран, возделывающих рис (Liu et al., 2014; Jiang et al., 2020). Убытки, вызванные этим заболеванием, могут поставить под угрозу глобальную продовольственную безопасность (Tang et al., 2000; Lang et al., 2014). Патоген *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* включен в список I карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории Евразийского экономического союза, а также в перечень A1 Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) вредных организмов, которые ЕОКЗР рекомендует регулировать в качестве карантинных¹. Принято считать, что бактериальная полосатость листьев риса впервые обнаружена на Филиппинах в 1918 г., однако бактерия, вызывающая данное заболевание, была идентифицирована только в 1957 г. в Китае (Nino-Liu et al., 2006). В настоящее время область распространения заболевания ограничивается тропической и субтропической Азией, северной частью Австралии, а также частью западной Африки (EPPO, 2007; Xie et al., 2014; Jiang et al., 2020). На сегодняшний день на территории Российской Федерации

X. o. pv. oryzicola отсутствует, однако ранее были зафиксированы² случаи заражения на Юге и Дальнем Востоке (EPPO, 2007, 2018). Согласно данным службы отчетности ЕОКЗР (EPPO Reporting Service), уже к 1994 г. в России не было случаев заражения данной бактерией³.

Основным растением-хозяином *X. o. pv. oryzicola* является рис (*Oryza sativa* L., 1753), кроме того, бактерии поражают некоторые злаковые сорные растения и незначительное число других культивируемых злаков *Poaceae*: *Leersia* spp., *Leptochloa* spp., *Oryza* spp., *Paspalum scrobiculatum*, *Zizania*, *Zoysia* spp. (Ou, 1985; Saddler, Bradbury, 2005; EPPO, 2007). Основные пути распространения возбудителя заболевания – зараженный семенной материал, а также через механические повреждения. Помимо этого, перенос на небольшие расстояния происходит с ветром, дождем или водой для орошения, а также за счет контакта с зараженным растительным материалом (Mew et al., 1993).

Бактерии вида *X. o. pv. oryzicola* размножаются в субстоматальной полости, проникая в лист в основном через устьица, и поражают межклеточное пространство паренхимы, однако они не попадают в ксилему, их распространение ограничено апопластом ткани мезофилла (Nino-Liu et al., 2006; Triplett et al., 2011; Jacques et al., 2016). Ранний этап заражения характеризуется наличием небольших водянистых межжилковых штрихов, по мере развития симптомов на поверхности листьев может появиться бактериальный экссудат (Mew et al., 1993). Жилки действуют как барьеры для прохождения патогена, пораженные участки удлиняются, распространяясь по всей длине листа, и со временем могут сливаться. При сильном заражении симптомы бактериальной полосатости риса трудно отличимы от бактериального ожога, вызываемого близкородственным карантинным видом *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*; также визуальную идентификацию затрудняют благоприятные условия внешней среды, способ-

¹ EPPO for the EU under Contract 90/399003. Data Sheets on Quarantine Pests. https://gd.eppo.int/download/doc/530_ds_XANTOR_en [Дата обращения: 23.11.2021].

² Cabi Invasive Species Compendium. Datasheet *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* (bacterial leaf streak of rice). <https://www.cabi.org/isc/> [Дата обращения: 23.11.2021].

³ EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int> [Дата обращения: 23.11.2021].

ствующие развитию симптомов, и степень устойчивости сортов растений (Swings et al., 1990; Poulin et al., 2014). Оба варианта могут встречаться на рисовых полях одновременно, а на некоторых растениях обнаруживаются симптомы обоих заболеваний (Mew et al., 1993; Nino-Liu et al., 2006).

Цель настоящего исследования – разработка и апробация системы диагностики для специфического выявления фитопатогена *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, вызывающего заболевание бактериальной полосатости листьев риса, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также ПЦР с последующим секвенированием ампликонов.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии и ООО «Синтол». В качестве положительных контролей прохождения специфичной реакции использовали образцы ДНК *X. o. pv. oryzae* (2532 – типовой штамм из Индии) и *X. o. pv. oryzicola* (2286 – малайзийский патотип, на него получена черновая сборка полного генома) (Wilkins et al., 2015) из коллекции CIRM-CFBP (Франция). Географическое распространение *X. o. pv. oryzae* приурочено к странам Азии, Африки и Северной Америки, в то время как *X. o. pv. oryzicola* распространен только в Азии и Африке. При выборе целевых штаммов опирались на статистику импорта риса в Россию, по данным базы таможенной статистики, ключевой поставщик риса – Индия (31.7 % от общего импорта на 2018 г.), также лидирующие позиции занимают Таиланд, Пакистан и Казахстан⁴.

При дизайне олигонуклеотидов для качественного определения наличия ДНК *X. o. pv. oryzicola* использовали участок гена *hpaI* (Universal Protein Resource (UniProt) <https://www.uniprot.org/> [Дата обращения: 23.11.2021]). Как и многие другие грамотрицательные патогенные бактерии, *X. o. pv. oryzicola* обладает системой секреции III типа (type three secretion system, T3SS), отвечающей за инфицирование и доставку эффекторных белков в клетки растения-хозяина (Zhu et al., 2000; Furutani et al., 2003; Li et al., 2011). Система T3SS и секретлируемые ею компоненты связаны с запуском гиперчувствительного ответа (hypersensitive response, HR) у резистентных растений и растений, не являющихся основными хозяевами данного патогена. Она кодируется локусом гена гиперчувствительности и патогенности – *hrp* (Cho et al., 2008; Fan et al., 2017). Основной оперон состоит из более чем 20 генов на нескольких транскрипционных единицах, которые содержат гены *hrp*, *hrc* и *hpa* (Zou et al., 2006; Cho et al., 2008). Синтез олигонуклеотидов проведен и расходные материалы предоставлены компанией ООО «Синтол» (Москва, Россия).

При постановке классической ПЦР и ПЦР в режиме реального времени использовали реакционный буфер В-009 (ООО «Синтол») со следующими концентрациями компонентов: 3 мМ MgCl₂, 0.25 мМ dNTP и 2.5 е. а. по-

лимеразы с ингибирующими активностью фермента анти-телами (ООО «Синтол»). При дизайне олигонуклеотидов учитывали параметры: средняя температура отжига: 60–62 °С для праймеров и 64–67 °С – для зонда, наличие на 3'-GC-clamp.

Многopараметрический анализ свойств подобранных праймеров проверяли при помощи онлайн-приложений Thermofisher Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com>), Promega Biomath Calculator – Tm for Oligos Calculator (<https://worldwide.promega.com>), Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu>). В флуоресцентно-меченом зонде для ПЦР-РВ использовали краситель FAM, присоединенный к 5'-концу зонда. Гасителем флуоресценции послужил краситель RTQ-1, присоединенный к 3'-концу зонда. Концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 800 нМ, зонда – 400 нМ. Повторяемость и воспроизводимость результатов ПЦР-РВ оценивали при проведении реакций на следующих приборах: АНК-М (ИАП РАН, Россия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), CFX-96 (Bio-Rad, США), DTprime 5 («ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene 6000 (Qiagen, США). За положительный результат принимали образцы, уровень сигнала флуоресценции которых превышал пороговую линию (10 % от разницы модулей самого низкого и самого высокого сигнала).

Для установления аналитической чувствительности набора реагентов была создана конструкция на основе вектора pAL2-T («Евроген», Россия) с целевой вставкой *X. oryzae* pv. *oryzicola* размером 290 п. н. Лигирование проводили после очистки продукта ПЦР набором для выделения ДНК из реакционных смесей ColGen (ООО «Синтол»). При создании векторной конструкции использовали T4 ДНК-лигазный буфер (Thermo Fisher Scientific), фермент – T4 ДНК-лигаза (Thermo Fisher Scientific). Встраивание плазмидной ДНК в клетки бактерии *Escherichia coli* (Migula 1895) осуществляли химическим методом (тепловой шок). Наличие вектора проверяли методом ПЦР-колонии с использованием стандартных праймеров M13, с последующей визуализацией в 1.5 % агарозном геле. Выделение плазмидной ДНК осуществляли при помощи набора реагентов PlasGen (ООО «Синтол»). Полученная кольцевая плаزمиды была обработана рестриктазой *NotI* (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию плазмиды измеряли на флуориметре Quantus (Promega Corporation, США). Для определения аналитической чувствительности разрабатываемого набора реагентов проводили ПЦР-РВ с серией разведений плазмиды с известной концентрацией в дву- и четырехкратной повторности. Аналитическую специфичность разработанной системы праймеров и зондов проверяли на ДНК 53 близкородственных и сопутствующих организмов (Аляпкина и др., 2018).

Биоинформатический анализ и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения UGENE («Унипро», Россия) и AliView (Швеция).

Для секвенирования ДНК *X. o. pv. oryzicola* была сконструирована пара праймеров seqX.o.all_F 5'-TCCTTGAACACACAATTCGGCGG-3' и seqX.o.all_R 5'-TGGAGAATCTCTCCGACGATA-3'. Температурный режим

⁴ Экспертно-аналитический центр агробизнеса. <https://ab-centre.ru/articles/analiz-importa-risa-v-rossiyu-v-2001-2019-gg->

Таблица 1. Последовательности праймеров и зонда, участок гена *hpa1* бактерии *X. o. pv. oryzae* и соответствующая им программа амплификации

| Название | Последовательность | Программа амплификации |
|-------------------|----------------------------------------------|------------------------|
| Sva3X.o.col.a_F | F 5'-ATTCGAGCCAGGGCRGCAATG-3' | 5 мин при 95 °С |
| Sva3X.o.col.a_R | R 5'-ACCAAAGTCGCCCGCTGCT-3' | 15 с при 95 °С |
| Sva3X.o.col.a_FAM | Pb 5'-(FAM) AATCAGCAGGCCGGAAGGAGAA (RTQ1)-3' | 40 с при 60 °С |
| | | 50 циклов |

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; Pb – зонд.

программы амплификации для проведения классической ПЦР: первичная денатурация – 5 мин при 95 °С; циклическая – 15 с при 95 °С; отжиг – 40 с при 60 °С; циклическая элонгация – 30 с при 72 °С; количество циклов – 36; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С. Секвенирование ДНК выполняли на генетическом анализаторе Нанофор 05 (ИАП РАН).

Результаты и обсуждение

Поиск последовательностей в GenBank NCBI выявил 208 нуклеотидных последовательностей рода *Xanthomonas*, из них 20 штаммов *X. o. pv. oryzae*. При анализе выравнивания последовательностей в AliView были подобраны олигонуклеотиды для ПЦР-РВ на консервативные для *X. o. pv. oryzae* участки целевого гена *hpa1* таким образом, чтобы места посадки праймеров были строго специфичны и позволяли обнаруживать все штаммы целевого объекта, последовательности ДНК которых были загружены в базу данных GenBank NCBI⁵ на 11.11.2021. В табл. 1 представлены последовательности праймеров и зондов для диагностики бактерии *X. o. pv. oryzae*.

Аналитическую специфичность набора реагентов проверяли на 53 образцах ДНК близкородственных и сопутствующих объектов, полученных из различных коллекций, в том числе 9 образцов ДНК бактерий видов рода *Xanthomonas*.

Образцы получены из коллекций:

- ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») и подразделений Россельхознадзора: *Ralstonia solanacearum* 0023, 0027, 0029, 0030, *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 0140, 0028, 0244, *C. m.* subsp. *michiganensis* 0240, 0241, 0242, 0243, *X. o. pv. oryzae* 0227, *X. phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 0141, 0168, *P. atrosepticum* 0142, *Dickeya solani*, *Xylophilus ampelinus* 0124, *Pantoea stewartii*, *P. st.* subsp. *indologenes*, *P. agglomerance*, *Candidatus Liberibacter*, *Acidovorax citrullii*;
- CIRN-CFBP (Франция): *P. st.* subsp. *indologenes* CFBP 3614, *C. m.* subsp. *nebraskensis* CFBP 2405, CFBP 3491, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* CFBP 3418, *C. fl.* pv. *poinsettiae* CFBP 2403, *C. fl.* pv. *oortii* CFBP 1384, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP 2534;
- Института Лейбница DSMZ – Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур GmbH (Германия): *X. gardneri* DSM 19127, *X. perforans* DSM 18975, *P. wasabiae* DSM 18074, *X. euvesicatoria* DSM 19128,

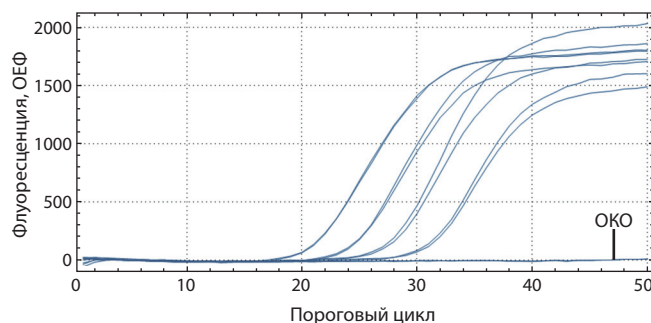


Рис. 1. Результаты ПЦР-РВ, серия разведений плазмиды с целевой вставкой ДНК *X. o. pv. oryzae* (0376), канал детекции FAM.

Интерфейс – CFX-96 (Bio-Rad); ОКО – отрицательный контрольный образец.

X. vesicatoria DSM 22252, *X. translucens* pv. *translucens* DSM 18974, *P. cacticida* DSM 21821, *P. betavascolorum* DSM 18076, *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* DSM 18013, *D. d.* subsp. *dadantii* DSM 18020, *D. paradisiaca* DSM 18069, *D. chrysanthemi* DSM 4610, *D. zea* DSM 18068, *P. c.* subsp. *odoriferum* DSM 22556;

- внутренней коллекции ООО «Сингента» (Россия): *C. m.* subsp. *michiganensis*, *Agrobacteria* spp., *X. campestris* pv. *campestris*, *X. translucens* pv. *translucens*;
- Всероссийской коллекции микроорганизмов (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН г. Пущино, Московская область): *C. m.* subsp. *insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. m.* subsp. *nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *Pseudomonas savastanoi* ВКМ В-1546;
- Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИ генетика, Москва): *C. albidum* ВКПМ В-1834.

Аналитическая специфичность праймеров и зонда в этой выборке близкородственных и сопутствующих организмов составила 100 %. Все образцы, содержащие ДНК *X. o. pv. oryzae*, дали положительный результат, что было подтверждено секвенированием. Ложноположительных результатов не выявлено, в том числе при внесении ДНК бактерии *X. o. pv. oryzae* – близкородственного патоварианта целевого объекта.

При проверке аналитической чувствительности исходная концентрация плазмиды с целевой вставкой *X. o. pv. oryzae* была 13 нг/мкл, что составило 3×10^9 копий/мкл. Для оценки аналитической чувствительности разрабатываемого набора проведена ПЦР-РВ с серией из семи разведений по следующей схеме: четыре 10-кратных разведения с соблюдением двойной повторности, начиная с

⁵ National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Дата обращения: 23.11.2021].

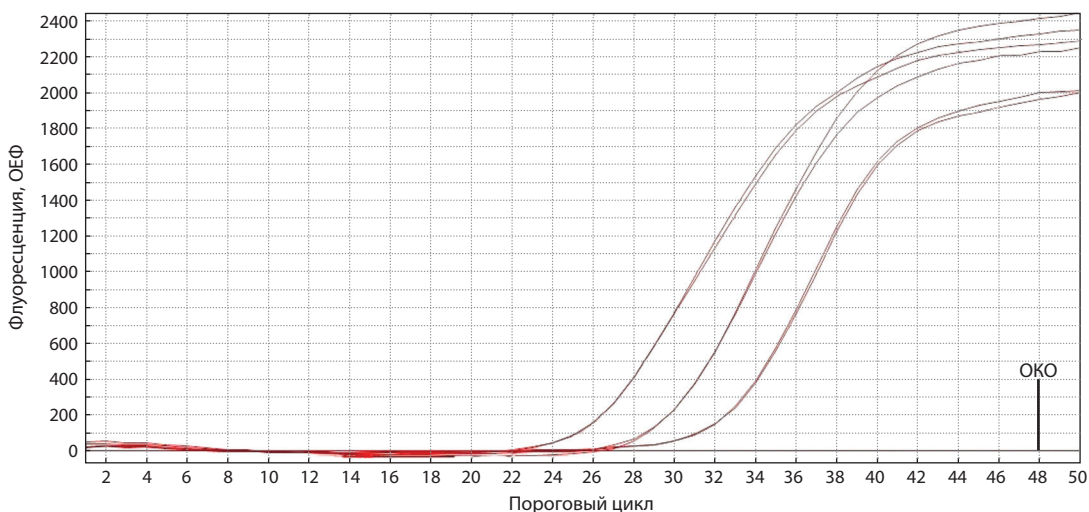


Рис. 2. Результаты ПЦР-РВ, серия разведений ДНК *X. o. pv. oryzae* (0376), канал детекции FAM. Интерфейс – АНК-М (ИАП РАН); ОКО – отрицательный контрольный образец.

Таблица 2. Результаты ПЦР-РВ на приборах пяти производителей при использовании набора реагентов для обнаружения участка гена *hpa1* бактерии *X. o. pv. oryzae*

| Образцы, 10-кратное разведение | Пороговый цикл, Ct | | | | |
|----------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | АНК-М (ИАП РАН) | QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) | CFX-96 (Bio-Rad) | DТprime 5 («ДНК-Технология») | Rotor-Gene 6000 (Qiagen) |
| 10 ⁻³ | 25.84 | 25.52 | 26.43 | 25.40 | 25.54 |
| 10 ⁻³ | 25.99 | 25.37 | 26.43 | 25.40 | 25.45 |
| 10 ⁻⁴ | 29.36 | 29.32 | 29.48 | 29.10 | 29.02 |
| 10 ⁻⁴ | 29.53 | 29.33 | 29.43 | 29.00 | 28.95 |
| 10 ⁻⁵ | 32.27 | 32.68 | 32.56 | 32.20 | 32.46 |
| 10 ⁻⁵ | 32.35 | 32.88 | 32.29 | 31.80 | 32.26 |
| Отрицательный контроль | Отсутствует | Неопределенный | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует |
| Отрицательный контроль | Отсутствует | Неопределенный | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует |
| Наклон кинетической кривой, А | 3.20 | 3.67 | 3.00 | 3.30 | 3.43 |
| Коэффициент корреляции, R ² | 0.998 | 0.999 | 0.998 | 0.997 | 1.000 |
| Значение эффективности, E % | 105 | 87 | 116 | 101 | 96 |

5-й серии разведений – в 4-кратной повторности (рис. 1). Концентрация плазмиды после первого разведения была 3×10^5 копий/мкл. Начиная с 150 копий плазмиды в реакцию все последующие серии разведений дополнительно титровали по схеме: 2×10^n , 5×10^n , 7×10^n в 4-кратной повторности. Для серии из семи 10-кратных разведений наклон кинетической кривой составил $A = -2.671$, коэффициент корреляции $R^2 = 0.989$. Стабильный специфичный сигнал ПЦР-РВ наблюдался при разведении до 25 копий плазмиды в реакции. Анализ чувствительности системы по 10-кратному разведению ДНК бактерии *X. o. pv. oryzae* показал более низкую чувствительность – до 43 копий ДНК на реакцию.

Разработанный набор реагентов был апробирован на пяти приборах для ПЦР-РВ зарубежного и российского производства (рис. 2, табл. 2). При проведении ПЦР-РВ

в качестве матрицы использовали серию 10-кратных разведений ДНК патогена. Наклон кинетической кривой составил $A = 3.00-3.67$, коэффициент корреляции $R^2 = 0.997-1.000$, эффективность ПЦР-РВ $E = 87-116$ %. Разница в пороговых значениях составила ± 1 цикл, что обусловлено конструктивными особенностями каждого прибора и алгоритмами расчета порогового цикла.

Для проверки пары праймеров seqX.o.all_F и seqX.o.all_R, позволяющих провести видовую диагностику методом секвенирования по Сенгеру, проведена классическая ПЦР, где в качестве матрицы использовались ДНК *X. o. pv. oryzae* (2532) и *X. o. pv. oryzae* (2286), а также смесь ДНК бактерий в соотношении 1:1 в качестве имитации совместного заражения.

Показательным участком, характеризующимся большим количеством нуклеотидных замен, при дифферен-

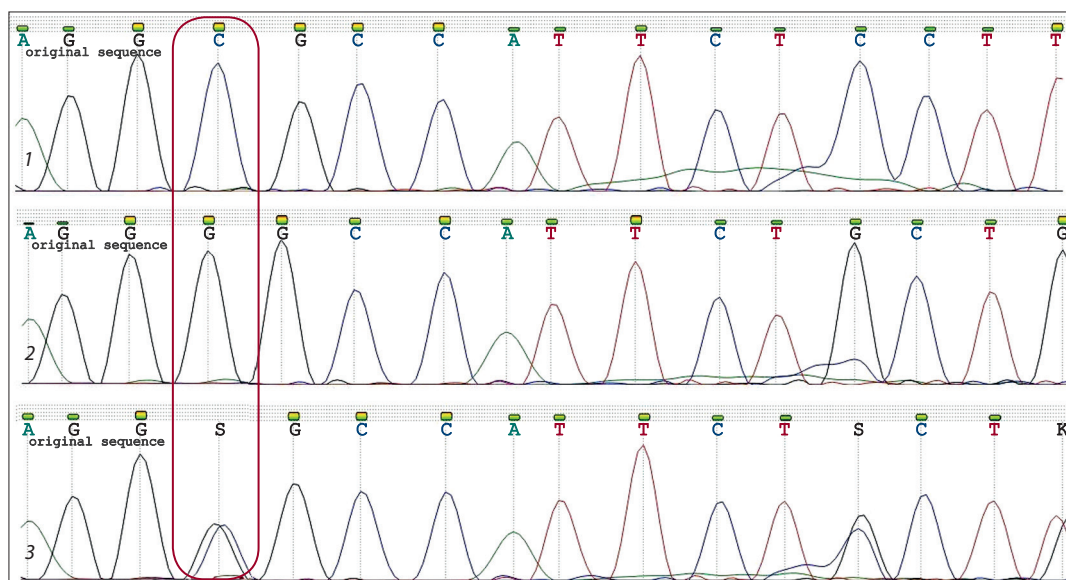


Рис. 3. Фрагменты последовательностей ДНК *X. oryzae* pv. *oryzicola* (1), *X. oryzae* pv. *oryzae* (2), смесь ДНК двух патовариантов (3), полученные в результате секвенирования с помощью пары праймеров seqX.o.all. Рамкой отмечено наложение пиков. Программное обеспечение – UGENE («Унипро»), версия 38.1.

циации двух близкородственных видов, является участок 2288483–2288778 п. н. относительно референсной последовательности CP050113.1 из баз данных NCBI GenBank. Сравнение нуклеотидных последовательностей *X. o.* pv. *oryzae*, *X. o.* pv. *oryzicola* и их смеси представлено на рис. 3, где наблюдается наложение пиков C/G, в отличие от результатов секвенирования каждого возбудителя отдельно: *X. o.* pv. *oryzae* (нуклеотид G), *X. o.* pv. *oryzicola* (нуклеотид C). Биоинформатический анализ полученных последовательностей подтверждает наличие ДНК как *X. o.* pv. *oryzae* и *X. o.* pv. *oryzicola*, так и сразу двух названных ранее организмов.

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей при анализе сиквенсов смеси ДНК *X. o.* pv. *oryzae* и *X. o.* pv. *oryzicola* показало 19 нуклеотидных замен относительно референсного генома CP050113.1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain K2 chromosome, complete genome (см. табл. 3).

Помимо указанных в табл. 3 нуклеотидных замен, обнаружены трехнуклеотидная инсерция TGC у *X. o.* pv. *oryzicola* в положении 2288667 п. н. и трехнуклеотидная делеция *X. o.* pv. *oryzicola* относительно референсного генома *X. o.* pv. *oryzae*, положение 2288702 п. н. (рис. 4).

Специфичная посадка на *X. oryzae* разработанных праймеров для секвенирования позволяет выполнять анализ последовательностей патовариантов, определять совместное заражение двумя близкородственными бактериями, а также проводить их видовую идентификацию.

На основе полученных нуклеотидных последовательностей удалось подтвердить принадлежность культур к коллекционным штаммам относительно результатов из геномной базы данных. Выравнивание последовательностей базы данных позволяет выявить некоторое внутривидовое генетическое разнообразие штаммов *X. o.* pv. *oryzae*, место сбора которых – страны Африки. Генетическое разнооб-

Таблица 3. Выявляемые нуклеотидные замены в амплифицированном фрагменте при использовании праймеров для секвенирования seqX.o.all

| № п/п | Положение замены относительно референсного генома CP050113.1, п. н. | Тип замены | |
|-------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | | <i>X. o.</i> pv. <i>oryzae</i> | <i>X. o.</i> pv. <i>oryzicola</i> |
| 1 | 2288729 | G | C |
| 2 | 2288720 | G | C |
| 3 | 2288717 | T | G |
| 4 | 2288677 | A | C |
| 5 | 2288656 | C | T |
| 6 | 2288640 | C | T |
| 7 | 2288636 | A | G |
| 8 | 2288622 | G | T |
| 9 | 2288621 | A | G |
| 10 | 2288578 | G | A |
| 11 | 2288571 | T | C |
| 12 | 2288566 | G | A |
| 13 | 2288565 | C | T |
| 14 | 2288564 | C | T |
| 15 | 2288563 | C | G |
| 16 | 2288562 | T | C |
| 17 | 2288561 | G | T |
| 18 | 2288559 | T | C |
| 19 | 2288558 | T | C |

CP050113.1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain K2 chromosome. complete genome
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* + *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* + *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

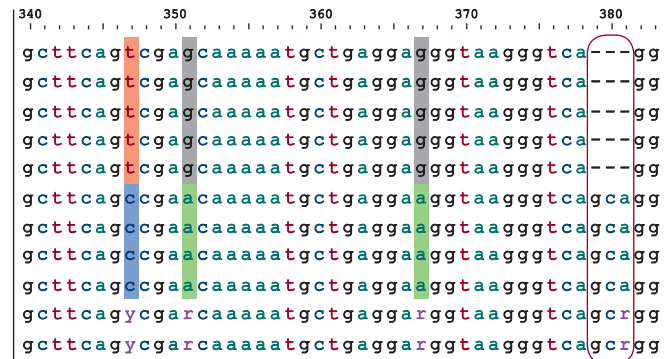


Рис. 4. Выравнивание последовательностей ДНК *X. o. pv. oryzae* и *X. o. pv. oryzicola* и смеси ДНК двух патовариантов, полученных в результате секвенирования с помощью праймеров seqX.o.all.

Рамкой отмечено место делеции. Выравнивания получены в программе AliView (Швеция), версия 1.27.

разии штаммов *X. o. pv. oryzicola* невелико, одна SNP на исследуемый участок кластера генов *hpaI*. Несмотря на генетический полиморфизм популяций бактериальных возбудителей болезней риса, сконструированные праймеры как для проведения секвенирования, так и для системы ПЦР-РВ позволяют определить все изоляты, вне зависимости от точки сбора материала, депонированные в базу данных Nucleotide NCBI.

Большинство процедур, описанных для обнаружения *X. o. pv. oryzae*, также применимо для *X. o. pv. oryzicola*. Идентификация бактерий группы *X. oryzae* начинается с отбора образцов с выраженными симптомами заражения и последующего высева на питательную среду. Этот метод не лишен недостатков: колонии обеих бактерий медленно растут на изолирующих средах; проблемой является и наличие доминирующих видов бактерий и микроорганизмов-антагонистов, что мешает наблюдению за колониями целевых бактерий. Разделение двух патовариантов *X. oryzae* возможно по фенотипическим признакам, симптомам индукции, серологическим тестам, электрофорезу белков в полиакриламидном геле (фингерпринтинг), фаготипированию (Vera Cruz et al., 1984; Benedict et al., 1989; EPPO, 2007).

Исследования на основе метода полиморфизма длин рестриционных фрагментов позволяют получить более полное представление о генетическом разнообразии изолятов и их происхождении (Gonzalez et al., 2007). Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков, включая чувствительность, специфичность и трудоемкость, неприменимую в диагностических, поточных лабораториях, поэтому для идентификации бактерий рода *X. oryzae* широкое применение нашел метод ПЦР (Sakthivel et al., 2001).

В настоящее время все разнообразие диагностических систем предназначено для выявления вида *X. oryzae* в целом, и дальнейшее разделение на патоварианты происходит при помощи классической ПЦР с видоспецифичными праймерами на *X. o. pv. oryzae*, рекомендованными ЕОКЗР и ФГБУ «Всероссийский центр карантин растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), и с последующим секвенированием. Протоколом ЕОКЗР для идентификации *X. o. pv. oryzae* и *X. o. pv. oryzicola* рекомендуется применение праймеров ТХТ/ТХТ-4R (Sakthivel et al., 2001; EPPO,

2007; Lang et al., 2010). Для обнаружения ДНК *X. oryzae* методом ПЦР-РВ предложены праймеры, разработанные в ФГБУ «ВНИИКР» X.o.F/X.o.R, и зонд X.or.P (Егорова и др., 2014). Для разделения двух патовариантов возможно проведение ПЦР-РВ с использованием праймеров PF/PR и TaqMan-зонда, они предназначены исключительно для выявления *X. o. pv. oryzae* (Zhao et al., 2007).

В 2021 г. ФГБУ «ВНИИКР» проведены межлабораторные сравнительные испытания в области карантина растений по обнаружению бактериальной полосатости риса (21X00). В этом раунде участвовали 16 референтных центров и межобластных ветеринарных лабораторий, которые успешно прошли испытание по выявлению данного возбудителя с помощью разработанного нами набора реагентов для ПЦР-РВ “*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*-РВ”.

Заключение

Система диагностики дает возможность выявлять возбудителя бактериальной полосатости листьев риса. Система представляет собой набор реагентов для полимеразной цепной реакции в реальном времени “*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*-РВ”, а также праймеры seqX.o.all_F/R для классической ПЦР с последующим секвенированием, выявляющие оба патоварианта *X. oryzae* как при одиночном, так и при совместном заражении. Система диагностики дает возможность проводить полноценный скрининг подкарантинной продукции подтверждая полученный методом ПЦР-РВ результат секвенированием ДНК. Набор реагентов для ПЦР-РВ успешно апробирован на пяти приборах для ПЦР-РВ разных производителей, что позволяет рекомендовать данную тест-систему для диагностических и скрининговых анализов в исследовательских и диагностических лабораториях.

Список литературы / References

- Аляпкина Ю.С., Моисеева М.В., Ксенофонтова О.В., Алексеев Я.И. Разработка и валидация набора для мультиплексного ПЦР-РВ анализа регуляторных элементов (промотора SsuAra и терминатора E9) для обнаружения генетически модифицированных (ГМ) линий риса, сои, картофеля и других растений. *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2018;3:5-16. DOI 10.26897/0021-342X-2018-3-5-16.
 [Alyapkina Yu.S., Moiseeva M.V., Ksenofontova O.V., Alekseev Ya.I. Development and validation of multiplex real-time PCR

- test system for analyzing regulator elements (SsuAra promoter and E9 terminator) to detect genetically-modified strains of rape, soybeans, potatoes, and other plants. *Izvestiya Timiryazevskoy Selsk Khozyajstvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2018;3:5-16. DOI 10.26897/0021-342X-2018-3-5-16. (in Russian)]
- Egorova M.S., Ignatov A.N., Mazurin E.S. Усовершенствование методов диагностики возбудителя бактериального ожога риса на основе ПЦР. *Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Агрономия и животноводство*. 2014;2:22-27. DOI 10.22363/2312-797X-2014-2-22-27.
- [Egorova M.S., Ignatov A.N., Mazurin E.S. Improvement of PCR-based methods for detecting bacterial blight of rice. *Vestnik Rossijskogo Universiteta Druzhy Narodov. Seriya Agronomiya i Zhivotnovodstvo = RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2014; 2:22-27. DOI 10.22363/2312-797X-2014-2-22-27. (in Russian)]
- An S.Q., Potnis N., Dow M., Vorhölter F.J., He Y.Q., Becker A., Teper D., Li Y., Wang N., Bleris L., Tang J.L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2020;44(1):1-32. DOI 10.1093/femsre/fuz024.
- Benedict A.A., Alvarez A.M., Berestecky J., Imanaka W., Mizumoto C.Y., Pollard L.W., Mew T.W., Gonzalez C.F. Pathovar-specific monoclonal antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*. *Phytopathology*. 1989; 79(3):322-328. DOI 10.1094/Phyto-79-322.
- Bogdanove A.J., Koebnik R., Lu H., Furutani A., Angiuoli S.V., Patil P.B., ... Brendel V.P., Rabinowicz P.D., Leach J.E., White F.F., Salzberg S.L. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J. Bacteriol.* 2011;193(19):5450-5464. DOI 10.1128/JB.05262-11.
- Cho H.J., Park Y.J., Noh T.H., Kim Y.T., Kim J.G., Song E.S., Lee D.H., Lee B.M. Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. *Microb. Pathog.* 2008;44(6):473-483. DOI 10.1016/j.micpath.2007.12.002.
- EPPO. *Xanthomonas oryzae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2007; 37(3):543-553. DOI 10.1111/j.1365-2338.2007.01162.x.
- EPPO. Corrigendum. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2018;48(2):318. DOI 10.1111/epp.12474.
- Fan S., Tian F., Li J., Hutchins W., Chen H., Yang F., Yuan X., Cui Z., Yang C.H., He C. Identification of phenolic compounds that suppress the virulence of *Xanthomonas oryzae* on rice via the type III secretion system. *Mol. Plant. Pathol.* 2017;18(4):555-568. DOI 10.1111/mpp.12415.
- Fang Y., Wang H., Liu X., Xin D., Rao Y., Zhu B. Transcriptome analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* exposed to H₂O₂ reveals horizontal gene transfer contributes to its oxidative stress response. *PLoS One*. 2019;14(10):e0218844. DOI 10.1371/journal.pone.0218844.
- Furutani A., Tsuge S., Oku T., Tsuno K., Inoue Y., Ochiai H., Kaku H., Kubo Y. HpaI secretion via type III secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 2003;69(4):271-275. DOI 10.1007/s10327-003-0042-2.
- Gonzalez C., Szurek B., Manceau C., Mathieu T., Séré Y., Verdier V. Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007;20(5):534-546. DOI 10.1094/MPMI-20-5-0534.
- Jacques M.A., Arlat M., Boulanger A., Boureau T., Carrère S., Cesbron S., Chen N.W., Cociancich S., Darrasse A., Denancé N., Fischer-Le Saux M., Gagnevin L., Koebnik R., Lauber E., Noël L.D., Pieretti I., Portier P., Pruvost O., Rieux A., Robène I., Royer M., Szurek B., Verdier V., Vernière C. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016;54:163-187. DOI 10.1146/annurev-phyto-080615-100147.
- Jiang N., Yan J., Liang Y., Shi Y., He Z., Wu Y., Zeng Q., Liu X., Peng J. Resistance genes and their interactions with bacterial blight/leaf streak pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in rice (*Oryza sativa* L.) – an updated review. *Rice*. 2020;13(1):3. DOI 10.1186/s12284-019-0358-y.
- Lang J.M., Hamilton J.P., Diaz M.G.Q., Van Sluys M.A., Burgos M.R.G., Vera Cruz C.M., Buell C.R., Tisserat N.A., Leach J.E. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Dis.* 2010;94(3):311-319. DOI 10.1094/pdis-94-3-0311.
- Lang J.M., Langlois P., Nguyen M.H., Triplett L.R., Purdie L., Holton T.A., Djikeng A., Vera Cruz C.M., Verdier V., Leach J.E. Sensitive detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola* by loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80(15):4519-4530. DOI 10.1128/AEM.00274-14.
- Leyns F., De Cleene M., Swings J.G., De Ley J. The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.* 1984;50(3):308-356. DOI 10.1007/bf02862635.
- Li Y.R., Zou H.S., Che Y.Z., Cui Y.P., Guo W., Zou L.F., Chatterjee S., Biddle E.M., Yang C.H., Chen G.Y. A novel regulatory role of HrpD6 in regulating *hrp-hrc-hpa* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011;24(9):1086-1101. DOI 10.1094/MPMI-09-10-0205.
- Liu W., Liu J., Triplett L., Leach J.E., Wang G.L. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014;52:213-241. DOI 10.1146/annurev-phyto-102313-045926.
- Mew T.W., Alvarez A.M., Leach J.E., Swings J. Focus on bacterial blight of rice. *Plant Dis.* 1993;77:5-12. DOI 10.1094/PD-77-0005.
- Nino-Liu D.O., Ronald P.C., Bogdanove A.J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* 2006;7(5):303-324. DOI 10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x.
- Ou S.H. Rice Diseases. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985;96-101.
- Poulin L., Grygiel P., Magne M., Gagnevin L., Rodriguez-R L.M., Forero Serna N., Zhao S., El Rafii M., Dao S., Tekete C., Wonn I., Koita O., Pruvost O., Verdier V., Vernière C., Koebnik R. New multilocus variable-number tandem-repeat analysis tool for surveillance and local epidemiology of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;81(2):688-698. DOI 10.1128/aem.02768-14.
- Ryan R.P., Vorhölter F.J., Potnis N., Jones J.B., Van Sluys M.A., Bogdanove A.J., Dow J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9(5): 344-355. DOI 10.1038/nrmicro2558.
- Saddler G.S., Bradbury J.F. *Xanthomonadales ord. nov.* In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Boston: Springer, 2005;63-122. DOI 10.1007/0-387-28022-7_3.
- Sakthivel N., Mortensen C.N., Mathur S.B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001;56(3-4):435-441. DOI 10.1007/s002530100641.
- Soto-Suárez M., Gonzalez C., Piégu B., Tohme J., Verdier V. Genomic comparison between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, using suppression-subtractive hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010;308(1):16-23. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.01985.x.
- Swings J., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W., Kersters K. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990;40(3):309-311. DOI 10.1099/00207713-40-3-309.
- Tang D., Wu W., Li W., Lu H., Worland A.J. Mapping of QTLs conferring resistance to bacterial leaf streak in rice. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:286-291. DOI 10.1007/s001220051481.

- Triplett L.R., Hamilton J.P., Buell C.R., Tisserat N.A., Verdier V., Zink F., Leach J.E. Genomic analysis of *Xanthomonas oryzae* isolates from rice grown in the United States reveals substantial divergence from known *X. oryzae* pathovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(12):3930-3937. DOI 10.1128/AEM.00028-11.
- Vera Cruz C.M., Gossele F., Kersters K., Segers P., Van Den Mooter M., Swings J., De Ley J. Differentiation between *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* and the bacterial 'brown blotch' pathogen on rice by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams. *J. Gen. Microbiol.* 1984;130(11):2983-2999. DOI 10.1099/00221287-130-11-2983.
- Wilkins K.E., Booher N.J., Wang L., Bogdanove A.J. TAL effectors and activation of predicted host targets distinguish Asian from African strains of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* while strict conservation suggests universal importance of five TAL effectors. *Front. Plant Sci.* 2015;6:536. DOI 10.3389/fpls.2015.00536.
- Xie X., Chen Z., Cao J., Guan H., Lin D., Li C., Lan T., Duan Y., Mao D., Wu W. Toward the positional cloning of qBlsr5a, a QTL underlying resistance to bacterial leaf streak, using overlapping sub-CSSLs in rice. *PLoS One.* 2014;9(4):e95751. DOI 10.1371/journal.pone.0095751.
- Zhao W.J., Zhu S.F., Liao X.L., Chen H.Y., Tan T.W. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe. *Mol. Biotechnol.* 2007;35(2):119-127. DOI 10.1007/BF02686106.
- Zhu W., MaGbanua M.M., White F.F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 2000;182(7):1844-1853. DOI 10.1128/JB.182.7.1844-1853.2000.
- Zou L.F., Wang X.P., Xiang Y., Zhang B., Li Y.R., Xiao Y.L., Wang J.S., Walmsley A.R., Chen G.Y. Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(9):6212-6224. DOI 10.1128/AEM.00511-06.

ORCID ID

M.L. Koroleva orcid.org/0000-0001-8746-6249
S.A. Blinova orcid.org/0000-0001-6782-8353
A.A. Shvartsev orcid.org/0000-0002-2786-9860
V.E. Kurochkin orcid.org/0000-0001-8743-9507
Ya. I. Alekseev orcid.org/0000-0002-1696-7684

Благодарности. Авторы выражают благодарность организациям и институтам, предоставившим образцы ДНК для проведения исследования: ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), подразделениям Россельхознадзора по защите и карантину растений, Институту Лейбница DSMZ – Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Французской коллекции микроорганизмов CIRM-CFBP, ООО «Сингента», Всероссийской коллекции микроорганизмов, Институту биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.01.2022. После доработки 28.03.2022. Принята к публикации 11.05.2022.

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

Редкие генотипы *Wolbachia* в лабораторных линиях *Drosophila melanogaster*

А.С. Рябинин, О.Д. Шишкина, Ю.Ю. Илинский, Р.А. Быков 


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

Аннотация. Симбиотические бактерии рода *Wolbachia* широко распространены в популяциях *Drosophila melanogaster*. На основе полиморфизма перестроек генома разнообразие *Wolbachia* у *D. melanogaster* подразделяется на две клады: MEL (генотипы *wMel*, *wMel2*, *wMel3* и *wMel4*) и CS (*wMelCS* и *wMelCS2*). Генотип *wMel* доминирует в природных популяциях *D. melanogaster* и распространен по всему миру. Генотипы CS-клады представляют особый интерес, поскольку неизвестно, как они поддерживаются в популяциях *D. melanogaster*. При низкой частоте встречаемости они должны элиминироваться вследствие генетического дрейфа или вытесняться генотипом *wMel*, чего в действительности не происходит. Следовательно, эти генотипы поддерживаются отбором. Например, штамм *wMelPlus* (генотип *wMelCS*) способен увеличивать продолжительность жизни мух при повышенных температурах. Генотип *wMelCS* также увеличивает интенсивность дофаминавого метаболизма у дрозофил по сравнению с генотипами MEL-клады. В настоящей работе проведен поиск редких генотипов *Wolbachia wMelCS* и *wMelCS2*, а также новых генотипов в линиях *D. melanogaster* дикого типа и в отдельных мутантных линиях лабораторного фонда. Симбионт был выявлен во всех популяционных выборках у 200 из 385 линий дикого типа и у 83 из 170 мутантных. Разнообразие *Wolbachia* в линиях *D. melanogaster* дикого типа представлено генотипами *wMel*, *wMelCS* и *wMelCS2*. Более 90 % инфицированных линий несут *Wolbachia wMel* генотипа, 9 % – *wMelCS2*, и только в двух линиях обнаружен *wMelCS*. Новых генотипов *Wolbachia* не зафиксировано. Для генотипа *wMelCS2* отмечена наиболее северная точка распространения – Ижевск (Удмуртия). Впервые показано присутствие генотипа *wMelCS2* в линии *D. melanogaster* из популяции о. Сахалин, а в линии из популяции г. Нальчик – генотипа *wMelCS*. Сравнение генетического разнообразия *Wolbachia* между лабораторными линиями дикого типа и ранее полученными данными для мутантных лабораторных линий показало различие в частотах редких генотипов CS-группы, у мутантных линий их больше, что может быть связано с историей поддержания линий *Drosophila*.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; *Wolbachia*; генотипы; лабораторный фонд.

Для цитирования: Рябинин А.С., Шишкина О.Д., Илинский Ю.Ю., Быков Р.А. Редкие генотипы *Wolbachia* в лабораторных линиях *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):553-559. DOI 10.18699/VJGB-22-67

Rare *Wolbachia* genotypes in laboratory *Drosophila melanogaster* strains

A.S. Ryabinin, O.D. Shishkina, Yu.Yu. Ilinsky, R.A. Bykov 

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

Abstract. Symbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* are widespread in *Drosophila melanogaster* populations. Based on the polymorphism of the *Wolbachia* genome, the symbionts' diversity in *D. melanogaster* is presented by two groups: MEL (*wMel*, *wMel2*, *wMel3* and *wMel4*) and CS (*wMelCS* and *wMelCS2*). The *wMel* genotype is predominant in natural *D. melanogaster* populations and is distributed all over the world. The CS genotypes, on the other hand, are of particular interest because it is unclear how they are maintained in the fruit fly populations since they should have been eliminated from them due to their low frequency and genetic drift or been replaced by the *wMel* genotype. However, this is not what is really observed, which means these genotypes are supported by selection. It is known that the *wMelPlus* strain of the *wMelCS* genotype can increase the lifespan of infected flies at high temperatures. The same genotype also increases the intensity of dopamine metabolism in *Drosophila* compared to the MEL-group genotypes. In the present study, we searched for the rare *Wolbachia wMelCS* and *wMelCS2* genotypes, as well as for new genotypes in wild-type *D. melanogaster* strains and in several mutant laboratory strains. The symbiont was found in all populations, in 200 out of 385 wild-type strains and in 83 out of 170 mutant strains. *Wolbachia* diversity in *D. melanogaster* wild-type strains was represented by the *wMel*, *wMelCS* and *wMelCS2* genotypes. More than 90 % of the infected strains carried *wMel*; 9 %, *wMelCS2*; and only two strains were found to carry *wMelCS*. No new *Wolbachia* genotypes were found. The northernmost point reported for the *wMelCS2* genotype was Izhevsk city (Udmurtia, Russia). For the first time the *wMelCS2* genotype was detected in *D. melanogaster* from the Sakhalin Island, and

wMelCS, in the flies from Nalchik (the North Caucasus). A comparison of *Wolbachia* genetic diversity between the wild-type laboratory strains and previously obtained data on mutant laboratory strains demonstrated differences in the frequencies of rare CS genotypes, which were more prevalent in mutant strains, apparently due to the breeding history of these *Drosophila* strains.

Key words: *Drosophila melanogaster*; *Wolbachia*; genotypes; laboratory stock.

For citation: Ryabinin A.S., Shishkina O.D., Ilinsky Yu.Yu., Bykov R.A. Rare *Wolbachia* genotypes in laboratory *Drosophila melanogaster* strains. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6): 553-559. DOI 10.18699/VJGB-22-67

Введение

Симбиотические бактерии рода *Wolbachia* широко распространены в популяциях *Drosophila melanogaster* (Riegler et al., 2005; Richardson et al., 2012; Ilinsky, 2013; Bykov et al., 2019). Геномы *Wolbachia* у линий *D. melanogaster*, кроме небольшого количества точечных мутаций, различаются по ряду перестроек, которые легко могут быть идентифицированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим электрофоретическим анализом по протоколу M. Reigler с коллегами (2005). На основе этого полиморфизма выделяют две группы генотипов: MEL, включающую генотипы wMel, wMel2, wMel3 и wMel4, и CS – генотипы wMelCS и wMelCS2 (Riegler et al., 2005; Ilinsky, 2013). Одноименный со штаммом генотип wMel преобладает в популяциях *D. melanogaster*, остальные генотипы встречаются редко и/или локально (Riegler et al., 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Ilinsky, 2013; Bykov et al., 2019).

Генотип wMelCS широко распространен, однако частоты его встречаемости в популяциях *D. melanogaster* обычно не превышают 10 % (Riegler et al., 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Serga et al., 2014; Bykov et al., 2019). В популяциях *D. melanogaster* Восточной Европы, Центральной и Северной Азии и Западной Сибири обнаруживается генотип wMelCS2, частоты в отдельных выборках достигали 40 % (Riegler et al., 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Ilinsky, 2013; Bykov et al., 2019). В популяциях Южной и Юго-Восточной Азии описаны единичные случаи инфицированности мух *Wolbachia* генотипа wMel2 (Riegler et al., 2005; Bykov et al., 2019). Генотип wMel4 впервые выявлен на территории п-ва Синай, и данных по его распространенности в популяциях нет (Ilinsky, 2013), а wMel3 обнаружен только у одной лабораторной линии и, вероятно, в природе не встречается (Riegler et al., 2005).

Детальный геномный анализ *Wolbachia* у *D. melanogaster* подтвердил справедливость выделения групп MEL и CS, а также позволил разбить их на несколько клад (Richardson et al., 2012; Chrostek et al., 2013; Early, Clark, 2013; Ilinsky, 2013). Для наиболее распространенного генотипа wMel было описано четыре клады, I, II, III и V, для wMel2 – две, IV и VIII. Для CS-группы генотипов выделяют одну кладу (Richardson et al., 2012; Chrostek et al., 2013; Ilinsky, 2013). Анализ нуклеотидного полиморфизма полных геномов *Wolbachia* wMelCS и wMelCS2 позволил выявить четыре гаплотипа (Bykov et al., 2019). Один гаплотип распространен у линий *D. melanogaster* из природных популяций и у мутантных линий фонда, а остальные варианты были обнаружены только у небольшого числа мутантных линий, что свидетельствует о низком генетическом разнообразии генотипов CS-группы.

Для некоторых генотипов *Wolbachia* описано влияние на биологию *D. melanogaster*. Так, генотипы wMel клады V, преобладающий в популяциях *D. melanogaster* Палеарктики (Bykov et al., 2019), и wMelCS клады VI способны индуцировать слабую цитоплазматическую несовместимость (Илинский, Захаров, 2009; Ilinsky, 2013). Сравнение времени содержания мух при разных температурных режимах (Versace et al., 2014; Mazzucco et al., 2020) показало, что в «холодных» условиях лучше выживают *D. melanogaster*, несущие *Wolbachia* клады V (wMel-генотип), по сравнению с кладами VI (wMelCS) и I, II, III (wMel). Определено различие температурных предпочтений мух, в зависимости от статуса инфицированности и генотипа *Wolbachia* (Arnold et al., 2019; Truitt et al., 2019). Показано, что wMelCS увеличивает интенсивность дофаминового метаболизма, в отличие от wMel, wMel2 и wMel4 (Gruntenko et al., 2017). Самки *D. melanogaster*, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMel, более плодовиты, по сравнению с неинфицированными, а также с инфицированными бактерией генотипа wMelCS (Serga et al., 2014). Эти авторы также отмечают, что wMelCS может снижать плодовитость.

Данных по распространенности и разнообразию *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* достаточно много (Hoffmann et al., 1994, 1998; Riegler et al., 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Verspoor, Haddrill, 2011; Bykov et al., 2019), в то время как исследования лабораторных фондов включают всего две работы (Clark et al., 2005; Илинский и др., 2014). Исследование мух фонда Bloomington *Drosophila* Stock Center проводилось только на уровне оценки инфицированности линий с разными группами мутаций, а также линий, содержащих P-элемент, и линий дикого типа (Clark et al., 2005). Показаны различия по числу инфицированных линий в разных группах мух, что, вероятно, связано с историей их создания и поддержания.

Исследование мутантных линий *D. melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН было направлено не только на анализ частот инфицированности, но и на определение генетического разнообразия *Wolbachia* в линиях фонда, несущих различные мутации (Илинский и др., 2014). В результате были выявлены отличия как по частотам инфицированности, так и по составу генотипов между группами линий с разными мутациями. При этом в отдельных случаях явно прослеживалась связь с историей ведения культуры, в частности использование конкретных инфицированных балансерных линий для поддержания отдельных мутаций.

В отношении генетического разнообразия *Wolbachia* генотипы CS-группы представляют особый интерес, по-

сколькo неизвестно, как они поддерживаются в популяциях *D. melanogaster*. С учетом низкой частоты встречаемости они должны элиминироваться из популяций вследствие генетического дрейфа или вытесняться генотипом *wMel*, однако в действительности этого не происходит (Riegler et al., 2005; Ilinsky, 2013; Bykov et al., 2019). Вероятно, эти варианты *Wolbachia* поддерживаются отбором. Сейчас появляются данные по некоторым фенотипическим эффектам представителей этой группы генотипов. Например, штамм *wMelPlus* (генотип *wMelCS*) увеличивает выживаемость мух при тепловом стрессе, но механизмы этого явления неизвестны (Burdina et al., 2021). Еще один штамм бактерии, *wMelPop* (генотип *wMelCS*), был выделен на основе эффекта гибели мух вследствие безудержной пролиферации бактерий в клетках хозяина (Min, Benzer, 1997; Woolfit et al., 2013).

Сравнительное исследование изолятов *Wolbachia* на основе их генетической дифференциации, возможно, позволит обнаружить новые явления и понять механизмы взаимодействия симбионта и хозяина, что в перспективе может быть использовано в прикладных целях. Так, например, для генотипов *wMel* и *wMelCS* установлена способность блокировать передающиеся комарами вирусные заболевания, такие как лихорадка Денге, вирус Зика и др., при переносе их от дрозифилы комарам (Schultz et al., 2017; Xue et al., 2018; Flores et al., 2020).

Цель настоящей работы – поиск в линиях *D. melanogaster*, содержащихся в лабораторном фонде Института цитологии и генетики СО РАН, редких генотипов *Wolbachia*, таких как *wMelCS* и *wMelCS2*, а также новых генотипов. Эти линии в дальнейшем могут быть использованы для изучения воздействия *Wolbachia* на биологию *D. melanogaster*, в частности для анализа ее влияния на метаболизм инфицированных линий мух, их плодовитость и устойчивость к тепловому стрессу. Результаты проведенного исследования дополняют данные предыдущих работ о распространенности и разнообразии *Wolbachia* в природных популяциях и лабораторных фондах *D. melanogaster*.

Материалы и методы

В работе было использовано 555 линий *D. melanogaster* из фонда отдела генетики насекомых ИЦиГ СО РАН. Линии были созданы на основе сборов из природных популяций разных регионов России, Украины и Киргизии за период с 1985 по 2016 г., а также из Кении – 2019 г. (табл. 1, 2). Для выделения ДНК задействовали пулы из пяти самок. Мух гомогенизировали в буфере STE (0.1 M NaCl, 10 mM Трис-НСl (pH 8.0), 1 M ЭДТА (pH 8.0)) и инкубировали в течение часа при 56 °С. После инкубации образцы центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин для осаждения дебриса, после чего супернатант использовали для постановки ПЦР. Образцы были проанализированы на: 1) присутствие *Wolbachia* (вся коллекция); 2) частоту инфицированности и присутствие редких генотипов *Wolbachia* (370 линий дикого типа (см. табл. 1)), а для популяций, представленных более чем 10 линиями, определяли частоту инфицированности *Wolbachia* и рассчитывали 95 % доверительные интервалы методом Клоппера–Пирсона; 3) разнообразие CS-генотипов (170 линий, содержащих выделенные из природы мутации (см. табл. 2)); 4) возмож-

ную потерю инфекции (15 линий *D. melanogaster* дикого типа из популяции г. Томска (см. табл. 1), ранее охарактеризованных на статус инфицированности и генотип *Wolbachia* (Bykov et al., 2019)).

Определение статуса инфицированности и генотипов *Wolbachia* осуществляли по методике M. Riegler с коллегами (2005) с использованием четырех маркеров: встройка в локусы WD_1310 и WD_0516, количество повторов минисателлитных мотивов *vntr* 105 и *vntr* 141. Для 170 мутантных линий *D. melanogaster* анализ присутствия *Wolbachia* был проведен только по локусам 1310 и 0516/7, позволяющим отнести бактерию к MEL- или CS-группе генотипов. Для выявленных вариантов CS-группы выполнили дополнительный анализ по локусам *vntr* 105 и *vntr* 141, дающим возможность разделить *wMelCS*- и *wMelCS2*-генотипы. Эти 170 линий не учитывали при анализе частот инфицированности и частот генотипов *Wolbachia*, поскольку они не дают представления о встречаемости симбионта в популяции. Статистический анализ выполняли с помощью Minitab 17.1.0 (Minitab Inc., Стейт-Колледж, Пенсильвания, США).

Результаты

Из 555 линий *D. melanogaster*, использованных в анализе, *Wolbachia* выявлена у 51.9 % линий дикого типа (см. табл. 1) и 48.8 % мутантных (см. табл. 2). Для коллекции линий дикого типа уровень инфицированности варьировал от 15.8 до 100 % (см. табл. 1) и в среднем составил 52 % (95 % ДИ 46.8–57.0 %). Симбионт обнаружен во всех популяционных выборках. Для 15 линий из популяции Томска был подтвержден статус инфицированности и ожидаемый генотип *Wolbachia*, т.е. потери бактерии за 10 лет содержания линий в лаборатории не зафиксировано.

Разнообразие *Wolbachia* в исследованных линиях *D. melanogaster* дикого типа представлено тремя генотипами: *wMel*, *wMelCS* и *wMelCS2*. Более 90 % инфицированных линий несут генотип *wMel*, что согласуется с его преобладанием в природных популяциях мира (Riegler et al., 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Bykov et al., 2019). На долю *wMelCS2* приходится около 9 % инфицированных линий, полученных из популяций Алтая (Горно-Алтайск, Бийск), Киргизии (Бишкек) и Удмуртии (Ижевск). Единственный случай бактерии генотипа *wMelCS* обнаружен нами в линии из популяции Украины. Редкие варианты *Wolbachia* CS-клады также были выявлены у мутантных мух из популяций о. Сахалина и г. Нальчика (см. табл. 2). При этом *wMelCS2* на территории Сахалина ранее не обнаруживался, а для популяций Нальчика сообщений о генотипе *wMelCS* прежде не было.

Обсуждение

Мы провели поиск бактерий *Wolbachia* генотипов *wMelCS* и *wMelCS2* в линиях *D. melanogaster*, собранных из природных популяций и поддерживающихся в лабораторном фонде в течение 3–36 лет. Эти генетические варианты симбионта редко встречаются в популяциях мух, но при этом могут быть географически широко распространены в мире (Riegler et al., 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Bykov et al., 2019). В большинстве случаев они выявлены в линиях мух из регионов, где их уже находили ранее.

Таблица 1. Частота встречаемости и генетический состав *Wolbachia* в линиях *D. melanogaster* дикого типа из фонда отдела генетики насекомых ИЦиГ СО РАН

| Место сбора, год | N/N_{w+} (%w+; 95 % ДИ)* | Генотип (количество)** |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Украина, Киев, 1985 | 1/1 | wMelCS2 |
| Крым, Магарач, 1990 | 7/4 | wMel |
| Украина, Запорожье, 1990 | 9/1 | wMel |
| Россия, Горно-Алтайск, 1992 | 8/5 | wMel (1), wMelCS2 (4) |
| Россия, Бийск, 1993 | 49/20 (40.8 %; 27.0–55.8 %) | wMel (14), wMelCS2 (6) |
| Украина, Никополь, 1997 | 10/6 (60 %; 26–88 %) | wMel |
| Россия, Ижевск, 2000 | 10/5 (50 %; 19–81 %) | wMel |
| Россия, Карамбай, 2000 | 19/3 (15.8 %; 33.8–39.6 %) | wMel |
| Россия, Пычас, 2000 | 11/7 (63.6 %; 30.8–89.1 %) | wMel |
| Украина, Черкассы, 2000 | 30/12 (40 %; 22.7–59.4 %) | wMel |
| Киргизия, Бишкек, 2001 | 25/6 (24 %; 9–45 %) | wMel (4), wMelCS2 (2) |
| Россия, Пычас, 2001 | 28/19 (67.9 %; 47.6–84.1 %) | wMel |
| Украина, Черкассы, 2001 | 46/10 (22 %; 11–36 %) | wMel (9), wMelCS (1) |
| Россия, Адлер, 2002 | 2/1 | wMel |
| Россия, Ижевск, 2002 | 22/15 (68.2 %; 45.1–86.1 %) | wMel (14), wMelCS2 (1) |
| Киргизия, Бишкек, 2006 | 3/3 | wMel (2), wMelCS2 (1) |
| Россия, Краснодар, 2006 | 11/8 (73 %; 39–94 %) | wMel |
| Россия, Томск, 2006 | 3/2 | wMel |
| Украина, Никополь, 2006 | 17/7 (41.2 %; 18.4–67.1 %) | wMel |
| Крым, Магарач, 2008 | 4/2 | wMel |
| Украина, Киев, 2008 | 2/2 | wMel |
| Украина, Полесское, 2008 | 14/10 (71.4 %; 42–92 %) | wMel |
| Украина, Чернобыль, 2008 | 10/7 (70 %; 35–93 %) | wMel |
| Россия, Томск, 2011*** | 15/15 (100 %; 78.2–100 %) | wMel |
| Кения, Найроби, 2019 | 1/1 | wMel |
| Кения, Китале, 2019 | 10/10 (100 %; 69–100 %) | wMel |
| Кения, Кибоко, 2019 | 8/8 | wMel |
| Кения, 2019 | 10/10 (100 %; 69–100 %) | wMel |
| Всего | 385/200 | wMel (184), wMelCS (1), wMelCS2 (15) |

* N – количество проанализированных линий; N_{w+} – количество инфицированных линий; %w+ – доля инфицированных образцов; 95 % доверительные интервалы (ДИ) рассчитаны методом Клоппера–Пирсона для выборок $N \geq 10$; ** количество указано в случае обнаружения нескольких генотипов; *** линии были ранее охарактеризованы (Bykov et al., 2019).

Таблица 2. Распространенность *Wolbachia* в коллекции мутантных линий *D. melanogaster*, выделенных из природных популяций

| Место сбора, год | N/N_{w+} | N_{MEL} | N_{CS} (генотип) |
|----------------------------|------------|-----------|-------------------------|
| Россия, Сахалин, 2014–2016 | 128/53 | 52 | 1 (wMelCS2) |
| Россия, Нальчик, 2000 | 42/30 | 25 | 4 (wMelCS2), 1 (wMelCS) |
| Всего | 170/83 | 77 | 5 (wMelCS2), 1 (wMelCS) |

Примечание. N – количество проанализированных линий; N_{w+} – количество инфицированных линий; N_{MEL} , N_{CS} – количество линий, несущих *Wolbachia* MEL- и CS-клады соответственно.

Таблица 3. Сравнение данных по генотипическому составу *Wolbachia* в линиях *D. melanogaster* из фондов дикого типа, мутантных линий и природных популяций

| Тип линий | $N_{wMel}/\%wMel$ | 95 % ДИ | Редкие генотипы ($wMelCS$, $wMelCS2$, $wMel2$, $wMel4$) | Редкие, % | 95 % ДИ |
|----------------------------------|-------------------|---------|-----------------------------------------------------------------|-----------|---------|
| Дикий тип | 184/92 | 87–95 | 16 | 8 | 5–13 |
| Мутантные (Илинский и др., 2014) | 60/43 | 35–52 | 78 | 57 | 48–65 |
| Природные (Вуков et al., 2019) | 852/98 | 96–99 | 17 | 2 | 1–3 |

Примечание. N_{wMel} – количество линий с *Wolbachia* генотипа $wMel$; $\%wMel$ – процент линий с *Wolbachia* генотипа $wMel$.

Таблица 4. Сравнение данных по распространенности *Wolbachia* в линиях *D. melanogaster* из фондов дикого типа, мутантных линий и природных популяций

| Тип линий | N | N_{w+} | N_{w-} | Частота, % | 95 % ДИ |
|----------------------------------|------|----------|----------|------------|---------|
| Дикий тип | 385 | 200 | 185 | 52 | 47–57 |
| Мутантные (Илинский и др., 2014) | 353 | 138 | 215 | 39 | 34–44 |
| Природные (Вуков et al., 2019) | 1505 | 869 | 636 | 57 | 55–60 |

Примечание. N – количество линий; N_{w+} , N_{w-} – количество инфицированных и неинфицированных линий соответственно.

На территории Удмуртии (Ижевск) *Wolbachia* генотипа $wMelCS2$ у *D. melanogaster* ранее не обнаружено, что, вероятно, связано с малым количеством проверенных линий (Илинский, Захаров, 2007а). На сегодняшний день это самая северная точка в мире, где мы смогли найти данный генотип (Вуков et al., 2019), хотя сведений о генетическом разнообразии *Wolbachia* в северных популяциях *D. melanogaster* крайне мало. Вероятно, границы распространенности *Wolbachia wMelCS2* значительно шире, чем известно сейчас. Вероятен также и случайный завоз *D. melanogaster* с этим вариантом бактерии в данный регион вместе с продуктами. При этом в дальнейшем он может не закрепиться в популяциях мух, например вследствие гибели локальной популяции в зимний период. Похожий случай завоза, возможно, произошел с мутантной линией *D. melanogaster* с о. Сахалин, у которой выявлена *Wolbachia wMelCS*-генотипа, ранее не наблюдавшегося на этой территории.

Ранее мы подробно охарактеризовали инфицированность и генетическое разнообразие *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster* г. Нальчик 2010–2013 гг., в которых обнаружили единичные случаи генотипа $wMelCS2$ (Быков и др., 2014; Вуков et al., 2019). Проведенный нами анализ мутантных линий *D. melanogaster*, выделенных из популяции г. Нальчик 2000 г., показал присутствие как генотипа $wMelCS2$, так и $wMelCS$. На основании полученных данных можно сделать вывод о стабильном поддержании *Wolbachia wMelCS2* в популяциях дрозофил этого региона. Выявленный случай $wMelCS$ -генотипа подтверждает более раннее предположение о возможном присутствии этого варианта бактерии в популяциях г. Нальчика (Быков и др., 2014). Поддержание редких генотипов *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster* на протяжении многих лет может быть обусловлено несколькими причинами. Особи *D. melanogaster*, несущие бактерии генотипов $wMelCS$ и $wMelCS2$, могут переживать и давать новые поколения инфицированных мух (Kriesner et al., 2016; Вуков et al., 2019). Сам симбионт может давать преимущества

инфицированным особям (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Gruntenko et al., 2017) или индуцировать репродуктивные аномалии, направленные на поддержание инфекции в популяции (Илинский, Захаров, 2009; Ilinsky, 2013).

У мутантных лабораторных линий *D. melanogaster* генотипы *Wolbachia wMelCS* и $wMelCS2$ встречаются значительно чаще, что объясняется историей создания линий, а именно использованием балансерных линий с бактериями этих генотипов (Илинский и др., 2014). Сравнение данных по генетическому разнообразию *Wolbachia* у *D. melanogaster* из природных популяций, фонда мутантных линий и фонда линий дикого типа показывает наличие достоверных различий по соотношению генотипов между линиями дикого типа из фонда и природными популяциями (точный тест Фишера, $p = 7 \times 10^{-5}$). Коллекция мутантных линий значительно отличается по генетическому составу *Wolbachia* от линий дикого типа и от природных линий, точный тест Фишера, $p < 1 \times 10^{-8}$ в обоих случаях (табл. 3).

В целом результаты по распространенности *Wolbachia* в лабораторных культурах *D. melanogaster*, полученные в ходе данной работы, согласуются с ранее опубликованными данными для природных популяций, свидетельствующими, что симбионт присутствует повсеместно с преимущественно высокими частотами (Илинский, Захаров, 2007а; Verspoor, Haddrill, 2011; Serga et al., 2014; Вуков et al., 2019). При детальном сравнении наших данных для линий дикого типа с мутантными линиями и природными популяциями выявлены различия в частотах встречаемости *Wolbachia*. Как мутантные линии, так и линии дикого типа отличаются от природных популяций (точный тест Фишера, $p = 0.043$ для дикого типа и $p < 1 \times 10^{-8}$ – для мутантных линий) и различаются между собой ($p = 0.0005$) (табл. 4).

Возможным объяснением разницы в частотах встречаемости симбионта между природными популяциями и линиями дикого типа из фонда может быть потеря ин-

фекции в ряде линий в течение многих поколений. Известно, что *Wolbachia* способна со временем утрачиваться в материнской родословной за счет неполной материнской передачи, а в отсутствие какого-либо положительного влияния на хозяина может вовсе элиминироваться из популяции (Hoffmann et al., 1998; Илинский и др., 2014). По результатам нашего анализа, мы не зафиксировали утраты *Wolbachia* в 15 линиях *D. melanogaster* из популяции Томска, содержащихся в фонде на протяжении 10 лет. Однако для мутантных линий *D. melanogaster* ранее были выявлены случаи возможной утраты симбионта (Илинский и др., 2014). Для использованной в работе (Ilinsky, 2013) линии S400, несущей *Wolbachia* генотипа wMel клады III, также отмечена утрата *Wolbachia* (данные не приведены).

Заключение

Выявлены две линии *D. melanogaster*, несущие *Wolbachia* генотипа wMelCS, и 20 линий с бактерией wMelCS2-генотипа. Эти линии будут использованы в дальнейших исследованиях влияния симбионта на биологию *D. melanogaster*. Наши данные расширяют представления о границах распространенности редкого генотипа wMelCS2, для которого определена наиболее северная точка. Результаты проведенного исследования показывают возможность стабильного поддержания *Wolbachia* в лабораторных линиях, однако не исключают возможности утраты симбионта при более длительном содержании. Частоты встречаемости симбионта и его генотипический состав в целом согласуются с полученными ранее данными для природных популяций и дополняют их. В сравнении с фондом мутантных линий *D. melanogaster* частоты встречаемости и генотипический состав *Wolbachia* у фонда линий дикого типа более приближены к наблюдающимся в природных популяциях.

Список литературы / References

- Быков Р.А., Илинский Ю.Ю., Волошина М.А., Захаров И.К. Распространенность и генотипическое разнообразие симбиотической бактерии *Wolbachia* в популяции *Drosophila melanogaster* г. Нальчик. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014; 18(2):315-319.
[Bykov R.A., Ilinskii Yu.Yu., Voloshina M.A., Zakharov I.K. Prevalence and genotypic diversity of the symbiotic bacterium *Wolbachia* in the *Drosophila melanogaster* population of Nalchik. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2014;4:539-542. <https://doi.org/10.1134/S2079059714060057>.]
- Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Захаров И.К. Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций Института цитологии и генетики СО РАН: генотипы эндосимбионта *Wolbachia* и митотипы вида-хозяина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;17(3):404-423.
[Ilinsky Y.Y., Bykov R.A., Zakharov I.K. Cytotypes of mutant *Drosophila melanogaster* stocks from the collection of the genetics of population laboratory of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS: genotypes of the *Wolbachia* endosymbiont and host mitotypes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;17(3):404-423. (in Russian)]
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Эндосимбионт *Wolbachia* в евразийских популяциях *Drosophila melanogaster*. *Генетика*. 2007a; 43(7):905-915.
[Ilinsky Yu.Yu., Zakharov I.K. The endosymbiont *Wolbachia* in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*. *Russ. J. Genet.* 2007a;43(7):748-756. DOI 10.1134/S102279540707006X.]
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Характеристика инфицированности цитоплазматическим эндосимбионтом *Wolbachia* популяции *Drosophila melanogaster* Умани. *Докл. акад. наук*. 2007b; 413(4):561-563.
[Ilinsky Yu.Yu., Zakharov I.K. Infection of the Uman' population of *Drosophila melanogaster* with the cytoplasmic endosymbiont *Wolbachia*. *Dokl. Biol. Sci.* 2007b;413(1):166-168. DOI 10.1134/S0012496607020238.]
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Цитоплазматическая несовместимость у *Drosophila melanogaster*, обусловленная различными генотипами *Wolbachia*. *Экол. генетика*. 2009;7(2):1-18.
[Ilinsky Yu.Yu., Zakharov I.K. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* is caused by different *Wolbachia* genotypes. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2011;1(5):458-462. DOI 10.1134/S2079059711020031.]
- Arnold P.A., Levin S.C., Stevanovic A.L., Johnson K.N. *Drosophila melanogaster* infected with *Wolbachia* strain wMelCS prefer cooler temperatures. *Ecol. Entomol.* 2019;44(2):287-290. DOI 10.1111/een.12696.
- Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Ilinsky Y.Y., Gruntenko N.E. Unique *Wolbachia* strain wMelPlus increases heat stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2021;106(4):e21776. DOI 10.1002/arch.21776.
- Bykov R.A., Yudina M.A., Gruntenko N.E., Zakharov I.K., Voloshina M.A., Melashchenko E.S., Danilova M.V., Mazunin I.O., Ilinsky Y.Y. Prevalence and genetic diversity of *Wolbachia* endosymbiont and mtDNA in Palearctic populations of *Drosophila melanogaster*. *BMC Evol. Biol.* 2019;19(1):45-53. DOI 10.1186/s12862-019-1372-9.
- Chrostek E., Marialva M.S., Esteves S.S., Weinert L.A., Martinez J., Jiggins F.M., Teixeira L. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003896. DOI 10.1371/journal.pgen.1003896.
- Clark M.E., Anderson C.L., Cande J., Karr T.L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. *Genetics*. 2005;170(4):1667-1675. DOI 10.1534/genetics.104.038901.
- Early A.M., Clark A.G. Monophyly of *Wolbachia* pipientis genomes within *Drosophila melanogaster*: geographic structuring, titre variation and host effects across five populations. *Mol. Ecol.* 2013; 22(23):5765-5778. DOI 10.1111/mec.12530.
- Flores H.A., Taneja de Bruyne J., O'Donnell T.B., Tuyet Nhu V., Thi Giang N., Thi Xuan Trang H., ... Thi Hue Kien D., Thuy Vi T., Willis B., O'Neill S.L., Simmons C.P., Carrington L.B. Multiple *Wolbachia* strains provide comparative levels of protection against dengue virus infection in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 2020;16(4): e1008433. DOI 10.1371/journal.ppat.1008433.
- Gruntenko N.E., Ilinsky Y.Y., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Rauschenbach I.Y. Various *Wolbachia* genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions. *BMC Evol. Biol.* 2017;17(2):15-22. DOI 10.1186/s12862-017-1104-y.
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S.L., Johnson K.N. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*. 2008;322(5902):702. DOI 10.1126/science.1162418.
- Hoffmann A.A., Clancy D.J., Merton E. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1994; 136(3):993-999. DOI 10.1093/genetics/136.3.993.
- Hoffmann A.A., Hercus M., Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1998;148(1):221-231. DOI 10.1093/genetics/148.1.221.
- Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes. *PLoS One*. 2013;8(1):e54373. DOI 10.1371/journal.pone.0054373.
- Kriesner P., Conner W.R., Weeks A.R., Turelli M., Hoffmann A.A. Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila*

- melanogaster* and the possible role of reproductive dormancy. *Evolution*. 2016;70(5):979-997. DOI 10.1111/evo.12923.
- Mazzucco R., Nolte V., Vijayan T., Schlötterer C. Long-term dynamics among *Wolbachia* strains during thermal adaptation of their *Drosophila melanogaster* hosts. *Front. Genet.* 2020;11:482. DOI 10.3389/fgene.2020.00482.
- Min K.T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94(20):10792-10796. DOI 10.1073/pnas.94.20.10792
- Richardson M.F., Weinert L.A., Welch J.J., Linheiro R.S., Magwire M.M., Jiggins F.M., Bergman C.M. Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2012;8(12):e1003129. DOI 10.1371/journal.pgen.1003129.
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 2005;15(15):1428-1433. DOI 10.1016/j.cub.2005.06.069.
- Schultz M.J., Isern S., Michael S.F., Corley R.B., Connor J.H., Frydman H.M. Variable inhibition of Zika virus replication by different *Wolbachia* strains in mosquito cell cultures. *J. Virol.* 2017;91(14):e00339-17. DOI 10.1128/JVI.00339-17.
- Serga S., Maistrenko O., Rozhok A., Mousseau T., Kozeretska I. Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the wMel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Symbiosis*. 2014;63(1):11-17. DOI 10.1007/s13199-014-0283-1.
- Teixeira L., Ferreira Á., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 2008;6(12):e1000002. DOI 10.1371/journal.pbio.1000002.
- Truitt A.M., Kapun M., Kaur R., Miller W.J. *Wolbachia* modifies thermal preference in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Microbiol.* 2019;21(9):3259-3268. DOI 10.1111/1462-2920.14347.
- Versace E., Nolte V., Pandey R.V., Tobler R., Schlötterer C. Experimental evolution reveals habitat-specific fitness dynamics among *Wolbachia* clades in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Ecol.* 2014;23(4):802-814. DOI 10.1111/mec.12643.
- Verspoor R.L., Haddrill P.R. Genetic diversity, population structure and *Wolbachia* infection status in a worldwide sample of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* populations. *PLoS One*. 2011;6(10):e26318. DOI 10.1371/journal.pone.0026318.
- Woolfit M., Iturbe-Ormaetxe I., Brownlie J.C., Walker T., Riegler M., Seleznev A., Popovici J., Rances E., Wee B.A., Pavlides J., Sullivan M.J., Beatson S.A., Lane A., Sidhu M., McMeniman C.J., McGraw E.A., O'Neill S.L. Genomic evolution of the pathogenic *Wolbachia* strain, wMelPop. *Genome Biol. Evol.* 2013;5(11):2189-2204. DOI 10.1093/gbe/evt169.
- Xue L., Fang X., Hyman J.M. Comparing the effectiveness of different strains of *Wolbachia* for controlling chikungunya, dengue fever, and Zika. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(7):e0006666. DOI 10.1371/journal.pntd.0006666.

ORCID ID

A.S. Ryabinin orcid.org/0000-0002-3464-3325
O.D. Shishkina orcid.org/0000-0001-9370-4485
Yu.Yu. Ilinsky orcid.org/0000-0002-2691-3241
R.A. Bykov orcid.org/0000-0001-7405-1773


Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного задания (проект № FWNR-2022-0019).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 31.05.2022. После доработки 28.06.2022. Принята к публикации 28.06.2022.

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

Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов

Е.А. Анисимова , Н.А. Фахрутдинов, Д.А. Миргазов, Е.А. Додонова, И.А. Елизарова, М.Е. Горбунова, Н.И. Хаммадов, Л.И. Зайнуллин, К.А. Осянин

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Научный городок-2, Казань, Россия


 elizaveta-real@mail.ru

Аннотация. Бактерии *Bacillus anthracis* являются возбудителем сибирской язвы. Для эпидемиологии этой инфекции имеет значение не только идентификация этиологического агента, но и выяснение закономерности его эволюции и распространения. Современные методы молекулярной биологии позволяют определить ряд генетических маркеров, пригодных для индикации и дифференциации штаммов *B. anthracis*. К таким маркерам относят VNTR-локусы – последовательности, организованные в геноме в виде tandemных повторов, а также SNP – отличия в последовательности ДНК в сравниваемых локусах размером в один нуклеотид. Целью настоящей работы была оценка эффективности совместного применения SNP-анализа и ПЦР-амплификации VNTR-локусов с анализом температуры плавления ампликонов высокого разрешения для идентификации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы. Исследовали семь штаммов *B. anthracis*, полученных из образцов почвы и трупов животных, в качестве референс-микроорганизма был вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1. Для молекулярно-генетической характеристики данных бактерий проведен анализ 12 однонуклеотидных полиморфизмов, а также варибельности восьми VNTR-локусов, для определения различий в которых был впервые использован метод определения температур плавления ПЦР-продуктов в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen (ЗАО «Синтол», Россия). Для детекции SNP применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двойных TaqMan-зондов. Обнаружено, что все изучаемые вирулентные штаммы, кроме *B. anthracis* № 1 и 3, по SNP-профилю не могут быть отнесены к какой-либо филогенетической подгруппе возбудителя сибирской язвы. Методический подход, включающий в себя анализ SNP- и VNTR-последовательностей, позволил дифференцировать между собой штаммы *B. anthracis* № 1–4, в то время как бактерии *B. anthracis* № 5–7 демонстрируют одинаковые SNP- и HRM-профили и, как следствие, формируют один кластер. Таким образом, показана принципиальная возможность использования рассмотренной в этой работе методики для предварительного анализа эпизоотической ситуации при вспышках сибирской язвы.


Ключевые слова: *Bacillus anthracis*; генотипирование; VNTR; SNP; HRM-анализ; эпидемиология сибирской язвы.

Для цитирования: Анисимова Е.А., Фахрутдинов Н.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Зайнуллин Л.И., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):560-567. DOI 10.18699/VJGB-22-68

Bacillus anthracis strain differentiation based on SNP and VNTR loci

Е.А. Anisimova , N.A. Fakhrutdinov, D.A. Mirgazov, E.A. Dodonova, I.A. Elizarova, M.E. Gorbunova, N.I. Khammatov, L.I. Zainullin, K.A. Osyenin

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny Gorodok-2, Kazan, Russia

 elizaveta-real@mail.ru

Abstract. *Bacillus anthracis* is the anthrax causative agent. For its epidemiology, it is important not only to identify the etiological agent but also to determine the patterns of its evolution and spread. Modern methods of molecular biology make it possible to detect a number of genetic markers suitable for indicating and differentiating the strains of *B. anthracis*, including the loci arranged as variable number tandem repeats (VNTRs) and SNPs, one nucleotide-sized differences in the DNA sequence of the loci being compared. The objective of the present study was to examine the effectiveness of SNP analysis and PCR amplification of VNTR loci combined with the high-resolution amplicon melting analysis for identification and differentiation of the anthrax agent strains. In the study, seven strains of *B. anthracis* obtained from soil samples and animal carcasses were investigated using vaccine strain STI-1 as a reference. For molecular genetic characterization of these bacteria, analysis of 12 SNPs and variability analysis of eight VNTR loci were carried out. To detect the differences between the strains, their PCR product melting points were measured in the presence of the EvaGreen (Sintol, Russia) intercalating dye. For SNP detection, a PCR assay with double TaqMan probes was applied. It was found that the studied virulent strains, except for *B. anthracis* No. 1 and 3, could not be attributed to any phylogenetic subgroup of the anthrax agents. The proposed method made it possible to differentiate four out of the seven

investigated strains. Strains No. 5–7 had identical SNP and HRM profiles and, as a result, formed a single cluster. Our investigation has confirmed that the proposed method can be successfully used for preliminary analysis of an epizootic situation in the case of anthrax.

Key words: *Bacillus anthracis*; genotyping; VNTR; SNP; HRM-analysis; epidemiology of anthrax.

For citation: Anisimova E.A., Fakhrutdinov N.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Khamadov N.I., Zainullin L.I., Osyaniin K.A. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):560-567. DOI 10.18699/VJGB-22-68

Введение

Бактерии *Bacillus anthracis* являются возбудителем особо опасной зоонозной инфекции – сибирской язвы. Несмотря на то что на сегодняшний день разработаны и достаточно широко внедрены эффективные меры по предупреждению возникновения и распространения этого заболевания, ежегодно во всем мире регистрируется от 2000 до 20000 случаев сибирской язвы (Pisarenko et al., 2019). Наибольшее количество случаев заражения в мире отмечено в странах Африки, Средней Азии и Южной Америки (Hugh-Jones, Blackburn, 2009; Kenefic et al., 2009), в России – на территории Сибири и Северного Кавказа (Логвин и др., 2017).

Все известные популяции *B. anthracis* крайне мономорфны и обладают клональной структурой (Achtman, 2008; Keim et al., 2009). Такое высокое генетическое сходство значительно затрудняет дифференциацию штаммов возбудителя сибирской язвы бактериологическими и серологическими методами. Решение этой задачи возможно при помощи молекулярно-генетических подходов. Для индикации и дифференциации штаммов *B. anthracis* наиболее перспективны методы, основанные на детекции областей с варибельным числом tandemных повторов (VNTR-локусы) и единичных нуклеотидных замен (SNP-локусы) в геноме возбудителя (Тимофеев и др., 2018; Wang et al., 2020).

Локусы SNP, по сравнению с VNTR-локусами, эволюционно наиболее стабильны, характеризуются низкой частотой мутаций, однако обладают меньшей разрешающей способностью. Поэтому детекция полиморфизмов в SNP-локусах возбудителя сибирской язвы часто служит начальным этапом в системе генотипирования, основанной на алгоритме совместного использования SNP- и VNTR-маркеров (Тимофеев и др., 2018). Широкое применение находит набор из 14 диагностически значимых «канонических» SNP (canSNP). Система дает возможность определить принадлежность исследуемого микроорганизма к той или иной филогенетической линии и, как следствие, сделать предположение о его географическом происхождении (Van Ert et al., 2007). Всего на сегодняшний день выделяют три филогенетические линии (А, В и С), которые в свою очередь образуют 14 филогенетических групп: А.Br.Ames, А.Br.Australia 94, А.Br.003/004, А.Br.Vollum, А.Br.005/006, А.Br.001/002, А.Br.Western, А.Br.WNA, А.Br.008/009, А.Br.011/009, В.Br.001/002, В.Br.KrugerB, В.Br.CNEVA и С.Br.A1055 (Тимофеев и др., 2018). Согласно данным литературы, штаммы, выделенные на территории Российской Федерации, принадлежат преимущественно к группе В.Br.001/002 линии В и группам А.Br.001/002 и А.Br.008/009 линии А, реже – к А.Br.Aust94 (Еременко и др., 2018; Котенева и др., 2019).

Для дальнейшей дифференциации штаммов в пределах каждого SNP-кластера используют мультилокусный анализ числа tandemных повторов (MLVA) (Тимофеев и др., 2018). Наиболее распространенная стратегия MLVA – проведение ПЦР-анализа с последующим разделением продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле, а также с применением капиллярного электрофореза (Бондарева и др., 2014). Наиболее точные результаты могут быть получены при проведении секвенирования ампликонов, однако существенным недостатком этого подхода является длительность его исполнения (от нескольких дней).

В настоящем исследовании для определения различий в VNTR-локусах, а именно количества tandemных повторов, применяли метод под названием HRM (high resolution melting), основанный на анализе температур плавления ампликонов в реальном времени. Используемый для HRM-анализа интеркалирующий краситель EvaGreen (ЗАО «Синтол», Россия) встраивается между двумя комплементарными нуклеотидами в двуспиральной молекуле ДНК. При возбуждении красителя светом длиной волны 490 нм он флуоресцирует по каналу детекции Fam. При денатурации ДНК и разрыве водородных связей флуоресценция отсутствует. Таким образом, при постепенном повышении температуры в амплификаторе и постоянной детекции возможно определить количество повторов по температуре плавления ампликонов. Последний подход имеет преимущество перед классическими MLVA-методами, поскольку не требует секвенирования или использования флуоресцентно-меченых зондов и, как следствие, позволяет провести детекцию различий в VNTR-локусах штаммов *B. anthracis* с меньшими финансовыми и временными затратами. Метод HRM-анализа продуктов ПЦР-амплификации ранее был предложен для SNP-генотипирования (Derzelle et al., 2011), однако для анализа VNTR-локусов не описан.

Целью работы стала оценка эффективности совместного применения SNP-анализа и ПЦР-амплификации VNTR-локусов с анализом температуры плавления ампликонов высокого разрешения для идентификации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы.

Материалы и методы

В работе использовали семь штаммов *B. anthracis*, полученных из образцов почвы и трупов животных (табл. 1). В качестве референс-микроорганизма задействовали вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 из коллекции штаммов микроорганизмов (Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФЦТРБ-ВНИВИ), Казань). Подготовку проб штаммов *B. anthracis* для дальнейших молекулярно-генетических

Таблица 1. Используемые в работе штаммы *B. anthracis*

| Номер штамма | Место и год выделения | Источник выделения |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | Чечено-Ингушская АССР, 1971 | Труп овцы |
| 2 | Таджикская ССР, 1971 | Труп крупного рогатого скота |
| 3 | Курганская область, 1971 | |
| 4 | г. Ульяновск, 2004 | Почва (место падежа животного) |
| 5 | | Труп свиньи |
| 6 | Республика Татарстан, 2004 | Труп крупного рогатого скота |
| 7 | Республика Татарстан, 2008 | |
| СТИ-1 | Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, 1980 | Вакцинный штамм |

исследований проводили согласно методическим указаниям (МУК 4.2.2941-11, 2011).

Геномную ДНК исследуемых микроорганизмов выделяли с помощью набора «ДНК-сорб В» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения SNP-анализа применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью двойных TaqMan-зондов и праймеров, представленных ранее в работе (Van Ert et al., 2007). Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 125 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 2.5 мМ MgCl₂, 5 пМ каждого праймера и зонда, 10 нг ДНК-матрицы, 1.0 единицу Taq-полимеразы («Евроген», Россия), ddH₂O (до 15 мкл). ПЦР-РВ проводили с использованием прибора Real-Time C1000 с оптическим блоком CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 мин; далее 39 циклов: денатурация 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов 50 °С – 30 с (детекция по каналу R6G/ROX), элонгация 72° С – 5 с. Определение точечной нуклеотидной замены в каждом

локусе выполняли, анализируя интенсивность флуоресценции по каждому каналу. Для численной оценки вариабельности SNP-локусов брали индекс аллельного полиморфизма (h) (Selander et al., 1986).

Для проведения MLVA применяли метод определения температур плавления ампликонов с помощью интеркалирующего красителя EvaGreen. Набор праймеров, использованных для амплификации VNTR-локусов, представлен в табл. 2.

Реакционная смесь для ПЦР-РВ объемом 15 мкл содержала 1.5 мкл 10×ПЦР-буфера с красителем EvaGreen («Синтол»), 2.5 мМ раствора MgCl₂ («Синтол»), 1.0 единицу Taq-полимеразы («Синтол»), 125 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 5 пМ прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК-матрицы, ddH₂O (до 15 мкл). Амплификацию ДНК с последующим HRM-анализом осуществляли с помощью прибора Real-Time C1000 с оптическим блоком CFX96 (Bio-Rad) по следующей программе: начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 мин; далее 39 циклов: денатурация 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: 60 °С – 30 с (детекция по каналу FAM), элонгация: 72 °С – 10 с. Параметры плавления: диапазон температур от 65 до 95 °С, шаг 0.2 °С – 5 с. Графический анализ кривых плавления продуктов амплификации выполняли в программе CFX Manager™ (Bio-Rad). Разделение ампликонов проводили в нативном 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) (Sambrook et al., 1989).

Биоинформационный анализ геномов *B. anthracis* осуществляли с помощью программ Vector NTI 9.1 и баз данных ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.gov>).

Результаты

Разработка и апробация

Для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* использовали расширенный протокол, включающий детекцию 12 SNP-локусов, условно обозначенных как A.Br.001, A.Br.003, A.Br.004, A.Br.006, A.Br.007, A.Br.008, A.Br.009, B.Br.001, B.Br.002, B.Br.003, B.Br.004 и A/B.Br.001 (Van Ert et al., 2007), и анализ восьми VNTR-локусов (VtrA, VtrB1, VtrB2, VtrC1, VtrC2, CG3, pX01 и

Таблица 2. Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе для амплификации VNTR-локусов

| Локус | ID: Локализация в геноме, п. о. | Нуклеотидная последовательность праймера, 5'→3' | | Ожидаемая длина ампликона (без повторов), п. о. |
|-------|---------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|
| | | Прямой | Обратный | |
| VrrA | CP076222.1: 4103374–4103699 | CACAАCTACCACCGATGGCAC | GCGCGTTTCGTTTGATTCATAC | 266 |
| VrrB1 | CP054800.1: 3380187–3380415 | ATAGGTGGTTTTCCGCAAGTTATTC | GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG | 211 |
| VrrB2 | CP054800.1: 3380389–3380541 | CACAGGCTATTCTTTATCAAАCTCATC | CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA | 135 |
| VrrC1 | CP054816.1: 1937943–1938522 | GAAGCAAGAAAGTGATGTAGTGGAC | CATTTCTCAAGTGCTACAGGTTC | 544 |
| VrrC2 | CP054816.1: 1937447–1937978 | CCAGAAGAAGTGGAACTGTAGCAC | GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC | 460 |
| CG3 | CP054816.1: 4931009–4931169 | CCATGTCGTTTTACTTCTCTCTCCAATAC | AGTCATTGTCTGTATAAAGGGCAT | 151 |
| pX01 | FR872876 | CAATTTATTAACGATCAGATTAAGTTCA | TCTAGAATTAGTTGCTTCATAATGGC | 108 |
| pX02 | FR872886 | TCATCTCTTTAAGTCTTGGGT | GTGTGATGAACTCCGACGACA | 123 |

Таблица 3. Результаты SNP-анализа исследуемых штаммов *B. anthracis*

| Номер штамма | Локус | | | | | | | | | | | | | Филогенетическая группа |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|--------------|-------------------------|
| | A.Br.001 | A.Br.003 | A.Br.004 | A.Br.006 | A.Br.007 | A.Br.008 | A.Br.009 | B.Br.001 | B.Br.002 | B.Br.003 | B.Br.004 | A/B.Br.001 | | |
| СТИ-1 | T | G | T | A | T | T | A | T | G | G | T | A | A.Br.008/009 | |
| 1 | T | - | C | A | T | - | A | T | G | G | T | A | A.Br.003/004 | |
| 2 | T | - | C | A | C | - | A | T | G | G | T | A | - | |
| 3 | T | - | T | A | T | - | A | T | G | G | T | A | A.Br.008/009 | |
| 4 | T | - | C | A | C | - | A | T | G | G | T | A | - | |
| 5 | T | - | C | C | T | - | A | T | T | A | T | A | - | |
| 6 | T | - | C | C | T | - | A | T | T | A | T | A | - | |
| 7 | T | - | C | C | T | - | A | T | T | A | T | A | - | |

Таблица 4. Характеристика VNTR-локусов бактерий *B. anthracis* СТИ-1

| Локус | Размер локуса, п. о. | Длина повтора, п. о. | Нуклеотидная последовательность повтора | Количество повторов | Температура плавления ампликона, °C |
|-------|----------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| VrrA | 314 | 12 | tatcaacaaca | 4 | 84.5 |
| VrrB1 | 229 | 9 | caaggtcac | 2 | 86.2 |
| VrrB2 | 162 | 9 | caatatcaa | 3 | 85.7 |
| VrrC1 | 616 | 36 | cttctctgactcttctgttccgcaattacttcta | 2 | 82 |
| VrrC2 | 604 | 72 | ctacgaccggtgcttctctgcaactggtgttctctacaatcggtgttctctacaactgattgttct | 2 | 85 |
| CG3 | 156 | 5 | tatta | 1 | 75.2 |
| pX01 | 156 | 3 | aat | 16 | 74.2 |
| pX02 | - | 2 | at | - | - |

pX02) (Keim et al., 2000). Апробацию разработанного подхода к генотипированию штаммов возбудителя сибирской язвы провели на вакцинном штамме *B. anthracis* СТИ-1.

По результатам SNP-анализа, приведенным в табл. 3, можно сделать вывод о конфигурации точечных нуклеотидных замен в исследуемых 12 локусах штамма *B. anthracis* СТИ-1. Обнаружено, что за исключением двух локусов (A.Br.003 и A.Br.008), полученный в этом исследовании SNP-профиль для бактерий *B. anthracis* СТИ-1 соотносится с представленными в литературе данными об однонуклеотидных полиморфизмах для того же штамма (Афанасьев и др., 2014; Еременко и др., 2018). Отметим, что санSNP достаточно консервативны и, как известно, имеют низкую скорость мутаций (Тимофеев и др., 2018). Достоверность обнаруженных для *B. anthracis* СТИ-1 нетипичных однонуклеотидных замен в локусах A.Br.003 и A.Br.008 требует дальнейшего подтверждения, в частности секвенированием. Поэтому на данном этапе работы локусы A.Br.003 и A.Br.008 были исключены из диагностической санSNP-панели, пригодной для дифференциации изучаемых штаммов.

Для проведения MLVA применяли метод классической ПЦР с последующим разделением ампликонов в ПААГ. Этот метод позволил определить только примерные размеры семи анализируемых VNTR-локусов штамма *B. anthracis* СТИ-1: VrrA – 300 п. о., VrrB1 – 250 п. о., VrrB2 –

190 п. о., VrrC1 – 700 п. о., VrrC2 – 600 п. о., CG3 – 160 п. о., pX01 – 160 п. о. Продукт амплификации локуса, локализованного на плазмиде капсулообразования pX02, не детектирован. Отсутствие плазмиды pX02 является характерным признаком штамма *B. anthracis* СТИ-1 (Афанасьев и др., 2014).

Точный размер амплифицируемых VNTR-участков ДНК *B. anthracis* СТИ-1, а также размер нуклеотидных повторов в них определили *in silico*. С помощью программы Vector NTI 9.1 нуклеотидную последовательность хромосомной ДНК бактерий *B. anthracis* СТИ-1 (GenBank CP066168) ограничили соответствующими праймерами (см. табл. 2). Результаты, полученные после биоинформационного анализа генома *B. anthracis* СТИ-1, приведены в табл. 4. Полная нуклеотидная последовательность плазмиды pX01 этого штамма отсутствует в базе данных GenBank. Поэтому количество tandemных повторов в данном локусе определили как разницу между молекулярной массой ампликона и размером амплифицируемого фрагмента «без повторов», которую делили на количество нуклеотидов в варибельной области. С помощью электрофореза обнаружено, что размеры локусов CG3 и pX01 бактерий *B. anthracis* СТИ-1 идентичны между собой. Исходя из этого факта, при расчете количества повторов, локализованных на плазмиде pX01, использовали молекулярную массу локуса CG3.

Таблица 5. Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов исследуемых штаммов *B. anthracis*

| Номер штамма | Локус | | | | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | VrrA1 | VrrB1 | VrrB2 | VrrC1 | VrrC2 | CG3 | pXO1 | pXO2 |
| 1 | 84.6 | 86.0 | 85.4 | 84.2 | 83.6 | 75.6 | 74.6 | 78.2 |
| 2 | 84.6 | 86.0 | 83.0 | 84.0 | 83.4 | 75.0 | 74.2 | 77.8 |
| 3 | 84.2 | 85.8 | 85.4 | 84.2 | 83.4 | 75.0 | 74.2 | 78.2 |
| 4 | 85.2 | 86.0 | 85.4 | 84.2 | 83.6 | 75.2 | 74.6 | 78.4 |
| 5 | 85.0 | 85.8 | 85.8 | 84.0 | 83.4 | 75.2 | 74.6 | 78.2 |
| 6 | 85.0 | 86.0 | 85.8 | 84.0 | 83.6 | 75.2 | 74.6 | 78.4 |
| 7 | 85.0 | 86.0 | 86.0 | 84.0 | 83.6 | 75.2 | 74.8 | 78.4 |

Определены пики плавления ПЦР-РВ-продуктов амплифицируемых VNTR-локусов штамма *B. anthracis* СТИ-1 (см. табл. 4). ПЦР-РВ проводили с использованием красителя EvaGreen в восьми репликах. Обнаружено, что разница между репликами для большинства анализируемых локусов составляет 0.2 °С. Поэтому для дальнейшей дифференцировки штаммов сибирской язвы на основе разниц температур плавления VNTR-локусов допустимым отличием в показаниях приняли значения от 0.2 °С.

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов

Результаты молекулярно-генетического анализа SNP-локусов, исследованных в данной работе, вирулентных штаммов *B. anthracis* представлены в табл. 2. Обнаружено, что SNP-анализ не выявил различий в пяти локусах: A.Br001, A.Br005, A.Br009, B.Br001 и A/B.Br001. Значения индекса варибельности (h) для других семи SNP-локусов находились в диапазоне от 0.12 до 0.4.

По полученным результатам изученные штаммы распределены в четыре кластера. Самый большой кластер формируют три штамма, выделенные на территории Республики Татарстан (*B. anthracis* № 6, 7) в 2008 и 2014 гг., и г. Ульяновска (*B. anthracis* № 5) – в 2004 г. Во второй кластер входят штаммы № 2 и 4, полученные в Таджикской ССР в 1972 г. и Ульяновске в 2004 г. соответственно. Штаммы *B. anthracis* № 1 и 3, обнаруженные на территории Чечено-Ингушской АССР в 1971 г. и Курганской области – в 1972 г. соответственно, формируют еще два кластера.

По данным SNP-типирования установили принадлежность штамма *B. anthracis* № 1 к филогенетической подгруппе A.Br.003/004. Обнаружено, что бактерии *B. anthracis* № 3, как и референсный штамм *B. anthracis* СТИ-1, могут быть отнесены к филогенетической линии A.Br.011/009. У остальных исследуемых микроорганизмов полученные SNP-профили не характерны для какой-либо из выделенных ранее филогенетических подгрупп штаммов *B. anthracis*.

Мультилокусный анализ числа tandemных повторов

Для дифференцировки различий в VNTR-локусах использовали температуры плавления ампликонов (табл. 5). Температура плавления полученных ПЦР-фрагментов после амплификации варибельных локусов зависит от

их нуклеотидного состава, а именно от количества tandemных повторов: чем их больше, тем выше температура плавления.

Установлено, что полученные после амплификации локуса VrrA1 кривые плавления штаммов *B. anthracis* № 1 и 2 идентичны кривой плавления того же локуса референсного штамма *B. anthracis* СТИ-1 и, вероятно, содержат в локусе VrrA1 четыре tandemных повтора. Четыре штамма *B. anthracis* (№ 4–7) демонстрируют более высокую температуру плавления ампликонов в сравнении с *B. anthracis* СТИ-1, что говорит о большем количестве tandemных повторов в локусе VrrA1. В свою очередь, среди исследованных штаммов *B. anthracis* № 3 имеет самую низкую температуру плавления ампликона VrrA1 и, как следствие, отличается наименьшим количеством повторов в локусе VrrA1.

Бактерии *B. anthracis* (№ 5–7) и СТИ-1 обладают идентичными кривыми плавления ампликонов VrrB2 и содержат в локусе VrrB2 характерные для *B. anthracis* СТИ-1 три tandemных повтора. В соответствии с данными, представленными в табл. 5, следует, что остальные исследованные штаммы имеют в этом локусе меньшее количество повторов – *B. anthracis* (№ 1, 3, 4, 6), вероятно, два, а *B. anthracis* № 2 – один tandemный повтор.

Полученные результаты о кривых плавления ампликонов CG3 свидетельствуют о том, что все штаммы, кроме *B. anthracis* № 1, содержат в локусе CG3 один tandemный повтор, характерный для *B. anthracis* СТИ-1. Бактерии *B. anthracis* № 1, вероятно, несут в этом локусе несколько повторов.

Детектировано, что бактерии *B. anthracis* № 2 и 3 характеризуются идентичными с референсным штаммом температурами ампликона pXO1. Исходя из данного факта следует, что эти бактерии содержат на плазмиде pXO1 16 tandemных повторов, а остальные исследованные штаммы *B. anthracis* – более 16.

Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученные после амплификации локусов VrrB1, VrrC1 и VrrC2, не различались у изучаемых штаммов *B. anthracis*, таким образом, число повторов на данных участках ДНК идентично. Бактерии *B. anthracis* СТИ-1 содержат в этих локусах по два tandemных повтора. Исследуемые микроорганизмы демонстрируют более низкую температуру плавления ампликонов VrrB1 и VrrC2 в сравнении с референсным

штаммом и, вероятно, несут в этих локусах один повтор. Что касается локуса VtrC1, у всех изученных штаммов *B. anthracis* температура плавления ПЦР-продуктов, полученная после амплификации данного локуса, превышала значение, отмеченное для *B. anthracis* СТИ-1. Следовательно, эти штаммы несут в локусе VtrC1 три или более tandemных повтора. Количество повторов в локусе rXO2 для исследованных штаммов *B. anthracis* установить невозможно ввиду отсутствия этого маркера у бактерий *B. anthracis* СТИ-1.

Таким образом, по результатам анализа температур плавления ампликонов установлено, что штамм *B. anthracis* № 1 отличается от остальных бактерий по количеству tandemных повторов в локусе CG3, штамм № 2 – в локусах VtrB2 и rXO2, а штамм № 3 – в локусе VtrA1. Для бактерий *B. anthracis* № 1–3 выявлен уникальный профиль температур плавления ПЦР-продуктов амплификации VNTR-локусов, позволяющий различить их между собой. Три штамма *B. anthracis* (№ 5–7) демонстрируют один и тот же профиль температур плавления продуктов амплификации VNTR-локусов, поэтому их можно объединить в один кластер. Схожий с данным кластером профиль температур плавления детектирован для бактерий *B. anthracis* № 4, которые отличались от штаммов № 5–7 только по числу tandemных повторов в локусе VtrB2.

Обсуждение

За последние годы отечественными и зарубежными исследователями опубликовано значительное количество работ, посвященных разработке приемлемых подходов к генотипированию штаммов возбудителя сибирской язвы (Le Flèche et al., 2001; Keim et al., 2004; Van Ert et al., 2007; Gierczynski et al., 2009; Еременко и др., 2012; Афанасьев и др., 2014). Большинство доступных методов генотипирования *B. anthracis* основано на полиморфизме tandemных повторов или точечных мутаций их генома. Ряд исследователей считают, что тест-системы, построенные на сочетании генетических маркеров, отличающихся своей дискриминационной способностью и стабильностью, наиболее эффективны для дифференциации штаммов *B. anthracis* (Keim et al., 2004; Chang et al., 2007; Афанасьев и др., 2014). SNP-локусы являются более стабильными, но имеют в сравнении с VNTR невысокий индекс разнообразия. Поэтому при совместном использовании данных локусов рекомендуется сначала с помощью canSNP установить принадлежность изучаемых штаммов *B. anthracis* к той или иной филогенетической группе, после чего дифференцировать штаммы внутри каждого canSNP-кластера посредством MLVA-анализа (Тимофеев и др., 2018).

Универсальным подходом к анализу VNTR-локусов остается их ПЦР-амплификация с последующей визуализацией полученных ампликонов в агарозном или полиакриламидном геле (Jackson et al., 1997, 1999; Keim et al., 2000). Этот метод может быть эффективен для дифференциации нуклеотидных повторов размером более 10 п. о. (VtrA1 – 12 п. о., VtrC1 – 36 п. о., VtrC2 – 72 п. о.), но не подходит для разделения повторов в 2–3 нуклеотида (VtrB1 и VtrB2 – 9 п. о., CG3 – 5 п. н., rXO1 – 3 п. о., rXO2 – 2 п. о.). Размер большинства используемых в на-

шей работе повторов не превышает 10 п. о., следовательно, применение электрофореза для разделения изучаемых штаммов не представляется возможным. В настоящем исследовании для дифференциации аллельных вариантов VNTR-локусов, а именно количества tandemных повторов, применяли альтернативный метод – HRM-анализ. Он широко используется при генотипировании, в частности для обнаружения мутаций, полиморфизмов и эпигенетических различий в образцах двуцепочечной ДНК (Graham et al., 2005; Margraf et al., 2006). Применение HRM-анализа также позволяет проводить индикацию и дифференциацию штаммов бруцелл (Winchell et al., 2010).

Согласно данным литературы, штаммы *B. anthracis*, циркулирующие на неблагоприятных по сибирской язве территориях Российской Федерации, преимущественно относятся к А.Br.001/002, А.Br.008/009, В.Br.001/002 и А.BrAust94 генотипам (Еременко и др., 2018; Кравец и др., 2018; Котенева и др., 2019). В частности, штаммы, выделенные на административных территориях Северного Кавказа, как правило, распределяются по canSNP-кластерам А.Br.008/009 и А.BrAust94. В Республике Дагестан также встречается генотип В.Br.001/002 (Котенева и др., 2019). На территориях Сибири и Дальнего Востока чаще других выявляются штаммы, относящиеся к филогенетическим группам А.Br.001/002, А.Br.008/009 и В.Br.001/002 (Еременко и др., 2018; Кравец и др., 2018).

Отметим, что, по мнению ряда исследователей, canSNP-генотипы, вероятно, не ограничиваются описанными на сегодняшний день 14 генотипами (Афанасьев и др., 2014; Тимофеев и др., 2018). Так, в работе М.В. Афанасьева с коллегами (2014) обнаружено три дополнительные филогенетические подгруппы. Действительно, по результатам проведенного нами генетического типирования семи культур *B. anthracis* методами SNP- и MLVA-анализа установлено, что все изучаемые микроорганизмы, кроме *B. anthracis* № 1 и 3, по SNP-профилю не входили в состав основных филогенетических canSNP-подгрупп. Филогенетическая линия А.Br.003/004, к которой отнесли штамм *B. anthracis* № 1, включает преимущественно штаммы с американских континентов (Еременко и др., 2018). Среди всех исследуемых штаммов наиболее характерный для российских изолятов профиль однонуклеотидных полиморфизмов был у штамма *B. anthracis* № 3, выделенного на территории Курганской области.

Исследованные в этой работе штаммы возбудителя сибирской язвы, как правило, организованы в SNP-кластеры по своему географическому происхождению. Исключением считаются имеющие общий SNP-профиль микроорганизмы *B. anthracis* № 2 и *B. anthracis* № 4, изолированные на территории бывшей Таджикской ССР в 1972 г. и г. Ульяновска – в 2004 г. соответственно. С помощью HRM-анализа ПЦР-продуктов амплификации VNTR-локусов установлено, что данные бактерии отличаются по числу повторов в локусах VtrA1, VtrA2, rXO1 и rXO2 и, как следствие, могут быть дифференцированы между собой. Можно предположить, что эти микроорганизмы имеют общее географическое происхождение, однако с течением времени произошла их дивергенция, в частности под действием миграционных и торговых потоков. Действительно, согласно литературным данным,

VNTR-локусы характеризуются высокой скоростью мутаций (от 10^{-5} до 10^{-4} на поколение) (Keim et al., 2004; Birdsell et al., 2012; Thierry et al., 2014) и, в сравнении с SNP-локусами, являются маркерами более поздней эволюции штаммов *B. anthracis*.

Полученные для остальных исследованных штаммов HRM-профили формируют паттерны, полностью соотносящиеся с SNP-профилями. Таким образом, расширенный протокол, включающий в себя анализ SNP и VNTR, позволяет дифференцировать четыре штамма *B. anthracis*. Штаммы *B. anthracis* № 5–7 демонстрируют одинаковые SNP- и HRM-профили, и, как следствие, формируют один кластер.

Таким образом, применение HR-анализа в нашей работе позволило дифференцировать исследованные штаммы между собой и определить их в кластеры. Установлен размер повторов в локусах, температура плавления ПЦР-продуктов которых была идентична температурам плавления ампликонов тех же VNTR-локусов референсного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Однако на сегодняшний день точный размер tandemных повторов может быть определен только с помощью секвенирования. Поэтому в дальнейшем необходимо осуществить секвенирование VNTR-локусов исследованных в данной работе штаммов. Совместное использование HRM- и секвенс-анализа, на наш взгляд, в перспективе может привести к созданию базы данных кривых плавления VNTR-локусов, соотносящихся с их размером.

Заключение

Проведенные исследования показали, что использование метода HRM для анализа ПЦР-продуктов VNTR-локусов имеет большое практическое значение. В частности, этот метод можно применять для быстрой предварительной дифференциации штаммов *B. anthracis*, принадлежащих к одной вспышке инфекционного заболевания. Для наиболее результативной и информативной индикации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы нами предлагается следующий алгоритм анализа: 1) распределение исследуемых штаммов по филогенетическим подгруппам с помощью SNP-типирования; 2) дифференциация штаммов внутри каждого SNP-кластера методом MLVA с применением HRM-анализа; 3) MLVA-типирование с использованием классической ПЦР, электрофореза и секвенирования дифференцированных таким образом штаммов. Однако для более детальных ответов на вопросы о применении данной стратегии генотипирования необходимо проведение более масштабных исследований.

Список литературы / References

Афанасьев М.В., Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Такайшвили В.Е., Половинкина В.С., Балахонов С.В. Сравнительный мультилокусный VNTR- и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis*. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2014;2:36-40.
[Afanas'ev M.V., Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Takaishvili V.E., Polovinkina V.S., Balakhonov S.V. Comparative multilocus VNTR and SNP analysis of *Bacillus anthracis* vaccine strains. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2014;29(2):86-92. DOI 10.3103/S0891416814020025.]

Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Абуева А.И., Муратова Ю.О., Антонов В.А. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014;19(1):34-44.
[Bondareva O.S., Savchenko S.S., Tkachenko G.A., Abueva A.I., Muratova Yu.O., Antonov V.A. Modern approaches to the genotyping of causative agents of particularly dangerous infections. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*. 2014;1:34-44. (in Russian)]

Еременко Е.И., Писаренко С.В., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жиров А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Куличенко А.Н. Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*. *Бактериология*. 2018;3(2):57-63. DOI 10.20953/2500-1027-2018-2-57-63.
[Eremenko E.I., Pisarenko S.V., Aksenova L.Yu., Ryazanova A.G., Zhirov A.M., Semenova O.V., Bobrysheva O.V., Kovalev D.A., Kulichenko A.N. Phylogenetics, evolution, and phylogeography of *Bacillus anthracis*. *Bakteriologiya = Bacteriology*. 2018;3(2):57-63. DOI 10.20953/2500-1027-2018-2-57-63. (in Russian)]

Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Буравцева Н.П., Куличенко А.Н. Генотипическое разнообразие штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных в регионе Кавказа. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2012;2:26-29.
[Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Kulichenko A.N. Genotype diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated from the Caucasus region. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012;27(2):74-78. DOI 10.3103/S0891416812020024.]

Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Абрамович А.В. Спектр canSNP-генотипов как показатель внутривидового генетического и фенотипического разнообразия штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на Северном Кавказе и сопредельных территориях. *Мед. вестник Северного Кавказа*. 2019;14(4):580-582. DOI 10.14300/mnnc.2019.14144.
[Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Abramovich A.V. The spectrum of canSNP genotypes as an indication of intraspecific genetic and phenotypic diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated in North Caucasus and in neighboring areas. *Meditsinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*. 2019;14(4):580-582. DOI 10.14300/mnnc.2019.14144. (in Russian)]

Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Такайшвили В.Е., Иванова Т.А., Чеснокова М.В., Балахонов С.В. Изучение биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов *Bacillus anthracis*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока (1959–2013 гг.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018;3:54-59. DOI 10.21055/0370-1069-2018-3-54-59.
[Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Takaishvili V.E., Ivanova T.A., Chesnokova M.V., Balakhonov S.V. Biological and molecular properties of *Bacillus anthracis* strains isolated in Siberia and the Russian Far East (1959–2013). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2018;3:54-59. DOI 10.21055/0370-1069-2018-3-54-59. (in Russian)]

Логвин Ф.В., Кондратенко Т.А., Водяницкая С.Ю. Сибирская язва в мире, странах СНГ и Российской Федерации (обзор литературы). *Мед. вестник Юга России*. 2017;8(3):17-22. DOI 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.
[Logvin F.V., Kondratenko T.A., Vodyanitskaya S.Y. Anthrax in the world, CIS, and Russian Federation (literature review). *Meditsinskiy Vestnik Yuga Rossii = Medical Herald of the South of Russia*. 2017;8(3):17-22. DOI 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.]

МУК 4.2.2941-11 Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.
[MUK 4.2.2941-11 Organization and Protocol of Anthrax Laboratory Diagnostics in Municipal, Regional, and Federal Laboratories:

- Methodological Guidelines. Moscow: Rospotrebnadzor Federal Hygiene and Epidemiology Center, 2011. (in Russian)]
- Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Дятлов И.А. Генотипирование *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов. *Генетика*. 2018;54(1):3-14. DOI 10.7868/S0016675818010113. [Timofeev V.S., Bakhteeva I.V., Dyatlov I.A. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. *Russ. J. Genet.* 2018;54(1):1-11. DOI 10.1134/S1022795418010118.]
- Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008;62:53-70. DOI 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832.
- Birdsell D.N., Pearson T., Price E.P., Hornstra H.M., Nera R.D., Stone N., Gruendike J., Kaufman E.L., Pettus A.H., Hurbon A.N., Buchhagen J.L., Harms N.J., Chanturia G., Gyuranecz M., Wagner D.M., Keim P.S. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays Melt-MAMA: a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI 10.1371/journal.pone.0032866.
- Chang C.H., Chang Y.C., Underwood A. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(Database issue):D416-D421. DOI 10.1093/nar/gkl872.
- Derzelle S., Laroche S., Le Flèche P., Hauck Y., Thierry S., Vergnaud G., Madani N. Characterization of genetic diversity of *Bacillus anthracis* in France by using high-resolution melting assays and multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(12):4286-4292. DOI 10.1128/JCM.05439-11.
- Gierczynski R., Jackubczak A., Jagielski M. Extended multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 2009;58(1):3-7.
- Graham R., Liew M., Meadows C., Lyon E., Wittwer C.T. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clin. Chem.* 2005;51(7):1295-1298. DOI 10.1373/clinchem.2005.051516.
- Hugh-Jones M., Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(6):356-367. DOI 10.1016/j.mam.2009.08.03.
- Jackson P.J., Hill K.K., Laker M.T., Ticknor L.O., Keim P. Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J. Appl. Microbiol.* 1999;87(2):263-269. DOI 10.1046/j.1365-2672.1999.00884.x.
- Jackson P.J., Walthers E.A., Kalif A.S., Richmond K.L., Adair D.M., Hill K.K., Kuske C.R., Andersen G.L., Wilson K.H., Hugh-Jones M., Keim P. Characterization of the variable-number tandem repeats in *virA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(4):1400-1405. DOI 10.1128/aem.63.4.1400-1405.1997.
- Keim P., Gruendike J.M., Klevytska A.M., Schupp J., Challacombe J., Okinaka R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(6):397-405. DOI 10.1016/j.mam.2009.08.005.
- Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000;182(10):2928-2936. DOI 10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000.
- Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.* 2004;4(3):205-213. DOI 10.1016/j.meegid.2004.02.005.
- Kenefic L., Pearson T., Okinaka R., Schupp J., Wagner D., Ravel J., Hoffmaster A., Trim C.P., Chung W.-K., Beaudry J.A., Foster J., Mead J., Keim P. Pre-Columbian origins for North American anthrax. *PLoS One*. 2009;4(3):e4813. DOI 10.1371/journal.pone.0004813.
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Rammisse V., Sylvestre P., Benson G., Rammisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001;1:2. DOI 10.1186/1471-2180-1-2.
- Margraf R.L., Mao R., Highsmith W.E., Holtegaard L.M., Wittwer C.T. Mutation scanning of the RET protooncogene using high-resolution melting analysis. *Clin. Chem.* 2006;52(1):138-141. DOI 10.1373/clinchem.2005.052951.
- Pisarenko S.V., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Kovalev D.A., Buravtseva N.P., Aksenova L.Yu., Dugarzhapova Z.F., Evchenko A.Yu., Kravets E.V., Semenova O.V., Bobrisheva O.V., Kuznetsova I.V., Golovinskaya T.M., Volynkina A.S., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N. Phylogenetic analysis of *Bacillus anthracis* strains from Western Siberia reveals a new genetic cluster in the global population of the species. *BMC Genomics.* 2019;20(1):692. DOI 10.1186/s12864-019-6060-z.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986;51(5):873-884. DOI 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
- Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy Ch., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of french *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014;9(6):e95131. DOI 10.1371/journal.pone.0095131.
- Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007;2(5):e461. DOI 10.1371/journal.pone.0000461.
- Wang D., Wang B., Zhu L., Wu S., Lyu Y., Feng E., Pan C., Jiao L., Cui Y., Liu X., Wang H. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis. *Microbiol. Res.* 2020;233:126414. DOI 10.1016/j.micres.2020.126414.
- Winchell J.M., Wolff B.J., Tiller R., Bowen M.D., Hoffmaster A.R. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(3):697-702. DOI 10.1128/JCM.02021-09.

ORCID ID

Е.А. Анисимова orcid.org/0000-0002-0416-6193
Н.А. Фахрутдинов orcid.org/0000-0002-6522-7930
Д.А. Миргазов orcid.org/0000-0002-4709-314X
Е.А. Додонова orcid.org/0000-0002-6919-4064

И.А. Елизарова orcid.org/0000-0003-0802-435X
М.Е. Горбунова orcid.org/0000-0002-0707-2117
Н.И. Хаммадов orcid.org/0000-0001-5669-1486
Л.И. Зайнуллин orcid.org/0000-0002-3086-4921
К.А. Осянин orcid.org/0000-0003-2763-8605

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.03.2022. После доработки 28.06.2022. Принята к публикации 28.06.2022.

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

Влияние колхицина на физиолого-биохимические свойства *Rhodococcus qingshengii*

Ю.А. Маркова¹✉, Л.А. Беловежец², В.Н. Нурминский¹, И.С. Капустина¹, Н.В. Озолина¹, В.В. Гурина¹,
А.Л. Ракевич³, А.В. Сидоров¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

³ Иркутский филиал Института лазерной физики Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ juliam06@mail.ru

Аннотация. Род *Rhodococcus* объединяет полиморфные неспорообразующие грамположительные бактерии, относящиеся к классу Actinobacteria. *Rhodococcus* вместе с *Mycobacterium* и *Corynebacterium* входят в группу Mycolata. Благодаря относительно высокой скорости роста и способности к образованию биопленок, *Rhodococcus* являются удобной моделью для изучения действия биологически активных соединений на патогенные *Mycolata*. Ранее было показано, что колхицин угнетал образование биопленок у *P. carotovorum* VKM B-1247 и *R. qingshengii* VKM Ac-2784D. Целью настоящей работы было изучение действия колхицина на жирнокислотный состав и микровязкость мембран *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D для понимания механизма действия этого алкалоида на бактериальную клетку. В качестве положительного контроля использовали нистатин, снижающий микровязкость мембран. Установлено, что колхицин в концентрациях 0.01 и 0.03 г/л и нистатин (0.03 г/л) не оказали существенного влияния на выживаемость *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, культивируемого в забуференном физиологическом растворе глюкозы (ЗФРГ). Однако колхицин (0.03 г/л) значительно угнетал образование биопленки. Клетки *Rhodococcus*, культивируемые в течение суток в ЗФРГ с колхицином, приобретали округлую форму. Колхицин в концентрации 0.01 г/л вызывал увеличение жирных кислот C16:1(n-7), C17:0, C20:1(n-9) и C21:0. Микровязкость мембраны отдельных клеток распределялась от максимально низких до максимально высоких значений показателя обобщенной поляризации флуоресценции лаурдана (GP), что свидетельствует о разнообразии адаптационных ответов на этот алкалоид. При более высокой концентрации колхицина (0.03 г/л) в мембранах клеток *R. qingshengii* VKM Ac-2784D увеличивалось содержание насыщенных жирных кислот и падало – разветвленных. Это способствовало увеличению микровязкости мембраны, что подтверждается данными по GP. Таким образом, колхицин индуцирует перестройку клеточной мембраны *Rhodococcus*, вероятно, в сторону увеличения ее микровязкости, что может быть одной из причин негативного действия колхицина на образование биопленок *R. qingshengii* VKM Ac-2784D.

Ключевые слова: *Rhodococcus qingshengii*; колхицин; биопленки; жирные кислоты; микровязкость мембран.

Для цитирования: Маркова Ю.А., Беловежец Л.А., Нурминский В.Н., Капустина И.С., Озолина Н.В., Гурина В.В., Ракевич А.Л., Сидоров А.В. Влияние колхицина на физиолого-биохимические свойства *Rhodococcus qingshengii*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):568-574. DOI 10.18699/VJGB-22-69

Effect of colchicine on physiological and biochemical properties of *Rhodococcus qingshengii*

Yu.A. Markova¹✉, L.A. Belovezhets², V.N. Nurminsky¹, I.S. Kapustina¹, N.V. Ozolina¹, V.V. Gurina¹,
A.L. Rakevich³, A.V. Sidorov¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

³ Irkutsk Branch of the Institute of Laser Physics, The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ juliam06@mail.ru

Abstract. The genus *Rhodococcus* includes polymorphic non-spore-forming gram-positive bacteria belonging to the class Actinobacteria. Together with *Mycobacterium* and *Corynebacterium*, *Rhodococcus* belongs to the Mycolata group. Due to their relatively high growth rate and ability to form biofilms, *Rhodococcus* are a convenient model for studying the effect of biologically active compounds on pathogenic *Mycolata*. Colchicine was previously found to reduce biofilm formation by *P. carotovorum* VKM B-1247 and *R. qingshengii* VKM Ac-2784D. To understand the mechanism of action of this alkaloid on the bacterial cell, we have studied the change in the fatty acid composition and microviscosity of the *R. qingshengii* VKM Ac-2784D membrane. Nystatin, which is known to reduce membrane microviscosity, is used as a positive control. It has been found that colchicine at concentrations of 0.01 and 0.03 g/l and nystatin (0.03 g/l) have no significant effect on the survival of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D cultivated in a buffered saline solution with 0.5 % glucose (GBSS). However, colchicine (0.03 g/l) significantly inhibits biofilm formation. *Rhodococcus* cells cultivated for 24 hours in GBSS with colchicine acquire a rounded shape. Colchicine at 0.01 g/l concen-

tration increases C16:1(n-7), C17:0, C20:1(n-9) and C21:0 fatty acids. The microviscosity of the membrane of individual cells was distributed from the lowest to the highest values of the generalized laurdan fluorescence polarization index (GP), which indicates a variety of adaptive responses to this alkaloid. At a higher concentration of colchicine (0.03 g/l) in the membranes of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D cells, the content of saturated fatty acids increases and the content of branched fatty acids decreases. This contributes to an increase in membrane microviscosity, which is confirmed by the data on the GP fluorescence of laurdan. All of the above indicates that colchicine induces a rearrangement of the *Rhodococcus* cell membrane, probably in the direction of increasing its microviscosity. This may be one of the reasons for the negative effect of colchicine on the formation of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D biofilms.

Key words: *Rhodococcus qingshengii*; colchicine; biofilms; fatty acids; membrane microviscosity.

For citation: Markova Yu.A., Belovezhets L.A., Nurminsky V.N., Kapustina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Rakevich A.L., Sidorov A.V. Effect of colchicine on physiological and biochemical properties of *Rhodococcus qingshengii*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):568-574. DOI 10.18699/VJGB-22-69

Введение

Род *Rhodococcus* объединяет полиморфные неспорообразующие грамположительные бактерии, относящиеся к классу Actinobacteria. *Rhodococcus* широко распространены в окружающей среде, включая живые организмы. Одна из важных особенностей этих микроорганизмов – способность разлагать органические соединения с разной химической структурой, в том числе поллютанты (полициклические ароматические углеводороды, ПАУ, бифенилы, алканы и др.) (Szőköi et al., 2014; Li et al., 2016). На этом основан растущий интерес к *Rhodococcus* как к ценным биотехнологическим видам.

Rhodococcus вместе с *Mycobacterium* и *Corynebacterium* относятся к группе Mycolata, которая характеризуется наличием миколовых кислот на клеточной стенке (Sutcliffe, 1998). Эта особенность делает их более устойчивыми к токсичным соединениям, таким как дезинфектанты, антибиотики или ПАУ. В отличие от мико- и коринебактерий, большинство видов *Rhodococcus* непатогенные. Поэтому благодаря относительно высокой скорости роста и способности к образованию биопленок *Rhodococcus* являются удобной моделью для изучения действия биологически активных соединений на патогенные *Mycolata*.

Целостность микробиологической клетки обеспечивает цитоплазматическая мембрана. Чтобы выжить в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды и поддерживать оптимальную текучесть мембраны, бактерии изменяют жирнокислотный состав мембранных липидов (Dubois-Brissonnet et al., 2016). Клеточная мембрана – основная мишень токсичности неполярных органических растворителей (de Carvalho et al., 2005). Растительные метаболиты тоже влияют на мембрану, ингибируя активность эффлюкс-каналов (Tegos et al., 2002), содержание белков-поринов (Abreu et al., 2012) и т. д.

Ранее мы выявили, что алкалоид колхицин в концентрации 0.25 г/л супрессировал образование биопленки видами *Pectobacterium carotovorum* VKM B-1247 и *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D (Быбин и др., 2018). При этом негативное влияние на жизнеспособность этих бактерий не обнаружено. Колхицин широко известен как алкалоид, нарушающий полимеризацию тубулина у эукариотических клеток (Zhang et al., 2018). Возможно, по отношению к микроорганизмам он выполняет аналогичную функцию, воздействуя на цитоскелет и препятствуя адгезии микробных клеток (Dubey et al., 2011). Однако его влияние на микробные клетки практически не изучено. Это обусловило наш интерес к данному соединению.

Цель настоящей работы состояла в изучении действия колхицина на жирнокислотный состав и микровязкость мембран *R. qingshengii* VKM Ac-2784D.

Материалы и методы

В исследовании использовали штамм *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, выделенный нами из ризосферы пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Nevski), произрастающего на нефтезагрязненной территории Иркутской области (Россия) (Petrushin et al., 2021). Этот штамм *Rhodococcus* характеризуется стабильно высоким формированием биопленок, поэтому считается хорошей моделью для их изучения.

Бактерии культивировали на БТН-агаре (ООО «Биотехновация», Россия) в течение 48 ч при 26 °С. Затем переносили на забуференный физиологический раствор с 0.5 % глюкозы (ЗФРГ) и доводили плотность суспензии до ОП₅₉₅ 0.26–0.33.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) колхицина для *R. qingshengii* VKM Ac-2784D определяли методом предельных разведений (Руководство..., 2000).

Для оценки влияния нистатина и колхицина на кинетику роста и образование биопленки 150 мкл бактериальной суспензии вносили в лунки стерильных плоскодонных 96-луночных планшетов и измеряли оптическую плотность (ОП) в первые, третьи и восьмые сутки культивирования с помощью планшетного ридера iMark (Bio-Rad, США), λ = 595 нм. Планшет отмывали от слабо прикрепившихся клеток. Осадок окрашивали 1 % раствором кристаллического фиолетового в течение 45 мин. Затем после трехкратного промывания для экстрагирования краски в лунки добавляли по 200 мкл 96 % этанола. Уровень экстракции (абсорбции) кристаллического фиолетового этанолом измеряли с помощью планшетного ридера iMark (Bio-Rad) при длине волны 595 нм в единицах оптической плотности (ед. ОП₅₉₅). Степень образования биопленки соответствовала интенсивности окрашивания красителем содержимого лунок (Шагинян и др., 2007).

В работе использовали два контроля. Одним из них были бактерии, культивируемые в ЗФРГ без добавления колхицина. Вторым контролем служили бактерии, выросшие в среде с добавлением 0.03 г/л нистатина (ОАО «Бисинтез», Пенза, Россия), так как нистатин обладает способностью снижать микровязкость клеточных мембран. Колхицин (Sigma-Aldrich, США) был в концентрациях 0.01 и 0.03 г/л. При построении графиков применяли показатель относительной оптической плотности в про-

центрах к контролю. Размеры клеток оценивали с помощью программы AxioVision Rel. 4.8.

Для определения жирнокислотного состава бактериальной мембраны и упорядоченности (микровязкости, текучести) ее липидной фазы бактерии культивировали в вышеуказанных средах в течение суток. Упорядоченность липидов мембран оценивали по обобщенной поляризации (GP) флуоресценции липофильного зонда лаурдан в каждом пикселе, соответствующем светящейся области изображения. Для окрашивания препаратов в каждую пробирку вносили 10 мкМ метанольного раствора лаурдана (2-(диметиламино)-6-додеканоилнафталин) (Sigma-Aldrich). Живые окрашенные бактерии наблюдали под микроскопом (лазерный сканирующий конфокальный флуоресцентный микроскоп MicroTime 200; PicoQuant GmbH, Германия).

При анализе данных распределения величин GP визуализировали в виде гистограмм. Для каждой гистограммы строили теоретическое многомодальное распределение как суперпозицию (наложение) нескольких нормальных распределений (Нурминский и др., 2017). Далее делали оценку формы (подгонку параметров) экспериментальных распределений значений GP бактериальных мембран. Модельное распределение представляло собой нормальное распределение или смесь распределений и, таким образом, состояло из одной или нескольких компонент (составляющих). В результате анализа осуществляли подбор оптимальных параметров компонент, наиболее близко подходящих к экспериментальному распределению.

Для определения состава жирных кислот (ЖК) бактерии культивировали аналогичным образом без добавления лаурдана. Экстракцию липидов осуществляли по методу (Bligh, Dyer, 1959). К экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1 % метанольный раствор H_2SO_4 и нагревали на водяной бане при 60 °C в течение 30 мин. После охлаждения трижды экстрагировали гексаном (Christie, 1993). Метилловые эфиры ЖК анализировали с помощью хроматомасс-спектрометра Agilent Technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Детектор – масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа применяли режим регистрации полного ионного тока. Для разделения экстракта использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль; подвижная фаза – гелий; скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя – 250 °C, источника ионов – 230 °C, детектора – 150 °C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, – 280 °C. Диапазон сканирования – 41–450 а. е. м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков – 5:1. Хроматографию выполняли в изотермическом режиме при 200 °C. Для идентификации пиков метилловых эфиров ЖК использовали стандарты метилловых эфиров (Sigma-Aldrich) и метод масс-спектрометрии с помощью библиотеки масс-спектров NIST 05 (Озолина и др., 2017). Содержание отдельных ЖК рассчитывали как процент к общему количеству ЖК и разделяли на группы: насыщенные (НЖК), мононенасыщенные (МНЖК), полиненасыщенные (ПНЖК), насыщенные *iso*- и *anteiso*-

метил разветвленные жирные кислоты (РЖК) (Rodrigues, de Carvalho, 2015).

Достоверность различий биоупленкообразования и количественного содержания жирных кислот оценивали по непараметрическому критерию Крускала–Уоллиса с поправкой Даннета (Гланц, 1998). Все расчеты проводили с помощью программы RStudio.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что МИК колхицина для *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D равна 0.02 г/л, поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали концентрации ниже и выше этого значения, 0.01 и 0.03 г/л соответственно. Выбранные концентрации колхицина и нистатина не оказали значимого влияния на рост *Rhodococcus* (рис. 1). В то же время было установлено, что колхицин в концентрации 0.03 г/л существенно угнетал образование биоупленки на всех этапах эксперимента, а в концентрации 0.01 г/л оказал разнонаправленное действие. Нистатин в первые сутки стимулировал формирование биоупленки, на третьи и восьмые сутки культивирования его влияние было сопоставимо с контролем (рис. 2).

Культивирование *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D в присутствии колхицина в течение суток привело к значимому изменению морфологии клетки в сторону более округлой формы (табл. 1). При этом мы наблюдали неоднород-

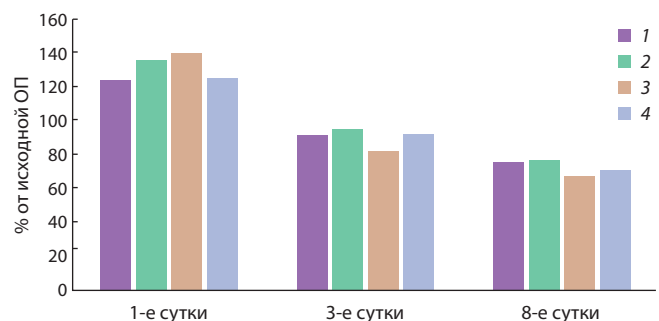


Рис. 1. Оптическая плотность суспензии клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D относительно контроля, %, в первые, третьи и восьмые сутки культивирования.

Здесь и на рис. 2: 1 – ЗФРГ; 2 – ЗФРГ с 0.03 г/л колхицина; 3 – ЗФРГ с 0.01 г/л колхицина; 4 – ЗФРГ с 0.03 г/л нистатина.

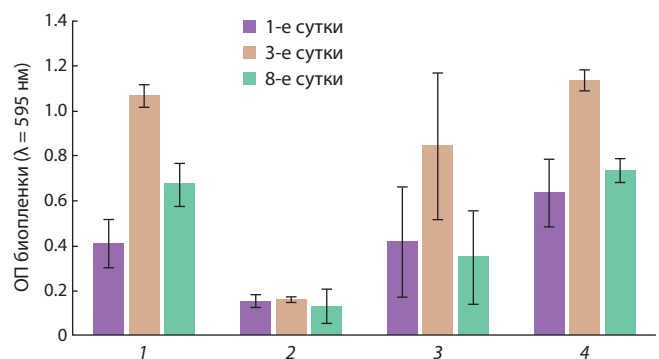


Рис. 2. Оптическая плотность биоупленки *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D в первые, третьи и восьмые сутки культивирования.

Таблица 1. Размеры клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D через сутки культивирования в контрольных условиях и в присутствии исследуемых соединений

| Вариант | Длина, нм | Ширина, нм | Длина/ширина |
|--------------------|--------------|-------------|--------------|
| Контроль | 1.35 ± 0.29 | 0.56 ± 0.08 | 2.42 |
| Колхицин, 0.01 г/л | 1.04 ± 0.23* | 0.58 ± 0.1 | 1.78* |
| Нистатин, 0.03 г/л | 1.46 ± 0.36 | 0.68 ± 0.14 | 2.12 |

* $p < 0.05$.

ность внутриклеточного содержимого (рис. 3), что согласуется с результатами, полученными для *Bacillus megaterium* (Dubey et al., 2011). Форма клеток *Rhodococcus* под действием нистатина не изменялась.

Изменение морфологии клетки, как правило, сопровождается структурно-функциональной перестройкой их клеточных мембран (de Carvalho et al., 2014). При этом происходит изменение степени насыщенности ЖК, их длины, а также количества разветвленных жирных кислот.

Мембраны клеток *Rhodococcus* в контрольных условиях содержали преимущественно пальмитиновую, стеариновую и олеиновую кислоты (табл. 2). Отношение насыщенных кислот к мононенасыщенным жирным кислотам

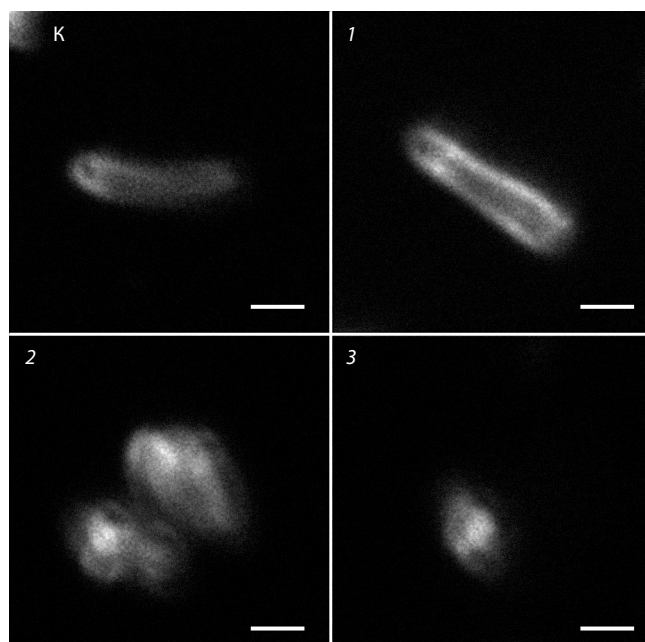


Рис. 3. Морфология клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D при культивировании в течение суток в забуференном физиологическом растворе с глюкозой (5 г/л) (К) и при внесении 0.03 г/л нистатина (1), 0.01 г/л колхицина (2), 0.03 г/л колхицина (3).

Окрашивание лаурданом. Увеличение × 600.

Таблица 2. Состав жирных кислот мембран клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D, культивируемых в течение суток в ЗФРГ, в присутствии колхицина (0.03 и 0.01 г/л) и нистатина (0.03 г/л)

| Жирная кислота | Контроль | Концентрация алкалоидов, г/л | | |
|--------------------------------|--------------|------------------------------|---------------------|----------------------|
| | | Колхицин 0.03 | Колхицин 0.01 | Нистатин 0.03 |
| Лауриновая C12:0 | – | – | – | 0.76 ± 0.04 |
| Миристиновая C14:0 | 4.76 ± 0.38 | 6.09 ± 0.02 | 5.45 ± 0.26 | 4.89 ± 0.02 |
| Пентадекановая C15:0 | 1.99 ± 0.22 | 2.36 ± 0.32 | 2.25 ± 0.01 | 1.60 ± 0.06 |
| Антеизо-пентадекановая C15:0-а | – | – | – | 1.08 ± 0.03 |
| Пальмитиновая C16:0 | 36.76 ± 3.52 | 34.58 ± 0.33 | 32.27 ± 2.10 | 27.98 ± 0.48* |
| Изопальмитиновая C16:0-і | – | – | – | 1.63 ± 0.04 |
| Пальмитолеиновая C16:1(n-9) | 5.16 ± 1.05 | 3.78 ± 0.35 | 4.50 ± 0.14 | 3.53 ± 0.21 |
| C16:1(n-7) | 1.31 ± 0.14 | 2.33 ± 0.35 | 3.11 ± 0.36* | 2.21 ± 0.28 |
| C16:1(n-9) | – | – | – | 4.78 ± 0.17 |
| C16:1(n-5) | 2.30 ± 0.26 | 2.06 ± 0.09 | 3.79 ± 1.04 | – |
| Гептадекановая C17:0 | 1.26 ± 0.14 | 1.35 ± 0.03 | 1.60 ± 0.11* | 1.28 ± 0.05 |
| Антеизо-гептадекановая C17:0-а | 0.84 ± 0.23 | 1.23 ± 0.03* | 0.72 ± 0.16 | 0.83 ± 0.09 |
| Стеариновая C18:0 | 12.09 ± 0.19 | 14.80 ± 0.25 | 10.15 ± 0.21 | 13.91 ± 0.29 |
| Олеиновая C18:1(n-9) | 25.79 ± 2.42 | 24.24 ± 0.24 | 28.46 ± 1.10 | 30.29 ± 0.09* |
| C18:1(n-7) | 1.36 ± 0.11 | 0.89 ± 0.02 | 2.33 ± 0.13 | 0.59 ± 0.13 |
| Линолевая C18:2(n-6) | 4.41 ± 0.61 | 1.54 ± 0.01 | 2.01 ± 0.49 | 2.33 ± 0.05 |
| Арахидиновая C20:0 | 0.99 ± 0.08 | 1.55 ± 0.01* | 1.16 ± 0.01 | 0.86 ± 0.00 |
| C20:1(n-9) | – | 0.46 ± 0.04 | 0.36 ± 0.01 | 0.27 ± 0.00 |
| Генэйкозановая C21:0 | – | 0.48 ± 0.09 | 0.44 ± 0.09 | 0.26 ± 0.03 |
| Бегеновая C22:0 | 1.10 ± 0.13 | 2.28 ± 0.19 | 1.40 ± 0.03 | 0.92 ± 0.17 |

* $p < 0.05$.

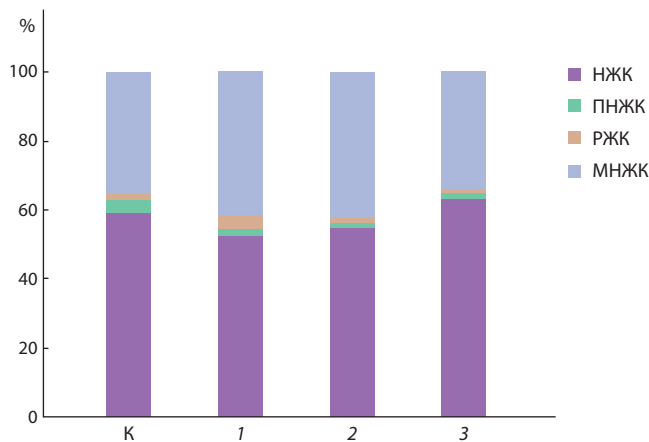


Рис. 4. Относительное содержание основных групп жирных кислот при культивировании в течение суток в забуференном физиологическом растворе с глюкозой (5 г/л) (К) и при внесении 0.03 г/л нистатина (1), 0.01 г/л колхицина (2), 0.03 г/л колхицина (3).

НЖК – насыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; РЖК – разветвленные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты.

составляло 1.64. Доля полиненасыщенных и разветвленных кислот была невелика (4.41 и 0.84 % соответственно). Колхицин в концентрации 0.01 г/л способствовал изменению соотношения насыщенных и мононенасыщенных ЖК (1.29) в сторону последних, параллельно снижая количество полиненасыщенных ЖК. В то же время количество длинноцепочечных ЖК C20:1(n-9), C21:0 и C22:0 увеличивалось. В присутствии 0.03 г/л колхицина возрастало относительное содержание насыщенных и разветвленных ЖК (рис. 4), при этом отношение НЖК к МНЖК достигало 1.89. Все это свидетельствует о перестройке мембраны *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D в ответ на присутствие колхицина в среде культивирования. Интересно, что различные концентрации колхицина оказывали прямо противоположное влияние на состав ЖК клеточной

мембраны. Вероятно, это связано с разной степенью нарушения систем регуляции. Внесение нистатина как соединения, достоверно увеличивающего текучесть мембран, сопровождалось возрастанием количества ненасыщенных и разветвленных ЖК при значительном снижении содержания пальмитиновой и увеличении олеиновой ЖК.

Текучесть (микровязкость) мембран – интегральный показатель, зависящий от насыщенности липидов, содержания стерина и белков. Поэтому на следующем этапе исследования было определено влияние колхицина и нистатина на упорядоченность липидной фазы мембраны *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D. Для этого использовали показатель GP флуоресценции лаурдана, который может принимать значения в диапазоне от -1 до +1. Его отрицательные значения соответствуют меньшей микровязкости (большей текучести) клеточной мембраны (Нурминский и др., 2015) (см. Материалы и методы).

Подгонка экспериментальных распределений значений GP бактериальных мембран позволила выявить от одной до четырех компонент при влиянии нистатина и колхицина (рис. 5). Наиболее весомая компонента во всех вариантах – компонента, характеризующая жидко-неупорядоченные области мембраны (α : (средние значения GP): -0.16–0.04, вклад: 73.9–100 %), что соответствует известному механизму действия данного антибиотика на мембраны эу- и прокариот (Ефимова и др., 2014). Колхицин, наоборот, способствовал повышению упорядоченности мембран, α самых весомых компонент хоть и незначительно, но сместились в сторону положительных значений, по сравнению с контролем, в обоих вариантах концентраций (α : 0.04, вклад: 73.9–89.4 %), что согласуется с наблюдаемым нами увеличением количества насыщенных ЖК. Однако при этом существенно усилился разброс данных и количество компонент увеличилось до 2 (в варианте с 0.01 мг/мл) и до 4 (в варианте с 0.03 мг/мл). Минорные компоненты соответствовали более плотноупакованным участкам мембран (α : 0.29, вклад: 1.8 %) или, наоборот, менее плотноупакованным (α : -0.29, вклад: 6.7 %).

а

| Вариант | Компонента | Среднее GP, α | Стандартное отклонение, σ | Вклад, % |
|---------------------|------------|----------------------|----------------------------------|----------|
| Контроль | 1 | 0.01 | 0.16 | 100 |
| Нистатин | 1 | -0.16 | 0.17 | 100 |
| Колхицин, 10 мкг/мл | 1 | -0.08 | 0.24 | 26.1 |
| | 2 | 0.04 | 0.16 | 73.9 |
| Колхицин, 30 мкг/мл | 1 | -0.19 | 0.03 | 2.1 |
| | 2 | 0.04 | 0.18 | 89.4 |
| | 3 | 0.29 | 0.02 | 1.8 |
| | 4 | -0.29 | 0.11 | 6.7 |

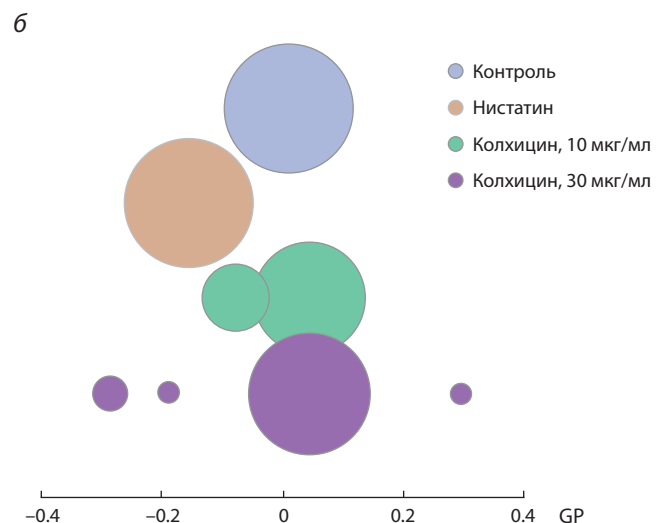


Рис. 5. Влияние нистатина и колхицина на параметры компонент распределений значений GP мембран *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D (а) и сопоставление компонент на пузырьковой диаграмме (б). Площадь круга отражает величину вклада каждой компоненты, $n = 10-26$.

Заклучение

Таким образом, колхицин в составе ЗФРГ в концентрациях 0.01 и 0.03 г/л не оказал существенного влияния на выживаемость *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D, но при этом значительно угнетал образование биопленки. Клетки *Rhodococcus*, культивируемые в течение суток в ЗФРГ с колхицином, приобретали округлую форму. В присутствии 0.01 г/л колхицина увеличилось содержание С16:1(n-7), С17:0, С20:1(n-9) и С21:0 жирных кислот.

Микровязкость мембраны отдельных клеток распределяется от максимально низких до максимально высоких показателей GP, что свидетельствует о разнообразии адаптационных ответов на данный алкалоид. При более высокой концентрации колхицина (0.03 г/л) в мембранах клеток *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D увеличивалось содержание насыщенных жирных кислот и падало содержание разветвленных жирных кислот. В результате микровязкость мембраны увеличивалась, что подтверждалось данными по GP флуоресценции лаурдана. Результаты свидетельствуют об адаптивной перестройке клеточной мембраны под действием исследуемого алкалоида, что согласуется с другими исследованиями (Wang et al., 2020). Это может быть одной из причин негативного действия колхицина на образование биопленок *R. qingshengii* ВКМ Ас-2784D.

Список литературы / References

- Быбин В.А., Турская А.Л., Максимова Л.А., Маркова Ю.А. Оценка влияния ряда алкалоидов на биопленкообразование бактерий разных видов. В: Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Иркутск: Институт географии им. В.Б. Сочавы Сибирского отделения Российской академии наук, 2018;1206-1209. DOI 10.31255/978-5-94797-319-8-1206-1209.
- [Bybin V.A., Turskaya A.L., Maksimova L.A., Markova Yu.A. Evaluation of the influence of some alkaloids on biofilm formation by different bacterial species. In: Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Plant Physiologists of Russia, the All-Russia Scientific Conference with International Participation, and the School of Young Scientists. Irkutsk: Sochava Institute of Geography of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018;1206-1209. DOI 10.31255/978-5-94797-319-8-1206-1209. (in Russian)]
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. [Glantz S. Primer of Biostatistics. McGraw-Hill Publ., 1991. (Russ. ed.): Glantz S. Mediko-Biologicheskaya Statistika. Moscow: Praktika Publ., 1998.]
- Ефимова С.С., Щагина Л.В., Остроумова О.С. Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов. *Acta Naturae*. 2014;6(4(23)):72-85.
- [Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Investigation of channel-forming activity of polyene macrolide antibiotics in planar lipid bilayers in the presence of dipole modifiers. *Acta Naturae*. 2014;6(4(23)):67-79. DOI 10.32607/20758251-2014-6-4-67-79.]
- Нурминский В.Н., Нестеркина И.С., Спиридонова Е.В., Ракевич А.Л., Озолина Н.В. Выявление стерин-содержащих доменов вакуолярной мембраны методом конфокальной микроскопии. *Биол. мембраны*. 2017;34(4):307-312. DOI 10.7868/S0233475517040065.
- [Nurminsky V.N., Nesterkina I.S., Spiridonova E.V., Ozolina N.V., Rakevich A.L. Identification of sterol-containing domains in vacuolar membranes by confocal microscopy. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2017;11(4):296-300. DOI 10.1134/S1990747817040080.]
- Нурминский В.Н., Ракевич А.Л., Мартынович Е.Ф., Озолина Н.В., Нестеркина И.С., Колесникова Е.В., Пилипченко А.А., Салыев Р.К., Чернышов М.Ю. Особенности структуры вакуоли растительной клетки, выявленные с помощью конфокальной микроскопии. *Цитология*. 2015;57(6):443-451.
- [Nurminsky V.N., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Pilipchenko A.A., Chernyshov M.Y. Peculiar properties of some components in a plant cell vacuole morphological structure revealed by confocal microscopy. *Cell Tiss. Biol*. 2015;9(5):406-414. DOI 10.1134/S1990519X15050090.]
- Озолина Н.В., Гурина В.В., Нестеркина И.С., Дударева Л.В., Катышев А.И., Нурминский В.Н. Жирнокислотный состав общих липидов вакуолярной мембраны при абиотическом стрессе. *Биол. мембраны*. 2017;34(1):63-69. DOI 10.7868/S0233475517010078.
- [Ozolina N.V., Gurina V.V., Nesterkina I.S., Dudareva L.V., Katshev A.I., Nurminsky V.N. Fatty acid composition of total lipids in vacuolar membrane under abiotic stress. *Biologicheskije Membrany = Biological Membranes*. 2017;34(1):63-69. DOI 10.7868/S0233475517010078. (in Russian)]
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум, 2000. [Guidelines for the Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Moscow: Remedium Publ., 2000. (in Russian)]
- Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Битов А.Б. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007;1:3-9.
- [Shaginyan I.A., Danilina G.A., Chernukha M.Yu., Alekseeva G.V., Batov A.B. Biofilm formation by strains of *Burkholderia cepacia* complex in dependence of their phenotypic and genotypic characteristics. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology*. 2007;1:3-9. (in Russian)]
- Abreu A.C., McBain A.J., Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep*. 2012;29(9):1007-1021. DOI 10.1039/c2np20035j.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 1959;37:911-917.
- Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Christie W.W. *Advances in Lipid Methodology – Two*. Dundee: Oily Press, 1993;69-111.
- de Carvalho C.C., Marques M.P., Hachicho N., Heipieper H.J. Rapid adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to salt stress by synthesizing polyunsaturated fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2014;98(12):5599-5606. DOI 10.1007/s00253-014-5549-2.
- de Carvalho C.C., Parreño-Marchante B., Neumann G., Da Fonseca M.M.R., Heipieper H.J. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2005;67(3):383-388. DOI 10.1007/s00253-004-1750-z.
- Dubey K.K., Jawed A., Haque S. Structural and metabolic correlation for *Bacillus megaterium* ACBT03 in response to colchicine biotransformation. *Microbiology*. 2011;80(6):758-767. DOI 10.1134/S0026261711060099.
- Dubois-Brissonnet F., Trotier E., Briandet R. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Front. Microbiol*. 2016;7:1673. DOI 10.3389/fmicb.2016.01673.

- Li C., Zhang C., Song G., Liu H., Sheng G., Ding Z., Wang Z., Sun Y., Xu Y., Chen J. Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster in *Rhodococcus ruber* OA1 involved in naphthalene degradation. *Ann. Microbiol.* 2016;66(1):469-478. DOI 10.1007/s13213-015-1132-z.
- Petrushin I.S., Markova Yu.A., Karepova M.S., Zaytseva Yu.V., Belovezhets L.A. Complete genome sequence of *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D, isolated from *Elytrigia repens* rhizosphere. *Microbiol. Resour. Announc.* 2021;10(11):e00107-21. DOI 10.1128/MRA.00107-21.
- Rodrigues C.J.C., de Carvalho C.C.C.R. *Rhodococcus erythropolis* cells adapt their fatty acid composition during biofilm formation on metallic and non-metallic surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2015; 91(12):fiv135. DOI 10.1093/femsec/fiv135.
- Sutcliffe I.C. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;74(1):49-58. DOI 10.1023/a:1001747726820.
- Szőkö J., Rucká L., Šimčíková M., Halada P., Nešvera J., Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98(19):8267-8279. DOI 10.1007/s00253-014-5881-6.
- Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(10):3133-3141. DOI 10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002.
- Wang C., Chen Y., Zhou H., Li X., Tan Z. Adaptation mechanisms of *Rhodococcus* sp. CNS16 under different temperature gradients: Physiological and transcriptome. *Chemosphere.* 2020;238:124571. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.124571.
- Zhang W., Zhou Q.M., Du G.H. Colchicine. In: Du G.H. Natural Small Molecule Drugs from Plants. Singapore: Springer, 2018;503-507. DOI 10.1007/978-981-10-8022-7_83.

ORCID ID

Yu.A. Markova orcid.org/0000-0001-7767-4204
L.A. Belovezhets orcid.org/0000-0001-5922-3397
V.N. Nurminsky orcid.org/0000-0003-1265-1639
I.S. Kapustina orcid.org/0000-0002-6495-1783

N.V. Ozolina orcid.org/0000-0002-0436-8166
V.V. Gurina orcid.org/0000-0001-7552-0818
A.L. Rakevich orcid.org/0000-0002-3445-0558
A.V. Sidorov orcid.org/0000-0003-4948-4301

Благодарности. Работа выполнена в рамках базовой тематики под № гос. регистрации 121031300011-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.05.2022. После доработки 29.06.2022. Принята к публикации 08.07.2022.

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

Активность гена алканмонооксигеназы *alkB* у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов

Т.Н. Шапиро¹ ✉, Н.А. Манучарова², Е.С. Лобакова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, Россия

✉ floyd52@rambler.ru

Аннотация. Ферменты алканмонооксигеназы *AlkB* и *Cyp153* ответственны за аэробную деградацию *n*-алканов нефти и нефтепродуктов. Для доказательства использования штаммами углеводородокисляющих бактерий, выделенных из авиационного керосина ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95, *n*-алканов нефти и нефтепродуктов, проведена детекция ключевых генов *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*, кодирующих алканмонооксигеназы *AlkB* и *Cyp153*, ответственных за окисление углеводородов с определенной длиной цепи. Установлено, что штаммы бактерий, изолированные из реактивного топлива ТС-1, за исключением *Deinococcus* sp. Bi7, имели как минимум один из исследованных генов деградации *n*-алканов. Штаммы *Sphingobacterium multivorum* Bi2, *Alcaligenes faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Rhodococcus erythropolis* Bi6 содержали ген *alkB*. У штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из бензина АИ-95, этот ген алканмонооксигеназы не был детектирован. С помощью метода ПЦР в реальном времени проанализирована активность гена *alkB* у всех полученных из нефтепродуктов штаммов бактерий и определено число его копий. Методом ПЦР в реальном времени с использованием праймера с другой последовательностью нуклеотидов для детекции гена *alkB* установлена его активность у всех штаммов бактерий, выделенных из бензина АИ-95, причем штамм *Paenibacillus agaridevorans* Bi11 отнесен к группе с высоким уровнем его активности (1290 копий/мл). По оценке роста исследованных углеводородокисляющих бактерий на плотной минеральной среде Эванса с модельной смесью углеводородов штаммы были разделены на три группы. Отмечены совпадения результатов по распределению штаммов углеводородокисляющих бактерий в группах по активности гена *alkB* и группах, сформированных на основе способности роста и использования модельной смеси углеводородов и нефтепродуктов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости применения комплекса молекулярно-генетических и физиологических методов для всестороннего анализа распространения исследуемых генов у бактерий и оценки их активности в штаммах углеводородокисляющих бактерий, способных к биодegradации углеводородов нефтепродуктов.

Ключевые слова: биоповреждение; нефтепродукты; углеводородокисляющие бактерии; биодegradация; алканмонооксигеназы; ген *alkB*; ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Шапиро Т.Н., Манучарова Н.А., Лобакова Е.С. Активность гена алканмонооксигеназы *alkB* у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):575-582. DOI 10.18699/VJGB-22-70

Activity of alkanmonoxygenase *alkB* gene in strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from petroleum products

T.N. Shapiro¹ ✉, N.A. Manucharova², E.S. Lobakova¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Soil Science, Moscow, Russia

✉ floyd52@rambler.ru

Abstract. Alkanmonoxygenase enzymes *AlkB* and *Cyp153* are responsible for the aerobic degradation of *n*-alkanes of petroleum and petroleum products. To prove the usage of *n*-alkanes from oil and petroleum products by hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from aviation kerosene TC-1 and automobile gasoline AI-95, the detection of the key genes *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* and *Cyp153* encoding alkanmonoxygenases *AlkB* and *Cyp153* (responsible for the oxidation of hydrocarbons with a certain chain length) was carried out. It was found that epy bacterial strains isolated from TS-1 jet fuel, except *Deinococcus* sp. Bi7, had at least one of the studied *n*-alkane degradation genes. The strains *Sphingobacterium multivorum* Bi2; *Alcaligenes faecalis* Bi3; *Rhodococcus* sp. Bi4; *Sphingobacterium* sp. Bi5; *Rhodococcus erythropolis* Bi6 contained the *alkB* gene. In the strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from

gasoline AI-95, this alkanmonoxygenase gene was not detected. Using the real-time PCR method, the activity of the *alkB* gene in all bacterial strains isolated from petroleum products was analyzed and the number of its copies was determined. By real-time PCR using a primer with a different sequence of nucleotides to detect the *alkB* gene, its activity was established in all bacterial strains isolated from gasoline AI-95; besides, the strain *Paenibacillus agaridevorans* Bi11 was assigned to the group with a high level of its activity (1290 copies/ml). According to the assessment of the growth of isolated hydrocarbon-oxidizing bacteria on a solid Evans mineral medium with the addition of the model mixture of hydrocarbons, the strains were divided into three groups. The distributions of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the groups based on the activity of the *alkB* gene and groups formed based on the growth ability and use of the model mixture of hydrocarbons and petroleum products were found to be consistent. The results obtained indicate that we need to use a complex of molecular and physiological methods for a comprehensive analysis of the distribution of the studied genes in bacteria and to assess their activity in the strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria capable of biodegradation of petroleum hydrocarbons.

Key words: biodamage; petroleum products; hydrocarbon-oxidizing bacteria; biodegradation; alkanmonoxygenase; *alkB* gene; real-time PCR.

For citation: Shapiro T.N., Manucharova N.A., Lobakova E.S. Activity of alkanmonoxygenase *alkB* gene in strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from petroleum products. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):575-582. DOI 10.18699/VJGB-22-70

Введение

Нефтепродукты представляют собой основной источник энергии в хозяйственной деятельности и жизни человека. Данные о биологическом загрязнении нефтепродуктов и в первую очередь различных видов топлива, особенно авиационного керосина, в последнее время в открытой печати существенно расширились (Martin-Sanchez et al., 2018). Прямые и косвенные потери от микробиологической коррозии нефтепродуктов в промышленно развитых странах составляют от 2 до 5 % годового валового внутреннего продукта (Каримова, 2007). Исследование способности штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов, к использованию *n*-алканов, имеет важное значение как для защиты нефтепродуктов от повреждения, так и для применения при утилизации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов в акваториях и на суше (Dedov et al., 2017). Кроме того, способность бактерий ассимилировать углеводороды нефтепродуктов может быть причиной потери их качества при транспортировке, хранении и в процессе эксплуатации техники (Martin-Sanchez et al., 2018).

Как правило, микроорганизмы способны к избирательному усвоению конкретных типов углеводов, что определяется количеством углеродных атомов в молекуле и особенностью структуры углеводорода. В природных условиях микроорганизмы образуют сообщества, в которых формируется единая цепь окисления углеводов нефти и нефтепродуктов по типу метабиоза. Каждый из микроорганизмов сообщества, обладая специфическими ферментными системами, направленными на использование определенного типа углеводов, применяет этот субстрат в своем метаболизме. Поэтому при совместном воздействии микроорганизмов сообщества происходит биодegradация не только большего количества, но и более широкого спектра углеводов нефти и нефтепродуктов (Тимергазина, Переходова, 2012).

Известно, что большинство бактериальных превращений углеводов представляют собой окислительные реакции, протекающие наиболее активно в аэробных условиях. Имеются данные о молекулярных механизмах и путях аэробной биодegradации углеводов, которые заключаются в следующем: 1) обнаружено множество много-

целевых оксигеназных систем, образующих активные комплексы с углеводородными субстратами и молекулярным кислородом; 2) охарактеризовано несколько ферментов, участвующих в начальной стадии аэробной биодegradации алканов (Coon, 2005; Funhoff et al., 2006; Van Beilen, Funhoff, 2007); 3) метагеномный подход позволил описать новые метаболические пути дegradации углеводов, отличные от тех, которые ранее были исследованы у культивируемых чистых штаммов бактерий (Sierra-García et al., 2014), и 4) обнаружены новые флотипы генов алканмонооксигеназы (*alkB*), кодирующие алканмонооксигеназы, встречающиеся в морских экосистемах (Wasmund et al., 2009; Smith et al., 2013).

Аэробная дegradация алканов может осуществляться двумя основными типами ферментов: алканмонооксигеназой AlkB (известной также как алкангидроксилаза) и некоторыми системами цитохрома P450 (Van Beilen et al., 2006), обнаруженными у бактерий родов *Pseudomonas* (Johnson, Hyman, 2006), *Rhodococcus* (Sameshima et al., 2008), *Acinetobacter* (Throne-Holst et al., 2007), *Alcanivorax* (Liu, Shao, 2005), *Burkholderia* (Mohanty, Mukherji, 2008), *Geobacillus* (Vomberg, Klinner, 2000) и *Gordonia* (Kato et al., 2009). Гены, кодирующие протеиновый комплекс алканмонооксигеназы CYP 153 P450, были исследованы несколькими учеными (Whyte et al., 1998; Smits et al., 1999; Kloos et al., 2006; Powell et al., 2006). Предложены молекулярные методы их идентификации не только в чистых культурах, но также на уровне микробного сообщества (Wang et al., 2010).

Однако регуляция экспрессии генов, кодирующих пути дegradации алканов, до настоящего времени имеет много нерешенных вопросов в связи с тем, что во многих случаях в этих процессах также участвуют гены центрального клеточного метаболизма (Paisse et al., 2011). Кроме того, так как эти гены и их продукты являются адаптационными, многие из них зачастую находятся в плазидах, что может способствовать их вариабельности и горизонтальному переносу (Коршунова и др., 2011).

Семейство цитохрома P450 Cyp153 – это тип алканмонооксигеназ, используемых для дegradации коротко- и среднепечочных *n*-алканов, обычно они встречаются у углеводородокисляющих бактерий, лишенных моноокси-

геназ *AlkB* (Van Beilen, Funhoff, 2007). Системы, активируемые кислородом, не имеющие этого цитохрома, характерны для прокариот и образованы другой интегральной мембраносвязанной монооксигеназой, кодируемой у большинства бактерий геном *alkB*, и электрон-транспортными белками, такими как рубредоксин и НАДН-зависимая редуктаза, кодируемыми генами *alkG* и *alkT* соответственно (Van Beilen et al., 2006; Carpelletti et al., 2011). Монооксигеназа *AlkB* выявлена у бактерий различных систематических групп и используется ими для реакций окисления *n*-алканов с длиной цепи до C₁₆ (Wasmund et al., 2009). Так, *Alk*-подобные гены исследованы у грамположительных бактерий родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Praserella* (Andreoni et al., 2000; Vomberg, Klinner, 2000; Van Beilen et al., 2002; Whyte et al., 2002).

Для подтверждения наличия конкретной системы окисления *n*-алканов и степени гомологии ее последовательности с ранее изученными последовательностями гена *alkB* в основном применялся метод амплификации фрагментов гена *alkB* с использованием специфичных праймеров к этому гену. Только для отдельных штаммов были проведены исследования на предмет генетической и структурной организации систем окисления *n*-алканов, регуляции их генов и спектра утилизируемых субстратов. Следует учитывать, что каждый микроорганизм имеет определенный набор индуцибельных оксигеназных систем, и способность деградировать некоторые углеводороды зависит от экспрессии соответствующих оксигеназ (Redmond et al., 2010).

Детекция и определение активности ключевых генов, ответственных за окисление определенных видов углеводородов в нефти и нефтепродуктах, являются прямым доказательством использования углеводородокисляющими бактериями углеводородов, а также могут служить мерой оценки метаболической активности конкретного микроорганизма.

Целью работы была детекция у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из образцов реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95, генов *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*, кодирующих алканмонооксигеназы *AlkB* и *Cyp153*, и изучение активности гена *alkB* методом ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

Объекты исследования. В работе использовали 13 штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95 (Shapiro et al., 2021). Нуклеотидные последовательности секвенированного фрагмента гена 16S рРНК выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий депонированы в международной базе данных Genbank (табл. 1). Штаммы бактерий хранятся в коллекции кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Поддержание культур проводили на плотной органической среде Rich, содержащей пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и глюкозу (Лысак и др., 2003), проверку роста выделенных штаммов в присутствии нефтепродуктов выполняли на минеральной среде Эван-

Таблица 1. Штаммы углеводородокисляющих бактерий, выделенные из образцов нефтепродуктов

| Вид нефте-продукта | Штамм бактерии | Genbank ID |
|------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| ТС-1 | <i>Sphingobacterium multivorum</i> Bi2 | MG812313.1 |
| | <i>Alcaligenes faecalis</i> Bi3 | MG812316.1 |
| | <i>Rhodococcus</i> sp. Bi4 | MK951703 |
| | <i>Sphingobacterium</i> sp. Bi5 | MK968142 |
| | <i>R. erythropolis</i> Bi6 | MG871403.1 |
| | <i>Deinococcus</i> sp. Bi7 | MG812379.1 |
| | <i>Rhodococcus</i> sp. Bi10 | MG871414.1 |
| | <i>Sphingobacterium</i> sp. Bi8 | MK968144 |
| | <i>S. mizutaii</i> Bi9 | MK968143 |
| | АИ-95 | <i>Paenibacillus agaridevorans</i> Bi11 |
| <i>Bacillus pumilus</i> Bi12 | | MK951709 |
| <i>B. safensis</i> Bi13 | | MK951740 |
| <i>Bacillus</i> sp. Bi14 | | MK951752 |

са (Evans et al., 1970) с добавлением углеводов в качестве единственного источника углерода.

Выделение бактериальной ДНК. Выделение ДНК проводили после 7 сут культивирования штаммов углеводородокисляющих бактерий на среде Rich. Для выделения бактериальной ДНК использовали набор Thermo Scientific™ MagJET™ Plant Genomic DNA Kit, как описано ранее (Shapiro et al., 2021).

Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на среде с модельными углеводородами. Сравнение роста выделенных культур углеводородокисляющих бактерий в присутствии углеводов проводили по методу М.В. Журиной с коллегами (2008). В агаризованную среду ЭМ, содержащую 1.96 % об. смеси углеводов № 1 (C₁₅H₃₂, C₁₆H₃₄, C₁₈H₃₈ и C₉H₁₂-псевдокумол), вносили 0.025 мкл суспензионной культуры штамма углеводородокисляющих бактерий с оптической плотностью (ОП) 0.2 и равномерно распределяли по поверхности чашки шпателем. Через 7 сут выросшие колонии микроорганизмов смывали раствором 1 % NaCl двумя порциями по 5 мл. В объединенной пробе измеряли оптическую плотность полученной суспензии клеток с помощью ФЭК КФК-2-УХЛ 4.2 при λ = 540 нм и толщине оптического слоя l = 10 мм.

Детекция генов алканмонооксигеназ *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*. Для получения целевых продуктов генов, кодирующих различные алканмонооксигеназы (Kohno et al., 2002; Иванова и др., 2014) (последовательности использованных праймеров указаны в табл. 2), с геномной ДНК выделенных штаммов проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со следующими температурно-временными параметрами: начальная инициация – 94 °С × 3 мин, последующие 35 циклов – 94 °С × 30 с, 55 °С (*Cyp153*) или 60 °С (*alkB*) × 40 с, 72 °С – 1 мин; конечная полимеризация – 72 °С × 7 мин (Иванова и др., 2014). Для генов *Alk 1-3* ПЦР выполняли в следующем режиме: начальная инициация – 94 °С × 3 мин; последующие 30 циклов – 94 °С × 60 с, 40 °С × 30 с, 72 °С – 30 с; конечная полимеризация – 72 °С × 7 мин (Kohno et al., 2002).

ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient DNA amplifier (Eppendorf, Германия). Объем ам-

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для детекции генов *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*, кодирующих алканмонооксигеназы

| Детектируемый ген | Последовательность, 5'→3' | Длина ПЦР-фрагмента, п. н. | Литературный источник |
|-------------------|------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>Cyp153</i> | F-GATCCGCTCGCGTGTC R-GGGAGTGAGGCGAACCA | 870 | Иванова и др., 2014 |
| <i>alkB</i> | F-AGAACSCRCSSGAYGAGG R-ATRTCRCGCRTAGTGC | 960 | |
| <i>Alk1</i> | F-CATAATAAAGGGCATCACCGT R-GATTCATCTCGAAACTCCAAAC | 185 | Kohno et al., 2002 |
| <i>Alk2</i> | F-GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA R-TTGTATTATCCAACTATGCTC | 271 | |
| <i>Alk3</i> | F-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA R-CCGTAGTGCTGACGTAGTT | 330 | |

плификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 10 мкл 1× Taq-полимеразного буфера («Евроген», Россия), по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 1 мкл ДНК соответствующего образца и 37 мкл воды. Результаты амплификации регистрировали с помощью электрофореза. Очистку ПЦР-продукта проводили единым способом и для бактериальной, и для микромицетной ДНК с помощью набора Cleanup Standard («Евроген»).

ПЦР в реальном времени. Для количественного анализа числа копий ДНК, содержащих функциональный ген *alkB*, отвечающий за деградацию *n*-алканов, применяли метод ПЦР в реальном времени. Измерение проводили на детектирующем амплификаторе DTLite4 («ДНК-Технология», Россия) после 7 сут культивирования штаммов углеводородоокисляющих бактерий на среде Rich (Лысак и др., 2003) по методике, описанной в работе (Manucharova et al., 2021). Последовательности праймеров, используемых для выявления штаммов углеводородоокисляющих бактерий, обладающих функциональным геном *alkB*, – F(TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATC TGG), R(CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG) (Whyte et al., 2002).

Количество исследуемой ДНК выражали в абсолютных или относительных единицах, и определение матрицы ДНК проводили при наличии трех стандартов и отрицательного контроля (образца без матрицы ДНК).

Результаты и обсуждение

Ранее в загрязненных образцах нефтепродуктов (реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95) были выделены, идентифицированы и охарактеризованы штаммы углеводородоокисляющих бактерий (Shapiro et al., 2021). В данном исследовании использовали 9 штаммов углеводородоокисляющих бактерий, изолированных из топлива ТС-1, и 4 штамма – из бензина АИ-95.

Все указанные штаммы углеводородоокисляющих бактерий были изучены на наличие генов, кодирующих алканмонооксигеназы: *alkB*, *Cyp153*, *Alk1*, *Alk2* и *Alk3* (табл. 3). Ген *Alk1* кодирует алканмонооксигеназу Alk1, катализирующую реакции терминального окисления *n*-алканов с длиной цепи C₆–C₁₂ у бактерий, относящихся к роду *Pseudomonas*. Ген *Alk2* кодирует у представителей рода *Acinetobacter* алканмонооксигеназу Alk2, катализирующую реакции терминального окисления *n*-алканов с дли-

ной цепи > C₁₂ с помощью монооксигеназ или диоксигеназ. Ген *Alk3* кодирует алканмонооксигеназу Alk3, обладающую субстратной специфичностью по отношению к *n*-алканам и оксидазным системам (Kohno et al., 2002).

Установлено, что ген алканмонооксигеназы *Alk2*, характерный преимущественно для бактерий рода *Acinetobacter* (Kohno et al., 2002), отсутствует у всех исследованных штаммов бактерий. Среди штаммов, выделенных из реактивного топлива ТС-1, штамм *Deinococcus* sp. Bi7 не содержал исследованных генов алканмонооксигеназ деградации *n*-алканов. Все остальные штаммы, изолированные из топлива ТС-1, имели как минимум один из исследованных генов деградации *n*-алканов. Пять из девяти штаммов (*Sphingobacterium multivorum* Bi2, *Alcaligenes faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Rhodococcus erythropolis* Bi6) содержали ген *alkB*. У штаммов углеводородоокисляющих бактерий, полученных из бензина АИ-95, данный ген алканмонооксигеназы не был детектирован (рис. 1, см. табл. 3).

У штаммов углеводородоокисляющих бактерий *A. faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4 и *R. erythropolis* Bi6 были установлены все изученные гены алканмонооксигеназ: *alkB*, *Cyp153*, *Alk1* и *Alk3*. Интересен факт наличия одновременно различных изоформ гена *alkB* и гена *Cyp153* у этих бактерий, а у штаммов *Sphingobacterium multivorum* Bi2 и *S. mizutaii* Bi9 – генов *alkB*, *Cyp153*. Согласно литературным данным, фермент *Cyp153* является типом алканмонооксигеназы, участвующей в деградации коротко- и среднецепочечных *n*-алканов у углеводородоокисляющих бактерий, лишенных алканмонооксигеназ AlkB (Van Beilen, Funhoff, 2007).

В природной нефти и нефтепродуктах *n*-алканы составляют до 88 % объема и могут служить источником энергии для микроорганизмов, способных их разлагать (Van Beilen et al., 2003; Dedov et al., 2017). Ранее была проведена детекция генов группы алканмонооксигеназ для бактериальных сообществ, выделенных из нефтепродуктов, и показана активность штаммов в отношении деградации различных углеводородов, включая *n*-алканы (Likhoshvay et al., 2014; Lomakina et al., 2014).

Гены семейства *alkB*, как правило, присутствуют в геномах как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий в нескольких вариантах (Van Beilen et al., 2003). Это согласуется с полученными нами данными о наличии

Таблица 3. Наличие исследованных генов алканмонооксигеназ окисления углеводов *alkB*, *Cyp153*, *Alk1*, *Alk2* и *Alk3* у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов

| Штамм/ген | Bi2* | Bi3 | Bi4 | Bi5 | Bi6 | Bi7 | Bi8 | Bi9 | Bi10 | Bi11 | Bi12 | Bi13 | Bi14 |
|---------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>alkB</i> | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>Cyp153</i> | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>Alk1</i> | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Alk3</i> | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

* Полное название штаммов приведено в табл. 1.

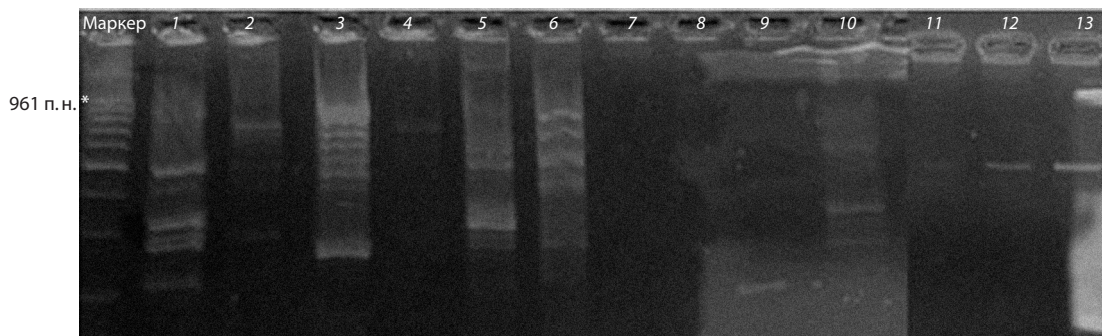


Рис. 1. Электрофорез в агарозном геле ПЦР-продукта гена *alkB*.

1 – *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2 – *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 – *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 – *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 – *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 – *Deinococcus* sp. Bi7; 7 – *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 – *Sphingobacterium mizutaii*; 9 – *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 – *Bacillus pumilus* Bi12; 11 – *Bacillus safensis* Bi13; 12 – *Bacillus* sp. Bi14; 13 – *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (100 + bp DNA Ladder). * Ожидаемая длина целого ПЦР-продукта.

нескольких генов семейства *alkB* у выделенных штаммов грамотрицательных бактерий рода *Sphingobacterium* и грамположительных – рода *Rhodococcus*.

Способность к эффективной деградации *n*-алканов у штаммов, для которых это не было описано в литературе ранее, может быть доказательством нахождения гена в плазмиде и его горизонтального переноса между членами сообщества, что показано в работе (Turova et al., 2008), где бактерии рода *Geobacillus* могли приобретать гены *alkB* от бактерий рода *Rhodococcus*.

Среди штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из автомобильного бензина АИ-95, только у штамма *P. agaridevorans* Bi11 был детектирован ген *Cyp153*.

Данные о наличии у изученных штаммов бактерий генов семейства *alkB* только частично согласовались с данными по способности их к росту на жидких и твердых средах в присутствии 1 % *n*-алканов с разной длиной углеродной цепи (Shapiro et al., 2021). Так, штаммы *Sphingobacterium mizutaii* Bi9, *Bacillus pumilus* Bi12, *Bacillus safensis* Bi13, *Bacillus* sp. Bi14, *Paenibacillus agaridevorans* Bi11 росли на модельной смеси углеводородов, содержащих в своем составе алканы с разной длиной цепи, топливе ТС-1 и нефти (рис. 2 и 3). Также были установлены способность к росту и высокая активность выделенных штаммов в отношении деградации *n*-алканов модельной смеси углеводородов при отсутствии данного гена (см. рис. 3).

Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на плотной среде ЭМ с модельной смесью угле-

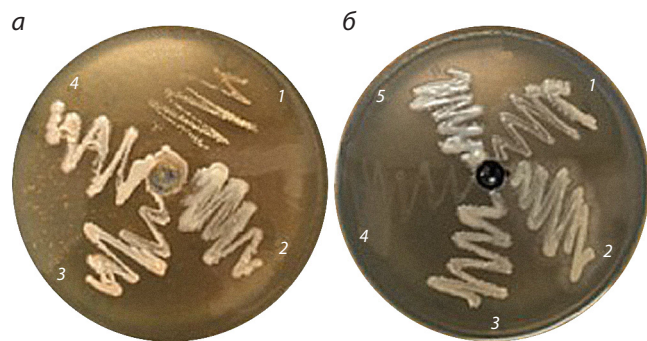


Рис. 2. Рост некоторых исследуемых культур на минеральной среде Эванса в присутствии реактивного топлива ТС-1 (а) и нефти (б).

Фрагмент а: 1 – *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2 – *Sphingobacterium* sp. Bi5; 3 – *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 – *Alcaligenes faecalis* Bi3. Фрагмент б: 1 – *Rhodococcus* sp. Bi4; 2 – *Sphingobacterium mizutaii* Bi9; 3 – *Sphingobacterium* sp. Bi8; 4 – *Deinococcus* sp. Bi7; 5 – *Rhodococcus erythropolis* Bi6.

водородов (см. рис. 3) позволила разделить штаммы по скорости роста на три группы. Такое деление предложено нами и основано на следующем: первая группа (активные культуры) – значение оптической плотности суспензии клеток после культивирования в течение 7 сут от 3 ед. и выше; вторая группа (средняя активность) – от 2 до 3 ед.; третья группа (низкая активность) – значение оптической плотности суспензии клеток менее 2 ед.

Установлено, что в наиболее активную группу штаммов, способных к использованию модельной смеси углеводородов, входили штаммы *R. erythropolis* Bi6, *Rhodo-*

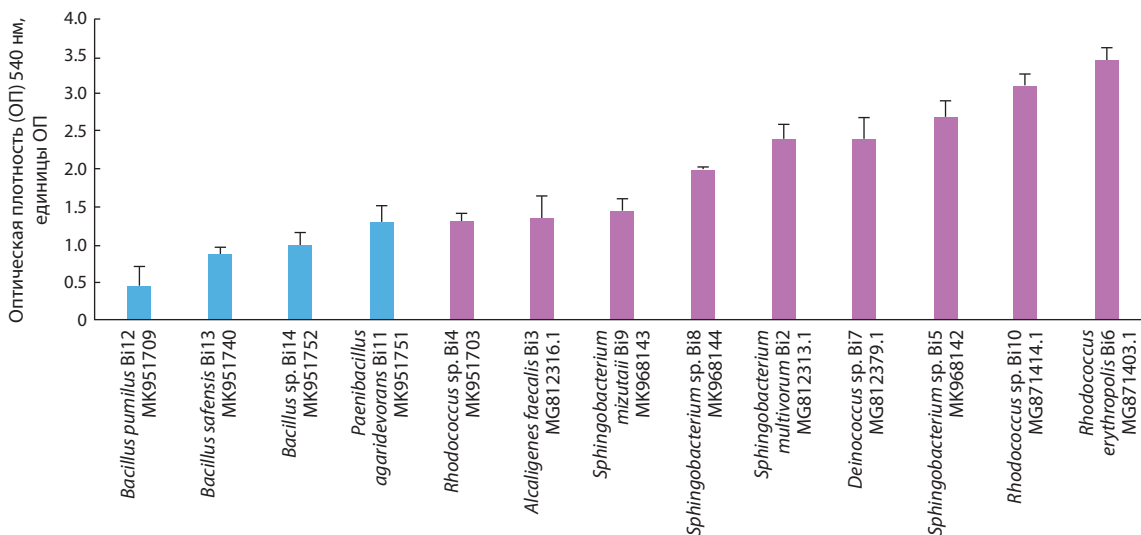


Рис. 3. Рост выделенных штаммов бактерий из автомобильного бензина АИ-95 (голубые столбцы) и реактивного топлива ТС-1 (розовые столбцы) на твердой среде со смесью углеводов № 1 в течение семи суток.

coccus sp. Bi10. Средняя скорость роста характерна для штаммов *Deinococcus* sp. Bi7, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8. При этом у штамма *Deinococcus* sp. Bi7 тестируемые гены алканмонооксигеназ не обнаружены. Медленнее всего в присутствии модельной смеси углеводов росли штаммы *Rhodococcus* sp. Bi4, *S. mizutaii* Bi9, *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *A. faecalis* Bi3 и все штаммы бактерий, выделенные из бензина АИ-95, – *Bacillus safensis* Bi13; *Bacillus* sp. Bi14, у которых ген *alkB* не был детектирован, больше чем на 80 % использовали пентадекан, октодекан и гексадекан модельной смеси углеводов (Shapiro et al., 2021). В связи с этим был проведен количественный анализ числа копий ДНК, содержащих функциональный ген алканмонооксигеназы у всех выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий. По результатам проведенного ПЦР в реальном времени установлено, что ген *alkB* присутствует и активен у всех выделенных из нефтепродуктов штаммов бактерий.

По числу копий гена все штаммы бактерий были разделены на две группы. Первая группа – с наибольшей активностью гена *alkB*, для которой значения концентрации достигали от 1290 до 8060 ДНК копий/мл, и вторая группа – значения концентрации были на порядок ниже и колебались в пределах от 10.4 до 786 ДНК копий/мл:

| Первая группа | Вторая группа |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Alcaligenes faecalis</i> Bi3 | <i>Rhodococcus</i> sp. Bi4 |
| <i>Sphingobacterium multivorum</i> Bi2 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> Bi6 |
| <i>Sphingobacterium mizutaii</i> Bi9 | <i>Rhodococcus</i> sp. Bi10 |
| <i>Sphingobacterium</i> sp. Bi5 | <i>Sphingobacterium</i> sp. Bi8 |
| <i>Paenibacillus agaridevorans</i> Bi11 | <i>Deinococcus</i> sp. Bi7 |
| | <i>Bacillus pumilus</i> Bi12 |
| | <i>Bacillus safensis</i> Bi13 |
| | <i>Bacillus</i> sp. Bi14 |

Установлено, что все штаммы углеводородокисляющих бактерий, выделенные из бензина АИ-95, показали активность гена *alkB*, а штамм *Paenibacillus agaridevorans* Bi11

был отнесен к первой группе штаммов с высоким уровнем его активности (1290 ДНК копий/мл). Полученные результаты согласовались с данными по способности выделенных из нефтепродуктов штаммов расти (см. рис. 3) и использовать углеводороды модельной смеси углеводов (Shapiro et al., 2021). Отмечены также совпадения результатов по распределению штаммов углеводородокисляющих бактерий в группах по активности гена *alkB* (см. табл. 2) и группах, сформированных на основании их способности роста и использования модельной смеси углеводов и нефтепродуктов (Shapiro et al., 2021).

У бактерий, растущих на нефтепродуктах, включающих как коротко-, так и длинноцепочечные *n*-алканы, система их окисления включает несколько изоферментов ключевого белка алканмонооксигеназы. Выделенные из реактивного топлива ТС-1 и бензина АИ-95 штаммы бактерий-биодеструкторов способны использовать широкий спектр субстратов, что предполагает наличие у них сложной алканмонооксигеназной системы. Установлено, что у представителей разных групп микроорганизмов-деструкторов углеводов могут присутствовать несколько эволюционных вариантов ферментов алканмонооксигеназ, что требует подбора для разных углеводородокисляющих бактерий наборов праймеров, позволяющих выявление всех вариантов генов оксигеназ углеводов. В таких случаях предлагают применять несколько вариантов праймеров к различным группам изоферментов (Kohn et al., 2002; Heiss-Blanquet et al., 2005). В нашей работе задействовано два типа праймеров для детекции наличия и активности гена *alkB*. Детекция гена *alkB* с праймерами, предложенными в статье А.Е. Ивановой с коллегами (2014), показала присутствие данного гена у пяти штаммов бактерий, а с праймерами по (Whyte et al., 2002) – у всех изученных штаммов-деструкторов нефтепродуктов. Это может свидетельствовать о большей универсальности праймеров, предложенных L.G. Whyte с коллегами (2002), с одной стороны, или о присутствии специфической изоформы фермента, с другой.

Заклучение

Таким образом, методом ПЦР в реальном времени обнаружена активность гена *alkB* у всех штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95. Показано существенное количественное различие по активности этого гена у выделенных штаммов. Для штаммов, изолированных из автомобильного бензина, значения активности соответствуют физиолого-биохимическим данным о росте бактерий в присутствии модельной смеси углеводородов и эффективности их деградации (Shapiro et al., 2021). Полученные результаты свидетельствуют о необходимости использования комплекса методов (полифазного подхода) для всесторонней оценки способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к биodeградации углеводородов нефтепродуктов, в том числе с применением молекулярных (в частности, ПЦР) и физиологических методов для анализа распространения и гомологии исследуемого гена у бактерий.

Список литературы / References

- Журина М.В., Стрелкова Е.А., Плакунов В.К., Беляев С.С. Влияние состава реконструированных биопленок на активность парафин-окисляющих бактерий. *Микробиология*. 2008;77(5):701-703. [Zhurina M.V., Strelkova E.A., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Effect of reconstituted biofilm composition on bacterial hydrocarbon-oxidizing activity. *Microbiology*. 2008;77(5):625-627.]
- Иванова А.Е., Сухачева М.В., Канатьева А.Ю., Кравченко И.К., Курганов А.А. Углеводородокисляющий потенциал и гены биodeградации *n*-алканов новой ацидофильной ассоциации микобактерий из серных карт. *Микробиология*. 2014;83(6):667-667. [Ivanova A.E., Kravchenko I.K., Sukhacheva M.V., Kanat'eva A.Y., Kurganov A.A. Hydrocarbon-oxidizing potential and genes for *n*-alkane biodegradation in a new acidophilic mycobacterial association from sulfur blocks. *Microbiology*. 2014;83(6):764-772.]
- Каримова С.А. Коррозия – главный враг авиации. *Наука и жизнь*. 2007;6:63-65. [Karimova S.A. Corrosion is the main enemy of aviation. *Nauka i Zhizn' = Science and Life*. 2007;6:63-65. (in Russian)]
- Коршунова А.В., Турова Т.П., Шестакова Н.М., Михайлова Е.М., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Детекция и транскрипция генов биodeградации *n*-алканов (*alkB*) в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* К. *Микробиология*. 2011;80(5):669-678. [Korshunova A.V., Tourova T.P., Shestakova N.M., Mikhailova E.M., Nazina T.N., Poltaraus A.B. Detection and transcription of *n*-alkane biodegradation genes (*alkB*) in the genome of a hydrocarbon-oxidizing bacterium *Geobacillus subterraneus* К. *Microbiology*. 2011;80(5):682-691.]
- Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС пресс, 2003. [Lysak L.V., Dobrovolskaya T.G., Skvortsova I.N. Methods for Assessing the Bacterial Diversity of Soils and the Identification of Soil Bacteria. Moscow: MAX Press Publ., 2003. (in Russian)]
- Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами. *Нефтегазовая геология. Теория и практика*. 2012;7(1):15. [Timergazina I.F., Perekhodova L.S. Biological oxidation of oil and petroleum products using hydrocarbon-oxidizing microorganisms. *Neftgazovaya Geologiya. Teoriya i Praktika = Petroleum Geology. Theoretical and Applied Studies*. 2012;7(1):15. (in Russian)]
- Andreoni V., Bernasconi S., Colombo M., van Beilen J.B., Cavalca L. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN. *Environ. Microbiol.* 2000;2:572-577. DOI 10.1046/j.1462-2920.2000.00134.x.
- Cappelletti M., Fedi S., Frascari D., Ohtake H., Turner R.J., Zannoni D. Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(5):1619-1627. DOI 10.1128/AEM.01987-10.
- Coon M.J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:1-25.
- Dedov A.G., Ivanova E.A., Sandzhieva D.A., Kashcheeva P.B., Buznik V.M., Lobakova E.S., Kirpichnikov M.P., Ishkov A.G. New materials and ecology: biocomposites for aquatic remediation. *Theor. Found. Chem. Eng.* 2017;51(4):617-630. DOI 0.1134/S0040579517040042.
- Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of micro-organisms: 2. Construction of a chemostat. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 2. London; New York: Academic Press, 1970: 277-327. DOI 10.1016/S0580-9517(08)70227-7.
- Funhoff E.G., Bauer U., Garcia-Rubio I., Witholt B., van Beilen J.B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J. Bacteriol.* 2006;188(14):5220-5227. DOI 10.1128/JB.00286-06.
- Heiss-Blanquet S., Benoit Y., Marechaux C., Monot F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J. Appl. Microbiol.* 2005;99(6):1392-1403. DOI 10.1111/j.1365-2672.2005.02715.x.
- Johnson E.L., Hyman M.R. Propane and *n*-butane oxidation by *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(1):950-952. DOI 10.1128/AEM.72.1.950-952.2006.
- Kato T., Miyana A., Kanaya S., Morikawa M. Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC Microbiol.* 2009;9(1):1-9. DOI 10.1186/1471-2180-9-60.
- Kloos K., Munch J.C., Schloter M. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J. Microbiol. Methods*. 2006;66(3):486-496. DOI 10.1016/j.mimet.2006.01.014.
- Kohno T., Sugimoto Y., Sei K., Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. *Microbes Environ.* 2002;17:114-121. DOI 10.1264/jsme2.17.114.
- Likhoshvay A., Lomakina A., Grachev M. The complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* from Lake Baikal. *Springerplus*. 2014;3(1):1-5. DOI 10.1186/2193-1801-3-621.
- Liu C., Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55(3):1181-1186. DOI 10.1099/ijso.63443-0.
- Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Zemskaya T.I. Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal. *Microbiology*. 2014;83(3):278-287. DOI 10.1134/S0026261714030126.
- Manucharova N.A., Pozdnyakov L.A., Vlasova A.P., Yanovich A.S., Ksenofontova N.A., Kovalenko M.A., Stepanov A.L. Metabolically active prokaryotic complex in grassland and forests' sod-podzol under polycyclic aromatic hydrocarbon influence. *Forests*. 2021;12(8):1103. DOI 10.3390/f12081103.
- Martin-Sanchez P.M., Becker R., Gorbushina A.A., Toepel J. An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2018;129:89-94. DOI 10.1016/j.ibiod.2018.01.009.
- Mohanty G., Mukherji S. Biodegradation rate of diesel range *n*-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2008;61(3):240-250. DOI 10.1016/j.ibiod.2007.06.011.
- Paisse S., Duran R., Coulon F., Goñi-Urriza M. Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes

- in chronically polluted coastal sediments? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;92(4):835-844. DOI 10.1016/j.ibt.2007.06.011.
- Powell S.M., Ferguson S.H., Bowman J.P., Snape I. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microb. Ecol.* 2006;52(3):523-532. DOI 10.1007/s00248-006-9131-z.
- Redmond M.C., Valentine D.L., Sessions A.L. Identification of novel methane-, ethane-, and propane-oxidizing bacteria at marine hydrocarbon seeps by stable isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76(19):6412-6422. DOI 10.1128/AEM.00271-10.
- Sameshima Y., Honda K., Kato J., Omasa T., Ohtake H. Expression of *Rhodococcus opacus alkB* genes in anhydrous organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* 2008;106(2):199-203. DOI 10.1263/jbb.106.199.
- Shapiro T.N., Lobakova E.S., Dolnikova G.A., Ivanova E.A., Sandzhieva D.A., Burova A.A., Dedov A.G. Community of hydrocarbon-oxidizing bacteria in petroleum products on the example of TS-1 jet fuel and AI-95 gasoline. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021;57(9):949-961. DOI 10.1134/S0003683821090076.
- Sierra-García I.N., Alvarez J.C., de Vasconcellos S.P., de Souza A.P., dos Santos Neto E.V., de Oliveira V.M. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *Plos One.* 2014;9(2):E90087. DOI 10.1371/journal.pone.0090087.
- Smith C.B., Tolar B.B., Hollibaugh J.T., King G.M. Alkane hydroxylase gene (*alkB*) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton. *Front. Microbiol.* 2013;4:370. DOI 10.3389/fmicb.2013.00370.
- Smits T.H.M., Röthlisberger M., Witholt B., Van Beilen J.B. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;1(4):307-317. DOI 10.1046/j.1462-2920.1999.00037.x.
- Throne-Holst M., Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.K., Zotchev S.B. Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(10):3327-3332. DOI 10.1128/AEM.00064-07.
- Turova T.P., Nazina T.N., Mikhailova E.M., Rodionova T.A., Eki-mov A.N., Mashukova A.V., Poltareus A.B. *AlkB* homologues in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. *Mol. Biol. (Mosk.)* 2008;42(2):247-257.
- Van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;74(1):13-21. DOI 10.1007/s00253-006-0748-0.
- Van Beilen J.B., Funhoff E.G., van Loon A., Just A., Kaysser L., Bouza M., Witholt B. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(1):59-65. DOI 10.1128/AEM.72.1.59-65.2006.
- Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.* 2003;58(4):427-440. DOI 10.2516/ogst:2003026.
- Van Beilen J.B., Smits T.H., Whyte L.G., Schorch S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Witholt B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* 2002;4(11):676-682. DOI 10.1046/j.1462-2920.2002.00355.x.
- Vomberg A., Klinner U. Distribution of *alkB* genes within *n*-alkane-degrading bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2000;89(2):339-348. DOI 10.1046/j.1365-2672.2000.01121.x.
- Wang L., Wang W., Lai Q., Shao Z. Gene diversity of CYP153A and *AlkB* alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 2010;12(5):1230-1242. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02165.x.
- Wasmund K., Burns K.A., Kurtböke D.I., Bourne D.G. Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(23):7391-7398. DOI 10.1128/AEM.01370-09.
- Whyte L.G., Hawari J., Zhou E., Bourbonnière L., Inniss W.E., Greer C.W. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64(7):2578-2584. DOI 10.1128/AEM.64.7.2578-2584.1998.
- Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microb. Ecol.* 2002;41(2):141-150. DOI 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00975.x.

ORCID ID

T.N. Shapiro orcid.org/0000-0002-4005-8114
N.A. Manucharova orcid.org/0000-0002-7304-7753
E.S. Lobakova orcid.org/0000-0002-7054-0024

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта РНФ № 21-14-00076 «Разнообразие и биотехнологический потенциал почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузок» и частично поддержано Междисциплинарной научно-образовательной школой Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.05.2022. После доработки 14.06.2022. Принята к публикации 07.07.2022.

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

Особенности видового состава патогенных грибов рода *Fusarium* в биоценозах кукурузы Воронежской области

Т.М. Коломиец , М.И. Киселева, Н.С. Жемчужина, Л.Ф. Панкратова, С.А. Елизарова

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, р.п. Большие Вяземы, Одинцовский район, Московская область, Россия
 lomi1@yandex.ru


Аннотация. Кукуруза относится к основным культурам современного мирового земледелия. Она стоит на первом месте по валовым сборам зерна и на втором – по посевным площадям, уступая лишь основной хлебной культуре земного шара – пшенице. Одна из актуальных задач аграрного производства – проблема увеличения валового сбора зерна и зеленой массы кукурузы. Высокая потенциальная урожайность очень часто остается нереализованной вследствие развития болезней, прямые потери от которых оцениваются в 20–50 %. Цель настоящей работы – изучение видового состава микромицетов на растениях кукурузы, собранных в разные фазы вегетации в мае-июле 2020 г. в Воронежской области, идентификация фитопатогенных грибов из рода *Fusarium*, выявление патогенных и фитотоксичных штаммов грибов рода *Fusarium* для пополнения коллекции Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии. Сохранение инфекционного материала грибов из рода *Fusarium* имеет немаловажное значение для фитопатологических, иммунологических, селекционных, генетических и токсикологических исследований. В результате проведенного микологического анализа обнаружено большое количество изолятов грибов из родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Periconia*, *Pythium*, *Trichothecium* и др., выделенных из пораженных корней, стеблей и початков кукурузы в Воронежской области в 2020 г. Изоляты грибов из семи таксономических групп: *Fusarium fujikuroi* Nirenberg (*F. moniliforme*, *F. verticillioides*), *Fusarium oxysporum* Schldt., *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium heterosporum* Nees & T. Nees (*F. lolii*), *Fusarium roseum* Link (*F. sambucinum*), *Fusarium sporotrichioides* Sherb., были проверены по патогенности и фитотоксичности на всходах растений-тестеров. Показано, что патогенная и фитотоксичная активность у грибов как между видами *Fusarium*, так и в пределах одного вида существенно различается. Наибольшую опасность для кукурузы представляют виды *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, обладающие высокой интенсивностью проявления фитотоксической активности, связанной с тем, что они способствуют синтезу и накоплению опасных токсинов в тканях растений. В результате проведенных исследований отобрано 55 штаммов грибов из рода *Fusarium*, относящихся к семи видам. Стабильные по морфолого-культуральным признакам и изученные по патогенности и фитотоксичности изоляты помещены на длительное хранение в Государственную коллекцию фитопатогенных микроорганизмов и сортов растений-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов, созданную на базе Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии.

Ключевые слова: коллекции микроорганизмов; микромицеты; генетическое разнообразие; кукуруза; фитопатогены; *Fusarium*.

Для цитирования: Коломиец Т.М., Киселева М.И., Жемчужина Н.С., Панкратова Л.Ф., Елизарова С.А. Особенности видового состава патогенных грибов рода *Fusarium* в биоценозах кукурузы Воронежской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):583-592. DOI 10.18699/VJGB-22-71

A characteristic of the species composition of pathogenic fungi of the genus *Fusarium* in corn biocenoses of the Voronezh region

T.M. Kolomiets , M.I. Kiseleva, N.S. Zhemchuzhina, L.F. Pankratova, S.A. Elizarova

All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology, Bolshie Vyazemy, Odintsovo district, Moscow region, Russia
 lomi1@yandex.ru

Abstract. Corn is one of the main crops of modern world agriculture. It ranks first in terms of gross grain harvests and second in terms of acreage, ceding only to the main grain crop of the globe, wheat. The problem of increasing the production of grain and green mass of corn remains one of the urgent tasks of agricultural production. High potential yields very often remain untapped due to diseases, direct losses from which are estimated at 20–50 %. The purpose of this work was to study the species composition of micromycetes on corn collected in different phases of vegetation in May–July 2020 in the Voronezh region, to identify phytopathogenic genus *Fusarium* fungi, to study pathogenic and phytotoxic strains of the fungi to replenish the collection of the All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology. Preservation of infectious material of fungi from the genus *Fusarium* is of no small importance for phytopathological, immunological, breeding, genetic and toxicological studies. As a result of the mycological studies carried out, a lot of fungi isolates from the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Periconia*, *Pythium*, *Trichothecium*, etc., isolated from the affected roots, stems and ears of corn in the Voronezh region in 2020 were

identified. Fungi isolates from seven taxonomic groups: *Fusarium fujikuroi* Nirenberg (*F. moniliforme*, *F. verticillioides*), *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium heterosporum* Nees & T. Nees (*F. loli*), *Fusarium roseum* Link (*F. sambucinum*), *Fusarium sporotrichioides* Sherb. were tested for pathogenicity and phytotoxicity on seedlings of plant-testers. It has been shown that pathogenic and phytotoxic activity in fungi varies significantly between *Fusarium* species and within the same species. The greatest danger to corn is represented by the species *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, which have a high intensity of phytotoxic activity associated with the fact that they contribute to the synthesis and accumulation of dangerous toxins in plant tissues. As a result of the conducted studies, 55 strains of fungi from the genus *Fusarium* belonging to seven species were selected. The isolates, stable in morphological and cultural characteristics and studied for pathogenicity and toxicity, were placed for long-term storage in the Russian State Collection of Plant Pathogenic Microorganisms and Cultivars for Identification of Phytopathogenic Microbial Strains at the All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology.

Key words: collections of microorganism; micromycetes; genetic diversity; corn; plant pathogens; *Fusarium*.

For citation: Kolomiets T.M., Kiseleva M.I., Zhemchuzhina N.S., Pankratova L.F., Elizarova S.A. A characteristic of the species composition of pathogenic fungi of the genus *Fusarium* in corn biocenoses of the Voronezh region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):583-592. DOI 10.18699/VJGB-22-71

Введение

Наряду с тем что кукуруза сахарная (лат. *Zea mays* L. ssp. *mays*) является единственным культурным представителем рода Кукуруза (*Zea*) семейства Злаки (Poaceae) и самым древним хлебным растением в мире, она остается одной из самых востребованных культур в реалиях современного земледелия (Сотченко, 2005). Кукуруза стоит на первом месте по валовым сборам зерна и на втором по посевным площадям, уступая лишь основной хлебной культуре земного шара – пшенице. Крупнейшие производители кукурузы – США (около половины мирового урожая), Китай, Бразилия, Мексика, Франция, Аргентина, Индия, Индонезия, Италия и Румыния (Бабич, 1986; Березкин, Малько, 1998; Elmore, Abendroth, 2008). В России кукурузу возделывают главным образом в южных районах страны (Супрунов, 2009).

Благодаря высокой урожайности и полезным качествам кукурузы значение ее для разностороннего использования трудно переоценить. На продовольственные цели в странах мира приходится более 20 % зерна кукурузы, технические – 15–20 % и примерно две трети – на корм скоту (Сотченко, 2009).

Кукуруза как пищевая культура занимает третье место в мире по посевным площадям, уступая только пшенице и рису. По урожайности зерна у нее лидирующее положение: в нем содержится 65–70 % углеводов, 9–12 % белка, 4–8 % растительного масла (в зародыше до 40 %) и лишь около 2 % клетчатки. Кроме того, кукуруза богата витаминами А, В1, В2, В6, Е, С, D, F, незаменимыми аминокислотами, минеральными солями, микроэлементами и используется на продовольственные и медицинские цели (Сотченко, 2002).

В современном мире кормовая кукуруза дает большие урожаи и высокопитательный корм, благодаря чему имеет решающее значение в развитии животноводства. В кормовом балансе кукуруза стоит на первом месте из-за ее калорийных особенностей и возможности использования как зерна, так и зеленой массы – силоса (<https://universityagro.ru/растениеводство/кукуруза/>; Ивашенко и др., 2006; Сотченко, Горбачева, 2011).

Кукуруза имеет немаловажное значение и для промышленности. Кукурузное масло служит сырьем для получения дорожных красок, мыла и заменителей резины. Куку-

рузный крахмал применяют для аппретирования тканей и кожи, повышения плотности и гладкости бумаги; в производстве вискозного волокна, взрывчатых веществ, декстринового клея. Из стеблей и других вегетативных частей растений получают строительные и упаковочные материалы, бумагу, улучшающие добавки для почвы, взрывчатку. Из кочерыжек початков кукурузы выделяют фурфурол – сырье для производства пластмасс, нейлона и других синтетических веществ (<https://universityagro.ru/растениеводство/кукуруза/>).

Одна из актуальных задач аграрного производства – проблема увеличения валового сбора зерна кукурузы (Сотченко, 2005). В условиях России высокая потенциальная урожайность кукурузы часто остается нереализованной вследствие развития болезней, среди которых основная роль принадлежит микромитетам из родов *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria* и др. Прямые потери зерна от корневой гнили и фузариоза початков оцениваются в 20–50 % (Ивашенко, 2007, 2012).

Широко распространенными заболеваниями кукурузы, особенно в районах с повышенной влажностью, являются фузариоз початков и корневая гниль. В этих районах поражается до 50–60 % посевов кукурузы. Большую группу болезней кукурузы представляют грибы из рода *Fusarium*: *Fusarium acuminatum* Ellis & Everh., *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. gibbosum* Appel. et Wollenw., *F. graminearum* Schwabe, *F. heterosporum* Nees & T. Nees, *F. oxysporum* f. *conglutinans* (Wollenw.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, *F. oxysporum* f. *cucumerinum* Berk. & Broome, *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. roseum* Link, *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb. и др. (Ali et al., 2005; Eller et al., 2008).

Фузариоз початков, вызываемый гембиотрофным грибом *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (syn. *Fusarium moniliforme* J. Sheld., сумчатая стадия – *Gibberella fujikuroi*), приводит к снижению урожая и ухудшению его качества (Miller et al., 2007; Murillo-Williams, Munkvold, 2008; Mesterhazy et al., 2012). При хранении початков в условиях высокой влажности и недостаточной аэрации грибок продуцирует микотоксины, известные как фумонизины. Эти токсины канцерогенны для человека и животных (Clements, White, 2004; Robertson-Hoyt et al., 2007).

Что касается видов, вызывающих корневую гниль, то низкая температура в период прорастания семян, повышенная влажность и кислотность почвы усиливают развитие заболевания (Супрунов, 2009). При этом на поверхности прорастающей зерновки образуется слабый налет гриба розового или белого цвета. Вскоре после выхода растений кукурузы на поверхность росток бурет и отмирает. Если росток выживает, то он имеет слабо развитую корневую систему, растения задерживаются в росте, листья засыхают, часто полегают (Иващенко и др., 2006).

Поскольку возбудители корневой гнили и фузариоза початков обитают в почве на растительных остатках и зерне, вопрос изучения круга наиболее патогенных микромицетов, в том числе из рода *Fusarium*, актуален для разработки экологически чистых методов борьбы с ними, включая и создание устойчивых к болезни сортов и гибридов кукурузы (Hooker, 1967; Иващенко, 2009а; Иващенко, Матвеева, 2010). Особое внимание при этом уделяется созданию инфекционных фондов, на которых проводятся мероприятия по оценке и отбору устойчивых форм (Иващенко, 2007, 2009б). Немаловажное значение имеет и подготовка составов инфекционных фондов, которая включает изучение видового состава микромицетов кукурузы, выявление наиболее патогенных изолятов грибов рода *Fusarium* и создание условий для длительного их хранения без потери патогенных свойств.

Микологический анализ образцов кукурузы и анализ научной литературы, связанной с разрабатываемым вопросом, свидетельствует о том, что мониторинг видового состава грибов на возделываемой культуре в настоящее время весьма актуален как для принятия срочных профилактических и оздоровительных мер, так и для развития стратегии предотвращения негативных последствий от развития болезней. Исследования, направленные на изучение видового состава микромицетов, вызывающих корневую гниль и фузариоз початков, в итоге обуславливают возможность получения экологически чистых и стабильных урожаев кукурузы.

Сохранение инфекционного материала грибов из рода *Fusarium* имеет немаловажное значение для фитопатологических, иммунологических, селекционных, генетических и токсикологических исследований (Дубовой и др., 2016; Коломиец и др., 2018; Kolomiets, Zhemchuzhina, 2018). Для решения поставленных задач в соответствии с Федеральным законом от 10.01.02. № 7-ФЗ (ред. от 24.11.2014, с изм. от 29.12.2014) «Об охране окружающей среды» Постановлением Правительства РФ от 24.06.1996 № 725-47 «О мерах по сохранению и рациональному использованию коллекций микроорганизмов, культивируемых клеток высших растений, перевиваемых соматических клеток позвоночных», а также с учетом положений Конвенции о биологическом разнообразии (1992 г.) и рекомендаций Европейской организации по экономическому и социальному развитию (GENERAL GUIDELINES FOR ALL BRCS, 2006; GUIDANCE FOR THE OPERATION OF BIOLOGICAL RESOURCE CENTRES (Part 2: Micro-Organism Domain), 2006; OECD Best Practice Guidelines for BRCs 2007) была создана Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов растений-идентификаторов патогенных штаммов

микроорганизмов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ГКФМ ВНИИФ). Она является Государственным депозитарием фитопатогенных микроорганизмов.

Что касается создания коллекции грибов из рода *Fusarium*, то основными ее задачами были не только сохранение жизнеспособности и генетической стабильности штаммов этих грибов по морфолого-культуральным признакам в течение длительного времени, но и пополнение фонда новыми видами с различным спектром свойств патогенности и фитотоксичности, а также увеличение круга географических территорий сбора пораженных образцов кукурузы (Гагкаева, Левитин, 2005; Гагкаева и др., 2008). Для выполнения этих задач образцы зараженных растений, ежегодно поступающие из различных районов страны, подвергаются микологическим исследованиям, на основании данных анализа материала проводится отбор наиболее патогенных и фитотоксичных образцов в коллекцию.

Целью настоящей работы стали изучение видового состава микромицетов на растениях кукурузы, собранных в разные фазы вегетации в мае-июле 2020 г. в Воронежской области, идентификация фитопатогенных грибов из рода *Fusarium*, выявление патогенных и фитотоксичных штаммов грибов рода *Fusarium* для пополнения коллекции ФГБНУ ВНИИФ.

Материалы и методы

Материалом для исследований были растения кукурузы с различными признаками поражения грибными инфекциями на листьях, стеблях и корнях. Образцы районированных сортов кукурузы (Аякс, Донская высокорослая, Зерноградский) были собраны в разные фазы вегетации, согласно классификации фенологического развития по системе ВВСН: формирование 5–6-го листа – ф.2, трубкования или формирование 8–10-го листа – ф.32, налива – молочной спелости – ф.75 (Large, 1954; Lancashire et al., 1991). Все работы были выполнены с использованием оборудования ЦКП ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ (<http://www.vniif.ru/vniif/page/ckp-gkmf/1373>).

Фитосанитарное состояние образцов оценивали по общепринятым в фитопатологии методикам (Gerlach, Nirenberg, 1982; Leslie, Summerell, 2006; Dictionary..., 2008; Watanabe, 2010). Виды грибов определяли по морфологии спор под микроскопом при увеличении $\times 400$ (Билай, 1977; Билай, Элланская, 1982; Гагкаева и др., 2008).

Выделение симбиотрофных и сапрофитных микромицетов из пораженных растений проводили с использованием голодного, картофельно-глюкозного и картофельно-морковного агар-агаров. Грибы из образцов кукурузы изолировали по стандартной методике (Билай, 1977; Билай, Элланская, 1982). Отмытые водопроводной водой больные растения каждого образца разрезали на фрагменты размером 5–10 мм, стерилизовали в 50 % спирте в течение 20–30 с и в асептических условиях раскладывали на поверхность 2 % картофельно-глюкозного агар-агара в чашки Петри (по 4–6 кусочков в каждую). Образец был представлен не менее чем 150–200 фрагментами пораженной ткани. Чашки Петри помещали

в термостат с температурой 22–24 °С. Наблюдение за развитием грибов проводили ежедневно. По мере роста колоний грибов делали отсев кусочком мицелия на питательную среду в центр чашки Петри. Чистые культуры грибов просматривали под микроскопом. Виды грибов идентифицировали по основным морфологическим признакам колоний и спор: скорости роста, окраске мицелия и его структуре, пигментации, форме, размерам апикальной и базальной клеток макроконидий, наличию микроконидий. Для оценки размера макроконидий брали средний показатель микрокопирования, 300 конидий.

В качестве справочной литературы при установлении видовой принадлежности гриба использовали определители (Gerlach, Nirenberg, 1982; Билай, Курбацкая, 1990; Leslie, Summerell, 2006; Dictionary..., 2008; Watanabe, 2010). Современный таксономический статус выделенных видов *Fusarium* уточняли по адресу <http://www.indexfungorum.org/>.

Частоту встречаемости отдельных видов *Fusarium* в образцах пораженных растений в процентах определяли по формуле

$$P = (100 \times n) / N,$$

где P – частота встречаемости вида в популяции (в %); N – общее количество изолятов грибов рода *Fusarium* в выборке; n – количество изолятов определенного вида *Fusarium* в выборке.

Изоляты грибов, выделенные из пораженных образцов кукурузы, помещали на хранение в лабораторию ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ. Изоляты содержались в холодильниках при температуре 7–10 °С в биологических пробирках на косяках питательной среды – картофельно-глюкозном агар-агаре (Билай, Элланская, 1982).

Патогенные и токсичные свойства штаммов изучали, применяя метод биопробы на семенах. Патогенность споровых суспензий и фитотоксичность фильтратов культуральных жидкостей (ФКЖ) грибов тестировали на семенах пшеницы (сорт Мироновская 808). О степени патогенности и токсичности штаммов судили по влиянию суспензий конидий и ФКЖ на всхожесть семян, развитие ростка и первичных корней пшеницы, однако основным показателем считали длину корней.

Определение степени патогенности и токсичности проводили на 5-е сутки от начала проращивания семян. Если длина проростков и корней (в мм) в опытном варианте составляла 0–30 % от длины контроля, то это свидетельствовало о сильной патогенной (П) и сильной токсичной (Т) активности гриба; 31–50 % – умеренной патогенности (УП) и умеренной токсичности (УТ); 51–70 % – слабой патогенности (СП) и слабой токсичности (СТ); 71–100 % – о непатогенных (НП) и нетоксичных (НТ) свойствах изолятов. Длину ростков и первичных корней семян, пророщенных в воде, считали контролем и принимали за 100 % (Парфенова, Алексеева, 1995).

Результаты и обсуждение

Микологические исследования анализируемых растений кукурузы, собранных в разные фазы вегетации (формирование 5–6-го листа, трубкование, молочная спелость), показали наличие на них микромицетов, относящихся как к фитопатогенам, так и к сапротрофам. Всего из образ-

цов кукурузы было выделено и идентифицировано более 30 видов микромицетов.

Сапротрофные виды грибов из родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Periconia*, *Pythium*, *Trichothecium* и др. преобладали на тканях корней и прикорневых участках стеблей кукурузы (табл. 1). На листьях образцов чаще обнаруживали гетеротрофные виды грибов. Практически половина (1600 ед.) идентифицированных из листьев и корней изолятов грибов принадлежала к родам *Alternaria*, *Bipolaris*, *Exserohilum* и *Fusarium*. Следует отметить, что частота встречаемости грибов *Alternaria* spp. зависела от фенологической фазы растений кукурузы. Так, в фазу формирования 5–6-го листа грибы этого рода значительно чаще выделяли из тканей корней кукурузы, в фазу молочной спелости – с листьев.

Симптоматический анализ образцов кукурузы выявил признаки инфицирования их возбудителем *Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J. Leonard & E.G. Suggs (= *Setosphaeria turcica*). На листьях кукурузы нижнего яруса отмечали крупные пятна, серые – в центре и с более темными краями с сажистым налетом. Образцы с такими признаками встречались в фазу трубкования и молочной спелости, интенсивность поражения их была низкой и колебалась от 1 до 20 % площади листа нижнего яруса.

Изоляты *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker (*Cochliobolus sativus*) преимущественно находили на корнях и прикорневой части стеблей кукурузы в фазу формирования 5–6-го листа. На листьях в эту и более поздние фенофазы гриб не идентифицировался.

Проявление болезней, вызванных грибами из рода *Fusarium*, имело схожую симптоматику. Как правило, на листьях, стеблях, прикорневой шейке и корнях кукурузы отмечали бурые или желтые участки, часто с признаками мацерации или трухлявости. Изучение в культуре образцов пораженных тканей растений кукурузы позволило выделить в чистую культуру более 900 изолятов рода *Fusarium* и идентифицировать их по морфологическим признакам (скорости роста колонии, окраске и структуре мицелия), наличию, форме и размерам макро- и микроконидий (при наличии); следующие 11 видов этого рода – *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. roseum*, *F. sporotrichioides*, *F. solani* (табл. 2). В ряде случаев из одного образца пораженной ткани кукурузы выделяли более чем один-два микромицета из рода *Fusarium*. Особенно часто это отмечали при выделении в чистую культуру *F. oxysporum*, которому, как правило, сопутствовали виды *F. roseum*, *F. poae*, *F. solani* и др.

Частота встречаемости фузариевых грибов была неоднозначной и заметно менялась в зависимости от фазы вегетации кукурузы и, возможно, складывающихся погодных условий сезона. В комплексе микромицетов из рода *Fusarium* на посевах кукурузы в Воронежской области наиболее часто встречались виды *F. heterosporum* и *F. oxysporum*. Суммарная доля этих двух видов составляла половину от всех идентифицированных изолятов, принадлежащих другим видам *Fusarium*. Тем не менее колебания по частоте встречаемости этих видов грибов наблюдали во все фенологические фазы развития кукурузы. При

Таблица 1. Виды микромицетов, обнаруженные на посевах кукурузы в Воронежской области в 2020 г.

| Вид гриба | Фенологические фазы развития | | |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|----------------------|
| | Формирование 5–6-го листа | Трубкование | Молочная спелость |
| <i>Acremonium</i> sp. | ++ | ++ | +++ |
| <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. | +++ | +++ | +++ |
| <i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire | +++ | +++ | +++ |
| <i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church | ++ | +++ | ++ |
| <i>Aspergillus flavus</i> Link | + | +++ | ++ |
| <i>Aspergillus niger</i> Tiegh. | +++ | +++ | ++ |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> Shoemaker | +++ | + | ++ |
| <i>Botrytis cinerea</i> Pers. | ++ | ++ | +++ |
| <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link | ++ | + | ++ |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries | +++ | ++ | +++ |
| <i>Cephalosporium</i> sp. | + | + | ++ |
| <i>Chaetomium murorum</i> Corda | +++ | +++ | +++ |
| <i>Curvularia</i> sp. | + | + | + |
| <i>Gliocladium</i> sp. | + | + | ++ |
| <i>Exserohilum turcicum</i> (Pass.) K.J. Leonard & E.G. Suggs | – | + | ++ |
| <i>Fusarium culmorum</i> (Wm.G. Sm.) Sacc. | ++ | ++ | +++ |
| <i>Fusarium gibbosum</i> Appel & Wollenw. | + | + | ++ |
| <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe | + | ++ | + |
| <i>Fusarium heterosporum</i> Nees & T. Nees | +++ | +++ | +++ |
| <i>Fusarium fujikuroi</i> Nirenberg | ++ | +++ | +++ |
| <i>Fusarium incarnatum</i> (Desm.) Sacc. | – | – | + |
| <i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. | +++ | +++ | +++ |
| <i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw. | – | + | +++ |
| <i>Fusarium roseum</i> Link | + | +++ | ++ |
| <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. | – | ++ | ++ |
| <i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb. | ++ | ++ | +++ |
| <i>Mucor mucedo</i> Fresen. | +++ | +++ | +++ |
| <i>Nigrospora</i> sp. | ++ | ++ | +++ |
| <i>Penicillium</i> sp. | +++ | +++ | +++ |
| <i>Periconia</i> sp. | ++ | ++ | ++ |
| <i>Pythium</i> sp. | ++ | ++ | +++ |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill | +++ | +++ | ++ |
| <i>Talaromyces luteus</i> (Zukal) C.R. Benj. | + | + | + |
| <i>Trichoderma</i> sp. | ++ | + | + |
| <i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link | ++ | +++ | +++ |
| Стерильные мицелии | ++ | +++ | +++ |

Примечание. «+» – от 1 до 10 изолятов гриба; «++» – от 11 до 20 изолятов гриба; «+++» – выше 20 изолятов гриба.

оценке частоты встречаемости видов из рода *Fusarium* в фазу молочной спелости было замечено, что доля изолятов *F. heterosporum* и *F. oxysporum* снижалась в 1.5–2 раза (см. табл. 2). Следует указать также, что изоляты *F. heterosporum* чаще выделялись с пораженных корней кукурузы, а *F. oxysporum* – со стеблей.

При микологических исследованиях тканей кукурузы изоляты *F. fujikuroi* находили во всех вариантах опыта.

Частота встречаемости гриба постепенно менялась от низкой (6.5 %) в фазу формирования 5–6-го листа до высокой (19.4 %) в фазу молочной спелости. Вероятно, с течением времени создавались условия, более благоприятные для накопления *F. fujikuroi* в почве и на растениях кукурузы. Аналогичную картину наблюдали и для видов *F. poae* и *F. sporotrichioides*, частота встречаемости которых значительно менялась от фазы формирования 5–6-го листа

Таблица 2. Частота встречаемости видов рода *Fusarium*, выявленных на пораженных образцах кукурузы из Воронежской области в 2020 г.

| Вид гриба | Фенологические фазы развития | | | | | | Частота встречаемости видов | |
|----------------------------|------------------------------|------|-------------|------|-------------------|------|-----------------------------|------|
| | Формирование 5–6-го листа | | Трубкавание | | Молочная спелость | | | |
| | Ед. | % | Ед. | % | Ед. | % | Ед. | % |
| <i>F. culmorum</i> | 28 | 13.0 | 22 | 6.9 | 31 | 8.2 | 81 | 8.9 |
| <i>F. gibbosum</i> | 7 | 3.3 | 0 | 0 | 12 | 3.2 | 19 | 2.1 |
| <i>F. graminearum</i> | 5 | 2.3 | 12 | 3.8 | 5 | 1.3 | 22 | 2.4 |
| <i>F. heterosporum</i> | 66 | 30.7 | 108 | 33.7 | 68 | 18.6 | 242 | 26.5 |
| <i>F. fujikuroi</i> | 14 | 6.5 | 32 | 10.0 | 73 | 19.9 | 119 | 13.0 |
| <i>F. incarnatum</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 1.8 | 7 | 0.8 |
| <i>F. oxysporum</i> | 81 | 37.7 | 76 | 23.8 | 51 | 13.5 | 208 | 22.8 |
| <i>F. poae</i> | 0 | 0 | 7 | 2.2 | 44 | 11.7 | 51 | 5.6 |
| <i>F. roseum</i> | 2 | 0.9 | 25 | 7.8 | 12 | 3.2 | 39 | 4.3 |
| <i>F. solani</i> | 0 | 0 | 20 | 6.2 | 17 | 4.5 | 37 | 4.0 |
| <i>F. sporotrichioides</i> | 12 | 5.6 | 18 | 5.6 | 57 | 15.1 | 87 | 9.6 |
| Количество изолятов | 215 | 100 | 320 | 100 | 377 | 100 | 912 | 100 |

до фазы молочной спелости, соответственно, от низкой (0 и 5.6 %) до высокой (11.7 и 15.1 %).

Что касается *F. culmorum*, то значительных колебаний по частоте встречаемости гриба на образцах кукурузы в разные фенологические фазы не обнаружено. Это свидетельствует о достаточно высокой жизнеспособности микромицета, занимающего определенную нишу в патокмплексе *Fusarium* spp. Как правило, макроконидии гриба выявляли на пораженных образцах с корней и листьев нижнего яруса.

Виды *F. roseum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. incarnatum* в патогенном комплексе фузариозных грибов на кукурузе встречались достаточно редко. В основном изоляты этих микромицетов определяли на пораженных корнях и прикорневой зоне стеблей. Возможно, либо эти виды грибов не играют существенной роли в патогенезе кукурузы, либо не было условий для их развития.

В результате микологических исследований получен биологический материал, представленный большим количеством изолятов грибов: 11 видов из рода *Fusarium*; 55 изолятов грибов из 7 таксономических групп (*F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. roseum*, *F. sporotrichioides*) были проверены по патогенности и фитотоксичности на всходах растений-тестеров.

В табл. 3 приведены результаты оценки влияния метаболитов споровых суспензий и фильтратов культуральных жидкостей изолятов грибов наиболее патогенных и фитотоксичных видов из рода *Fusarium* на развитие проростков пшеницы сорта Мироновская 808 (всхожесть семян, длина ростка и корней). Показано, что изоляты грибов из рода *Fusarium*, представленные разными видами, обладали широким внутривидовым разнообразием по изучаемым признакам. В пределах одного вида встречались штаммы гриба, принадлежащие к разным категориям – от патогенных/токсичных до непатогенных/нетоксичных (см. рисунок).

Высокие фитотоксичные и патогенные свойства показали виды *F. sporotrichioides* и *F. graminearum*. Фильтраты культуральной жидкости и споровые суспензии изолятов этих видов практически полностью подавляли развитие проростков растений сорта-тестера.

Виды грибов *F. culmorum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum* обладали более сильными фитотоксичными, чем патогенными, свойствами, проявляя умеренно-токсичную и токсичную реакцию к проросткам сорта-тестера. Вид *F. roseum* характеризовался слабыми патогенностью и фитотоксичностью.

Заключение

В результате микологического анализа состава микромицетов на пораженных растениях кукурузы в разные фенологические фазы развития растений выделено более 30 видов микромицетов. На корнях и прикорневой зоне кукурузы преобладали сапротрофные виды грибов из родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Periconia*, *Pythium*, *Trichothecium* и др. На листьях чаще обнаруживали гетеротрофные виды грибов, принадлежащие к родам *Alternaria*, *Bipolaris*, *Exserohilum* и *Fusarium*. Необходимо отметить, что частота встречаемости грибов *Alternaria* spp. зависела от фенологической фазы растений кукурузы. На листьях кукурузы нижнего яруса был идентифицирован возбудитель *Exserohilum turcicum*. Возбудитель *Bipolaris sorokiniana* преимущественно инфицировал корни и прикорневую часть стебля кукурузы в фазу формирования 5–6-го листа.

В течение онтогенеза на посевах кукурузы в Воронежской области встречались 11 видов грибов из рода *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. roseum*, *F. sporotrichioides*, *F. solani*. Среди них с высокой частотой отмечены два вида – *F. heterosporum* и *F. oxysporum*. Похожие виды патогенов на кукурузе идентифицированы зарубежными учеными (Ali et al., 2005;

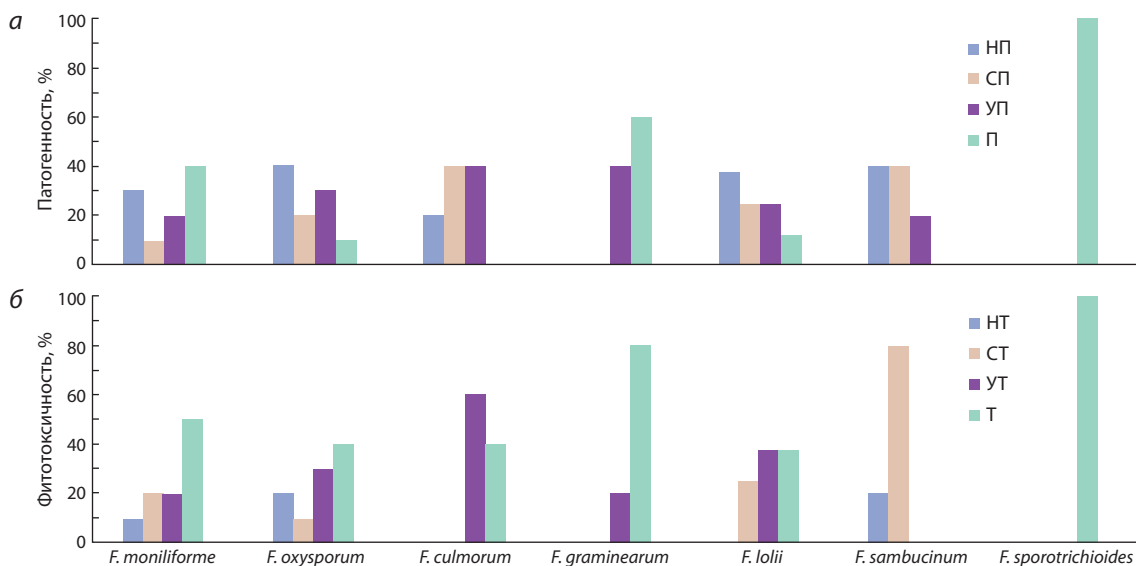
Таблица 3. Характеристика штаммов грибов семи видов из рода *Fusarium* по патогенности споровых суспензий и фитотоксичности культуральной жидкости на проростках пшеницы сорта Мироновская 808 (в % к контролю)

| Шифр штамма | Патогенность (споровая суспензия) | | | | Токсичность (культуральная жидкость) | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Всхожесть семян, % | Длина ростка, % | Длина корней, % | Степень влияния | Всхожесть семян, % | Длина ростка, % | Длина корней, % | Степень влияния |
| <i>F. fujikuroi</i> Nirenberg | | | | | | | | |
| ZM-FF-4з | 100.0 | 109.9±3.2 | 103.9±4.0 | НП | 100.0 | 96.1±3.5 | 61.0±2.6 | СТ |
| ZM-FF-2з | 100.0 | 113.7±5.2 | 99.5±4.0 | НП | 100.0 | 117.6±2.9 | 76.4±2.4 | НТ |
| ZM-FF-4з-1 | 96.7 | 113.0±4.2 | 104.8±3.1 | НП | 100.0 | 66.7±4.3 | 58.2±3.3 | УТ |
| ZM-FF-2л-1 | 100.0 | 87.3±4.6 | 65.6±3.6 | СП | 100.0 | 92.1±2.6 | 59.1±2.6 | СТ |
| ZM-FF-2кш | 100.0 | 75.8±5.3 | 45.2±3.6 | УП | 100.0 | 87.7±4.5 | 50.7±3.3 | УТ |
| ZM-FF-5з | 96.7 | 80.1±3.3 | 44.0±2.7 | УП | 100.0 | 73.3±2.6 | 86.1±1.7 | Т |
| ZM-FF-5к-1 | 83.3 | 52.4±4.3 | 18.7±2.2 | П | 95.1 | 68.4±3.7 | 17.7±4.1 | Т |
| ZM-FF-1п | 95.5 | 47.5±2.7 | 27.5±2.3 | П | 100.0 | 67.7±4.4 | 22.2±2.2 | Т |
| ZM-FF-5п | 90.0 | 64.4±3.3 | 25.5±3.4 | П | 96.7 | 65.7±5.1 | 28.3±4.6 | Т |
| ZM-FF-6з | 87.7 | 62.3±4.7 | 21.1±3.7 | П | 100.0 | 83.3±3.3 | 25.1±3.5 | Т |
| <i>F. oxysporum</i> Schlecht. | | | | | | | | |
| ZM-FO-1л | 100.0 | 114.1±4.4 | 109.5±2.2 | НП | 100.0 | 101.5±3.2 | 77.6±2.4 | НТ |
| ZM-FO-1ст | 100.0 | 111.1±3.1 | 101.9±1.5 | НП | 100.0 | 83.5±5.2 | 39.5±2.8 | УТ |
| ZM-FO-2к | 100.0 | 108.6±2.3 | 85.4±1.7 | НП | 100.0 | 91.1±4.4 | 43.1±4.3 | УТ |
| ZM-FO-8л | 100.0 | 106.5±4.2 | 88.0±2.5 | НП | 96.7 | 74.1±2.8 | 26.6±1.6 | Т |
| ZM-FO-2л | 100.0 | 101.2±4.1 | 54.5±2.0 | СП | 96.7 | 30.7±1.9 | 6.6±1.1 | Т |
| ZM-FO-4з-2 | 96.7 | 105.5±3.5 | 60.8±2.2 | СП | 100.0 | 104.0±3.7 | 80.3±2.2 | НТ |
| ZM-FO-4л-2 | 100.0 | 76.7±5.2 | 42.2±2.5 | УП | 96.7 | 96.5±3.1 | 43.6±2.5 | УТ |
| ZM-FO-4ст | 96.7 | 78.2±5.8 | 46.2±2.4 | УП | 100.0 | 86.7±3.1 | 45.3±4.5 | УТ |
| ZM-FO-3з | 100.0 | 84.1±3.3 | 40.3±3.7 | УТ | 100.0 | 51.8±5.0 | 25.8±2.4 | Т |
| ZM-FO-8з | 95.0 | 43.3±4.8 | 21.7±3.5 | Т | 100.0 | 55.8±5.4 | 18.5±3.7 | Т |
| <i>F. culmorum</i> (Sm.) Sacc. | | | | | | | | |
| ZM-FC-1з | 100.0 | 70.4±5.7 | 40.8±2.4 | УП | 96.7 | 96.5±3.1 | 43.6±2.5 | УТ |
| ZM-FC-2к | 96.7 | 78.2±5.8 | 56.2±4.4 | СП | 100.0 | 51.8±5.0 | 25.8±2.4 | Т |
| ZM-FC-3ст | 100.0 | 83.5±5.8 | 75.7±4.7 | НП | 100.0 | 86.7±3.3 | 49.5±3.5 | УТ |
| ZM-FC-6л | 100.0 | 83.1±3.5 | 53.3±5.5 | СП | 100.0 | 56.6±3.5 | 21.1±1.9 | Т |
| ZM-FC-4к-1 | 100.0 | 75.5±4.3 | 43.7±4.9 | УП | 96.7 | 95.5±3.7 | 45.5±4.2 | УТ |
| <i>F. graminearum</i> Schwabe. | | | | | | | | |
| ZM-FG-3п | 83.3 | 49.4±4.7 | 29.5±3.2 | П | 96.7 | 86.7±3.0 | 44.8±3.3 | УТ |
| ZM-FG-3кш | 96.7 | 63.3±5.1 | 56.7±4.7 | УП | 90.0 | 23.3±2.7 | 15.7±2.5 | Т |
| ZM-FG-2п | 95.0 | 55.4±4.3 | 17.5±3.3 | П | 93.7 | 76.7±3.5 | 46.7±3.7 | УТ |
| ZM-FG-1кш | 100.0 | 33.3±3.4 | 12.5±3.7 | П | 100.0 | 64.3±3.2 | 49.7±3.3 | УТ |
| ZM-FG-1л-2 | 83.3 | 66.7±4.5 | 29.1±3.7 | П | 91.1 | 65.7±3.0 | 45.4±3.5 | УТ |
| ZM-FG-5п-1 | 100.0 | 67.3±4.2 | 64.7±3.5 | УП | 100.0 | 40.3±3.8 | 15.3±3.3 | Т |
| ZM-FG-6кш | 96.3 | 63.3±4.2 | 44.7±5.1 | УП | 90.0 | 33.3±1.5 | 8.7±2.5 | Т |
| ZM-FG-4л | 100.0 | 81.1±4.4 | 58.9±3.5 | УП | 100.0 | 27.3±3.5 | 16.7±2.7 | Т |
| ZM-FG-1к-2 | 98.5 | 53.4±4.7 | 22.5±3.2 | П | 100.0 | 75.6±4.3 | 44.4±3.0 | УТ |
| ZM-FG-3п-1 | 100.0 | 63.7±4.3 | 27.7±5.2 | П | 95.0 | 33.3±2.4 | 19.1±2.5 | Т |
| <i>F. heterosporum</i> Nees & T. Nees | | | | | | | | |
| ZM-FL-1к | 100.0 | 103.5±1.8 | 77.0±1.6 | НП | 100.0 | 84.4±3.0 | 40.7±1.9 | УТ |
| ZM-FL-2л | 100.0 | 109.3±2.5 | 87.8±2.3 | НП | 100.0 | 86.2±2.2 | 42.3±1.2 | УТ |
| ZM-FL-1к-1 | 100.0 | 106.9±2.1 | 81.3±3.0 | НТ | 86.5 | 32.1±2.7 | 15.7±3.5 | Т |
| ZM-FL-3л | 100.0 | 97.2±2.4 | 64.9±1.6 | СП | 96.7 | 84.3±3.8 | 52.8±2.9 | СТ |
| ZM-FL-3л-1 | 96.7 | 75.5±4.3 | 66.7±2.7 | СП | 96.7 | 76.3±3.2 | 57.3±4.2 | СТ |
| ZM-FL-2кш | 98.6 | 66.5±5.4 | 50.7±4.7 | УП | 100.0 | 88.7±3.7 | 46.1±3.5 | УТ |
| ZM-FL-3к | 96.7 | 86.7±3.0 | 44.9±3.3 | УП | 93.3 | 43.4±2.5 | 19.7±3.5 | Т |
| ZM-FL-3л-2 | 83.3 | 47.7±4.3 | 23.3±3.2 | П | 90.0 | 36.7±4.7 | 25.7±1.5 | Т |

Окончание таблицы 3

| Шифр штамма | Патогенность (споровая суспензия) | | | | Токсичность (культуральная жидкость) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Всхожесть семян, % | Длина ростка, % | Длина корней, % | Степень влияния | Всхожесть семян, % | Длина ростка, % | Длина корней, % | Степень влияния |
| <i>F. roseum</i> Link | | | | | | | | |
| ZM-FR-5к | 100.0 | 101.3±1.8 | 93.8±3.2 | НП | 100.0 | 96.3±1.7 | 93.9±2.1 | НТ |
| ZM-FR-1к-1 | 100.0 | 99.1±2.8 | 95.3±4.1 | НП | 100.0 | 87.3±4.6 | 65.6±3.6 | СТ |
| ZM-FR-4п | 100.0 | 90.9±1.8 | 68.7±3.8 | СП | 100.0 | 92.3±2.5 | 65.4±2.7 | СТ |
| ZM-FR-4л-1 | 100.0 | 92.3±1.5 | 65.5±3.4 | СП | 96.7 | 84.3±3.8 | 62.8±3.9 | СТ |
| ZM-FR-6к | 96.7 | 88.8±2.3 | 48.8±2.5 | УП | 100.0 | 90.6±4.0 | 61.4±2.5 | СТ |
| <i>F. sporotrichioides</i> Swerb. | | | | | | | | |
| ZM-FS-4к | 100.0 | 34.5±4.5 | 15.9±1.7 | П | 100.0 | 29.8±1.9 | 4.2±0.8 | Т |
| ZM-FS-8к | 90.0 | 53.6±7.1 | 21.5±2.6 | П | 90.0 | 43.3±2.3 | 15.7±2.5 | Т |
| ZM-FS-2ст | 88.3 | 53.6±3.3 | 10.5±3.3 | П | 98.2 | 51.1±4.3 | 25.1±3.6 | Т |
| ZM-FS-2л-2 | 85.7 | 44.7±3.4 | 8.5±3.5 | П | 100.0 | 44.1±3.5 | 22.5±3.3 | Т |
| ZM-FS-6ст | 90.0 | 47.7±3.8 | 11.1±3.5 | П | 95.0 | 43.3±2.3 | 11.1±2.5 | Т |
| ZM-FS-1к-1 | 90.0 | 57.3±3.6 | 22.3±2.4 | П | 85.3 | 23.5±2.3 | 4.7±2.5 | Т |
| ZM-FS-4к-2 | 100.0 | 55.7±4.1 | 15.1±3.5 | П | 83.7 | 23.7±2.1 | 5.5±2.5 | Т |

Примечание. НП/НТ – непатогенный/нетоксичный; СП/СТ – слабопатогенный/слаботоксичный; УП/УТ – умеренно-патогенный/умеренно-токсичный; П/Т – патогенный/токсичный.



Распределение видов грибов из рода *Fusarium* по патогенности (а) и фитотоксичности (б), %.

Eller et al., 2008). В течение многолетних исследований В.Г. Иващенко с коллегами обнаружили 15 видов грибов фузариозной этиологии на посевах кукурузы в России (Иващенко, 2012).

Показано, что патогенная и фитотоксичная активность у грибов как между видами *Fusarium*, так и в пределах одного вида существенно различается. Наибольшую опасность для кукурузы представляют фузариевые грибы следующих видов: *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, обладающие высокой интенсивностью проявления фитотоксической активности, связанной со способностью к синтезу и накоплению опасных токсинов в тканях растений. Результаты исследований пшеницы, ранее полученные

нами, во многом совпадают с данными, представленными в статье. Штаммы *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. oxysporum*, выделенные с пшеницы, обладали широким внутривидовым разнообразием по этим признакам. Среди них так же, как и на кукурузе, встречались штаммы грибов с разным уровнем патогенной и фитотоксичной активности (Жемчужина и др., 2021).

Характер воздействия ФКЖ штаммов грибов *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* и *F. redolens* на проростки ячменя определяется высокой, а *F. avenaceum*, *F. poae* – слабой фитотоксичностью. Из всех перечисленных видов наиболее патогенными и фитотоксичными на ячмене оказались изоляты *F. sporotrichioides* и *F. sambucinum*. У видов *F. culmorum* и *F. oxysporum*, в от-

личие от выделенных с кукурузы, распределение частот встречаемости всех категорий патогенности и фитотоксичности было примерно одинаковым (Коломиец и др., 2018).

Таким образом, в результате микологических исследований, проведенных на пораженных образцах кукурузы из Воронежской области, Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ была пополнена 55 штаммами грибов, относящимися к семи видам патогенов из рода *Fusarium*. Отобранные штаммы фитопатогенов, стабильные по морфолого-культуральным признакам, охарактеризованные по свойствам патогенности и фитотоксичности, заложены на длительное хранение с использованием методов лиофилизации и криоконсервации.

Список литературы / References

- Бабиц А.А. Тенденции развития кукурузоводства в США. *Кукуруза и сорго*. 1986;4:40.
[Babich A.A. Trends in the development of maize industry in the USA. *Kukuruz a i Sorgo = Maize and Sorghum*. 1986;4:40. (in Russian)]
- Березкин А.Н., Малько А.М. Организация семеноводства сельскохозяйственных культур в Канаде. М.: Изд-во МСХА, 1998.
[Berezkin A.N., Malko A.M. Organization of Crop Seed Production in Canada. Moscow: Publishing House of the Ministry of Agriculture, 1998. (in Russian)]
- Билай В.И. Фузариоз. Киев: Наук. думка, 1977.
[Bilay V.I. Fusarii. Kyiv: Naukova Dumka Publ., 1977. (in Russian)]
- Билай В.И., Курбачкая З.А. Определитель токсинообразующих микромицетов. Киев: Наук. думка, 1990.
[Bilay V.I., Kurbatskaya Z.A. Guide to Toxin-Forming Micromycetes. Kyiv: Naukova Dumka Publ., 1990. (in Russian)]
- Билай В.И., Элланская И.А. Основные микологические методы в фитопатологии. В: Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев: Наук. думка, 1982;418-431.
[Bilay V.I., Ellanskaya I.A. Basic mycological methods in plant pathology. In: Methods of Experimental Mycology. Handbook. Kyiv: Naukova Dumka Publ., 1982;418-431. (in Russian)]
- Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М. Современное состояние таксономии грибов рода *Fusarium* секции *Sporotrichiella*. *Микология и фитопатология*. 2008;42(3):201-214.
[Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Levitin M.M. Modern taxonomy of fungi from the genus *Fusarium* section *Sporotrichiella*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2008;42(3):201-214. (in Russian)]
- Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М. Современное состояние таксономии грибов комплекса *Gibberella fujikuroi*. *Микология и фитопатология*. 2005;39(6):3-14.
[Gagkaeva T.Yu., Levitin M.M. Current state of the art in the taxonomy of the fungi belonging to *Gibberella fujikuroi* complex. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2005;39(6):3-14. (in Russian)]
- Дубовой В.П., Жемчужина Н., Елизарова С., Горелов П. Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ. *Аналитика*. 2016;1:76-79.
[Dubovoy V., Zhemchuzhina N., Elizarova S., Gorelov P. State collection of phytopathogenic microorganisms from All-Russian Research Institute of Phytopathology. *Analitika = Analytics*. 2016;1:76-79. (in Russian)]
- Жемчужина Н.С., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Аблова И.Б., Глинушкин А.П., Елизарова С.А. Выявление разнообразия микромицетов рода *Fusarium* в агроэкосистемах равнинной части Северного Кавказа для пополнения Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИФ. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):874-881. DOI 10.18699/VJ21.101.
- [Zhemchuzhina N.S., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Ablova I.B., Glinushkin A.P., Elizarova S.A. Revealing the diversity of *Fusarium* micromycetes in agroecosystems of the North Caucasus plains for replenishing the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):874-881. DOI 10.18699/VJ21.101. (in Russian)]
- Ивашченко В.Г. Распространенность основных болезней кукурузы в России и СНГ. *Вестн. защиты растений*. 2007;S:68-81.
[Ivashchenko V.G. Prevalence of major maize diseases in the USSR and the CIS. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2007;S:68-81. (in Russian)]
- Ивашченко В.Г. Технология отбора исходного материала и создания гибридов кукурузы с групповой и комплексной устойчивостью к болезням и засухе. СПб: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, 2009а.
[Ivashchenko V.G. Technology of Selection of Source Material and Creation of Maize Hybrids with Group and Complex Resistance to Diseases and Drought. St. Petersburg: All-Russian Research Institute of Plant Protection of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2009a. (in Russian)]
- Ивашченко В.Г. Устойчивость кукурузы к основным болезням и эффективность ее использования при скрининге. В: Современные иммунологические исследования, их роль в создании новых сортов и интенсификации растениеводства. М.: ВНИИФ, 2009б; 54-61.
[Ivashchenko V.G. Resistance of maize to major diseases and the effectiveness of its use in screening. In: Modern Immunological Studies, Their Role in the Creation of New Varieties, and the Intensification of Crop Production. Moscow: VNIIF, 2009b;54-61. (in Russian)]
- Ивашченко В.Г. Болезни кукурузы фузариозной этиологии: основные причины и следствия. *Вестн. защиты растений*. 2012;4: 3-19.
[Ivashchenko V.G. Fusarium maize diseases: main causes and consequences. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2012;4:3-19. (in Russian)]
- Ивашченко В.Г., Матвеева Г.В. Самоопыленные линии кукурузы (оценка на устойчивость к болезням). В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 796. СПб., 2010.
[Ivashchenko V.G., Matveeva G.V. Self-pollinated maize lines: assessment for disease resistance. In: Catalog of the VIR World Collection. Issue 796. St. Petersburg, 2010. (in Russian)]
- Ивашченко В.Г., Сотченко Е.Ф., Сотченко Ю.В. Совершенствование системы оценок кукурузы на устойчивость к засухе и фузариозу початков. *Вестн. защиты растений*. 2006;1:16-20.
[Ivashchenko V.G., Sotchenko E.F., Sotchenko Yu.V. Improving the evaluation system of maize for resistance to drought and Fusarium cob rot. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2006;1:16-20. (in Russian)]
- Коломиец Т.М., Жемчужина Н.С., Панкратова Л.Ф., Александрова А.В., Киселева М.И., Елизарова С.А. Микромицеты Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов, вызывающие микозы и микотоксикозы человека и животных. *Усп. мед. микологии*. 2018;19:371-372.
[Kolomiets T.M., Zhemchuzhina N.S., Pankratova L.F., Alexandrova A.V., Kiseleva M.I., Elizarova S.A. Micromycetes of the State Collection of phytopathogenic microorganisms causing mycoses and mycotoxicoses in humans and animals. *Uspekhi Meditsinskoy Mikologii = Advances in Medical Mycology*. 2018;19:371-372. (in Russian)]
- Парфенова Т.А., Алексеева Т.П. Токсическое влияние фильтрата культуральной жидкости грибов рода *Fusarium* на семена пшеницы. *Микология и фитопатология*. 1995;29(1):78-82.
[Parfenova T.A., Alekseeva T.P. Toxic effect of culture fluid filtrate of *Fusarium* fungi on wheat seeds. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1995;29(1):78-82. (in Russian)]

- Сотченко В.С. Перспективы производства зерна кукурузы в Российской Федерации. В: Материалы науч.-практ. конф. «Селекция семеноводство, производство зерна кукурузы». Пятигорск: Кавказская здравница, 2002;5-16.
[Sotchenko V.S. Prospects of maize grain production in the Russian Federation. In: Proceedings of the Scientific-Practical Conference "Breeding, Seed Industry, and Production of Maize Grain". Pyatigorsk: Kavkazskaya Zdravnitsa Publ., 2002;5-16. (in Russian)]
- Сотченко В.С. Состояние и перспективы производства зерна кукурузы в Российской Федерации. *Кукуруза и сорго*. 2005;1:2-9.
[Sotchenko V.S. The state and prospects of maize grain production in the Russian Federation. *Kukuruzha i Sorgo = Maize and Sorghum*. 2005;1:2-9. (in Russian)]
- Сотченко В.С. Перспективы возделывания кукурузы для производства высокоэнергетических кормов. В: Материалы науч.-практ. конф. «Селекция. Семеноводство. Технология возделывания кукурузы». Пятигорск: Кавказская здравница, 2009;12-22.
[Sotchenko V.S. Prospects of maize cultivation for the production of high-energy fodder. In: Materials of the Scientific-Practical Conference "Maize Breeding, Seed Production, and Cultivation Technology". Pyatigorsk: Kavkazskaya Zdravnitsa Publ., 2009;12-22. (in Russian)]
- Сотченко В.С., Горбачева А.Г. Производство кукурузы и особенности ее семеноводства в России. *Земледелие*. 2011;2:3-5.
[Sotchenko V.S., Gorbacheva A.G. Maize production and features of its seed industry in Russia. *Zemledelie = Agriculture*. 2011;2:3-5. (in Russian)]
- Супрунов А.И. Создание нового исходного материала для селекции различных подвидов кукурузы и его оценка в агроклиматических зонах России: Дис. ... д-ра с.-х. наук. Краснодар, 2009.
[Suprunov A.I. Creation of a new source material for the selection of various subspecies of maize and its evaluation in the agroclimatic zones of Russia: Doctor Sci. (Agric.) Dissertation. Krasnodar, 2009. (in Russian)]
- Agarwal V.K., Sinclair J.B. Principles of Seed Pathology. Boca Raton: CRC Press, 1997. DOI 10.1201/9781482275650.
- Ali M.L., Taylor J.H., Liu J., Sun G., William M., Kasha K.J., Reid L.M., Pauls K.P. Molecular mapping of QTLs for resistance to *Gibberella* ear rot in corn, caused by *Fusarium graminearum*. *Genome*. 2005;48(3):521-533. DOI 10.1139/g05-014.
- Clements M.J., White D.G. Identifying sources of resistance to aflatoxin and fumonisin contamination in corn. *J. Toxicol. Toxin Rev*. 2004;23:381-396. DOI 10.1081/TXR-200027865.
- Dictionary of the Fungi. P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers (Eds.). Wallingford: CABI, 2008.
- Eller M.S., Robertson-Hout L.A., Paune G.A., Holland J.B. Grain yield and *Fusarium* ear rot of maize hybrids developed from lines with varying levels of resistance. *Maydica*. 2008;53:231-237.
- Elmore R.W., Abendroth L. Agronomics for corn: have we exhausted the easy options. In: Illinois Crop Protection Technology Conference. 2008;75-78.
- Hooker A.L. Inheritance of mature plant resistance to rust in corn. *Phytopathology*. 1967;57:815.
- Gerlach W., Nirenberg H. The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesans Land-Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 1982.
- Kolomiets T., Zhemchuzhina N. Genetic resources of the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Research Institute of Phytopathology (ARRIP). In: Conf. proc. of XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collection Organisation, Moscow, 13–15 September 2018. Moscow. 2018;45-46. DOI 10.18699/PlantGen2019-002.
- Lancashire P.D., Bleiholder H., Langeluddecke P., Stauss R., van den Boom T., Weber E., Witzgen-Berger A. A uniform decimal code for the growth stages of crops and weeds. *Ann. Appl. Biol.* 1991;119(3): 561-601. DOI 10.1111/j/1774-7348/1991.tb04895.x.
- Large E.C. Growth stages in cereals illustration of the feekes scale. *Plant Pathol.* 1954;3(4):128-129. DOI 10.1111/j.1365-3059.1954.tb00716.x.
- Leslie J.F., Summerell B.A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.
- Mesterhazy A., Lemmens M., Reid L.M. Breeding for resistance to ear rot caused by *Fusarium* spp. in maize (a review). *Plant Breed.* 2012;131(1):1-19. DOI 10.1111/J.1439-0523.2011.01936.X.
- Miller S.S., Reid L.M., Harris L.J. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. *Can. J. Bot.* 2007;85(4):369-376. DOI 10.1139/B07-027.
- Murillo-Williams A., Munkvold G.P. Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Plant Dis.* 2008;92:1695-1700. DOI 10.1094/PDIS-92-12-1695.
- Robertson-Hoyt L.A., Kleinschmidt C.E., White D.G., Payne G.A., Maragos C.M., Holland J.B. Relationships of resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination with agronomic performance of maize. *Crop Sci.* 2007;47:1770-1778. DOI 10.2135/CROPSCI2006.10.0676.
- Watanabe T. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. New York: CRC Press, 2010. DOI 10.1201/9781420040821.

ORCID ID

T.M. Kolomiets orcid.org/0000-0002-1897-2380

Благодарности. Исследования выполнены при поддержке темы Государственного задания FGGU-2022-0008.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.04.2022. После доработки 15.06.2022. Принята к публикации 22.06.2022.

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 22.09.2022. Выход в свет 30.09.2022. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 10.4.

Уч.-изд. л. 12.1. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–45 экз.) Заказ № 284. Цена свободная.

Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

