

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ20.604

Учредители

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

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, 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)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Rogozin – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
В.С. Славин – д-р наук, проф. (США)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Нидерланды)
Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – д-р биол. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Д. Ларкин – д-р биол. наук (Великобритания)
И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.Ю. Новикова – канд. техн. наук (Россия)
Е. Песцова – д-р биол. наук (Германия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
Е. Турусбеков – канд. биол. наук (Казахстан)
М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)
Ю. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

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/VJ20.604

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"
The Vavilov Society of Geneticists and Breeders
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, 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

Executive Secretary

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

Editorial council

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agric.), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States
V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia
T.G. Amstislavskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Netherlands
N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
D. Larkin, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany
I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E. Pestsova, Dr. Sci. (Biology), Germany
L.Yu. Novikova, Cand. Sci. (Engineering), Russia
N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
E. Turuspekov, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

Генетика растений

- 5 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Полиморфизм сортов и дикорастущих видов земляники генетической коллекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1*. А.С. Лыжин, И.В. Лукьянчук, Е.В. Жбанова
- 12 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изучение изменчивости ДНК органелл аллоплазматических линий ячменя в эпоху высокопроизводительного секвенирования. М.Г. Синявская, А.М. Макаревич, И.М. Голоенко, В.С. Панкратов, О.Д. Левданский, Н.Г. Данilenко, Н.В. Луханина, А.М. Шимкевич, О.Г. Давыденко (на англ. языке)

Биотехнология и селекция растений

- 20 **ОБЗОР**
Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции. А.М. Камнев, О.Ю. Антонова, С.Е. Дунаева, Т.А. Гавриленко, И.Г. Чухина
- 31 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А.В. Солдатенко
- 40 **ОБЗОР**
Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы. Т.П. Жужалова, Е.О. Колесникова, Е.Н. Васильченко, Н.Н. Черкасова

Экологическая генетика

- 48 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Морфотипы и генетическая изменчивость *Dendrobaena schmidtii* (Lumbricidae, Annelida). С.В. Шеховцов, И.Б. Рапопорт, Т.В. Полубоярова, А.П. Гераськина, Е.В. Голованова, С.Е. Пельтек
- 55 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Выявление *Ehrlichia* spp. и *Theileria* spp. в клещах *Hyalomma anatolicum*, собранных в Таджикистане. М.Ю. Карташов, Ю.В. Кононова, И.Д. Петрова, Н.Л. Тупота, Т.П. Микрюкова, В.А. Терновой, Ф.Х. Тишкова, В.Б. Локтев (на англ. языке)
- 60 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Дикий горох (*Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn. s.l.) на периферии ареала: горы Загрос. О.Э. Костерин, В.С. Богданова, А.В. Мглинец (на англ. языке)

Молекулярная и клеточная биология

- 69 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Характеристика полногеномной последовательности рекомбинантного норовируса генотипа GII.P16/GII.4 Sydney_2012, выявленного в России. Е.В. Жираковская, А.Ю. Тикунов, С.Н. Соколов, Б.И. Кравчук, Е.И. Краснова, Н.В. Тикунова
- 80 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Нокаут гена *shp-2* приводит к повышению CAR-опосредованной цитотоксичности НК-клеток линии YТ. В.Г. Субракова, С.В. Кулемзин, Т.Н. Беловежец, А.Н. Чикаев, Н.А. Чикаев, О.А. Коваль, А.А. Горчаков, А.В. Таранин

Медицинская генетика

- 87 **ОБЗОР**
Лонгитюдные генетические исследования когнитивных характеристик. Р.Н. Мустафин, А.В. Казанцева, Р.Ф. Еникеева, С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова
- 96 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Связь носительства аллельных вариаций по rs2228145 (A > C) гена *IL6R* с уровнем транскриптов генов *VCAM1* и *ICAM1* при эссенциальной артериальной гипертензии. Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, И.В. Курбатова

Биоинформатика и системная биология

- 102 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
PlantLayout – программное средство для моделирования распределения веществ в тканях различной структуры. М.С. Савина, В.В. Миронова (на англ. языке)

Исправления

- 108 Исправление к статье «Уровень тревожности и содержание нейрометаболитов в гиппокампе и амигдале крыс после завершения хронического предаторного стресса». О.Б. Шевелев, В.Э. Цейликман, Н.В. Хоцкин, А.С. Хоцкина, Г.В. Концевая, М.С. Лапшин, М.П. Мошкин, М.В. Комелькова, И.В. Фекличева, О.Б. Цейликман, Е.Б. Манухина, Г.Ф. Дауни, Е.Л. Завьялов
- 109 Исправление к статье «Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии для таксономии мискантуса». Н.М. Слынько, Н.В. Бурмакина, О.М. Поцелуев, С.Ю. Капустянчик, Г.Ю. Галицын, Т.Н. Горячковская, Л.В. Куйбида, С.В. Шеховцов, С.Е. Пельтек, В.К. Шумный

Plant genetics

- 5 ORIGINAL ARTICLE
Polymorphism of the *FaOMT* and *FaFAD1* genes for fruit flavor volatiles in strawberry varieties and wild species from the genetic collection of the Michurin Federal Research Center. A.S. Lyzhin, I.V. Luk'yanchuk, E.V. Zhanova
- 12 ORIGINAL ARTICLE
The study of organelle DNA variability in alloplasmic barley lines in the NGS era. M.G. Siniauskaya, A.M. Makarevich, I.M. Goloenko, V.S. Pankratov, A.D. Liaudanski, N.G. Danilenko, N.V. Lukhanina, A.M. Shimkevich, O.G. Davydenko

Biotechnology and plant breeding

- 20 REVIEW
Molecular markers in the genetic diversity studies of representatives of the genus *Rubus* L. and prospects of their application in breeding. A.M. Kamnev, O.Yu. Antonova, S.E. Dunaeva, T.A. Gavrilenko, I.G. Chukhina
- 31 ORIGINAL ARTICLE
Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish. E.V. Kozar, E.A. Dombldes, A.V. Soldatenko
- 40 REVIEW
Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. T.P. Zhuzhzhhalova, E.O. Kolesnikova, E.N. Vasilchenko, N.N. Cherkasova

Ecological genetics

- 48 ORIGINAL ARTICLE
Morphotypes and genetic diversity of *Dendrobaena schmidtii* (Lumbricidae, Annelida). S.V. Shekhovtsov, I.B. Rapoport, T.V. Poluboyarova, A.P. Geraskina, E.V. Golovanova, S.E. Peltek
- 55 ORIGINAL ARTICLE
Detection of *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. in *Hyalomma anatolicum* ticks collected in Tajikistan. M.Yu. Kartashov, Yu.V. Kononova, I.D. Petrova, N.L. Tupota, T.P. Mikryukova, V.A. Ternovoi, F.H. Tishkova, V.B. Loktev
- 60 ORIGINAL ARTICLE
Wild pea (*Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn. s.l.) at the periphery of its range: Zagros Mountains. O.E. Kosterin, V.S. Bogdanova, A.V. Mglinets

Molecular and cell biology

- 69 ORIGINAL ARTICLE
Characterization of the complete genome sequence of the recombinant norovirus GII.P16/GII.4_Sydney_2012 revealed in Russia. E.V. Zhirakovskaia, A.Y. Tikunov, S.N. Sokolov, B.I. Kravchuk, E.I. Krasnova, N.V. Tikunova
- 80 ORIGINAL ARTICLE
shp-2 gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK-cells. V.G. Subrakova, S.V. Kulemzin, T.N. Belovezhets, A.N. Chikaev, N.A. Chikaev, O.A. Koval, A.A. Gorchakov, A.V. Taranin

Medical genetics

- 87 REVIEW
Longitudinal genetic studies of cognitive characteristics. R.N. Mustafin, A.V. Kazantseva, R.F. Enikeeva, S.B. Malykh, E.K. Khusnutdinova
- 96 ORIGINAL ARTICLE
The relationship of the carriership of allelic variations in rs2228145 (A > C) of the *IL6R* gene with the levels of *VCAM1* and *ICAM1* gene transcripts in patients with essential hypertension. L.V. Topchieva, V.A. Korneva, I.V. Kurbatova

Bioinformatics and systems biology

- 102 ORIGINAL ARTICLE
PlantLayout pipeline to model tissue patterning. M.S. Savina, V.V. Mironova

Erratum

- 108 Erratum to: "Anxiety and neurometabolite levels in the hippocampus and amygdala after prolonged exposure to predator-scent stress". O.B. Shevelev, V.E. Tseilikman, N.V. Khotskin, A.S. Khotskina, G.V. Kontsevaya, M.S. Lapshin, M.P. Moshkin, M.V. Komelkova, I.V. Feklicheva, O.B. Tseilikman, E.B. Manukhina, H.F. Downey, E.L. Zavjalov
- 109 Erratum to: "Gas chromatography-mass spectrometry in the taxonomy of *Miscanthus*". N.M. Slynko, N.V. Burmakina, O.M. Potseluyev, S.Yu. Kapustyanchik, G.Yu. Galitsin, T.N. Goryachkovskaya, L.V. Kuybida, S.V. Shekhovtsov, S.E. Peltek, V.K. Shumny

Полиморфизм сортов и дикорастущих видов земляники генетической коллекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1*

А.С. Лыжин , И.В. Лукьянчук, Е.В. Жбанова

Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина, Мичуринск, Тамбовская область, Россия

 e-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru

Аннотация. Аромат плодов – важный потребительский признак сортов земляники. К числу ключевых компонентов ароматического комплекса плодов земляники относятся мезифуран (фруктовый и карамельный аромат) и γ -декалактон (персиково-подобный, фруктовый, сладкий аромат). Содержание мезифурана в плодах земляники контролируется геном *FaOMT*, локализованным в дистальном районе длинного плеча хромосомы VII-F.1, γ -декалактона – геном *FaFAD1*, картированным в дистальном районе длинного плеча хромосомы III-2. Идентификация форм, несущих гены аромата, является важным этапом селекционных программ по созданию сортов с ароматными плодами. Использование молекулярных маркеров позволяет с высокой надежностью на ранних этапах онтогенеза определить присутствие в геноме целевых аллелей генов. Цель настоящего исследования – молекулярно-генетическое тестирование генотипов рода *Fragaria* L. по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1* для выявления полиморфизма изучаемых локусов и идентификации ценных для селекции генотипов. Объектами исследования были дикорастущие виды рода *Fragaria* L. и сорта земляники садовой (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) различного эколого-географического происхождения. Для оценки аллельного состояния гена *FaOMT* использовали маркер *FaOMT-SI/NO*, гена *FaFAD1* – маркер *FaFAD1*. Функциональный (активный) аллель гена *FaOMT* (*FaOMT+*) в гетерозиготном состоянии (генотип *FaOMT+FaOMT-*) выявлен у 34.9 % изучаемых форм, в гомозиготном (генотип *FaOMT+FaOMT+*) – у 51.2 %. Гомозиготное состояние неактивного аллеля (генотип *FaOMT-FaOMT-*) определено у 13.9 % образцов. Ген *FaFAD1* в анализируемой коллекции генотипов земляники идентифицирован у 25.6 % форм, в том числе у дикорастущих видов *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb. Сочетание функциональных аллелей генов *FaOMT* и *FaFAD1* обнаружено у 16.3 % проанализированных форм. Дикорастущие виды *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., а также сорт земляники садовой Red Gauntlet совмещают функциональный аллель гена *FaFAD1* с гомозиготным состоянием активного аллеля гена *FaOMT*, что позволяет рекомендовать их в качестве перспективных комплексных источников высокого содержания мезифурана и γ -декалактона в плодах для селекции на аромат.

Ключевые слова: земляника; аромат плодов; мезифуран; γ -декалактон; молекулярные маркеры; гены *FaOMT*; *FaFAD1*.

Для цитирования: Лыжин А.С., Лукьянчук И.В., Жбанова Е.В. Полиморфизм сортов и дикорастущих видов земляники генетической коллекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):5-11. DOI 10.18699/VJ20.588

Polymorphism of the *FaOMT* and *FaFAD1* genes for fruit flavor volatiles in strawberry varieties and wild species from the genetic collection of the Michurin Federal Research Center

A.S. Lyzhin , I.V. Luk'yanchuk, E.V. Zhibanova

I.V. Michurin Federal Scientific Center, Michurinsk, Tambov oblast, Russia

 e-mail: Ranenburzhetc@yandex.ru

Abstract. Fruit aroma is an important consumer attribute of strawberry varieties. The key volatile compounds of the aromatic complex of strawberry fruit are mesifurane (fruity and caramel aromas) and γ -decalactone (fruity, sweet, or peachy aroma). The mesifurane content in strawberry fruit is controlled by the *FaOMT* gene, which is mapped to the distal region of the long arm of chromosome VII-F.1. The γ -decalactone content in strawberry fruit is controlled by the *FaFAD1* gene, mapped to the distal region of the long arm of chromosome III-2. Identification of forms carrying genes for fruit flavor volatiles is an important step in breeding varieties with fragrant fruit. The use of molecular markers allows highly reliable detection of target gene alleles in a genome at early developmental stages. This study involves molecular genotyping of *Fragaria* L. varieties for the *FaOMT* and *FaFAD1* genes, analysis of polymorphism of the loci in question, and identification of genotypes valuable for breeding. The objects of our study were wild species of the genus *Fragaria* L. and strawberry varieties (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) of different ecological and geographic

origins. To assess the allelic states of the *FaOMT* gene, the codominant marker *FaOMT-SI/NO* was used, and for the *FaFAD1* gene, the dominant marker *FaFAD1*. The functional allele of the *FaOMT* gene (*FaOMT+*) in the heterozygous state (*FaOMT+FaOMT-* genotype) was detected in 34.9 % of the accessions tested. The functional allele of the *FaOMT* gene in the homozygous state (*FaOMT+FaOMT+* genotype) was detected in 51.2 % of the accessions. The homozygous state of the inactive allele (*FaOMT-FaOMT-* genotype) was detected in 13.9 % of the studied strawberry accessions. The *FaFAD1* gene was identified in 25.6 % of the analyzed collection of strawberry genotypes, including the wild species *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb. The combination of functional alleles of the *FaOMT* and *FaFAD1* genes was detected in 16.3 % of the analyzed forms. The wild species *F. orientalis* Los. and *F. moschata* Duch. and strawberry variety Red Gauntlet combine the functional allele of the *FaFAD1* gene with the homozygous state of the active allele of the *FaOMT* gene; therefore, we recommend them as promising sources of high contents of mesifurane and γ -decalactone in fruit in breeding programs for fruit aroma.

Key words: strawberry; fruit aroma; mesifurane; γ -decalactone; molecular markers; *FaOMT*; *FaFAD1*.

For citation: Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V., Zhanova E.V. Polymorphism of the *FaOMT* and *FaFAD1* genes for fruit flavor volatiles in strawberry varieties and wild species from the genetic collection of the Michurin Federal Research Center. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):5-11. DOI 10.18699/VJ20.588

Введение

Земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) – наиболее популярная и экономически выгодная ягодная культура, характеризующаяся высокими вкусовыми качествами и ароматом плодов¹ (Hummer, Hancock, 2009; Vandendriessche et al., 2013). При этом до недавнего времени в рамках улучшения сортимента земляники признак «аромат плодов» не считался селекционно-значимым, в связи с чем многие промышленные высокопродуктивные сорта характеризуются слабым, невыраженным ароматом (Ulrich, Olbricht, 2016; Bianchi et al., 2017). Сегодня созданию сортов с улучшенным ароматом уделяется все больше внимания, что обусловлено возросшими требованиями потребителей не только ко вкусу, но и к аромату плодов (Ulrich, Olbricht, 2011; Zorrilla-Fontanesi et al., 2012).

Ценным исходным материалом для селекции земляники, в том числе на аромат плодов, служат дикорастущие виды рода *Fragaria* L. Интрогрессия генов дикорастущих видов в геноплазму культивируемых сортов *F.* × *ananassa* Duch. позволит получить качественно новый в генетическом отношении исходный материал, повысить генетический полиморфизм селекционных популяций и диапазон варьирования признаков, способствуя интенсификации селекционного процесса (Hancock et al., 2010; Finn et al., 2013).

Ароматический профиль земляники – один из наиболее сложных, он включает более 350 летучих соединений, в том числе сложные эфиры, фураноны, терпены, альдегиды, кетоны, спирты, серосодержащие соединения и др. (Aharoni et al., 2004; Jetty et al., 2007; Schwab et al., 2008). Ключевыми компонентами ароматического комплекса плодов земляники являются фураноны: фуранеол (2,5-диметил-4-гидрокси-3(2H)-фуранон) и его производное – мезифуран (2,5-диметил-4-метокси-3(2H)-фуранон), придающие плодам фруктовый карамельный аромат. Чем больше фуранонов содержится в плодах земляники, тем более сладким кажется их запах (Lavid et al., 2002; Raab et al., 2006). Важным соединением ароматического комплекса плодов земляники является также γ -декалактон, который придает плодам персикоподобный, фруктовый, сладкий аромат (Jouquand et al., 2008; Schwab et al., 2008).

Концентрация мезифурана и γ -декалактона в плодах меняется в зависимости от генотипа, условий окружающей среды и степени зрелости плодов (Ménager et al., 2004; Jetty et al., 2007; Olbricht et al., 2008; Siegmund et al., 2010). При этом в отличие от большинства компонентов ароматического комплекса плодов земляники, биосинтез которых детерминирован полигенно, содержание мезифурана и γ -декалактона контролируется доминантными генами *FaOMT* и *FaFAD1* соответственно. В связи с этим эффективный скрининг генотипов с высоким уровнем признаков возможен с использованием функциональных ДНК-маркеров, что позволяет с высокой надежностью на ранних этапах онтогенеза выявить носителей целевых аллелей генов (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012; Chambers et al., 2014; Sánchez-Sevilla et al., 2014).

Цель настоящего исследования – молекулярно-генетическое тестирование генотипов рода *Fragaria* L. по генам аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1* для выявления полиморфизма изучаемых локусов и идентификации форм, перспективных для селекции на аромат плодов.

Материалы и методы

Биологическими объектами исследования служили видовые формы и сорта генетической коллекции земляники ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина»: 4 дикорастущих вида рода *Fragaria* L., сорт земклуники Купчиха (*F.* × *anashata* Kantor.), 38 сортов земляники садовой (*F.* × *ananassa* Duch.), из которых 22 генотипа – отечественной селекции, 16 – зарубежной (табл. 1).

Экстракцию геномной ДНК земляники проводили из молодых листьев согласно протоколу Diversity Arrays Technology P/L (DArT, 2014) с модификациями, описанными ранее (Luk'yanchuk et al., 2018).

Для оценки аллельного состояния гена *FaOMT* использовали маркер *FaOMT-SI/NO* (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012), гена *FaFAD1* – маркер *FaFAD1* (Chambers et al., 2014). Использованные для анализа праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва) и имели следующую нуклеотидную последовательность:

– маркер *FaOMT-SI/NO*: F 5'-CGATCATTTTCGAAAAG GACTA-3', R 5'-AAGCAGGGTTAGTTGTGGAGA-3';
– маркер *FaFAD1*: F 5'-CGGGATTAATGGTTTTGTTGT TGACCGACC-3', R 5'-GTAGAAGAGAGACCAA GACGAG-3'.

¹ Под термином «плод земляники» понимается используемое в пищу разросшееся сочное цветоложе с расположенными на его поверхности семенами (ложная ягода типа «фрага», или земляничина).

Таблица 1. Анализируемые дикорастущие виды и сорта земляники

№ п/п	Генотип	Происхождение/оригинатор
1	<i>F. orientalis</i> Los.	Приморский край, Россия
2	<i>F. moschata</i> Duch.	Европейская часть России
3	<i>F. ovalis</i> Rydb.	Британская Колумбия, Канада
4	<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i>	
5	Алёна	Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия
6	Витязь	
7	Русич	
8	Соловушка	
9	Зенит	
10	Сударушка	
11	Купчиха	Кокинский опорный пункт Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, Россия
12	Студенческая	
13	Крымчанка 87	Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Крым, Россия
14	Ласточка	Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина, Россия
15	Привлекательная	
16	Флора	
17	Фестивальная апомикт	
18	Дивная	Институт агроинженерных и экологических проблем сельскохозяйственного производства, Россия
19	Царскосельская	
20	Фестивальная	Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Россия
21	Торпеда	Свердловская селекционная станция садоводства Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, Россия
22	Былинная	Крымская опытно-селекционная станция Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Россия
23	Карнавал	Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Россия, Говорова Г.Ф.
24	Олимпийская надежда	
25	Богема	
26	Незнакомка	Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия, Попова И.В.
27	Гирлянда	Агрофирма «Поиск», Россия
28	Troubadour	Великобритания
29	Red Gauntlet	Шотландия
30	Фестивальная ромашка	Институт садоводства Национальной академии аграрных наук Украины, Украина
31	Polka	Plant Research International – WUR, Нидерланды
32	Gigantella Maxim	Нидерланды
33	Sonata	
34	Vima Tarda	Vissers International BV, Нидерланды
35	Vima Zanta	
36	Barlidaun	США
37	Marshall	
38	Samson	
39	Karmen	Чехия
40	Maryshka	
41	Symphony	Mylnefield Research Services Ltd, Великобритания
42	Elianny	Gebr. Vissers, Нидерланды
43	Tokado	Япония

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 2.0 мМ dNTPs, 2.5 мМ MgCl₂, 0.2 мкМ каждого праймера, 0.2 U Taq-полимеразы и 2.5 мМ Taq-буфера (+ (NH₄)₂SO₄, -KCl). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Аmplификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы Bio-Rad по следующим программам: маркер *FaOMT-SI/NO*: денатурация: 95 °C – 3 мин, 10 циклов: 95 °C – 30 с, 60 °C (–0.5 °C/цикл) – 30 с, 72 °C – 45 с; 25 циклов: 95 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 45 с; финальная элонгация: 72 °C – 5 мин; маркер *FaFAD1*: денатурация: 94 °C – 4 мин, 25 циклов: 94 °C – 30 с, 56 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; финальная элонгация: 72 °C – 10 мин.

Разделение ампликонов осуществляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Результаты и обсуждение

Содержание мезифурана в плодах земляники контролируется геном *FaOMT*, локализованным в дистальном районе длинного плеча хромосомы VII-F.1. Различия между функциональным и нефункциональным аллелями гена обусловлено рядом однонуклеотидных инсерций/делеций (индель) общим размером 30 п.н. в промоторной области гена. Праймеры *FaOMT-SI/NO* фланкируют район, содержащий указанные индели, позволяя идентифицировать активный (фрагмент размером 248 п.н.) и неактивный (фрагмент размером 217 п.н.) аллели гена *FaOMT* (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012). Влияние *FaOMT* на уровень биосинтеза мезифурана было проанализировано в гибридной комбинации 232 × 1392, где обе родительские формы характеризуются высоким уровнем мезифурана в плодах. Статистический анализ полученных результатов подтвердил участие одного локуса в формировании признака (фактическое расщепление соответствует теоретически ожидаемому 3:1, $p = 0.36$). Также была проведена оценка уровня экспрессии гена *FaOMT* в зрелых плодах контрастных по содержанию мезифурана форм. Обнаружен высокий уровень экспрессии *FaOMT* у форм с высоким содержанием мезифурана в плодах и очень слабая экспрессия у форм, характеризующихся отсутствием мезифурана в плодах, что подтверждает ключевую роль гена *FaOMT* в изменении содержания мезифурана в плодах земляники (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012).

В изучаемой коллекции генотипов земляники функциональный (активный) аллель гена *FaOMT* (*FaOMT+*) идентифицирован у 86.1 % форм из 43 проанализированных генотипов. Нефункциональный (неактивный) аллель (*FaOMT-*) выявлен у 48.8 % образцов. Сочетанием активного и неактивного аллелей (генотип *FaOMT+FaOMT-*) характеризуются 34.9 % форм. Гомозиготное состояние активного аллеля (генотип *FaOMT+FaOMT+*) выявлено у 51.2 % образцов, гомозиготное состояние неактивного аллеля (генотип *FaOMT-FaOMT-*) – у 13.9 % (пример идентификации приведен на рисунке, а, результаты – в табл. 2).

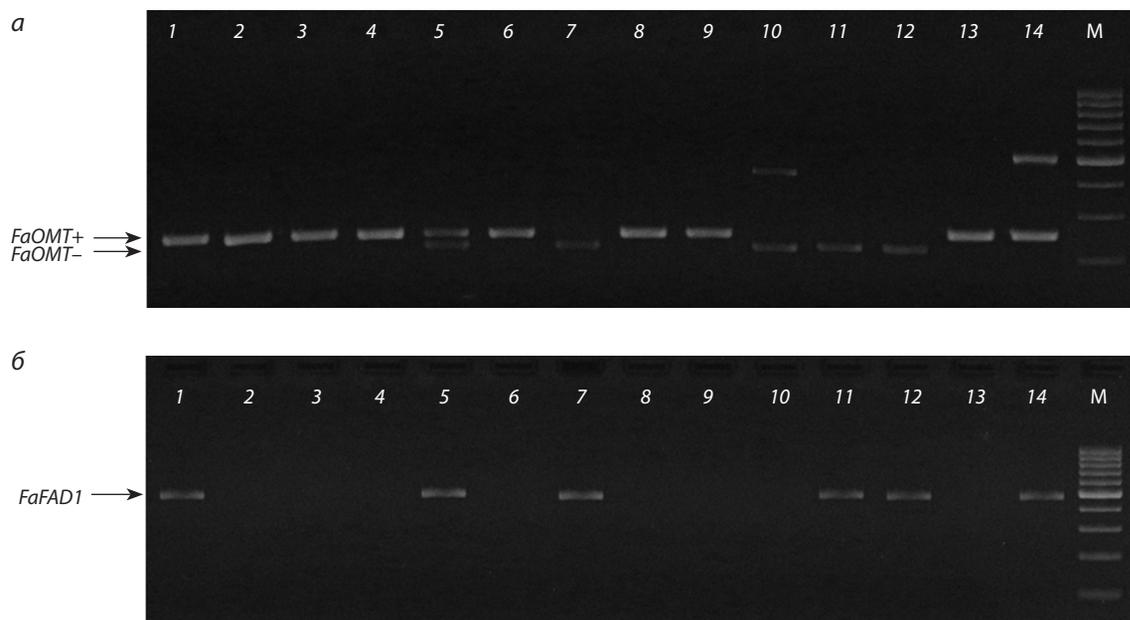
Среди проанализированных дикорастущих видов рода *Fragaria* L. аллель *FaOMT+* (генотип *FaOMT+FaOMT+*)

выявлен у *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch. и *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*. При этом необходимо отметить, что у Capron Royale – культивируемого во Франции сорта *F. moschata* Duch., целевые продукты маркера *FaOMT-SI/NO* не амплифицируются, хотя отмечается высокий уровень биосинтеза мезифурана (Cruz-Rus et al., 2017). Полученные результаты могут быть обусловлены замедлением в месте отжига праймеров или влиянием дополнительных генетических факторов на уровень биосинтеза мезифурана и требуют проведения дополнительных исследований.

Среди проанализированных 22 отечественных сортов земляники гомозиготным состоянием функционального аллеля *FaOMT+* характеризуются 59.1 % форм, гетерозиготным сочетанием аллелей – 27.3 % генотипов. Гомозиготное состояние неактивного аллеля *FaOMT-* идентифицировано у 13.6 % форм отечественной селекции. Среди проанализированных 16 сортов зарубежной селекции 56.3 % форм имеют генотип *FaOMT+FaOMT-*, 37.5 % – генотип *FaOMT+FaOMT+*, 6.2 % – генотип *FaOMT-FaOMT-*. Преобладание гетерозиготного сочетания аллелей гена *FaOMT* у зарубежных сортов земляники подтверждается также другими исследователями (Cruz-Rus et al., 2017).

Содержание γ -декалактона в плодах земляники контролируется геном *FaFAD1* (ген-кандидат 24414), локализованным в дистальном районе длинного плеча хромосомы III-2 генома *F. × ananassa* Duch. (Sánchez-Sevilla et al., 2014). В результате сравнения геномов сорта Elyana (γ -декалактон продуцируется) и сорта Mara des Bois (γ -декалактон не продуцируется) установлено, что биосинтез γ -декалактона в плодах земляники определяется экспрессией одного функционального аллеля *FaFAD1*, а отсутствие γ -декалактона обусловлено либо блокировкой транскрипции мРНК гена *FaFAD1*, либо отсутствием в геноме активного аллеля (Chambers et al., 2014). Праймеры *FaFAD1-F/R* амплифицируют с 5'-конца гена 24414 фрагмент размером 500 п.н. У генотипов, в плодах которых γ -декалактон не синтезируется, данный фрагмент не амплифицируется (Chambers et al., 2014). Зависимость между наличием в геноме функционального аллеля *FaFAD1* и биосинтезом γ -декалактона в плодах была протестирована на трех гибридных комбинациях: Elyana (γ -декалактон продуцируется) × Mara des Bois (γ -декалактон не продуцируется), Elyana (γ -декалактон продуцируется) × сеянец № 98 (γ -декалактон продуцируется), Mara des Bois (γ -декалактон не продуцируется) × сеянец № 98 (γ -декалактон продуцируется). Все генотипы с высоким содержанием γ -декалактона в плодах характеризовались наличием доминантного аллеля *FaFAD1*. Корреляция между наличием аллеля *FaFAD1* и синтезом γ -декалактона подтверждена также анализом сортов: Radiance, Albion, Winter Star, Sweet Charlie (γ -декалактон продуцируется); Deutsch Evern, Strawberry Festival, LF9, Mieke Schindler (γ -декалактон не продуцируется) (Chambers et al., 2014). По данным (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012), высокое содержание γ -декалактона в плодах в 93.3 % случаев обусловлено наличием гена *FaFAD1*.

В анализируемой коллекции из 43 генотипов земляники ген *FaFAD1* идентифицирован у 25.6 % форм, в том числе



Электрофоретический профиль маркеров *FaOMT-SI/NO* (а) и *FaFAD1* (б) генотипов земляники:

1 – Red Gauntlet; 2 – Ласточка; 3 – Торпеда; 4 – Зенит; 5 – Sonata; 6 – Karmen; 7 – Былинная; 8 – Samson; 9 – Богема; 10 – Сударушка; 11 – Купчиха; 12 – *F. ovalis* Rydb.; 13 – *F. virginiana* Duch. ssp. *platypetala*; 14 – *F. moschata* Duch.; М – маркер молекулярного веса.

Таблица 2. Аллельное разнообразие генов аромата плодов *FaOMT* и *FaFAD1* у дикорастущих видов и сортов земляники (1 – аллель присутствует, 0 – отсутствует)

№ п/п	Генотип	<i>FaOMT</i>			№ п/п	Генотип	<i>FaFAD1</i>		
		217 п. н.	248 п. н.	500 п. н.			217 п. н.	248 п. н.	500 п. н.
1	<i>F. orientalis</i> Los.	0	1	1	23	Торпеда	0	1	0
2	<i>F. moschata</i> Duch.	0	1	1	24	Фестивальная	0	1	0
3	<i>F. ovalis</i> Rydb.	1	0	1	25	Фестивальная апомикт	0	1	0
4	<i>F. virginiana</i> Duch. ssp. <i>platypetala</i>	0	1	0	26	Фестивальная ромашка	1	1	0
5	Алёна	0	1	0	27	Флора	0	1	0
6	Богема	0	1	0	28	Царскосельская	1	1	0
7	Былинная	1	0	1	29	Barlidaun	0	1	0
8	Витязь	1	1	0	30	Elianny	0	1	0
9	Гирлянда	0	1	0	31	Gigantella Maxim	1	0	1
10	Дивная	0	1	0	32	Karmen	0	1	0
11	Зенит	0	1	0	33	Marshall	1	1	1
12	Карнавал	0	1	0	34	Maryshka	1	1	0
13	Крымчанка 87	0	1	0	35	Polka	1	1	0
14	Купчиха	1	0	1	36	Samson	0	1	0
15	Ласточка	0	1	0	37	Sonata	1	1	1
16	Незнакомка	1	1	0	38	Symphony	1	1	0
17	Олимпийская надежда	1	0	0	39	Tokado	1	1	1
18	Привлекательная	1	1	0	40	Troubadour	1	1	0
19	Русич	1	1	0	41	Red Gauntlet	0	1	1
20	Соловушка	1	1	0	42	Vima Tarda	1	1	1
21	Студенческая	0	1	0	43	Vima Zanta	0	1	0
22	Сударушка	1	0	0					

у дикорастущих видов *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb. (пример идентификации см. на рисунке, б, результаты – в табл. 2). Ген *FaFAD1* присутствует также у культивируемого французского сорта земляники мускатной Carpon Royale (Cruz-Rus et al., 2017). Среди 22 генотипов земляники отечественной селекции ген *FaFAD1* присутствует у 9.1 % форм (сорта Былинная и Купчиха). Среди изученных 16 зарубежных сортов доля генотипов с геном *FaFAD1* составила 37.5 %. В проведенном ранее скрининге генотипов *F. × ananassa* Duch. зарубежной селекции ген *FaFAD1* идентифицирован у 40.0 % форм (Cruz-Rus et al., 2017).

Более широкое распространение гена *FaFAD1* в геноплазме зарубежных сортов земляники предположительно объясняется генетической близостью многих сортов вследствие широкого использования в селекции одних и тех же родительских форм (большинство созданных после 1960 г. сортов иностранной селекции получено от скрещивания семи исходных форм (Lei et al., 2002)), одна или несколько из которых могли быть донором функционального аллеля гена *FaFAD1*.

Аромат плодов земляники – это сложный многокомпонентный признак, проявление которого детерминировано экспрессией многих генетических факторов. В связи с этим наиболее перспективными по признаку «аромат плодов» формами являются генотипы, совмещающие в геноме несколько генов аромата. В анализируемой коллекции генотипов земляники сочетание функциональных аллелей генов *FaOMT* и *FaFAD1* выявлено у 16.3 % форм (см. табл. 2). При этом дикорастущие виды *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., а также сорт земляники садовой Red Gauntlet совмещают функциональный аллель гена *FaFAD1* с гомозиготным состоянием активного аллеля гена *FaOMT*. Сорта зарубежной селекции Marshall, Sonata, Tokado и Vima Tarda характеризуются сочетанием функционального аллеля гена *FaFAD1* с гетерозиготным состоянием гена *FaOMT*. Среди отечественных сортов земляники сочетания функциональных аллелей генов *FaOMT* и *FaFAD1* не выявлено.

Заключение

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа аллельного состояния гена *FaOMT* для селекции на аромат плодов перспективными источниками высокого содержания мезифурана являются отечественные (Алёна, Богема, Гирлянда, Дивная, Зенит, Карнавал, Крымчанка 87, Ласточка, Студенческая, Торпеда, Фестивальная, Флора) и зарубежные (Barlidaun, Elianny, Karmen, Samson, Vima Zanta) сорта земляники садовой, характеризующиеся гомозиготным состоянием функционального аллеля (генотип *FaOMT*+*FaOMT*+). Источником высокого содержания γ -декалактона в плодах являются сорта Былинная, Купчиха, Gigantella Maxim, Marshall, Sonata, Tokado, Vima Tarda, характеризующиеся наличием активного аллеля гена *FaFAD1*. Дикорастущие виды *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch. и сорт земляники садовой Red Gauntlet, совмещающие функциональный аллель гена *FaFAD1* с гомозиготным состоянием активного аллеля гена *FaOMT*, служат комплексными источниками высокого содержания мезифурана и γ -декалактона в плодах.

Список литературы / References

- Aharoni A., Giri A.P., Verstappen F.W., Berteau C.M., Sevenier R., Sun Z., Jongsma M.A., Schwab W., Bouwmeester H.J. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*. 2004;16(11):3110-3131. DOI 10.1105/tpc.104.023895.
- Bianchi G., Lucchi P., Maltoni M.L., Fagherazzi A.F., Baruzzi G. Analysis of aroma compounds in new strawberry advanced genotypes. *Acta Hort.* 2017;1156:673-678. DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1156.98.
- Chambers A.H., Pillet J., Plotto A., Bai J., Whitaker V.M., Foltá K.M. Identification of a strawberry flavor gene candidate using an integrated genetic-genomic-analytical chemistry approach. *BMC Genomics*. 2014;15(1):217. DOI 10.1186/1471-2164-15-217.
- Cruz-Rus E., Sesmero R., Ángel-Pérez J.A., Sánchez-Sevilla J.F., Ulrich D., Amaya I. Validation of a PCR test to predict the presence of flavor volatiles mesifurane and γ -decalactone in fruits of cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Mol. Breed.* 2017;37(10):131. DOI 10.1007/s11032-017-0732-7.
- DArT. 2014. Available at http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DaRT_DNA_isolation.pdf
- Finn C.E., Retamales J.B., Lobos G.A., Hancock J.F. The Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*): over 1000 years of domestication. *HortScience*. 2013;48(4):418-421. DOI 10.21273/HORTSCI.48.4.418.
- Hancock J.F., Finn C.E., Luby J.J., Dale A., Callow P.W., Sercxe S. Reconstruction of the strawberry, *Fragaria ananassa*, using genotypes of *F. virginiana* and *F. chiloensis*. *HortScience*. 2010;45(7):1006-1013. DOI 10.21273/HORTSCI.45.7.1006.
- Hummer K., Hancock J.F. Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies. In: Foltá K.M., Gardiner S.E. (Eds.). *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Ser. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. Vol. 6. Springer, New York, 2009;413-436. DOI 10.1007/978-0-387-77491-6_20.
- Jetti R.R., Yang E., Kurnianta A., Finn C., Qian M.C. Quantification of selected aroma-active compounds in strawberries by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and correlation with sensory descriptive analysis. *J. Food Sci.* 2007;72:487-496. DOI 10.1111/j.1750-3841.2007.00445.x.
- Jouquand C., Chandler C., Plotto A., Goodner K. A sensory and chemical analysis of fresh strawberries over harvest dates and seasons reveals factors that affect eating quality. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2008; 133(6):859-867. DOI 10.21273/JASHS.133.6.859.
- Lavid N., Schwab W., Kafkas E., Koch-Dean M., Bar E., Larkov O., Ravid U., Lewinsohn E. Aroma biosynthesis in strawberry: S-adenosylmethionine: furaneol O-methyltransferase activity in ripening fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50(14):4025-4030. DOI 10.1021/jf011409q.
- Lei J., Dai H., Deng M., Wu L., Hu W. Studies on the interspecific hybridization in the genus *Fragaria*. *Acta Horticulturae Sinica*. 2002; 29(6):519-523.
- Luk'yanchuk I.V., Lyzhin A.S., Kozlova I.I. Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria* L.) for *Rca2* and *Rpf1* genes with molecular markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):795-799. DOI 10.18699/VJ18.423.
- Ménager I., Jost M., Aubert C. Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of strawberry (cv. Cigaline) during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:1248-1254. DOI 10.1021/jf0350919.
- Olbricht K., Grafe C., Weiss K., Ulrich D. Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria × ananassa* Duch. *Plant Breed.* 2008;127(1):87-93. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01422.x.
- Raab T.L., López-Ráez J.A., Klein D., Caballero J.L., Moyano E., Schwab W., Muñoz-Blanco J. FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell*. 2006;18: 1023-1037. DOI 10.1105/tpc.105.039784.

- Sánchez-Sevilla J.F., Cruz-Rus E., Valpuesta V., Botella M.A., Amaya I. Deciphering gamma-decalactone biosynthesis in strawberry fruit using a combination of genetic mapping, RNA-Seq and eQTL analyses. *BMC Genomics*. 2014;15(1):218. DOI 10.1186/1471-2164-15-218.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J*. 2008;54(4):712-732. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x.
- Siegmund B., Bagdonaite K., Leitner E. Furaneol and mesifuran in strawberries – an analytical challenge. In: *Expression of Multidisciplinary Flavour Science: Proc. of the 12th Weurman Symp. Zürich*, 2010;537-540.
- Ulrich D., Olbricht K. Fruit organoleptic properties and potential for their genetic improvement. In: Jenks M.A., Bebeli P.J. (Eds.). *Breeding for Fruit Quality*. John Wiley & Sons, 2011;39-59.
- Ulrich D., Olbricht K. A search for the ideal flavor of strawberry – comparison of consumer acceptance and metabolite patterns in *Fragaria* × *ananassa* Duch. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2016;89:223-234. DOI 10.5073/JABFQ.2016.089.029.
- Vandendriessche T., Vermeir S., Martinez C.M., Hendrickx Y., Lamertyn J., Nicolaï B.M., Hertog M.L.A.T.M. Effect of ripening and inter-cultivar differences on strawberry quality. *LWT-Food Sci. Technol.* 2013;52(2):62-70. DOI 10.1016/j.lwt.2011.12.037.
- Zorrilla-Fontanesi Y., Rambla J.L., Cabeza A., Medina J.J., Sánchez-Sevilla J.F., Valpuesta V., Botella M.A., Granell A., Amaya I. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase *FaOMT* as the locus controlling natural variation in mesifurane content. *Plant Physiol.* 2012;159(2):851-870. DOI 10.1104/pp.111.188318.

ORCID ID

A.S. Lyzhin orcid.org/0000-0001-9770-8731
I.V. Luk'yanchuk orcid.org/0000-0003-1626-840X
E.V. Zhbanova orcid.org/0000-0001-5045-384X

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.04.2019. После доработки 08.08.2019. Принята к публикации 17.08.2019.

The study of organelle DNA variability in alloplasmic barley lines in the NGS era

M.G. Siniauskaya , A.M. Makarevich, I.M. Goloenko, V.S. Pankratov, A.D. Liaudanski, N.G. Danilenko, N.V. Lukhanina, A.M. Shimkevich, O.G. Davydenko

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

 e-mail: cytoplasmic@mail.ru

Abstract. Alloplasmic lines are a suitable model for studying molecular coevolution and interrelations between genetic systems of plant cells. Whole chloroplast (cp) and mitochondrial (mt) genome sequences were obtained by the MiSeq System (Illumina). Organelle DNA samples were prepared from a set of 12 alloplasmic barley lines with different cytoplasms of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* and *H. vulgare* ssp. *vulgare*, as well as from their paternal varieties. A bioinformatic approach for analysis of NGS data obtained on an organellar DNA mix has been developed and verified. A comparative study of *Hordeum* organelle genomes' variability and disposition of polymorphic loci was conducted. Eight types of chloroplast DNA and 5 types of mitochondrial DNA were distinguished for the barley sample set examined. These results were compared with the previous data of a restriction fragment length polymorphism (RFLP) study of organelle DNAs for the same material. Formerly established data about a field evaluation of alloplasmic barley lines were revised in the light of information about organelle genomes gained after NGS. Totally 17 polymorphic loci were found at exons of chloroplast genomes. Seven of the SNPs were located in the genes of the Ndh complex. The nonsynonymous changes of nucleotides were detected in the *matK*, *rpoC1*, *ndhK*, *ndhG* and *infA* genes. Some of the SNPs detected are very similar in codon position and in the type of amino acid substitution to the places where RNA editing can occur. Thus, these results outline new perspectives for the future study of nuclear-cytoplasmic interactions in alloplasmic lines.

Key words: barley; alloplasmic lines; chloroplast DNA; mitochondrial DNA; next generation sequencing (NGS).

For citation: Siniauskaya M.G., Makarevich A.M., Goloenko I.M., Pankratov V.S., Liaudanski A.D., Danilenko N.G., Lukhanina N.V., Shimkevich A.M., Davydenko O.G. The study of organelle DNA variability in alloplasmic barley lines in the NGS era. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):12-19. DOI 10.18699/VJ19.589

Изучение изменчивости ДНК органелл аллоплазматических линий ячменя в эпоху высокопроизводительного секвенирования

М.Г. Синявская , А.М. Макаревич, И.М. Голоенко, В.С. Панкратов, О.Д. Левданский, Н.Г. Даниленко, Н.В. Луханина, А.М. Шимкевич, О.Г. Давыденко

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

 e-mail: cytoplasmic@mail.ru

Аннотация. Аллоплазматические линии являются подходящей моделью для изучения молекулярной коэволюции и взаимодействий между генетическими системами растительной клетки. С использованием MiSeq System (Illumina) были определены полногеномные последовательности ДНК органелл клетки – хлоропластов и митохондрий. ДНК органелл выделена из 12 образцов коллекции аллоплазматических линий ячменя с цитоплазмами *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* (*H. spontaneum*) и *H. vulgare* ssp. *vulgare* (*H. vulgare*), а также из сортов ячменя доноров ядра. Разработан и верифицирован подход к анализу результатов NGS смесей хлоропластной и митохондриальной ДНК для сборки новых полных сиквенсов пластидных и митохондриальных геномов *H. vulgare* и *H. spontaneum*. Проведено сравнительное изучение изменчивости геномов органелл, локализованы полиморфные участки. Выделено восемь типов хпДНК и пять типов мтДНК. Полученная информация сопоставлена с результатами предыдущих исследований этих же линий методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК органелл. На основании сравнения полногеномных последовательностей хпДНК и мтДНК аллоплазматических линий и сортов доноров ядерных геномов пересмотрены полученные для них ранее данные по формированию признаков, связанных с продуктивностью. Семнадцать полиморфных локусов обнаружено в экзонах пластидных генов. Семь из них расположены в генах Ndh комплекса. Несинонимические замены нуклеотидов идентифицированы в генах *matK*, *rpoC1*, *ndhK*, *ndhG*, *infA*. Вероятно, некоторые SNP являются точками, где происходит эдитинг,

о чем свидетельствуют позиции замены в кодоне и тип аминокислотной замены. Проведенное исследование открывает новые перспективы для изучения ядерно-цитоплазматических взаимодействий на примере аллоплазматических линий.

Ключевые слова: ячмень; аллоплазматические линии; хлоропластная ДНК; митохондриальная ДНК; высокопроизводительное секвенирование.

Introduction

Barley is one of the most important cereals in the world, after wheat and rice. The history of its cultivation stretches from ancient times (Pankin, von Korf, 2017). Peculiar distribution of different nuclear and cytoplasmic gene loci of barley across localities occurred together with the process of migration of humans (Saisho, Purugganan, 2007). In parallel with the process of barley spreading from the centers of origin to different climatic zones, definite changes in nuclear and cytoplasmic genes have happened. This led to change in the interactions of the nucleus and cytoplasm, the establishment of new nuclear-cytoplasmic relations.

Chloroplasts and mitochondria are essential organelles in plant cells and play an important role in sustaining life. The genomes of organelles have a number of properties that make them indispensable for studying in various areas of modern biology: a large number of copies per cell; relatively conservative sequences; lack of recombination; maternal inheritance; coding the proteins for photosynthesis and respiration; endosymbiotic origin (Danilenko, Davydenko, 2003; Daniell et al., 2016).

The efficiency of photosynthesis (the cooperative work of chloroplast and nuclear genes) and the functioning of the mitochondrial respiratory chain complexes (the joint work of different subunits of mitochondrial complexes coded by nDNA and mtDNA) basically determine the productivity of plants.

Among the suitable models for study of nuclear-cytoplasmic interactions are allo- and isoplasmic plant lines. Alloplasmic lines are usually created via hybridization when the nucleus from one plant (species or subspecies) are placed into the cytoplasm of another plant through substitution backcrossing. Evolutionarily established relations between nucleus and cytoplasm are disrupted at this case, and various consequences could arise as the result. There is the big set of data about different effects of nuclear-cytoplasmic interactions. Wheat alloplasmic lines with the nucleus from *Triticum aestivum* and cytoplasm from different *Aegilops* and *Triticum* species were studied (Kihara, 1951; Fukasawa, 1959; Mukai et al., 1978; Maan, 1979; Tsunewaki, 1980, 1993). Barley alloplasmic lines were also created and thoroughly studied (Batura et al., 1989; Krepak et al., 1996). Different manifestations of nuclear-cytoplasmic interactions were investigated with the help of the alloplasmic lines collections: the influence of plasmon on morphogenesis, photosynthesis and respiration, fertility, different stress conditions, transmission and recombination of nuclear genes of plants (Palilova, Sylkova, 1987; Nakamura et al., 1991; Sychjova et al., 1998; Goloenko et al., 2002; Tsunewaki et al., 2002, 2019).

NGS of the whole chloroplast (cp) and mitochondrial (mt) genomes from different matrices (either total cell DNA, or a mixture of organelle DNA, or pure plastid and mitochondrial DNA) allows to explore large number of samples simultaneously, to obtain qualitatively new comparative data about the variability of cytoplasmic genomes (Nock et al., 2011; Twy-

ford, Ness, 2017). Especially the sequencing of pure organelle DNA templates – chloroplast or mitochondrial (or mixture of organelle DNAs), gained after organelle lysis appears to be the most promising for organelle genome studies. In this case numerous genomic and organelle DNA-like sequences from nucleus are drawn away from analysis facilitating the process of organelle genomes assembly.

Complete chloroplast and mitochondrial genome sequences are essential for realizing and reshaping the phylogenetic relationships between closely related taxa and for improving our understanding of the evolution of plant species (Gornicki et al., 2014; Givnish et al., 2018).

The comparative study of the plastid genomes variability in alloplasmic barley lines (differing in origin of the cytoplasm donor) and their euplasmic analogues were performed.

Materials and methods

Study material. Three barley varieties Vezha, Roland, Visit as well as twelve alloplasmic lines created and maintained in the Lab of Cytoplasmic Inheritance (Institute of Genetics and Cytology, NAS Belarus) were used for organelle DNA isolation (Table 1).

We explored alloplasmic barley lines with cytoplasm of *H. spontaneum* and *H. vulgare*, as unfortunately we lack the original seeds of *H. spontaneum* and *H. vulgare* donors of cytoplasm (maternal parent). This plant material was created in 1990th and then maintained by self pollinating.

The maternal inheritance of organelle genomes is well documented in angiosperms, and considered as one of the laws of cytoplasmic inheritance (Birky, 2008), though very seldom occasional paternal transmission can occur (Reboud, Zeyl, 1994). We considered the plasmon of definite alloplasmic line is equivalent to the original plasmon of corresponding wild *H. spontaneum*, *H. vulgare*. Moreover, one of the recent studies of alloplasmic lines in *Triticum-Aegilops* complex demonstrated the stability of organellar DNA characteristics between native euplasmic plants and alloplasmic line, indicating generally the usefulness of organellar genome in tracing the maternal lineage of species (Tsunewaki et al., 2019).

The whole sequences of *H. vulgare* chloroplast (NC_008590, Sasaki et al., 2007) and mitochondrial (AP017301, Hisano et al., 2016) genomes accessible in NCBI nucleotide database (GenBank) were used as references for assembly of new barley organelle genomes.

DNA extraction. Organelles were extracted from 7 days seedlings. The fraction of organelles was obtained by differential centrifugation (Triboush et al., 1998). Chloroplast and mitochondrial DNA were obtained by lysis of isolated organelles with subsequent phenol-chloroform deproteinization. This approach allowed simultaneous sequencing of both genomes from each sample. The quality and concentration of DNA was evaluated after 0.8 % agarose gel electrophoresis and at NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Table 1. Sources of nucleus and cytoplasm at the alloplasmic lines of barley

Alloplasmic line	The nuclear donor (<i>H. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>)	The cytoplasmic source			
		Subspecies	Working code	CPI No.	Origin
Vezha (W3) BC ₇	Vezha	<i>H. vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i>	W3	77129	Israel, Atlit-37
Roland (W3) BC ₇	Roland				
Visit (W3) BC ₇	Vizit				
Roland (W4) BC ₇	Roland	<i>H. vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i>	W4	77129	Israel, Atlit-55
Visit (W4) BC ₇	Vizit				
Vezha (W8) BC ₇	Vezha	<i>H. vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i>	W8	77135	Israel, Wadi Quilt-23
Roland (W8) BC ₇	Roland				
Visit (W8) BC ₇	Vizit				
Roland (W1) BC ₇	Roland	<i>H. vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i>	W1	77133	Israel, Hermon-9
Roland (W9) BC ₇			W9	77141	Israel, Sede-Boker-21
Roland (Atlas) BC ₇		<i>H. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	Atlas	77151	California cultivar
Roland (Himalaya) BC ₇			Himalaya	94435	Nepal cultivar

NGS. The NGS was performed on the MiSeq System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), library preparation kit NexteraXT, MiSeq Reagent Kit v3, read lengths 300 bp.

NGS data processing. The raw data were exported for the primary analysis. The algorithm of sequencing data processing included the following steps: trimming of raw reads (Trimmomatic; Bolger et al., 2014); aligning reads to the “double” reference, containing full sequences of chloroplast and mitochondrial barley genomes (Bowtie2, <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>); obtaining mapping statistics (bash scripts, BCFtools, <https://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html>); alignment visualization (Tablet; Milne et al., 2013); generating VCF files (Samtools; Li et al., 2009); filtering VCF files (VCFlib, <https://bio.tools/vcfliib>). The algorithm was tested on artificial Illumina reads synthesized using the ART program. Ultimately, VCF files containing all polymorphic loci of the chloroplast and mitochondrial genomes were obtained (Makarevich et al., 2018).

Comparative analysis of cp genomes. The VCF files for cp genomes of all studied samples as well as accessible complete cp genome sequences of *H. vulgare* ssp. *vulgare* (NC_008590) and *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (KC912688, KC912689) taken from the NCBI GenBank database were involved in whole-genome comparison analysis. To visually display the phylogenetic relationships between the studied samples and divide them into groups by the types of chloroplast genomes, the maximum parsimony-cladogram was constructed on the base of all founded SNPs and INDELS. Complete chloroplast genome sequences of *H. jubatum* (KM974741) and *H. bulbosum* (KY636105) available in NCBI GenBank acted as outgroups. The cladogram was built in Excel (Version 14.0.6112.5000) with searching for homologous regions in the outgroup genomes using the SnapGene V.4.3.10.

Results and discussion

15 chloroplast and 15 mitochondrial genome sequences were obtained after NGS (Illumina, MiSeq) of organelle DNA samples (plastid + mitochondrial fraction). Bioinformatics’ approaches have been optimized for the processing of the “raw” data after sequencing the mixture of cp and mtDNA.

The comparative analysis of the obtained sequences as well as available in NCBI nucleotide database (GenBank) was carried out, that promoted the assessment of the total level of sequence variation between samples of the same species, defined the regions, where changes more often occur.

Generally, 103 polymorphic loci of cpDNA were revealed after comparison analysis of 15 obtained new full organelle sequences and 4 sequences from GenBank (see Materials and methods). Among them 78 differences for the alloplasmic lines and barley paternal varieties were detected: 56 SNP (39 of them at introns of various genes, 17 – at exons (see Table 4)), 14 SSR loci and 8 indels.

The cladogram for the complete chloroplast genomes of barley was constructed on the base of polymorphic loci found, except for the SSR regions (see the Figure). It displays the diversity of chloroplast genomes of *H. vulgare* and *H. spontaneum*, which allows to subdivide the plasmotypes in the study set of barley (see below Table 2).

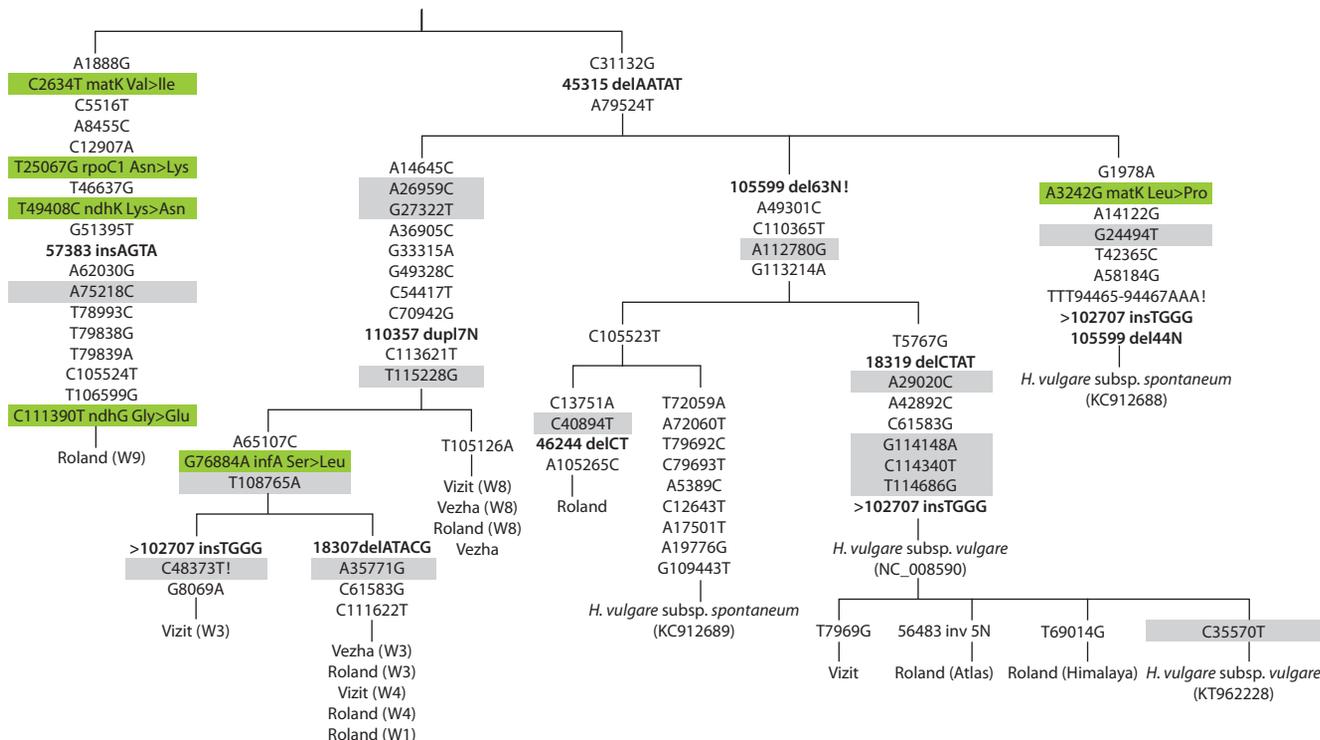
20 loci of mtDNA variability were identified. The level of sequence variation was much lower compared to chloroplast DNA. Only two types of changes were detected – point nucleotide substitutions (19) and insertion (1). All the indels and the most significant SNP were checked by Sanger sequencing to verify the assembly of both genomes.

Qualitatively new data about the variability of *Hordeum* organelle genomes and disposition of polymorphic loci were obtained after NGS. It turned out to be higher than described in earlier reports based on RFLP data or SSR analysis of relatively few loci (Neale et al., 1988; Provan et al., 1999; Russell et al., 2003; Lukhanina et al., 2006; Sipahi et al., 2013).

Differentiation of the alloplasmic lines collection according various molecular methods

As a result of NGS study, eight types of chloroplast DNA and five types of mitochondrial DNA were distinguished for the examined barley sample set (Table 2). We were able to highlight eight plasmotypes totally.

Earlier in 1984 the same set of cytoplasm as well as some others: W1, W3, W4, W5, W7, W8, W9, W10, Atlas, Himalaya, L1, L2 – were studied via restriction of cpDNA with



The cladogram for the complete chloroplast genomes of barley (based on variability regions).

Maximum parsimony-cladogram was constructed on the base of founded SNPs and INDELS. Chloroplast genome sequences of *H. jubatum* (KM974741) and *H. bulbosum* (KY636105) available in NCBI GenBank were used as outgroups. The polymorphic loci are given according to reference *H. vulgare* (NC_008590). Highlighted in green – synonymous nucleotide substitutions, grey – nonsynonymous substitutions. Indels are written in bold. Exclamation mark (!) – reverse replacements, ">" – parallel mutations.

Table 2. The specific combinations of chloroplast and mitochondrial DNA types in the collection of alloplasmic barley lines (NGS data)

Cp DNA type	Mt DNA type				
	1	2	3	4	5
1	I Roland (W9)				
2	II Vezha (W3), Vizit (W4), Roland (W3), Roland (W4), Roland (W1)				
3	III Vizit (W3)				
4	IV Vizit (W8), Vezha (W8), Roland (W8), Vezha				
5	V Roland				
6	VI Vizit				
7	VII Roland (Atlas)				
8	VIII Roland (Himalaya)				

4 endonucleases *BamHI*, *BclI*, *EcoRI*, *HindIII* (Clegg et al., 1984). Five different chloroplast RFLP patterns were detected. Afterwards mtDNA endonuclease digestion was performed for 12 alloplasmic lines with the above mentioned cytoplasms and nucleus from barley variety Vezha. Four groups of mtDNA types were detected (Sychjova et al., 1998). Combining these results, 9 specific plasmotypes were distinguished (Table 3).

NGS data for chloroplast genome (this work) and earlier obtained RFLP data (Clegg et al., 1984) were compared. RFLP analysis having quite low resolution was not able to show all the differences between samples. So, we expected that sequencing of full chloroplast and mitochondrial genomes of alloplasmic lines will shed light on the organelle genome variability of this collection.

Specific motifs for *BamHI*, *BclI*, *EcoRI*, *HindIII* endonucleases were determined in obtained full chloroplast genomes (SnapGene V.4.3.10). Despite many variability positions between samples detected by NGS (see the Figure), they mainly didn't affect the enzyme cutting sites (c. s.). All samples bear the same endonuclease digestion points for *BamHI* (54 c. s.), *BclI* (53 c. s.), *EcoRI* (97 c. s.), *HindIII* (40 c. s.). Just only G33315A substitution led to appearance the new cutting site for *BclI* in W1, W3, W4, W8 and Vezha cytoplasm (*BclI* is *Dam* methylation-sensitive enzyme, so it could influence the RFLP results). All together they bear 54 *BclI* sites.

The Roland (W9) appeared to be especially unique, because only this line had four new SNP: A1888G (created the new digestion site for *HindIII*), T25067C, T79838G and T79839A

Table 3. The specific combinations of chloroplast and mitochondrial DNA types in the collection of alloplasmic barley lines (according to previously published data of RFLP analysis)

Cp DNA type	Mt DNA type			
	A	C	D	E
1	I W10, Atlas, Himalaya			
2	II L1, L2			
3	III W7, W4	V W8	VI W9	
4	VII W1			VIII W5
5	IX W3			

(that promote the emergence of two new *EcoRI* cutting points). Thus Roland (W9) bears 41 *HindIII* and 99 *EcoRI* cleavage points.

We tried to collate the types of cytoplasm obtained by two different methodological approaches – RFLP and NGS sequencing (see the Figure and Table 2, 3).

Roland (Atlas) and Roland (Himalaya) refer to the same plasmotype according to RFLP data, but NGS differentiated it.

According to Clegg (Clegg et al., 1984), W3 and W4 belong to different RFLP because of different cpDNA types and one common mitochondrial. However, the NGS study combined them in one group, with one exception – Vizit (W3). Note an interesting fact – W3 and W4 lines originated from one locality Atlit in Israel and they are most likely closer genetically than other lines studied. Sequencing data put alloplasmic lines with W3 and W4 cytoplasm at one subcluster. So, Vezha (W3), Roland (W3), Roland (W4), Vezha (W4) are identical for all polymorphic loci and Vizit (W3) is very similar to other alloplasmic lines with W3 cytoplasm, bearing variability only at 7 polymorphic loci.

Alloplasmic lines with W8 cytoplasm formed separate group according to both methods.

Roland (W9) line was placed into the special RFLP group; according to NGS data, this line has more than 20 specific SNP, thus it appears to be remote from all other lines studied (see the Figure).

SNP detected at chloroplast genome sequences, their possible importance for plants

Only single nucleotide substitutions were revealed at exons of chloroplast genes, 12 of them were synonymous: *rpoA*, *rpoC1*, *rpoC2*, *ndhA*, *ndhD*, *ndhG*, *ndhH*, *ndhK*, *atpA*, *psaA* genes. The 5 nonsynonymous changes of nucleotides were detected in *matK*, *rpoC1*, *ndhK*, *ndhG* and *infA* genes (Table 4).

Some of SNP detected are very similar (position in codon and also the type of amino acid substitution) to the places

Table 4. List of SNP detected at exons of cpDNA after comparative analysis of obtained whole genomes

No.	Location at cpDNA	Gene	Gene function	Nucleotide substitution	Amino acid replacement	Codon position	Samples in which SNP was detected
1	2634	<i>matK</i>	Maturase within trnK intron	C > T	Val370Ile	1	Roland (W9)
2	25067	<i>rpoC1</i>	RNA polymerase beta' subunit-1	T > G	Asn571Lys	3	
3	26959	<i>rpoC2</i>	RNA polymerase beta' subunit-2	A > C	Ser449=	3	Lines with W1, W3, W4, W8 cytoplasm, Vezha
4	27322			G > T	Gly570=	3	
5	29020			A > C	Ser1136=	3	Vizit, Roland (Atlas), Roland (Himalaya)
6	35771	<i>atpA</i>	ATPase alpha subunit	A > G	Gly312=	3	Vezha (W3), Roland (W3), Vizit (W4), Roland (W4), Roland (W1)
7	40894	<i>psaA</i>	PSI p700 apoprotein A1	C > T	Pro329=	3	Roland
8	49408	<i>ndhK</i>	NADH-dehydrogenase 27kD subunit	T > C	Lys233Asn	3	Roland (W9)
9	75218	<i>rpoA</i>	RNA polymerase alpha subunit	A > C	Leu227=	3	Roland (W9)
10	76884	<i>infA</i>	Initiation factor 1	G > A	Ser87Leu	2	All lines with W1, W3, W4 cytoplasm
11	108765	<i>ndhD</i>	NADH-dehydrogenase ND4	T > A	Gly257=	3	All lines with W1, W3, W4 cytoplasm
12	111390	<i>ndhG</i>	NADH-dehydrogenase ND6	C > T	Gly16Glu	2	Roland (W9)
13	112780	<i>ndhA</i> <i>exon2</i>	NADH-dehydrogenase ND1	A > G	Gly213=	3	Vizit, Roland
14	114148	<i>ndhA</i> <i>exon1</i>	NADH-dehydrogenase ND1	G > A	Pro101=	3	Vizit, Roland (Atlas), Roland (Himalaya)
15	114340			C > T	Leu37=	3	
16	114686	<i>ndhH</i>	NADH-dehydrogenase 49kD subunit	T > G	Ser316=	3	Vizit, Roland (Atlas), Roland (Himalaya)
17	115228			T > G	Arg136=	1	All lines with W1, W3, W4, W8 cytoplasm, Vezha

Note: The grey filling in the table – marked SNP, where nonsynonymous changes of nucleotides occurred.

where RNA editing can occur. Editing usually appeared to be C-U replacement at the mRNA level, it corrects the “wrong” nucleotide at the DNA level. It leads to restoration of phylogenetically conservative amino acid sequences of the proteins (Maier et al., 1996; Danilenko, Davydenko, 2003). Editing is the important posttranscriptional control of the gene expression. It is necessary for plastids functioning and plants survival (Takenaka et al., 2013). Nucleotide substitutions in *matK* 2634 C>T (p.Val370Ile), *ndhK* 40894 C>T (p.Lys233Asn), *infA* 76884 G>A (p.Ser87Leu), *ndhG* 111390 C>T (p.Gly16Glu), *ndhA* exon2 112780 A>G (p.Gly213=), *ndhA* exon1 114148 G>A (p.Pro101=), *ndhA* exon1 114340 C>T (p.Leu37=) possibly mark positions where editing could take place.

According to Table 4, SNP at cpDNA 76884 nucleotide position resulted in amino acid substitution p.Ser87Leu at *infA* gene for lines *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* with W3 and W4 cytoplasm. *infA* is the factor 1 of translation initiation (IF1) encoded in chloroplast. It is highly conserved and universal in all living organisms (Roll-Mecak et al., 2001). Remarkably we found polymorphic loci at *infA* gene, position 76884 G>A of cpDNA. This SNP occurred at the second position of codon, usual position for editing (87% of all edited sites – the second nucleotide positions of triplets encoding amino acids). The barley with cytoplasm W3, W4, and W1 bear A (or T at opposite DNA strand) and they needn't correction C>T at the RNA level (editing), but all the other samples studied possess C and it can be corrected by editing machinery. This substitution will lead to Ser>Leu change – most common conversion during editing (Tsudzuki et al., 2001). Some further work to support this idea and to determine functional peculiarities of this event is needed.

About half of SNP (7 out of 17) are located at the genes of *NADH* complex. Chloroplast DNA of barley encodes 11 *Ndh* genes. Of note that these genes are quite variable in different taxons and still remain between the relatively few number of genes retained at cpDNA of higher plants in comparison with genome of prokaryotic *Cyanobacteria* ancestor. They have been lost in *Gnetales*, pines, *Erodium* species, some parasitic plants, endowing their characteristic cpDNA features (Peredo et al., 2013; Sabater, 2018). Nevertheless, most land photosynthetic plants contain these genes. It is considered, that they are important for adaptation of plants to photosynthesis (Martin, Sabater, 2010; Shikanai, 2016). *Ndh* complex function is necessary to optimize photophosphorylation rates under different stress conditions (Rumeau et al., 2007; Martin, Sabater, 2010).

Nearly 50% of editing sites of flowering plants concentrate at the *ndh* group of genes (Martin, Sabater, 2010). We found loci of variability at five of them. Possibly nucleotide substitution C>T at 111390 position of cpDNA resulted in amino acid change Gly16Glu, can be the place of editing event which needs future verification.

The productivity characters of substituted barley lines with five different nuclear genomes and six plasmotypes were thoroughly tested in field conditions for several years (Goloenko et al., 2000). The direct correlation between productivity and differences in the structure of organelle genomes was not found. The effects of cytoplasm substitution on the economically valuable traits of plants varied greatly depending on nuclear

genome, significant impact for various traits was revealed for definite nuclear-cytoplasmic combinations. Nevertheless, two groups of cytoplasm with minimal – W4, W8, and highest influence on productivity – A, L1, W3, W5 were defined on the basis of comparative analysis.

Conclusion

We have got detailed information about sequences of barley organelle genomes of set of alloplasmic lines. At present we cannot precisely foresee which cytoplasm type gives definite phenotypic effect. The results prove that interaction of definite nucleus with specific organelle genome in every case can be unique. Nevertheless, each line was marked and its peculiar features were defined. It represents the new type of starting material for prospective studies in breeding and molecular genetics in Poaceae.

Furthermore, alloplasmic lines appeared to be the promising material for the study of molecular coevolution between genetic systems of plant cell. If editing really occurs at some loci of organelle genes of definite barley cytoplasm it needs special transactors, at least PLS-type PPR proteins (encoded in nucleus). These proteins are highly specific for their RNA targets. If we combine in alloplasmic lines cpDNA which needs editing and nucleus where transactor for this event is not encoded, how could plants overcome this inconsistency? Another case – the cytoplasm loci need no editing, but transactor is encoded in nucleus. Amazingly, phylogenetic comparison of editing sites and corresponding PPR proteins leads to the very interesting fact: if conversion C to T at the DNA level takes place, no need in editing exists and PPR protein can gradually disappear from the nucleus of this taxon. Moreover, as revealed for DOT4 PPR protein – the loss of editing target site through C to T conversion allowed DOT4 in Poaceae to adapt for new function. Also some cases were described where the target sequences for editing exist, but no corresponding PPR is encoded by nucleus (Hein et al., 2019).

Thus, the field for further studies of nuclear-cytoplasmic cooperation is quite large. Possibly editing (PLS-PPRs) or other processes and their players both from nucleus and cytoplasm are involved, that bring us to discovery of fine mechanisms of different cell genetic systems interaction.

References

- Batura F.N., Davydenko O.G., Kadyrov M.A. The substitution of cytoplasm in barley varieties and its breeding impact. Doklady AN BSSR = Reports of the Academy of Sciences of the BSSR. 1989; 33(7):657-659. (in Russian)
- Birky C.W. Uniparental inheritance of organelle genes. Curr. Biol. 2008;18(16):R692-R695. DOI 10.1016/j.cub.2008.06.049.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30(15):2114-2120. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Clegg M.T., Brown A.N.D., Whitfield P.R. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: implication for genetic conservation. Genet. Res. 1984;4:339-343. DOI 10.1017/S0016672300026112.
- Daniell H., Lin C.S., Yu M., Chang W.J. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. Genome Biol. 2016;17(1):134. DOI 10.1186/s13059-016-1004-2.
- Danilenko N.G., Davydenko O.G. Worlds of Organelle Genomes, Minsk: Tekhnologiya Publ., 2003. (in Russian)

- Fukasawa H. Nucleus substitution and restoration by means of successive backcrosses in wheat and its related genus *Aegilops*. *Jpn. J. Bot.* 1959;17:55-91.
- Givnish T., Zuluaga A., Spalink D., Soto Gomez M., Lam V.K.Y., Saarela J.M., Sass C., Iles W.J.D., de Sousa D.J.L., Leebens-Mack J., Chris Pires J., Zomlefer W.B., Gandolfo M.A., Davis J.I., Stevenson D.W., dePamphilis C., Specht C.D., Graham S.W., Barrett C.F., Ané C. Monocot plastid phylogenomics, timeline, net rates of species diversification, the power of multi-gene analyses, and a functional model for the origin of monocots. *Am. J. Bot.* 2018;105(11):1888-1910. DOI 10.1002/ajb2.1178.
- Goloenko I.M., Davydenko O.G., Shimkevich A.M. The disturbance of splitting by nuclear marker genes in allo- and isoplasmic barley lines. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2002;38(7):944-949. (in Russian)
- Goloenko I.M., Teljatnicova A.A., Davydenko O.G. Some nuclei cytoplasmic combinations of barley substituted lines collection change the productivity characteristics. *Barley Genet. Newsl.* 2000;30:28-31.
- Gornicki P., Zhu H., Wang J., Challa G., Zhang Z., Gill B., Li W. The chloroplast view of the evolution of polyploid wheat. *New Phytologist*. 2014;204(3):704-714. DOI 10.1111/nph.12931.
- Hein A., Brenner S., Knoop V. Multifarious evolutionary pathways of a nuclear RNA editing factor: disjunctions in coevolution of DOT4 and its chloroplast target rpoC1eU488SL. *Genome Biol. Evol.* 2019; 11(3):798-813. DOI 10.1093/gbe/evz032.
- Hisano H., Tsujimura M., Yoshida H., Terachi T., Sato K. Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). *BMC Genomics*. 2016;17(1):824. DOI 10.1186/s12864-016-3159-3.
- Kihara H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations. *Cytologia*. 1951;16:177-193. DOI 10.1508/cytologia.16.177.
- Krepak I.M., Davydenko O.G., Triboush S.O., Danilenko N.G. The creation of allo- and isoplasmic barley lines. In: *Molecular-Genetic Markers in Plants: Abstracts of Int. Conf. Yalta, Nov. 11–15, 1996*. Kiev: Agrarna Nauka Publ., 1996;74. (in Russian)
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. DOI 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Lukhanina N.V., Siniauskaya M.G., Goloenko I.M., Davydenko O.G. Chloroplast microsatellites in barley: the reduction of variability spectrum in cultivated forms. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2006;IV(1):17-21. (in Russian)
- Maan S.S. Specificity of nucleo-cytoplasmic interactions in *Triticum* and *Aegilops* species. *Wheat Inform. Service*. 1979;50:71-79.
- Maier R., Zeltz P., Kössel H., Bonnard G., Gualberto J., Grienenberger J. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 1996;32(1-2):343-365. DOI 10.1007/BF00039390.
- Makarevich A., Pankratov O., Sinyavskaya M., Lukhanina N., Shymkevich A., Liaudansky A., Goloenko I., Danilenko N., Davydenko O. NGS data processing method for the mixture of chloroplast and mitochondrial DNA of barley. In: *Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2018): The Tenth International Young Scientists School (27–31 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia): Abstracts*. Novosibirsk, 2018;29. DOI 10.18699/SBB-2018-23.
- Martin M., Sabater B. Plastid *ndh* genes in plant evolution. *Plant Physiol. Biochem.* 2010;48(8):636-645. DOI 10.1016/j.plaphy.2010.04.009.
- Milne I., Stephen G., Bayer M., Cock P.J.A., Pritchard L., Cardle L., Shaw P.D., Marshall D. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief. Bioinformatics*. 2013;14(2):193-202. DOI 10.1093/bib/bbs012.
- Mukai Y., Maan S.S., Panayotov I., Tsunewaki K. Comparative studies of the nucleus-cytoplasm hybrids of wheat produced by three research groups. In: *Proc. 5th Int. Wheat Genet. Symp.* 1978;1: 282-292.
- Nakamura Ch., Yamakawa S., Suzuki T. Recovery of normal photosynthesis and respiration in common wheat with *Agropyron* cytoplasm by telocentric *Agropyron* chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 1991;81:514-518. DOI 10.1007/BF00219442.
- Neale D.B., Saghai-Marooif M.A., Allard R.W., Zhang Q., Jorgensen R.A. Chloroplast DNA diversity in populations of wild and cultivated barley. *Genetics*. 1988;120(4):1105-1110.
- Nock C.J., Waters D.L.E., Edwards M.A., Bowen S.G., Rice N., Cordeiro G.M., Henry R.J. Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification. *Plant Biotechnol. J.* 2011;9:328-333. DOI 10.1111/j.1467-7652.2010.00558.x.
- Palilova A.N., Sylkova T.A. Formation of productivity in the new series of alloplasmic wheat lines under the influence of alien cytoplasm. *Selskokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1987; 12:3-5. (in Russian)
- Pankin A., von Korff M. Co-evolution of methods and thoughts in cereal domestication studies: a tale of barley (*Hordeum vulgare*). *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017;36:15-21. DOI 10.1016/j.pbi.2016.12.001.
- Peredo E.L., King U.M., Les D.H. The plastid genome of *Najas flexilis*: adaptation to submersed environments is accompanied by the complete loss of the NDH complex in an aquatic angiosperm. *PLoS One*. 2013;8(7):e68591. DOI 10.1371/journal.pone.0068591.
- Provan J., Russell J.R., Booth A., Powell W. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Mol. Ecol.* 1999;8(3):505-511. DOI 10.1046/j.1365-294X.1999.00545.x.
- Reboud X., Zeyl C. Organelle inheritance in plants. *Heredity*. 1994;72: 132-140. DOI 10.1038/hdy.1994.19.
- Roll-Mecak A., Shin B.S., Dever T.E., Burley S.K. Engaging the ribosome: universal IFs of translation. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26: 705-709.
- Rumeau D., Peltier G., Cournac L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ.* 2007;30(9):1041-1051. DOI 10.1111/j.1365-3040.2007.01675.x.
- Russell J.R., Booth A., Fuller J.D., Baum M., Ceccarelli S., Grando S., Powell W. Patterns of polymorphism detected in the chloroplast and nuclear genomes of barley landraces sampled from Syria and Jordan. *Theor. Appl. Genet.* 2003;107(3):413-421. DOI 10.1007/s00122-003-1261-9.
- Sabater B. Evolution and function of the chloroplast. *Current investigations and perspectives*. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(10):3095.
- Saisho D., Purugganan M.D. Molecular phylogeography of domesticated barley traces expansion of agriculture in the Old World. *Genetics*. 2007;177(3):1765-1776. DOI 10.1534/genetics.107.079491.
- Saski C., Lee S.B., Fjellheim S., Guda C., Jansen R.K., Luo H., Tomkins J., Rognli O.A., Daniell H., Clarke J.L. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(4):571-590. DOI 10.1007/s00122-007-0567-4.
- Shikanai T. Chloroplast NDH: a different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics*. 2016;1857(7):1015-1022. DOI 10.1016/j.bbabi.2015.10.013.
- Sipahi H., Meydan H., Özbek K. Genetic variation of barley germplasm from Turkey assessed by chloroplast microsatellite markers. *Int. J. Biodivers. Conserv.* 2013;5(11):775-781. DOI 10.5897/IJBC2013.0613.
- Sychjova I.M., Aksjonova H.A., Davydenko O.G. The effect of intra-specific cytoplasmic substitution on the frequency of chiasmata and sister chromatid exchanges and on marker gene segregation. In: Lelley T. (Ed.). *Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement*. Wien: WUV-Universitätsverlag, 1998;168-174.
- Takenaka M., Zehrmann A., Verbitskiy D., Härtel B., Brennicke A. RNA editing in plants and its evolution. *Annu. Rev. Genet.* 2013; 47(13):335-352. DOI 10.1146/annurev-genet-111212-133519.

- Triboush S.O., Danilenko N.G., Davydenko O.G. Method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1998;16:183-189. DOI 10.1023/A:1007487806583.
- Tsudzuki T., Wakasugi T., Sugiura M. Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. *J. Mol. Evol.* 2001;53:327-332. pmid: 11675592.
- Tsunewaki K. (Ed.). *Genetic Diversity of the Cytoplasm in Triticum and Aegilops*. Tokyo: Jpn. Soc. for the Promotion of Science, 1980.
- Tsunewaki K. Genome-plasmon interactions in wheat. *Jpn. J. Genet.* 1993;68(1):1-34. DOI 10.1266/jjg.68.1.
- Tsunewaki K., Mori N., Takumi S. Experimental evolutionary studies on the genetic autonomy of the cytoplasmic genome "plasmon" in the *Triticum* (wheat)-*Aegilops* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(8):3082-3090. DOI 10.1073/pnas.1817037116.
- Tsunewaki K., Wang G.-Z., Matsuoka Y. Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. 2. Characterization and classification of 47 plasmons based on their effects on common wheat phenotype. *Genes Genet. Syst.* 2002;77(6):409-427. DOI 10.1266/ggs.77.409.
- Twyford A.D., Ness R.W. Strategies for complete plastid genome sequencing. *Mol. Ecol. Resour.* 2017;17(5):858-868. DOI 10.1111/1755-0998.12626.

ORCID ID

M.G. Siniauskaya orcid.org/0000-0002-9800-4725

Acknowledgements. The work was financed by GPNI "Biotechnology" 2016–2020 years. Subprogramme 2 "Structural and functional genomics", projects 2.06, 2.29.

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

Received June 13, 2019. Revised September 6, 2019. Accepted October 2, 2019.

Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции

А.М. Камнев^{1,2}, О.Ю. Антонова¹, С.Е. Дунаева¹, Т.А. Гавриленко¹✉, И.Г. Чухина¹✉

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru; i.chukhina@vir.nw.ru

Аннотация. Род *Rubus* L. (семейство Rosaceae Juss.), по оценкам разных систематиков, состоит из 12–16 подродов, объединяющих ~750 видов. Самые крупные по числу видов подроды – *Idaeobatus* (Focke) Focke, к которому относятся малины, и типовой подрод *Rubus* (= *Eubatus* Focke), включающий виды ежевик. Представители рода *Rubus* обладают высокой пищевой и хозяйственной ценностью, а также лекарственными свойствами. Селекционные исследования направлены на расширение генетического разнообразия и создание новых сортов малин и ежевик, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам и отличающихся высоким качеством плодов. Современные селекционно-генетические программы все шире включают достижения молекулярной генетики и геномики. В данной статье представлен обзор фундаментальных и прикладных исследований генетического разнообразия культивируемых и дикорастущих видов рода *Rubus*, выполненных на основе методов молекулярного маркирования. Рассмотрены основные типы молекулярных маркеров (RFLP, RAPD, SSR, ISSR, AFLP, SCAR, SSCP, ретротранспозонные маркеры и т.д.) и области их применения в изучении представителей рода *Rubus*. Приведены результаты работ по использованию методов ДНК-маркирования для решения самых разных задач, включая: исследование межвидового и внутривидового генетического разнообразия, филогенетических связей видов и надвидовых таксонов, выяснение спорных вопросов систематики, генотипирование и уточнение родословных сортов малин и ежевик, изучение соматической изменчивости и др. Наиболее важным результатом в практическом плане является создание насыщенных молекулярно-генетических карт для разных видов малин и ежевик, на которых локализованы многочисленные гены и QTL, детерминирующие различные хозяйственно ценные признаки. В то же время необходимо отметить, что число маркеров, перспективных для проведения эффективного молекулярного скрининга, пока еще недостаточно.

Ключевые слова: *Rubus*; малины; ежевики; ДНК-маркирование; полиморфизм; молекулярно-генетические карты; MAS.

Для цитирования: Камнев А.М., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):20-30. DOI 10.18699/VJ20.591

Molecular markers in the genetic diversity studies of representatives of the genus *Rubus* L. and prospects of their application in breeding

A.M. Kamnev^{1,2}, O.Yu. Antonova¹, S.E. Dunaeva¹, T.A. Gavrilenko¹✉, I.G. Chukhina¹✉

¹ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² Altai State University, Barnaul, Russia

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru; i.chukhina@vir.nw.ru

Abstract. According to estimates of various taxonomists, the genus *Rubus* L. (Rosaceae Juss.) consists of 12–16 subgenera comprising ~750 species. The two largest subgenera are *Idaeobatus* (Focke) Focke, which includes raspberries, and the type subgenus *Rubus* (= *Eubatus* Focke), which contains blackberry species. Representatives of the genus *Rubus* have high nutritional and economic values, as well as medicinal properties. Breeding programs are aimed at broadening genetic diversity and creating new varieties of raspberries and blackberries that are resistant to biotic and abiotic stressors and have high fruit quality. Modern breeding and genetic programs increasingly use the achievements of molecular genetics and genomics. This paper reviews the literature data on the application of molecular markers in fundamental and applied research aimed at studying the genetic diversity of cultivated and wild species of the genus *Rubus*. The review describes the main types of molecular markers (RFLP, RAPD, SCoT, SSR, ISSR, AFLP, SCAR, SSCP) and their application for studying the species of the genus *Rubus*. The results of the work on the use of DNA markers for solving different tasks are presented, including: studying the phylogenetic relationships of species, clari-

fyng controversial issues of taxonomy, analyzing interspecific and intraspecific diversity, genotyping and pedigree analysis of raspberry and blackberry varieties, studying somaclonal variation and others. The most important result is the development of molecular genetic maps for raspberry and blackberry species, on which numerous genes and QTLs conferring various valuable traits have been mapped. At the same time, the number of markers that are promising for effective molecular screening is still insufficient.

Key words: *Rubus*; raspberries; blackberries; DNA markers; genetic diversity; molecular maps; MAS.

For citation: Kamnev A.M., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Molecular markers in the genetic diversity studies of representatives of the genus *Rubus* L. and prospects of their application in breeding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):20-30. DOI 10.18699/VJ20.591 (in Russian)

Введение

Род *Rubus* L. (подсемейство Rosoideae Focke, семейство Rosaceae Juss.), по оценкам разных систематиков, состоит из 12–16 подродов, объединяющих ~750 видов (Focke, 1910, 1911, 1914; Robertson, 1974; Красовская, 2001). Самые крупные по числу видов подроды – *Idaeobatus* (Focke) Focke, к которому относятся малины, и типовой подрод *Rubus* (= *Eubatus* Focke), включающий виды ежевик. Представители рода произрастают на всех континентах, за исключением Антарктиды и аридных территорий. Наибольшее разнообразие видов подрода *Rubus* (= *Eubatus*) сосредоточено в северо-восточной Америке и Европе, а подрода *Idaeobatus* – в умеренной и субтропической части Восточной Азии (от Гималаев до Японии) и в западной и центральной части Китая (Бологовская, 1936). До сих пор не существует единого мнения об объеме и числе видов рода *Rubus*, что весьма затрудняет определение по флористическим спискам точного числа произрастающих на территории России видов. Анализ новейших региональных флористических сводок – «Конспект флоры Азиатской России» (2012) и «Флора Восточной Европы» (2001) – показал, что в Российской Федерации наибольшее видовое разнообразие подрода *Rubus* (53 вида) представлено в европейской части страны (Красовская, 2001), а подрода *Idaeobatus* (9 видов) – в азиатской (Овчинникова, 2012).

Три наиболее распространенных культурных вида малин – *R. idaeus* L. (малина обыкновенная), *R. strigosus* Michx. (малина щетинистая) и *R. occidentalis* L. (малина западная) относятся к секции *Idaeanthi* Focke подрода *Idaeobatus* (Knight, 1993). Большинство культивируемых видов ежевик входят в секции *Allegheniensis*, *Arguti*, *Flagellares*, *Rubus*, *Ursini* и *Verotrivialis* подрода *Rubus* (Gustafsson, 1943; Finn, 2008). Сорта малины и ежевики возделывают во многих странах. По данным на 2017 г. ведущими производителями являются Мексика, Сербия, США, РФ и Польша (<https://www.wikizero.com/en/Raspberry>; Strik, Finn, 2012). Помимо пищевой ценности, виды малин и ежевик обладают лекарственными свойствами.

Исходно селекция малины в европейских странах основывалась на отборах и введении в культуру лесных форм *R. idaeus*. В XIX в. в Европу была завезена малина щетинистая из Северной Америки (Jennings, 1988). Начало целенаправленной селекции малины, основанной на межвидовой гибридизации отобранных форм *R. idaeus* и *R. strigosus*, можно отнести к концу XIX в. Источниками генетического материала *R. strigosus* послужили всего лишь четыре сорта – ‘Cuthbert’, ‘Latham’, ‘Herbert’ и ‘Ranere’ (Daubeny, Anderson, 1989). В Европе также

использовалось предельно ограниченное число сортов *R. idaeus* (Jennings, 1988). В большинстве межвидовых скрещиваний участвовал сорт ‘Lloyd George’ (сеянец малины обыкновенной *R. idaeus*), который является прямым предком более 30 % селекционных сортов, выведенных до 1970 г. (Oydvin, 1970). Использование ограниченного числа одомашненных форм *R. idaeus* и *R. strigosus* на первых этапах селекционного процесса и многократное включение их в последующие скрещивания привели к резкому сокращению генетического разнообразия сортов малины, что до сих пор представляет серьезную проблему в селекции этой культуры (Jennings, 1988; Dale et al., 1993; Graham et al., 1996).

В настоящее время наиболее актуальными направлениями селекционной работы являются: создание сортов малины, устойчивых к абиотическим стрессорам, грибным и вирусным болезням (например, ботритиозу, антракнозу, корневым гнилям, вирусу кустистой карликовости малины (RBDV – Raspberry Bushy Dwarf Virus)), и выведение сортов с высоким качеством плодов (Евдокименко и др., 2012). Для расширения генетического разнообразия возделываемых сортов селекционеры все большее внимание уделяют привлечению в гибридизацию дикорастущих видов подрода *Idaeobatus*, а также представителей более отдаленных видов из других подродов рода *Rubus* (Knight et al., 1989).

В РФ селекционные исследования, направленные на создание новых сортов малины, выполняются во Всероссийском селекционно-технологическом институте садоводства и питомниководства в Москве, Кокинском опорном пункте этого института, в государственном бюджетном учреждении Самарской области «Научно-исследовательский институт «Жигулевские сады» в Самаре, на Свердловской селекционной станции садоводства, во Всероссийском научно-исследовательском институте садоводства им. И.В. Мичурина (Мичуринск) и на Новосибирской зональной станции садоводства. На Алтае селекционная работа по малине ведется с 1935 г. в Научно-исследовательском институте садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко в Горно-Алтайске и с 1951 г. – в Барнауле (Евдокименко и др., 2012).

В селекционно-генетических программах, направленных на создание нового поколения сортов малины и ежевики, все шире используются достижения молекулярной генетики, биотехнологии и геномики. В настоящей работе представлен обзор литературы по применению молекулярно-генетических методов в изучении биоразнообразия представителей рода *Rubus* и использованию этих подходов в селекционном процессе.

Изоферментные маркеры. Первым поколением молекулярных маркеров, использовавшихся для изучения межвидового и внутривидового полиморфизма представителей рода *Rubus* и молекулярной паспортизации сортов, являлись различные изоферментные системы: MDH (malate dehydrogenase – малатдегидрогеназа), PGI (phosphoglucose isomerase – фосфоглюкоизомераза), PGM (phosphoglucose mutase – фосфоглюкомутаза), TPI (triosephosphate isomerase – триозофосфатизомераза), IDH (isocitrate dehydrogenase – изоцитратдегидрогеназа), SKDH (shikimate dehydrogenase – шикиматдегидрогеназа) (Cousineau et al., 1993; Kollmann et al., 2000) и EST (esterase – эстераза), PX (peroxidase – пероксидаза), LAP (leucine aminopeptidase – лейцинаминопептидаза) (Дунаева и др., 2005). Изоферментный анализ также был применен в исследованиях типа размножения растений (половое размножение или апомиксис) (Kollmann et al., 2000). Следует отметить, что общей проблемой в использовании изоферментных маркеров является их сезонная и онтогенетическая зависимость, что ограничивает возможности изучения внутривидового и популяционного генетического разнообразия.

Успехи молекулярной генетики привели к развитию методов ДНК-маркирования, позволяющих использовать любые ткани и органы на всех стадиях развития растений как в живом, так и в гербарном материале и анализировать не только белок-кодирующие, но и некодирующие участки генома, а также повторяющиеся последовательности. В молекулярно-генетическом анализе видов рода *Rubus* применяют различные типы ДНК-маркеров – от ставших уже классическими AFLP, SSR, SCAR до новейших маркеров, основанных на методах секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing).

RFLP (restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ). В целях изучения межвидового и внутривидового генетического разнообразия представителей рода *Rubus* RFLP-маркеры начали применять еще в 90-х гг. прошлого века, когда информация о нуклеотидных последовательностях геномов видов малин и ежевик отсутствовала. Поэтому в качестве зондов использовали пробы чужеродной ДНК, например фрагменты ДНК фага M13 (Nybom et al., 1990; Nybom, Hall, 1991; Ноерфнер et al., 1993), пробы мини-сателлитной ДНК гена миоглобина человека (Parent, Pagé, 1992), а также пробы из библиотек хлоропластной ДНК томатов (Moore, 1993) и ячменя (Waugh et al., 1990). Пробы чужеродной ДНК были успешно использованы для генотипирования сортов малины и ежевики и анализа их родословных (Nybom, Hall, 1991; Parent, Pagé, 1992; Moore, 1993); исследования генетического разнообразия популяций *R. idaeus*, растущих на загрязненных и экологически чистых территориях (Keane et al., 1998); изучения соматоклональной изменчивости сортов малины в культуре *in vitro* (Ноерфнер et al., 1993) и в анализе полиморфизма потомства разных видов ежевик, способных к апомиксичному размножению (Kraft, Nybom, 1995; Kraft et al., 1996; Nybom, 1998; Werlemark, Nybom, 2003).

RAPD (random amplification of polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК). Поскольку работа с RAPD-маркерами не требует инфор-

мации о нуклеотидных последовательностях, практически у всех культур, в том числе у малин и ежевик, это были первые из применяемых ПЦР-маркеров. Наиболее активно их привлекали для генотипирования и уточнения родословных селекционных сортов: малины обыкновенной (Graham et al., 1994; Stafne et al., 2003; Umar et al., 2010; Simlat et al., 2018), малины западной (Weber, 2003) и ежевики (Stafne et al., 2003; Каган и др., 2014), а также дикорастущих популяций *R. idaeus* (Graham et al., 1997).

В работе корейских исследователей RAPD-анализ был применен для уточнения происхождения местного сорта КСВ (Korean Cultivated Bramble – ежевика, культивируемая в Корее) (Eu et al., 2008). Результаты указывают на внутрисортную гетерогенность КСВ, большинство образцов которого (13 из 14) кластеризовались вместе с образцами видов *R. occidentalis* и *R. crataegifolius* Bunge, и только один образец КСВ попал в один кластер вместе с *R. coreanus*, который ранее считался его предком.

В целом многие авторы отмечают, что метод RAPD-анализа отличается нестабильностью и слабой воспроизводимостью результатов, поэтому на современном этапе предпочтение отдается другим типам маркеров.

AFLP (amplified fragment length polymorphism – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов). Высокополиморфные AFLP-маркеры часто привлекались в исследования генетического разнообразия представителей рода *Rubus*. В работе Miyashita et al. (2015) их использовали для филогенетического анализа образцов разных видов рода *Rubus*, растущих на различных японских островах. Материал включал сорта малины обыкновенной и ежевики, образцы дикорастущих популяций *R. idaeus* var. *aculeatissimus* и образцы 10 диких видов, относящихся к четырем под родам: *Anoplobatus*, *Eubatus*, *Malachobatus* и *Idaeobatus*. Образцы выборки разделились на семь клад. Виды, относящиеся к первым трем под родам, сформировали три отдельные клады, тогда как виды под рода *Idaeobatus* разделились на четыре кластера. Интересно, что образцы *R. idaeus* var. *aculeatissimus*, собранные на о. Хоккайдо, оказались более гетерогенны (уровень полиморфизма 95.0%), чем образцы популяций дикорастущих видов *R. crataegifolius*, *R. parvifolius* и *R. phoenicolasius* Maxim., которые были собраны на трех островах – Хонсю, Кюсю и Хоккайдо. На основании результатов AFLP-анализа авторам удалось отделить дикорастущие образцы *R. idaeus* от сортов малины обыкновенной (Miyashita et al., 2015).

J. Kollmann с коллегами (Kollmann et al., 2000), изучив внутривидовую генетическую изменчивость европейских видов *R. armeniacus* Focke и *R. bifrons* Vest., сделали вывод о том, что уровень полиморфизма зависит прежде всего от типа размножения растений (апомиксис или половое размножение). Этот вывод подтвердил и M.L. Marulanda (Marulanda et al., 2007), изучавший генетическое разнообразие культурных и диких видов малин и ежевик из региона Центральные Анд Южной Америки (*R. glaucus* Benth., *R. adenotrichos* Schldtl., *R. bogotensis* Kunth, *R. robustus* C. Presl., *R. rosifolius* Sm., *R. urticifolius* Poir.).

С помощью AFLP-маркеров была исследована генетическая структура популяций инвазивного вида *R. alceifolius* Poir. и восстановлена история его интродукции из

Юго-Восточной Азии, где выявлен максимальный уровень меж- и внутривидовой изменчивости, в Австралию (низкий уровень полиморфизма) и на острова Индийского океана, на которых популяции часто представлены единичными AFLP-генотипами (Amsellem et al., 2000).

Турецкие исследователи применили AFLP-маркеры для изучения генетического разнообразия дикорастущих образцов малины *R. idaeus*, собранных в разных регионах Турции (Ercisli et al., 2008), и селекционного генофонда ежевик (Ipek et al., 2009; Agar et al., 2011). В этих работах продемонстрирован высокий уровень полиморфизма местных популяций. Авторы отметили, что полиморфные селекционные клоны, отобранные по признакам качества и устойчивости к болезням из дикорастущих популяций ежевики кавказской – *R. caucasicus* L. (Agar et al., 2011) и малино-ежевичных гибридов (*R. idaeus* × *R. ursinus* – бойзенова ягода) (Ipek et al., 2009), довольно сильно отличались от широко распространенных в Турции генетически однородных североамериканских селекционных сортов ежевики.

Маркеры, основанные на микросателлитных повторах. Для выявления полиморфизма микросателлитных локусов наиболее часто используют SSR- и ISSR-маркеры (SSR, simple sequence repeats – простые повторяющиеся последовательности; ISSR, inter simple sequence repeats – межмикросателлитные последовательности). В первой работе по изучению SSR-полиморфизма у представителей рода *Rubus* микросателлитные участки выявляли методом блот-гибридизации по Саузерну, используя в качестве зонда две синтетические ДНК-пробы с tandemно повторяющимися последовательностями GACA и GATA (Bussemeyer et al., 1997).

В настоящее время праймеры для SSR-анализа разрабатывают на основе информации о фланкирующих микросателлитных повторах участков. Для этого проводят поиск повторов в известных последовательностях или в сиквенсах, полученных в экспериментальных исследованиях. Например, в работе J.M. Bushakra с соавторами (Bushakra et al., 2015b) по результатам секвенирования библиотек кДНК были разработаны наборы SSR-маркеров для *R. idaeus* (сорт ‘Heritage’) и *R. occidentalis* (сорт ‘Bristol’) – 131 и 288 пар праймеров соответственно.

Существует, однако, и другой способ поиска микросателлитов, не требующий информации об анализируемом геноме, с использованием библиотек, обогащенных SSR-повторами. Геномную ДНК подвергают воздействию рестриктаз, после чего рестрицированные фрагменты клонируют в ВАС-векторах (ВАС, bacterial artificial chromosome – искусственная бактериальная хромосома). Полученные библиотеки ВАС-клонов скринируют путем гибридизации с олигонуклеотидными пробами, например (GA)₂₀, (CA)₂₀, (AT)₂₀, (GC)₂₀, (AGC)₁₅ и др. Позитивные ВАС-клоны, содержащие соответствующие микросателлитные участки, отбирают, секвенируют и, основываясь на информации об их последовательностях, разрабатывают SSR-праймеры. Подобный подход для малины был применен в ряде работ (Graham et al., 2002, 2004, 2006; Lopes et al., 2006; Lee et al., 2015). В частности, J. Graham с соавторами (Graham et al., 2002) выявили SSR-районы путем секвенирования клонов из библиотек, обогащенных

последовательностями (AC)_n и (AG)_n. Разработанные праймеры были апробированы на выборке из 50 генотипов, включающей сорта малины обыкновенной и малины западной, сорта ежевики, образцы дикорастущих видов *R. grabowski*, *R. deliciosus* и межвидовые гибриды. В итоге было отобрано десять наиболее информативных пар праймеров, генерирующих у изученных образцов значительное число (от 7 до 16) полиморфных продуктов (Graham et al., 2002).

В дальнейшем многочисленные группы исследователей создавали наборы SSR-маркеров для разных видов малин и ежевик: *R. hochstetterorum* (Lopes et al., 2006), *R. occidentalis* (Dossett et al., 2012a), *R. coreanus* (Lee et al., 2015), *R. glaucus* (López et al., 2019), а также сортов ежевики (Lewers et al., 2008). В ряде работ были разработаны мультиплексные системы (Fernández-Fernández et al., 2011; Zurn et al., 2018), разрешающую способность которых проверяли на разных моделях. Так, J. Zurn et al. (2018) апробировали мультиплексную систему из шести пар SSR-праймеров в эксперименте по детекции генетического материала родительских сортов у 489 F₁ семян ежевики из 18 комбинаций скрещиваний. По результатам SSR-анализа 94.5 % потомков были признаны гибридами F₁, остальные генерировали фрагменты, отсутствующие у родительских сортов, и были отнесены к категории “off-cross” – с апомиктичным способом размножения. С использованием мультиплексной системы из восьми пар SSR-праймеров были генотипированы полученные из разных генбанков 177 образцов ежевик, среди которых выявлены дублиеты (Zurn et al., 2018).

M. Woodhead с соавторами (Woodhead et al., 2008) провели поиск EST-SSR-маркеров (EST, expressed sequenced tag – экспрессирующиеся последовательности) в библиотеках кДНК, полученных из корней и почек сортов ‘Glen Moy’ (*R. idaeus*), ‘Latham’ (*R. strigosus*) и потомков от их скрещивания в количестве 188 семян. Полиморфизм EST-последовательностей был ассоциирован с изменчивостью следующих признаков: срок распускания почек, мощность растений, устойчивость к болезням. По результатам данного исследования идентифицированы участки псевдохромосом, связанные с признаками качества плодов и устойчивостью к фитофторозной корневой гнили малины. Значительная часть EST-SSR-праймеров, разработанных для селекционных сортов малины обыкновенной (*R. idaeus*), была способна к амплификации ДНК у ряда диких видов рода *Rubus*, что, по мнению авторов, указывает на наличие у них функциональных аллелей генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, и на перспективы вовлечения этих видов в селекционный процесс (Woodhead et al., 2008).

Созданные наборы SSR-маркеров широко использовались для изучения генетического разнообразия и генотипирования селекционных сортов ежевики и малины (Castillo et al., 2010a; Лебедев и др., 2018), малины обыкновенной (Badjakov et al., 2009; Lamoureux et al., 2011; Girichev et al., 2015; Laciš et al., 2017) и малины западной (Dossett et al., 2012a, b).

N. Castillo с коллегами (Castillo et al., 2010a) проанализировали 48 сортов малины и 48 сортов ежевики с помощью 13 пар SSR-праймеров, одна из которых была разработана

на основе последовательности из GenBank Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)), а остальные – на базе геномных библиотек сорта малины ‘Meeker’ и сорта ежевики ‘Marilon’. По результатам кластерного анализа полиплоидные (4x – 10x) сорта ежевики разделились на два основных кластера согласно их принадлежности к различным селекционным программам, реализуемым на востоке и западе США. Авторы объясняют полученные результаты использованием селекционерами восточных и западных штатов в интрогрессивной гибридизации различных диких видов разного уровня плоидности (Castillo et al., 2010a). Обособленные группы были сформированы сортами, сходными по происхождению (созданными с участием *R. strigosus*, *R. idaeus* или межвидовых гибридов), а также сортами, имеющими общий признак – способность к плодоношению на побегах первого года (Castillo et al., 2010a).

С помощью SSR-маркеров проведено генотипирование российских сортов малины обыкновенной и сортов селекции сопредельных стран (Lamoureux et al., 2011; Laciš et al., 2017), а также европейских сортов (Girichev et al., 2015). В этих исследованиях не было получено четкой кластеризации сортов, созданных в селекционных программах разных стран, и сортов, имеющих различное генетическое происхождение.

Другая область применения SSR-маркеров связана с изучением генетического разнообразия дикорастущих популяций разных видов малин и ежевик: *R. idaeus* (Graham et al., 2009), *R. mollucanus* L. (Bussemeyer et al., 1997), *R. crataegifolius*, *R. fruticosus* L., *R. coreanus* Miq. (Lee et al., 2016), аборигенных ежевик Кении (Ochieng et al., 2018). Анализ разнообразия дикорастущих в Шотландии популяций *R. idaeus* (Graham et al., 2009) выявил высокий уровень генетического разнообразия: 10 пар SSR-праймеров генерировали 80 аллелей у изученных образцов 12 популяций. Примечательно, что только 18 из них были выявлены у культивируемых образцов малины обыкновенной, что указывает на необходимость расширения генетического разнообразия сортов, в том числе за счет привлечения в скрещивания образцов изученных дикорастущих популяций, и, следовательно, указывает на важность их *in situ* сохранения.

Обратная ситуация выявлена при исследовании полиморфизма дикорастущих популяций *R. occidentalis*, собранных в 27 штатах США и в двух канадских провинциях. Оказалось, что у дикорастущих популяций генетическое разнообразие было ниже, чем у культурных форм малины западной, поэтому, по мнению авторов, данные природные популяции для дальнейших селекционных работ не представляют большого интереса (Dossett et al., 2012b).

SSR-маркеры использовали также для оценки генетической стабильности криорегенерантов малин и ежевик (Castillo et al., 2010b). Авторы сравнивали молекулярные спектры исходных растений, криорегенерантов и *ex vitro* растений с помощью 10 пар SSR-маркеров и 10 пар AFLP-праймеров. SSR-маркеры не обнаружили различий между анализируемыми генотипами, тогда как AFLP-маркеры позволили выявить полиморфизм у криорегенерантов.

Однако после одногодичного выращивания в полевых условиях криорегенеранты оказались идентичны исходным растениям. Выявленный у криорегенерантов полиморфизм авторы связывают с эпигенетической изменчивостью.

Настоящий прорыв в разработке микросателлитных маркеров связан с появлением методов секвенирования нового поколения (NGS): SSR-локусы стало возможно выявлять в полногеномных сиквенсах. Так, на основании более 40 миллионов коротких прочтений последовательностей видов *R. occidentalis* и *R. idaeus* было выявлено около 6000 SSR-локусов (Dossett et al., 2015), из которых для анализа отобрано 288 (по 144 для каждого вида). Показано, что праймеры, разработанные на базе сиквенсов малины западной, оказались более специфичными для этого вида: их амплификация у образцов *R. occidentalis* проходила более эффективно по сравнению с праймерами, разработанными на базе сиквенсов *R. idaeus*. В то же время для малины обыкновенной источник последовательностей при создании праймеров значения не имел. Всего было отобрано 166 пар SSR-праймеров, детектирующих как внутривидовой, так и межвидовой полиморфизм (Dossett et al., 2015).

Для разработки ISSR-маркеров не требуется информации о геномных последовательностях у изучаемых объектов. Анализ образцов дикорастущей малины (*R. idaeus*) из 19 пунктов Черноморского побережья Турции, проведенный при помощи 15 ISSR-праймеров, показал перспективность всех апробированных в этой работе маркеров. Наилучшие результаты (высокий полиморфизм, PIC > 0.3) показали праймеры (GGGT)₄, BDB(CA)₈ и (AG)₈YC (Cekic et al., 2018). Работа В.В. Соболева и коллег (2009) была направлена на генотипирование российских сортов малин (15 ремонтантных и 12 неремонтантных) и образцов пяти видов малин. Исследуемые образцы разделились по группам на ремонтантные сорта и сорта с летним типом плодоношения. По результатам опыта высказано предположение, что один из ISSR-маркеров (а именно K19 с последовательностью (AC)₈YA) ассоциирован с генетическим(и) фактором(-ами), детерминирующим(и) признак ремонтантности (Соболев и др., 2009).

SSCP (single-strand conformation polymorphism – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК). SSCP-анализ основан на изменении конформации однонитевой ДНК при мононуклеотидных заменах, т.е. при наличии однонуклеотидного полиморфизма. Изменение конформации ДНК, в свою очередь, приводит к изменению подвижности ПЦР-продукта в полиакриламидном геле относительно амплификатов у исходного генотипа. Известна работа корейских исследователей, в которой выяснялось происхождение культивируемого в Корее местного сорта KCB (=Korean Cultivated Bramble) от одного из видов – *R. coreanus* или *R. occidentalis*. По результатам SSCP-анализа трех межгенных спейсеров пластидной ДНК (*atpB-rbcL*, *trnT-trnL* и *trnL-trnF*) образцы KCB с большей вероятностью относятся к виду *R. occidentalis*, чем к *R. coreanus* (Eu et al., 2010).

SCAR (sequence characterized amplified region – амплифицированная область с известной нуклеотидной последовательностью). В зависимости от уровня специ-

фичности SCAR-маркеры чаще всего используют для идентификации определенных аллелей генов (например, доминантных аллелей *R* генов устойчивости, см. далее раздел MAS (marker-assisted selection – маркер-вспомогательная селекция), а также для детекции индивидуальных хромосом, построения генетических карт, выявления генетического материала определенных видов. Например, SCAR-маркеры, разработанные на основе специфичных RAPD-фрагментов *R. caesius* L., позволили выявить в коммерческих образцах ладанника *Cistus incanus* L. от 0 до 2 % примесей растительного материала данного вида ежевики (Marieschi et al., 2010). В рамках селекционной программы канадской провинции Квебек с использованием SCAR-маркеров проведена идентификация сортов малины обыкновенной и малины пурпурной (гибрид *R. idaeus* и *R. occidentalis*) (Parent, Pagé, 1998).

Ретротранспозонные маркеры. В отличие от других культур, для представителей рода *Rubus* работ по ретротранспозонным маркерам известно немного. Так, Y. Liang с коллегами (Liang et al., 2016), изучая LTR-последовательности (LTR, long terminal repeat – длинный концевой повтор) в геноме черемухи, разработали 336 пар праймеров, часть из которых была способна амплифицировать ДНК сортов малины и ежевики – 8.6 и 6.5 % соответственно. Отметим, что в GenBank депонированы некоторые последовательности транспозонов малины, например ретротранспозон Cassandra (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/AY860317>).

ДНК-штрихкодирование. Для ДНК-штрихкодирования у растений чаще всего используют последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальной ДНК (ITS1 и ITS2; ITS – internal transcribed spacer) и различные локусы пластидной ДНК (Шнеер, Родионов, 2018; Saddhe, Kumar, 2018). Методы ДНК-штрихкодирования только начинают применять в изучении сложного рода *Rubus*, формирование генетического разнообразия которого обусловлено процессами межвидовой гибридизации, различными формами размножения растений (половое, вегетативно-клональное, агамное, включая апомиксис) и полиплоидии (хромосомные числа варьируют от $2n = 2x = 14$ до $2n = 12x = 84$) (Jennings, 1988; Красовская, 2001; Meng, Finn, 2002). Вопросы таксономии и филогенетических отношений видов рода *Rubus* требуют отдельного обсуждения; в настоящей работе мы остановимся лишь на некоторых исследованиях, в которых методы генетического баркодинга использовали для определения границ и изучения таксономического статуса подродов, секций, видов.

L.A. Alice и C.S. Campbell (1999) провели секвенирование и сравнительный анализ последовательностей ITS1 и ITS2 для 56 видов из 12 подродов рода *Rubus*, а также 5 видов рода *Dalibarda* L. (в других системах *Dalibarda* рассматривают как подрод рода *Rubus*). Результаты молекулярно-филогенетических исследований не согласуются с традиционным разделением рода *Rubus* на 12 подродов. На филогенетическом древе изученные виды четко разделились на четыре группы. Первая клада содержала все изученные виды 9 подродов; в отдельную группу с высокой поддержкой выделились виды еще трех подродов *Comaropsis*, *Dalibarda* и *Lampobatus*, произрас-

тающие в Южном полушарии; третья клада включала виды подрода *Rubus* и *R. alpinus* из подрода *Lampobatus*. Монофилетичную кладу сформировали только виды подрода *Orobatus* (Alice, Campbell, 1999).

В работе Y. Wang et al. (2016) изучен полиморфизм ядерных ITS- и пластидных (*rbcL*, *rpl20-rps12*, *trnG-trnS*) последовательностей для проверки гипотез о происхождении видов малин и ежевик, произрастающих в Китае. Показано, что подрод *Malachobatus* является монофилетическим, а подроды *Idaeobatus* и *Cylactis* – полифилетическими. Выявленные в данной работе несоответствия в топологии дендрограмм, построенных по данным о полиморфизме ядерных генов рРНК и участков пластидного генома, указывают на гибридогенное происхождение изученных видов из секций *Rosaefolii*, *Leucanthi*, *Corchorifolii* (Wang et al., 2016).

A.J. Fazekas с коллегами (Fazekas et al., 2008) проанализировали последовательности 9 локусов оргanelльных ДНК у малины обыкновенной, малины западной, ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* L.) и малины душистой (*R. odoratus* L.). Были апробированы 8 локусов пластидной ДНК, а также митохондриального гена *cox1*. Большинство (6 из 8) изученных локусов не поддерживали гипотезу о монофилетическом происхождении видов малин, исключение составили два локуса – ген *matK* и спейсер *atpF/atpH* (Fazekas et al., 2008).

Результаты цитированных выше работ указывают на необходимость таксономической ревизии рода *Rubus*.

WGS и SNP (whole genome sequencing – полногеномное секвенирование, single nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм). В последнее время методы высокотехнологичного секвенирования стали привлекаться и в исследования видов рода *Rubus*. Насколько нам известно, на сегодня существуют полногеномные сиквенсы двух видов этого рода – *R. idaeus* (Wight et al., 2019) и близкого ему *R. occidentalis* (VanBuren, 2016). С помощью современных технологий секвенирования и генетического анализа выявлен высокий уровень синтении геномов *R. occidentalis* и земляники лесной *Fragaria vesca* L. (VanBuren, 2016).

Полногеномное секвенирование позволяет одновременно генерировать огромное количество SNP-маркеров, которые применяют для создания генетических карт (Ward et al., 2013; Hackett et al., 2018), идентификации генов устойчивости к патогенам, например к *Verticillium* (VanBuren et al., 2018), а также для картирования хозяйственно ценных признаков (López et al., 2019). В работе J. Ryu et al. (2018) SNP-маркеры были использованы и для регистрации мутационных изменений, индуцированных воздействием гамма-лучей, у растений 14 образцов ежевик и гибридов Boysenberry.

Microarray технологии (ДНК-чипы). Известно несколько работ, выполненных на малине с применением данной технологии. В одной из них изучали экспрессию генов с целью выяснения причин остановки процессов жизнедеятельности в почках у сорта малины ‘Glen Ample’ (Mazzitelli et al., 2006). Было выявлено свыше 80 генов, имеющих отношение к клеточному метаболизму, транскрипционным процессам и др. и, вероятно, регулирующих процесс распускания почек. T.P. Gotame et al.

(2014) изучали экспрессию генов у четырех сортов малины обыкновенной в зависимости от температуры окружающей среды. Авторы идентифицировали 644 гена, экспрессия которых зависела от температурных условий, но из них только 12 транскрибировались у всех четырех сортов. Работа G.E. Fernandez (Fernandez et al., 2018) была направлена на выяснение генетических механизмов возникновения белых костянок в плодах ежевики. Выявлено более 12 тыс. генов, дифференциально экспрессирующихся в черных и белых костянках. Оказалось, что количество РНК в белых костянках существенно снижено по сравнению с черными; в качестве причины возникновения данного феномена авторы рассматривают супрессию генов, ответственных за биосинтез нуклеиновых кислот, в ответ на воздействие стрессовых условий (Fernandez et al., 2018).

Использование ДНК-маркеров для построения генетических карт. Первая карта генома *R. idaeus* была сконструирована на основании анализа расщепляющейся популяции потомков от скрещивания двух сортов: ‘Glen Moy’ (*R. idaeus*) и ‘Latham’ (*R. strigosus*). Изначально на карту было нанесено 30 SSR-, 4 EST- и 206 AFLP-маркеров. На полученных группах сцепления были картированы локусы количественных признаков (QTL, quantitative trait loci – локусы, вовлеченные в контроль количественных признаков), таких как «наличие шипов на побегах», «плотность и распределение корневых волосков» (Graham et al., 2004). В дальнейшем эта карта совершенствовалась с привлечением новых ДНК-маркеров (Graham et al., 2006, 2015; Raluca et al., 2006; Woodhead et al., 2008; Simpson et al., 2017). По мере насыщения карты маркерами на ней были локализованы многие гены и QTL хозяйственно ценных признаков, например ген опушения побегов *H*, ответственный также за устойчивость малины к ряду заболеваний (в том числе к серой гнили побегов), гены и QTL устойчивости к пятнистости побегов (группы сцепления (linkage groups) LG2 и LG4), ржавчине (LG3 и LG5) (Graham et al., 2006), а также к вирусам пятнистости листьев и хлороза сосудов (LG2 и LG7) (Raluca et al., 2006). Разработанная карта была также использована для поиска в геноме малины QTL, отвечающих за синтез антоцианов; соответствующие участки были найдены в группах сцепления LG1 и LG4 (Kassim et al., 2009). В работе J. Graham et al. (2015) были картированы QTL, связанные с признаком крошащихся плодов; данные локусы были обнаружены в группах сцепления LG1 и LG3. Из последних исследований упомянем (Simpson et al., 2017), в котором преимущественно в группе сцепления LG3, а также LG1 и LG5 выявлены QTL, ответственные за созревание и размягчение плодов.

M. Woodhead et al. (2010) анализировали ту же самую популяцию ‘Glen Moy’ × ‘Latham’ с использованием 43 пар праймеров, часть из которых была разработана на основе последовательностей генов рода *Prunus* L. В результате были картированы 15 QTL, ассоциированных с признаками созревания плодов и устойчивостью к ряду патогенов. Позднее в этой же популяции были картированы QTL, ассоциированные с признаком ветвления побегов, и изучены вклады генетической и экологической составляющих в формирование данного признака (Woodhead et

al., 2013). Фенотипизацию проводили в различных условиях окружающей среды: в теплице, в поле и в условиях заражения растений *Phytophthora rubi* – возбудителем корневой гнили малины. Длительный на протяжении шести лет эксперимент позволил картировать несколько QTL, вовлеченных в контроль ветвления побегов, в группах сцепления LG2, LG3, LG5 и LG6, причем в LG3 и LG5 выявлена колокализация с QTL, влияющим на мощность растений, а в LG6 – с QTL устойчивости к корневой гнили.

Другая карта была создана в работе D.J. Sargent et al. (2007) на основе результатов косегрегационного анализа 95 AFLP- и 22 SSR-маркеров в потомстве, полученном от скрещивания сортов малины ‘Malling Jewel’ и ‘Malling Otton’. На этой карте были локализованы ген *A₁*, контролирующий устойчивость к малинной тле (LG3), и ген *dw*, ответственный за карликовый габитус растения (LG6).

В исследованиях по молекулярному картированию вовлекались и другие виды рода *Rubus*. Так, J.M. Bushakra et al. (2012) сконструировали карту сцепления маркеров для гибридной популяции, полученной от скрещивания образцов малины западной и малины обыкновенной. Был картирован 131 маркер, в том числе 14 ортологичных, выявленных у всех изученных представителей семейства Розоцветные. Позднее появилась работа по созданию генетической карты малины западной (Bushakra et al., 2015a). Для картирования использовали популяцию из 115 сеянцев F₁ комбинации ORUS 3021-2 × ORUS 4153-1. Один из родителей был устойчив к тле – *Amphiphora agathonica*, что позволило локализовать на карте ген устойчивости *Ag₄*. Первоначально карта содержала 566 полиморфных маркеров. Позднее она была насыщена 468 SNP-маркерами, распределенными по семи псевдохромосомам, и сопоставлена с физической картой (Jibrán et al., 2018). При этом показана высокая степень коллинеарности генетической и физических карт малины, а также геномов малины и земляники. Устойчивость малины западной к тле изучалась и далее; были картированы три гена, ответственных за данный признак (Bushakra et al., 2018).

Еще одна карта была построена на основе анализа популяции потомков скрещивания межвидового гибрида [*R. idaeus* (сорт ‘Tulameen’) × *R. parvifolius*] × сорт малины ‘Qualicum’ с использованием 161 AFLP- и 17 SSR-маркеров (Molina-Bravo et al., 2014). В этом исследовании определены участки, ответственные за адаптацию растений к низким температурам и колебаниям зимних температур (LG1, LG4, LG5 и LG6), а также за размер плода (LG5), его форму (LG6), цвет (LG1, LG5), за окраску венчика (LG5 и LG6) и плотность шипов (LG4 и LG6).

Для ежевик первая карта была сконструирована в 2013 г. (Castro et al., 2013) на основе анализа сегрегации в популяции потомков скрещивания сортов ‘Arapaho’ и ‘APF-12’. Участок, ответственный за отсутствие шипов, локализован в группе сцепления LG4, а QTL, контролирующей тип плодоношения, – в LG7.

MAS (marker-assisted selection). Несмотря на то что у разных видов малин и ежевик картированы многие гены и QTL селекционно-ценных признаков и определены тесно сцепленные с ними маркеры, статей по маркер-вспомогательной селекции известно крайне мало.

Большое значение для селекции имеет разработка маркеров гена *Vi*, контролирующего устойчивость к вирусу RBDV – крайне опасному патогену, наносящему большой экономический ущерб. Для решения этой задачи J.A. Ward et al. (2012) применили метод сегрегационного bulk-анализа при помощи RAPD-маркеров. Специфические для устойчивых генотипов фрагменты (BC002-900, BC296-425, BC615-600) были секвенированы. На основе полученных последовательностей созданы CAPS-маркеры, из которых наилучшую связь с устойчивостью показал маркер BC615_553_Alu I, отсутствующий, однако, у других устойчивых сортов. Далее последовательность этого маркера была выравнена по секвенированному геному земляники, при этом один из генов-кандидатов оказался гомологичен последовательности *N*-гена табака, контролирующего устойчивость к вирусу табачной мозаики. В результате был предложен внутригенный маркер *gaspN_gene_1202*, который в 96.7 % случаев связан с устойчивостью к RBDV. Эффективность данного маркера подтверждена и при анализе расширенной группы селекционных сортов: диагностический фрагмент выявлен у устойчивых сортов ('Nootka', 'Haida', 'Willamette', WSU 78117-1, 'Newburgh', 'Cowichan', 'Chilcotin', 'Malling Promise', 'Latham') и отсутствовал у поражаемых RBDV генотипов (Ward et al., 2012).

С целью разработки маркеров генов устойчивости к фитофторозной гнили корней J. Graham с коллегами (Graham et al., 2011) отобрали ВАС-клоны с фрагментами хромосом 3 и 6, на которых ранее были картированы QTL устойчивости к *Phytophthora rubi*. Специфических маркеров для QTL устойчивости к фитофторозной гнили корней получено не было, однако авторы отметили ассоциацию с этим признаком SSR-маркера Rub118b₁₁₀ (Graham et al., 2011). В исследованиях С.А. Weber et al. (2008), направленных на решение этой же задачи, обнаружены два основных QTL, связанных с устойчивостью к фитофторозной гнили корней. К данным участкам авторы создали SCAR- и CAPS-маркеры, которые при апробации на 18 сортах продемонстрировали уровень ассоциации с устойчивостью 76 %.

Заключение

Современный инструментарий молекулярно-генетических методов применяется как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях представителей многочисленного рода *Rubus*, хотя число вовлеченных в исследования видов пока еще невелико (см. Приложение)¹. Наиболее важным результатом в практическом плане является создание насыщенных молекулярно-генетических карт разных видов малин и ежевик, на которых локализованы многочисленные гены и QTL, детерминирующие хозяйственно ценные признаки. В то же время на сегодня для молекулярного скрининга доступно лишь небольшое число маркеров, разработанных для единичных генов. Благодаря развитию современных технологий секвенирования, которые начинают применяться и для представителей рода *Rubus*, в ближайшее время можно ожидать прогресс и в направлении маркер-вспомогательной селекции.

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx1.pdf>

Список литературы / References

- Бологовская Р.П. Малины и ежевики. В: Вульф Е.В. (ред.). Культурная флора СССР. Т. 16. М.; СПб., 1936;165-226.
[Bologovskaya R.P. Raspberries and blackberries. In: Vulf E.V. (Ed.). Flora of Cultivated Plants. Vol. 16. Moscow–Saint-Petersburg, 1936;165-226. (in Russian)]
- Дунаева С.Е., Кудрякова Н.В., Малышев Л.Л., Лупышева Ю.В., Гавриленко Т.А. *In vitro* коллекция малин и ежевик и идентификация производа по изоферментным спектрам. Аграрная Россия. 2005;2:49-55.
[Dunaeva S.E., Kudryakova N.V., Malyshev L.L., Lupysheva Y.V., Gavrilenko T.A. Raspberry and blackberry *in vitro* collection and allozyme identification of accessions. Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia. 2005;2:49-55. (in Russian)]
- Евдокименко С.Н., Кулагина В.Л., Якуб И.Я. Современные тенденции производства и селекции малины. Плодоводство и ягодоводство России. 2012;31(1):148-156.
[Evdokimenko S.N., Kulagina V.L., Yakub I.Y. Modern trends in raspberry production and breeding. Plodovodstvo i Yagodovodstvo Rossii = Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia. 2012;31(1):148-156. (in Russian)]
- Каган Д.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Филиппов М.С., Бесов С.А., Ивановская С.И., Ковалевич О.А., Барсукова М.М. Паспортизация сортов малины и ежевики и изучение их филогенетических взаимоотношений методом RAPD-анализа. В: Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: Сб. статей междунар. науч. конф. Минск, 2014;101-104.
[Kagan D.I., Shestibratov K.A., Lebedev V.G., Azarova A.B., Filipov M.S., Besov S.A., Ivanovskaya S.I., Kovalevich O.A., Barsukova M.M. Certification of raspberry and blackberry cultivars and study of their phylogenetic relationships by RAPD analysis. Proc. of the Int. Sci. Conf. "Biotechnological Methods in Conservation of Biodiversity and Plant Breeding". Minsk, 2014;101-104. (in Russian)]
- Красовская Л.С. Рубус – *Rubus* L. В: Цвелёв Н.Н. (отв. ред.). Флора Восточной Европы. Т. X. СПб., 2001;362-393.
[Krasovskaya L.S. Rubus – *Rubus* L. In: Tselev N. (Ed.). Flora of Eastern Europe. Vol. X. St. Petersburg, 2001;362-393. (in Russian)]
- Лебедев В.Г., Субботина Н.М., Киркач В.В., Видягина Е.О., Поздняков И.А., Шестибратов К.А. Анализ микросателлитных локусов как первый этап на пути к маркерной селекции малины и земляники. Селекция и сортоведение садовых культур. 2018;5(1):65-68.
[Lebedev V.G., Subbotina N.M., Kirkach V.V., Vidyagina E.O., Pozdnyakov I.A., Shestibratov K.A. Analysis of microsatellite loci as first stage of marker-assisted selection of raspberry and strawberry. Seleksiya i Sortorazvedenie Sadovykh Kul'tur = Breeding and Variety Cultivation of Fruit and Berry Crops. 2018;5(1):65-68. (in Russian)]
- Овчинникова С.В. Семейство Rosaceae. В: Байков К.С. (ред.). Конспект флоры Азиатской России. Новосибирск, 2012;199-266.
[Ovchinnikova S.V. The Rosaceae Juss. Family. In: Baykov K.S. (Ed.). Outline of the Flora of Asian Russia. Novosibirsk, 2012;199-266. (in Russian)]
- Соболев В.В., Соболева А.Г., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Оценка межвидового и межсортового полиморфизма малины и маркирование признака ремонтантности с использованием ISSR-ПЦР-анализа. Изв. ТСХА. 2009;2:103-109.
[Sobolev V.V., Soboleva A.G., Andreeva G.N., Karlov G.I. Assessment of interspecific and intercultivar polymorphism of raspberry and marking of the permanent flowering sign by ISSR-PCR analysis. Izvestiya TSKhA = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy. 2009;2:103-109. (in Russian)]
- Шнейер В.С., Родионов А.В. ДНК-штрихкоды растений. Успехи соврем. биологии. 2018;138(6):531-537.
[Shneyer V.S., Rodionov A.V. Plant DNA barcodes. Uspekhi Sovremennoy Biologii = Advances in Current Biology. 2018;138(6):531-537. (in Russian)]

- Agar G., Halasz J., Ercisli S. Genetic relationships among wild and cultivated blackberries (*Rubus caucasicus* L.) based on amplified fragment length polymorphism markers. *Plant Biosyst.* 2011;145: 347-352.
- Alice L.A., Campbell C.S. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Am. J. Bot.* 1999;86(1):81-97.
- Amsellem L., Noyer J., Le Bourgeois T., Hossart-McKey M. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *R. alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism markers. *Mol. Ecol.* 2000;9: 443-455.
- Badjakov I., Todorovska E., Boicheva I., Atanassov I., Atanassov A. Assessment of genetic diversity in Bulgarian raspberry germplasm collection by microsatellite markers (SSR). *Biotechnol. Equip.* 2009;19(1):43-47.
- Bassil N.V., Nyberg A.M., Finn C.E., Clark J.R., Peace C.P., Iezzoni A. Development of a multiplexed fingerprinting set in blackberry. *Acta Hort.* 2016;1133:89-96. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1133.14.
- Bushakra J.M., Bryant D.M., Dossett M., Vining K.J., VanBuren R., Gilmore B.S., Lee J., Mockler T.C., Finn C.E., Bassil N.V. A genetic linkage map of black raspberry (*Rubus occidentalis*) and the mapping of Ag₄ conferring resistance to the aphid *Amphorophora agathonica*. *Theor. Appl. Genet.* 2015a;128:1631-1646. DOI 10.1007/s00122-015-2541-x.
- Bushakra J.M., Dossett M., Carter K.A., Vining K.J., Lee J.C., Bryant D.W., VanBuren R., Lee J., Mockler T.C., Finn C.E., Bassil N.V. Characterization of aphid resistance loci in black raspberry (*Rubus occidentalis* L.). *Mol. Breed.* 2018;38:83. DOI 10.1007/s11032-018-0839-5.
- Bushakra J.M., Lewers K.S., Staton M.E., Zhebentyayeva T., Sasaki C.A. Developing expressed sequence tag libraries and the discovery of simple sequence repeat markers for two species of raspberry (*Rubus* L.) *BMC Plant Biol.* 2015b;15:258-269. DOI 10.1007/s00122-015-2541-x.
- Bushakra J.M., Stephens M.J., Atmadjaja A.N., Lewers K.S., Symonds V.V., Udall J.A., Chagné D., Buck E.J., Gardiner S.E. Construction of black (*Rubus occidentalis*) and red (*R. idaeus*) raspberry linkage maps and their comparison to the genomes of strawberry, apple, and peach. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(2):311-327. DOI 10.1007/s00122-012-1835-5.
- Bussemeyer D.T., Pelikan S., Kennedy R.S., Rogstad S.H. Genetic diversity of Philippine *Rubus moluccanus* L. (Rosaceae) populations examined with VNTR DNA probes. *J. Trop. Biol.* 1997;14:867-884. DOI 10.1017/S0266467400011044.
- Castillo N.R.F., Bassil N.V., Wada S., Reed B.M. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2010b;46(3):246-256. DOI 10.1007/s11627-009-9265-z.
- Castillo N.R.F., Reed B.M., Graham J., Fernández-Fernández F., Bassil N.V. Microsatellite markers for raspberry and blackberry. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2010a;135:271-278.
- Castro P., Stafne E.T., Clark J.R., Lewers K.S. Genetic map of the primocane-fruited and thornless traits of tetraploid blackberry. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126:2521-2532.
- Cekic C., Calis O., Ozturk E.S. Genetic diversity of wild raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.) in North Anatolia based on ISSR markers. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2018;16(5):6835-6843. DOI 10.15666/aer/1605_68356843.
- Cousineau J.C., Anderson A., Daubeny H.A., Donnelly D.J. Characterization of red raspberry cultivars and selections using isoenzyme analysis. *HortScience.* 1993;28(12):1185-1186.
- Dale A., Moore P.P., McNicol R.J., Sjulín T.M., Burmistrov L.A. Genetic diversity of red raspberry cultivars throughout the world. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1993;118:119-129.
- Daubeny H.A., Anderson A. Germplasm enhancement in the British Columbia raspberry breeding program. *Acta Hort.* 1989;262:61-64. DOI 10.17660/ActaHortic.1989.262.7.
- Dossett M., Bassil N., Finn C. SSR fingerprinting of black raspberry cultivars shows discrepancies in identification. *Acta Hort.* 2012a; 946:49-53. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.946.4.
- Dossett M., Bassil N.V., Lewers K.S., Finn C.E. Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012b;59:1849-1865.
- Dossett M., Bushakra J.M., Gilmore B., Koch C.A., Kempler C., Finn C.E., Bassil N.V. Development and transferability of black and red raspberry microsatellite markers from short-read sequences. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2015;140(3):243-252.
- Ercisli S., Badjakov I., Kondakova V., Atanassov A., Todorovska E. AFLP-based genetic relationships in wild and cultivated raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.). *Biotechnol. Equip.* 2008; 22(4):907-910.
- Eu G., Chung B., Bandopadhyay R., Yoo N.-H., Choi D., Yun S. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Crop Sci. Biotech.* 2008;11(1):39-44.
- Eu G., Park M., Baek S.H., Yun S. Phylogenetic relationship of *Rubus* cultivated in Korea revealed by chloroplast DNA spacers. *Korean J. Med. Crop Sci.* 2010;18(4):266-272.
- Fazekas A.J., Burgess K.S., Kenasakurti P.R., Graham S.W., Newmaster S.G., Husband B.C., Percy D.M., Hajibabaei M., Barrett S.C.H. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One.* 2008;3(7):e2802. DOI 10.1371/journal.pone.0002802.
- Fernandez G.E., Molina-Bravo R., Takeda F. What we know about heat stress in *Rubus*. In: Graham J., Brennan R. (Eds.). *Raspberry: Breeding, Challenges and Advances*. Springer, 2018;29-40.
- Fernández-Fernández F., Antanaviciute L., Govan C.L., Sargent D.J. Development of a multiplexed microsatellite set for fingerprinting red raspberry (*Rubus idaeus*) germplasm and its transferability to other *Rubus* species. *J. Berry Res.* 2011;1(4):177-187.
- Finn C.E. Blackberries. In: Hancock J.F. (Ed.) *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*. Springer, 2008;83-114.
- Focke W.O. Species Ruborum. *Monographiae generis Rubi prodromus. Biblioth. Bot.* 1910;17(72):1-120.
- Focke W.O. Species Ruborum. *Monographiae generis Rubi prodromus. Biblioth. Bot.* 1911;17(72):121-223.
- Focke W.O. Species Ruborum. *Monographiae generis Rubi prodromus. Biblioth. Bot.* 1914;17(83):1-274.
- Girichev G., Hanke M.V., Peil A., Flachowsky H. SSR fingerprinting of a German *Rubus* collection and pedigree based evaluation on trueness-to-type. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2015;64:89-103. DOI 10.1007/s10722-015-0345-0.
- Gotame T.P., Cullen D.W., Graham J., Hedley P.E., Smith K., Morris J., Andersen L., Petersen K.K. Effect of short-term exposure to high-temperature on total gene expression in the leaves of four raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 2014; 89(5):532-541. DOI 10.1080/14620316.2014.11513117.
- Graham J., Gordon S.C., Williamson B. Progress towards the use of transgenic plants as an aid to control soft fruit pests and diseases. In: *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference – Pests & Diseases*. Brighton, UK, 1996;3:777-781.
- Graham J., Hackett C.A., Smith K., Woodhead M., MacKenzie K., Tierney I., Cooke D., Bayer M., Jennings N. Towards an understanding of the nature of resistance to *Phytophthora* root rot in red raspberry. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:585-601. DOI 10.1007/s00122-011-1609-5.
- Graham J., McNicol R.J., Greig K., Van De Ven W.T.G. Identification of red raspberry cultivars and an assessment of their relatedness using fingerprints produced by random primers. *J. Hort. Sci.* 1994;69:123-130.
- Graham J., Smith K., MacKenzie K., Jorgensen L., Hackett C.A., Powell W. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:740-749.

- Graham J., Smith K., McCallum S., Hedley P., Cullen D., Dolan A., Milne L., McNicol J., Hackett C. Towards an understanding of crumbly fruit in red raspberry. SpringerPlus. 2015;4:223. DOI 10.1186/s40064-015-1010-y.
- Graham J., Smith K., Tierney I., MacKenzie K., Hackett C. Mapping gene *H* controlling cane pubescence in raspberry and its association with resistance to cane botrytis and spur blight, rust and cane spot. Theor. Appl. Genet. 2006;112:818-831.
- Graham J., Smith K., Woodhead M., Russell J.R. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. Mol. Ecol. Notes. 2002;2:250-252.
- Graham J., Squire B., Marshall B., Harrison R.E. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *R. idaeus* detected using RAPD markers. Mol. Ecol. 1997;6:1001-1008.
- Graham J., Woodhead M., Smith K., Russell J., Marshall B., Ramsay G., Squire G. New insight into wild red raspberry populations using simple sequence repeat markers. J. Am. Soc. Hort. Sci. 2009; 134(1):109-119.
- Gustafsson Å. The Genesis of the European Blackberry Flora. Acta Univ. Lund. 1943;39(6):1-200.
- Hackett C.A., Milne L., Smith K., Hedley P., Morris J., Simpson C.J., Preedy K., Graham J. Enhancement of Glen Moy × Latham raspberry linkage map using GbS to further understand control of development processes leading to fruit ripening. BMC Genetics. 2018;19:59. DOI 10.1186/s12863-018-0666-z.
- Hoepfner A.S., Nybom H., Carlsson U., Franzen R. DNA fingerprinting useful for monitoring cell line identity in micropropagated raspberries. Acta Agric. Scand. Sect. B. Soil Plant Sci. 1993;43:53-57.
- Ipek A., Barut E., Gulen H., Ipek M. Genetic diversity among some blackberry cultivars and their relationship with Boysenberry assessed by AFLP markers. Afr. J. Biotechnol. 2009;8:4830-4834.
- Jennings D.L. Raspberries and Blackberries: Their Breeding, Diseases and Growth. San Diego: Acad. Press Ltd, 1988.
- Jibrán R., Dzierzon H., Bassil N., Bushakra J.M., Edger P.P., Sullivan S., Finn C.E., Dossett M., Vining K.J., VanBuren R., Mockler T.C., Liachko I., Davies K.M., Foster T.M., Chagné D. Chromosome-scale scaffolding of the black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) genome based on chromatin interaction data. Hortic. Res. 2018;5:8. DOI 10.1038/s41438-017-0013-y.
- Kassim A., Poette J., Paterson A., Zait D., McCallum S., Woodhead M., Smith K., Hackett C., Graham J. Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci. Mol. Nutr. Food Res. 2009;53: 625-634.
- Keane B., Smith M.K., Rogstad S.H. Genetic variation in red raspberries (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) from sites differing in organic pollutants compared with synthetic repeat DNA probes. Environ. Toxicol. Chem. 1998;17:2027-2034. DOI 10.1002/etc.5620171019.
- Knight V.H. Review of *Rubus* species used in raspberry breeding at East Malling. Acta Hort. 1993;352:363-372. DOI 10.17660/ActaHortic.1993.352.52.
- Knight V.H., Jennings D.L., McNicol R.J. Progress in the UK raspberry breeding programme. Acta Hort. 1989;262:93-104. DOI 10.17660/ActaHortic.1989.262.12.
- Kollmann J., Steinger T., Roy B.A. Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. Am. J. Bot. 2000;87(11):1592-1598.
- Kostamo K., Toljamo A., Antonius K., Kokko H., Kärenlampi S.O. Morphological and molecular identification to secure cultivar maintenance and management of self-sterile *Rubus arcticus*. Ann. Bot. 2013;111(4):713-721. DOI 10.1093/aob/mct029.
- Kraft T., Nybom H. DNA fingerprinting and biometry can solve some taxonomic problems in apomictic blackberries (*Rubus*, subgen. *Rubus*). Watsonia. 1995;20:329-343.
- Kraft T., Nybom H., Werlemark G. DNA fingerprint variation in some blackberry species (*Rubus* subg. *Rubus*, Rosaceae). Plant Syst. Evol. 1996;199:93-108.
- Lacis G., Kota-Dombrowska I., Strautina S. Evaluation of red raspberry cultivars used for breeding and commercial growing in the Baltic region. Proc. Latvian Acad. Sci. Sect. B. 2017;71(3):203-210.
- Lamoureux D., Sorokin A., Lefevre I., Alexanian A., Eyzaguirre P., Hausmann J.F. Investigation of genetic diversity in Russian collections of raspberry and blue honeysuckle. Plant Genet. Resour. 2011; 9(2):202-205. DOI 10.1017/S1479262111000323.
- Lee G.A., Song J.Y., Choi H.R., Chung J.W., Jeon Y.A., Lee J.R., Ma K.H., Lee M.C. Novel microsatellite markers acquired from *Rubus coreanus* Miq. and cross-amplification in other *Rubus* species. Molecules. 2015;20:6432-6442. DOI 10.3390/molecules20046432.
- Lee K.J., Lee G.A., Kang H.K., Lee J.R., Raveendar S., Shin M.J., Cho Y.H., Ma K.H. Genetic diversity and population structure of *Rubus* accessions using simple sequence repeat markers. Plant Breed. Biotech. 2016;4(3):345-351. DOI 10.9787/PBB.2016.4.3.345.
- Lewers K., Saski C., Cuthbertson B., Henry D., Staton M., Main D., Dhanaraj A., Rowland L., Tomkins J. A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. BMC Plant Biol. 2008;8:69. DOI 10.1186/1471-2229-8-69.
- Liang Y., Lenz R.R., Dai W. Development of retrotransposon-based molecular markers and their application in genetic mapping in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). Mol. Breed. 2016;36:109. DOI 10.1007/s11032-016-0535-2.
- Lopes M., Maciel G., Mendonca D., Gil F., Da Camara A. Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *R. hochstetterorum* and their use in other species from the Rosaceae family. Mol. Ecol. Notes. 2006;6:750-752. DOI 1111/j.1471-8286.2006.01329.x.
- López A., Barrera C., Marulanda M. Evaluation of SSR and SNP markers in *R. glaucus* Benth progenitors' selection. Rev. Bras. Frutic. 2019;41(1):1-14. DOI 10.1590/0100-29452019081.
- Marieschi M., Torelli A., Poli F., Bianchi A., Bruni R. Quality control of commercial Mediterranean oregano: development of SCAR markers for the detection of the adulterants *Cistus incanus* L., *Rubus caesius* L. and *Rhus coriaria* L. Food Control. 2010;21:998-1003.
- Marulanda M., Lopez A., Aguilar S. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 2007;7:242-252.
- Mazzitelli L., Hancock R., Haupt S., Walker P., Pont S., McNicol J., Cardle L., Morris J., Viola R., Brennan R., Hedley P., Taylor M.A. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*R. idaeus* L.) buds. J. Exp. Bot. 2006;58(5):1035-1045.
- Meng R., Finn C. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. J. Am. Soc. Hort. Sci. 2002;127(5):767-775. DOI 10.21273/JASHS.127.5.767.
- Miyashita T., Kunitake H., Yotsukura N., Hoshino Y. Assessment of genetic relationships among cultivated and wild *Rubus* accessions using AFLP-markers. Sci. Hortic. 2015;193:165-173.
- Molina-Bravo R., Fernandez G.E., Sosinski B.R. Quantitative trait locus analysis of tolerance to temperature fluctuations in winter, fruit characteristics, flower color, and prickly-free canes in raspberry. Mol. Breed. 2014;33:267-280.
- Moore P.P. Chloroplast DNA diversity in raspberry. J. Am. Soc. Hort. Sci. 1993;118:371-376.
- Nybom H. Biometry and DNA fingerprinting detect limited genetic differentiation among populations of the apomictic blackberry *Rubus nessensis* (Rosaceae). Nordic J. Bot. 1998;18:323-333. DOI 10.1111/j.1756-1051.1998.tb01884.x.
- Nybom H., Hall H.K. Minisatellite DNA 'fingerprints' can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. Euphytica. 1991;53:107-114.
- Nybom H., Rogstad S.H., Schaal B.A. Genetic variation detected by use of the M13 'DNA fingerprint' probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). Theor. Appl. Genet. 1990;79:153-156.
- Ochieng J.A., Oyoo M.E., Gesimba R.M., Korir P.C., Ojwang P.P.O., Owuochi J.O. Genetic diversity of blackberry (*Rubus* subgenus *Rubus* Watson) in selected counties in Kenya using simple sequence

- repeats (SSRs) markers. *Afr. J. Biotechnol.* 2018;17(39):1247-1264. DOI 10.5897/AJB2018.16613.
- Oydivin J. Important Breeding Lines and Cultivars in Raspberry Breeding (in Norwegian). St. Forsokag. Njos, 1970.
- Parent J.G., Pagé D. Identification of raspberry cultivars by non-radioactive DNA fingerprinting. *HortScience.* 1992;27:1108-1110.
- Parent J.G., Pagé D. Identification of raspberry cultivars by sequence characterized amplified region DNA analysis. *HortScience.* 1998; 33:140-142.
- Raluca R.A., Pamfil D., Graham J. Mapping resistance of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) to viral diseases – leaf spot (RLSV) and vein chlorosis (RVCV) on the genetic linkage map. *USAMV-CN.* 2006;63:318-319.
- Robertson K.R. The genera Rosaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arboretum.* 1974;55:352-360.
- Ryu J., Kim W.J., Im J., Kim S.H., Lee K.S., Jo H.J., Kim E.Y., Kang S.Y., Lee J.H., Ha B.H. Genotyping-by-sequencing based single nucleotide polymorphisms enabled Kompetitive Allele Specific PCR marker development in mutant *Rubus* genotypes. *Electron. J. Biotechnol.* 2018;35:57-62. DOI 10.1016/j.ejbt.2018.08.001.
- Sadhe A.A., Kumar K. DNA barcoding of plants: selection of core markers for taxonomic groups. *Plant Sci. Today.* 2018;5(1):9-13.
- Sargent D.J., Fernandez-Fernandez F., Rys A., Knight V.H., Simpson D.W., Tobutt K.R. Mapping of *A₁* conferring resistance to *Amphiphora idaei* and *dw* (dwarfing habit) in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) using AFLP and microsatellite markers. *BMC Plant Biol.* 2007;7:15.
- Simlat M., Ptak A., Kula A., Orzel A. Assessment of genetic variability among raspberry accessions using molecular markers. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 2018;17(5):61-72. DOI 10.24326/asphe.2018.5.6.
- Simpson C.G., Cullen D.W., Hackett C.A., Smith K., Hallett P.D., McNicol J., Woodhead M. Mapping and expression of genes associated with raspberry fruit ripening and softening. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130(3):557-572.
- Stafne E., Clark J., Pelto M., Lindstrom J. Discrimination of *Rubus* cultivars using RAPD markers and pedigree analysis. *Acta Hort.* 2003;626:119-124. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.626.16.
- Strik B.C., Finn C.E. Blackberry production systems – a worldwide perspective. *Acta Hort.* 2012;946:341-347. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.946.56.
- Ukhatova Y.V., Dunaeva S.E., Antonova O.Y., Apalikova O.V., Pozdniakova K.S., Novikova L.Y., Shuvalova L.E., Gavrilenko T.A. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR *in vitro* collection using a modified droplet vitrification method. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2017;53:394-401. DOI 10.1007/s11627-017-9860-3.
- Umar G., Vasanthaiah H., Kambiranda D., Basha S., Phills B., Hunter W. Assessment of genetic diversity among selected raspberry cultivars. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 2010;123:26-28.
- VanBuren R., Bryant D., Bushakra J.M., Vining K.J., Edger P.P., Rowley E.R., Priest H.D., Michael T.P., Lyons E., Filichkin S.A., Dossett M., Finn C.E., Bassil N.V., Mockler T.C. The genome of black raspberry (*Rubus occidentalis*). *Plant J.* 2016;87:535-547.
- VanBuren R., Bryant D., Bushakra J.M., Vining K.J., Filichkin S., Edger P.P., Rowley E.R., Priest H.D., Michael T.P., Dossett M., Finn C.E., Bassil N.V., Mockler T.C. Sequence and analysis of the black raspberry (*Rubus occidentalis*) genome. In: Hytönen T., Graham J., Harrison R. (Eds.). *The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives.* Springer, 2018:185-197.
- Wang Y., Chen Q., Chen T., Tang H., Liu L., Wang X. Phylogenetic insights into Chinese *Rubus* (Rosaceae) from multiple chloroplast and nuclear DNAs. *Front. Plant Sci.* 2016;7:968. DOI 10.3389/fpls.2016.00968.
- Ward J.A., Bhangoo J., Fernandez-Fernandez F., Moore P., Swanson J.D., Viola R., Velasco R., Bassil N., Weber C.A., Sargent D.J. Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC Genomics.* 2013;14:2.
- Ward J.A., Boone W.E., Moore P.P., Weber C.A. Developing molecular markers for marker assisted selection for resistance to *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) in red raspberry. *Acta Hort.* 2012;946:61-66. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.946.6.
- Waugh R., Van de Ven W.T.G., Phillips M.S., Powell W. Chloroplast diversity in the genus *Rubus* revealed by Southern hybridization. *Plant Syst. Evol.* 1990;172:65-75.
- Weber C.A. Genetic diversity in black raspberry detected by RAPD markers. *HortScience.* 2003;38(2):269-272.
- Weber C.A., Pattison J., Samuelian S. Marker assisted selection for resistance to root rot in red raspberry caused by *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. *Acta Hort.* 2008;777:311-316. DOI 10.17660/ActaHortic.2008.777.46.
- Werlemark G., Nybom H. Pollen donor impact on progenies of pseudogamous blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*). *Euphytica.* 2003; 133:71-80.
- Wight H., Zhou J., Li M., Hannehalli S., Mount S., Liu Z. Draft genome assembly and annotation of red raspberry *Rubus idaeus*. *bioRxiv.* 2019. DOI 10.1101/546135.
- Woodhead M., Smith K., McCallum S., Cardle L., Mazzitelli M., Graham J. Identification, characterisation and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. *Mol. Breed.* 2008;22:555-563.
- Woodhead M., Weir A., Smith K., McCallum S., MacKenzie K., Graham J. Functional markers for red raspberry. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2010;135(5):418-427.
- Woodhead M., Williamson S., Smith K., McCallum S., Jennings N., Hackett C., Graham J. Identification of quantitative trait loci for cane splitting in red raspberry (*Rubus idaeus*). *Mol. Breed.* 2013;31:111-122.
- Zurn J.D., Carter K.A., Yin M.H., Worthington M., Clark J.R., Finn C.E., Bassil N. Validating blackberry seedling pedigrees and developing an improved multiplexed microsatellite fingerprinting set. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2018;143(5):381-390.

ORCID ID

A.M. Kamnev orcid.org/0000-0001-8103-2191
O.Yu. Antonova orcid.org/0000-0001-8334-8069
S.E. Dunaeva orcid.org/0000-0001-7002-8066
T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569
I.G. Chukhina orcid.org/0000-0003-3587-6064

Благодарности. Работа выполнена в рамках тематического плана 0481-2019-0002.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.07.2019. После доработки 18.08.2019. Принята к публикации 26.08.2019.

Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского

Е.В. Козарь , Е.А. Домблидес , А.В. Солдатенко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства», пос. ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область, Россия
 e-mail: koz.leno4ek@gmail.com; edomblides@mail.ru

Аннотация. В последние годы резко повысилась потребность рынка в увеличении производства сортов и гибридов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) для открытого и закрытого грунта, разнообразных по группам спелости, форме и окраске корнеплода. Поэтому важно расширять генетическое разнообразие и ускорять селекционный процесс. Технология получения удвоенных гаплоидов существенно сокращает время при создании гомозиготных константных родительских линий, для получения которых наиболее перспективен метод культуры микроспор *in vitro*. Нам впервые удалось осуществить полный цикл получения ДН-растений редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*, до включения материала в селекционный процесс. Подобраны: оптимальный размер бутонов, параметры теплового шока, среды для индукции и регенерации. Выявлено, что линейная длина бутонов с оптимальной стадией развития микроспор генотип-специфична. Так, для сортообразца Родос оптимальным является показатель 2.8–3.3 мм, а для сортообразца Тепличный Грибовский – 3.7–4.2 мм. Для большинства генотипов оптимален температурный шок 32 °С в течение 48 ч. Впервые для индукции эмбриогенеза использована модифицированная среда Мурасиге–Скуга и обнаружено существенное влияние взаимодействия факторов «генотип × среда» на индукцию эмбриогенеза. Для этапа регенерации растений из эмбриоидов рекомендуется добавление к среде 1 мг/л бензиламинопурина и 0.1 мг/л гиббереллиновой кислоты, укоренение микропобегов проводится на безгормональной среде. Анализ полученных растений-регенерантов методом подсчета хромосом и методом проточной цитометрии клеточных ядер показал, что 69 % растений имели диплоидный набор хромосом, 9 % – гаплоидный, 22 % – миксоплоидный и анеуплоидный. Семенное потомство удалось получить самоопылением из удвоенных гаплоидов и миксоплоидов, причем все растения R1 имели удвоенный набор хромосом. Это исследование является начальным этапом в разработке эффективной методики получения удвоенных гаплоидов редиса для применения в селекционном процессе. Ключевые слова: ДН-растения; *Raphanus sativus*; культура микроспор *in vitro*; факторы эмбриогенеза; регенерация в культуре *in vitro*; температурная обработка; андрогенез.

Для цитирования: Козарь Е.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В. Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592

Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish

E.V. Kozar , E.A. Domblides , A.V. Soldatenko

FSBSI "Federal Scientific Vegetable Center", VNIISOK, Odintsovo region, Moscow oblast, Russia
 e-mail: koz.leno4ek@gmail.com; edomblides@mail.ru

Abstract. Over the recent years the market demand for scaling up the production of European radish (*Raphanus sativus* L.) varieties and hybrids for open and protected production, varying in ripeness group, root shape and color, has drastically increased. Therefore, the expansion of genetic diversity and acceleration of the selection process are important. Doubled haploid technology considerably curtails the time required for creation of homozygous constant parental cell lines when *in vitro* microspore culture is used as the most promising method. For the first time, we were able to realize the full production cycle of DH plants of European radish by *in vitro* microspore culture up to inclusion of the produced material into the selection process. We have selected: preferable flower bud size, heat shock parameters, induction and regeneration media. It was revealed that the linear length on the flower buds with the best possible stage of microspore development is genotype-specific: the flower bud length 2.8–3.3 mm is optimal for accessions of Rhodes and 3.7–4.2 mm is optimal for accessions of Teplichny Gribovsky. Heat shock at 32 °C for 48 hours is the most suitable for most genotypes. For the first time Murashige and Skoog based culture medium has been used for embryogenesis induction, and a major dependence of embryogenesis induction on the genotype × medium interaction was found. At regeneration and tiller stage it is advisable to add 1 mg/mL of benzylaminopurine and 0.1 mg/L of gibberellic acid to the medium, and rotting of micro-sprouts is performed with the use of hormone-free medium. Analysis of the produced regenerant plants by chromosome count and cell nucleus flow cytometry showed that 69 % of plants have a diploid chromosome set, 9 % have a haploid chromosome set, and 22 % have mixoploids and aneu-

ploids chromosome sets. The seed progeny from doubled haploids and mixoploids were obtained by self-pollination, where all R1 plants had a doubled set of chromosomes. This study launches the development of an efficient method of radish doubled haploid production to be used in the selection process.

Key words: DH plants; *Raphanus sativus*; *in vitro* microspore culture; embryogenesis factors; regeneration from *in vitro* culture; heat treatment; androgenesis.

For citation: Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592

Введение

В современной селекции сельскохозяйственных культур приоритетным является создание гибридов F1, отличающихся от сортов высокой урожайностью, выравненностью растений по срокам созревания и качеству продуктивных органов. Наиболее сложное, трудоемкое и продолжительное звено в этом процессе – выведение константных родительских линий, на создание которых уходит от 6 до 12 лет при использовании традиционных методов селекции. В большинстве развитых стран в настоящее время для ускорения селекции широко используются ДН-технологии (Dunwell, 2010), что позволяет ускорить селекционный процесс по меньшей мере на три-четыре года (Ferrie, Möllers, 2011).

Основные методы получения гаплоидов и классификация методов рассмотрены в ряде обзоров (Maluszynski et al., 2003; Dunwell, 2010; Asif, 2013). Гаплоидные технологии расширяют спектр формообразовательного процесса, облегчают отбор полезных генов, способствуют обнаружению редких рецессивных аллелей, помогают создать уникальные формы и, таким образом, повышают эффективность практической селекции (Forster, Thomas, 2005). В крупнейших иностранных селекционных компаниях (Syngenta, Bayer и др.) производство удвоенных гаплоидов некоторых видов растений уже стало рутинным, необходимым этапом селекции; в России также достигнуты успехи в этой области по ряду зерновых (Игнатова, 2011) и овощных культур (Вюртц и др., 2017; Пивоваров и др., 2017). В ФГБНУ ФНЦО (ранее ВНИИССОК), отмечающем в 2020 г. столетний юбилей, с использованием удвоенных гаплоидов созданы гибриды основных овощных культур: капусты белокочанной, брокколи, перца сладкого, тыквы крупноплодной и др. (Domblides et al., 2017).

Удвоенные гаплоиды можно получить на основе андрогенеза (культура пыльников или культура микроспор), гиногенеза (культура неоплодотворенных семязпочек) и партеногенеза (опыление облученной/обработанной химическими веществами пыльцой или пыльцой отдаленных видов). Успех этих технологий определяется двумя процессами: индукцией эмбриогенеза из микроспор/гаплоидных клеток зародышевого мешка и регенерацией растений из эмбриоидов. На указанные процессы влияет множество факторов: условия выращивания донорных растений, генотип, стадия развития микроспор/клеток зародышевого мешка, предобработка бутонов и микроспор, питательные среды и условия культивирования (Ferrie, Caswell, 2011), в силу чего невозможно разработать универсальную методику для всех культур. Ее необходимо оптимизировать индивидуально для каждого вида и даже сорта. Клеточные технологии активно развиваются, тем

не менее в литературе представлено ограниченное число эффективных протоколов получения удвоенных гаплоидов овощных культур семейства Brassicaceae Burnett, часть из которых защищена патентами. Основная проблема – низкий выход ДН-растений, поэтому повышение эффективности методик очень важно и данному вопросу уделяют внимание во всем мире.

Ведущее место в селекционных программах по ускорению процесса создания высокопродуктивных гибридов и сортов сельскохозяйственных растений занимает культура микроспор *in vitro* (андрогенез). Изолированные микроспоры при определенных условиях (оптимальная комбинация условий культуры и стрессового воздействия) могут быть переведены с нормального гаметофитного пути развития на спорофитный, вследствие чего образуются эмбриоиды, переходящие в гаплоиды (Hs), удвоенные гаплоиды (ДН-растения), миксоплоиды и анеуплоиды. Отсутствие в культуре микроспор соматических тканей позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений (Домблидес и др., 2016).

Первые успешные исследования по культуре микроспор в семействе Brassicaceae проведены в начале 1980-х гг. (Lichter, 1982). Позднее был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой ДН-технологии для представителей рода *Brassica* L. (Pechan, Keller, 1988). Затем культуру микроспор стали применять для различных разновидностей капусты: капусты цветной (*B. oleracea* var. *botrytis*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), полу- и рыхлокочанной капусты (*B. oleracea* var. *costata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongyloides*), капусты декоративной (*B. oleracea* var. *acephala*) и белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata*), а также китайской (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Lichter, 1989; Cao et al., 1990; Takahata, Keller, 1991; Duijs et al., 1992; Zhang et al., 2008; Winarto, Teixeira da Silva, 2011; Yuan et al., 2012). Опубликованные протоколы для семейства Brassicaceae приведены в обзоре (Maluszynski et al., 2003). К сожалению, описанные в литературе экспериментальные подходы не всегда можно воспроизвести и отсутствие стандартных методик часто приводит к противоречивым результатам.

Редис европейский (*Raphanus sativus* L.) – корнеплодное растение семейства Капустные, одна из самых скороспелых и экономически значимых овощных культур. Эффективной методики получения удвоенных гаплоидов для редиса пока нет. Лишь в некоторых публикациях говорится о применении метода культуры микроспор *in vitro* для редиса (Takahata et al., 1996; Chun et al., 2011; Han et al., 2014, 2018; Tuncer, 2017). Тем не менее ни в одном из исследований не был завершен полный цикл получения ДН-растений в культуре микроспор редиса европейского.

Четких представлений об причинах трудности получения удвоенных гаплоидов редиса сейчас нет, и выявить их возможно только эмпирически.

Цель наших исследований – разработать технологию получения ДН-растений редиса европейского для включения полученного линейного материала в селекционный процесс с изучением и подробным описанием проблем на каждом этапе.

Материалы и методы

Материал исследования и условия выращивания донорных растений. В работе использованы 12 сортов образцов редиса европейского из коллекции лаборатории столовых корнеплодов ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФНЦО), Московская область:

Название сортаобразца	Происхождение
Марта	Nasco, Украина
Родос	Замен Маузер Кведлинбург, Германия
Тепличный Грибовский	ВНИИССОК, Россия
Корсар	«Гавриш», Россия
С/о 162 длинный розовый с белым кончиком	Япония
С/о 162 округлый красный	»
Stunchy red	»
Французский завтрак	«Аэлита», Россия
Ария	ВНИИССОК, Россия
Моховский	»
Розово-красный с белым кончиком (РБК)	»
Соната	»

Донорные растения выращивали в вегетационной камере с лампами досвечивания (Osram plantstar 600 W) при постоянном температурном режиме 19 °С, освещенности 9000 люкс и 16-часовом фотопериоде для стимуляции цветения.

Исследование стадий развития микроспор. Для изучения взаимосвязи между размером бутона и стадией развития микроспор проводили цитологические исследования. Визуализация микроспор и пыльцы выполнена с помощью методики дифференциального окрашивания (Alexander, 1969) и микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия).

Индукция эмбриогенеза в культуре микроспор. За основу была взята методика, разработанная в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО для культуры микроспор семейства Brassicaceae (Домблидес и др., 2016) с различными вариантами сред: NLN-13 (Lichter, 1982) и Мурасиге–Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с 13 % сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина для индукции эмбриогенеза. В опытах использовали реактивы компании SIGMA с маркировкой “plant cell culture tested”.

Температурная обработка проходила сразу после введения микроспор в культуру *in vitro* в термостате при 32 °С в течение одних-четырех суток. При этом использовались оптимальные среды для индукции эмбриогенеза, определенные в предыдущем опыте по индукции эмбриогенеза в культуре микроспор. Исследование оптимальной температурной обработки с варьированием по продолжитель-

ности температурного стресса проводилось для каждого индивидуального образца в пяти повторностях.

Получение растений-регенерантов. Эмбриониды на стадиях крупных глобул, а также сердечковидной и торпедовидной помещали в чашки Петри на безгормональную среду Мурасиге–Скуга (МС). Для прорастания эмбриониды переносили на среды: 1) МС с 2 % сахарозы, 0.1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 3.0 г/л фитогеля (Sigma, США); 2) МС с 2 % сахарозы, 1 мг/л БАП, 0.1 мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК), 3.0 г/л фитогеля; 3) МС с 2 % сахарозы, 0.2 мг/л тиадизурона (N-фенил-N'-(1,2,3-тиадиазол-5-ил)мочевина) (ТДЗ). Образовавшиеся побеги и эмбриониды отделяли и переносили для укоренения на безгормональную среду МС с 2 % сахарозы и 3.0 г/л фитогеля, pH 5.8. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами, с фотопериодом 14 ч, освещенностью 2500 люкс, постоянной температурой 25 °С.

Выращивание растений-регенерантов. Растения с нормально развитыми листьями и корневой системой переносили в вегетационные сосуды, заполненные смесью торфа и перлита (7:3), накрывали перфорированными пластиковыми стаканчиками для адаптации растений к условиям *in vivo*. Выращивали растения-регенеранты в тех же условиях климкамеры, что и донорные растения.

Определение плоидности растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер выполняли на базе лаборатории биоинженерии Алтайского государственного университета (Барнаул) при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH, Германия) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм.

Статистический анализ осуществлен в программе ANOVA: one way ANOVA, factorial ANOVA и тест Фишера.

Результаты и обсуждение

Определение зависимости стадии развития микроспор и выхода эмбрионидов от размера бутонов

Исследования показали, что структура популяции микроспор в пыльниках бутонов редиса европейского очень неоднородна и представлена фракциями микроспор на разных стадиях развития. Это согласуется с данными других авторов (Takahata et al., 1996; Bhatia et al., 2018).

Считается, что микроспоры наиболее восприимчивы к внешним факторам и способны изменять путь развития на поздней вакуолизированной одноклеточной и ранней двухклеточной стадиях (Pechan, Keller, 1988). Поэтому важно максимально увеличить концентрацию этих стадий в культуре, для чего необходимо определить линейный размер бутонов, который содержит такие стадии развития микроспор и пыльцы в наибольшей концентрации. Нами проанализировано процентное содержание (доля) микроспор на восприимчивой стадии развития в бутонах разных размеров (от 2.5 до 6.0 мм) у четырех генотипов редиса, проявивших отзывчивость к эмбриогенезу (табл. 1).

Выявлено, что количество восприимчивых микроспор в бутонах редиса редко достигает 50 %. Для сравнения, в бутонах отзывчивых культур, например у *B. oleracea* var. *capitata* L., этот показатель достигает 80 % (Bhatia et

Таблица 1. Содержание микроспор (%) на поздней одноклеточной вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития в зависимости от длины бутона редиса европейского

Генотип	Длина бутона, мм						
	2.5–3.0	3.0–3.5	3.5–4.0	4.0–4.5	4.5–5.0	5.0–5.5	5.5–6.0
Родос	38.2±5.6 ^{cd}	43.7±4.8 ^d	25.1±3.2 ^c	17.3±2.1 ^b	15.8±3.4 ^b	12.6±4.2 ^a	10.4±5.1 ^a
Тепличный Грибовский	29.8±2.3 ^b	38.2±5.1 ^c	46.8±4.0 ^d	40.5±2.7 ^c	27.2±3.5 ^b	21.4±6.2 ^{ab}	18.5±3.9 ^a
Моховский	28.1±4.2 ^b	51.2±2.4 ^c	30.3±3.7 ^b	25.2±3.5 ^b	19.9±2.7 ^a	18.7±1.9 ^a	18.9±3.2 ^a
РБК	29.1±3.3 ^c	44.2±2.9 ^d	43.7±3.1 ^d	28.6±4.6 ^c	20.1±3.8 ^{ab}	17.6±4.1 ^a	16.8±3.7 ^a

Примечание. Значения с одинаковыми буквами существенно не различаются при $p < 0.05$.

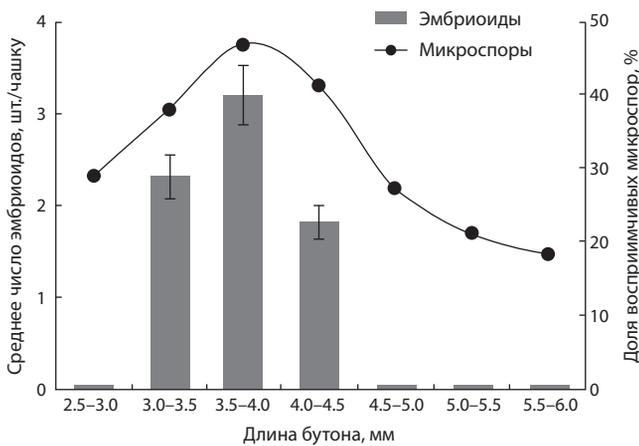


Рис. 1. Зависимость образования эмбриоидов от размера бутона и процентного содержания микроспор на восприимчивой стадии развития сортообразца редиса европейского Тепличный Грибовский (среднее значение и варьирование по повторностям).

al., 2018). При этом оптимальные размеры бутонов, с точки зрения отзывчивости микроспор к индукции эмбриогенеза в культуре *in vitro*, существенно различаются у разных генотипов редиса.

Чтобы выявить значимость качественного состава изолированных микроспор для индукции эмбриогенеза, мы провели оценку выхода эмбриоидов в культуре микроспор *in vitro*, изолируя микроспоры из бутонов различных размеров на примере сортообразца Тепличный Грибовский (рис. 1). Опыт был заложен в пятикратной повторности: отбирали бутоны размером от 2.5 до 6 мм с шагом 0.5 мм, затем микроспоры инкубировали на стандартной среде NLN-13 (Lichter, 1982) с 13 % сахарозы, pH 5.8.

В результате выполненного опыта подтверждено, что при размерах бутонов, в которых содержится наибольшее количество микроспор на восприимчивой стадии (44–51 % в зависимости от генотипа), выход эмбриоидов максимален. При уменьшении содержания восприимчивых микроспор на 6–8 % наблюдается резкое снижение выхода эмбриоидов, а при снижении этого показателя ниже 30 % образования эмбриоидов не происходит, независимо от размера бутонов.

Аналогичные результаты получены и в случае других сортообразцов редиса. Для каждого изученного генотипа редиса европейского был подобран наиболее оптималь-

ный размер бутонов для индукции эмбриогенеза в культуре *in vitro*.

Влияние состава питательной среды и длительности термообработки на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор редиса

Переход на спорофитный путь развития не происходит самопроизвольно, поэтому необходимо создать оптимальные условия, среди которых наибольшее значение имеют: температурная обработка, условия культивирования и состав питательных сред для индукции эмбриогенеза. В наших опытах подбор питательных сред проводился на основе литературных данных. Так, для индукции эмбриогенеза растений семейства Brassicaceae обычно используют среды NLN-13 (Lichter, 1982; Chun et al., 2011; Han et al., 2014) или 1/2 NLN-13 (Takahata et al., 1996; Tuncer, 2017; Han et al., 2018), в состав которых входят аминокислоты глутамин и серин, оказывающие положительное влияние на эмбриогенез. Известно также, что большую роль в стимуляции соматического эмбриогенеза в суспензионной культуре играет гидролизат казеина, который представляет собой смесь различных аминокислот и используется в питательных средах у моркови столовой (Masuda et al., 1981; Вюртц и др., 2017). Ввиду этого мы решили впервые применить среду МС с добавлением гидролизата казеина в культуре микроспор *in vitro* для редиса.

В наших экспериментах ни у одного из изученных генотипов при использовании среды 1/2 нормы макроэлементов NLN-13 эмбриоидов не образовалось, поэтому в последующих экспериментах данная среда не применялась. При инкубировании микроспор редиса на стандартной среде NLN-13 и МС с гидролизатом казеина процесс эмбриогенеза удалось индуцировать у четырех сортообразцов из двенадцати (табл. 2).

Применение сред NLN-13 и МС с гидролизатом казеина показало четко выраженную генотип-специфическую отзывчивость индукции эмбриогенеза у культуры редиса на состав среды, которая в основном определялась взаимодействием двух факторов «генотип × среда» с долей влияния в данном опыте более 50 % (рис. 2).

Так, у сортообразца Родос получить эмбриоиды на стандартной среде NLN-13 не удалось, а на среде МС с гидролизатом казеина их выход достиг шести эмбриоидов на чашку Петри. Для сортообразца Тепличный Грибовский эта среда тоже оказалась более подходящей: максимальный выход – восемь эмбриоидов на чашку Петри.

Таблица 2. Влияние состава питательных сред на эмбриогенез (выход эмбрионов) в культуре микроспор у разных генотипов редиса европейского

Генотип (сортообразец)	NLN-13		МС + 500 мг/л гидролизата казеина	
	Количество эмбрионов, шт./1 чашку Петри			
	среднее	максимальное	среднее	максимальное
Родос	0	0	3.8 ± 0.6	6
Тепличный Грибовский	2.4 ± 0.5	4	4.6 ± 1.0	8
Моховский	1.8 ± 0.4	3	1.0 ± 0.3	2
РБК	4.4 ± 1.0	8	0	0

Примечание. Достоверность отличий: фактор А (сорт) – $F_{\text{факт}} 4.2 > F_{\text{теор}} 2.9$; фактор В (среда) – $F_{\text{факт}} 0.2 < F_{\text{теор}} 4.1$; взаимодействие А × В – $F_{\text{факт}} 17.1 > F_{\text{теор}} 2.9$.

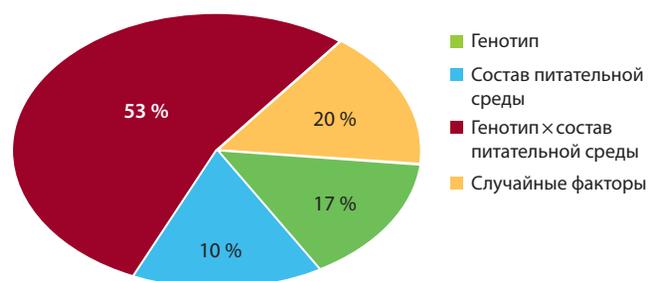


Рис. 2. Влияние факторов «генотип», «состав питательной среды» и их взаимодействия на процесс индукции эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*.

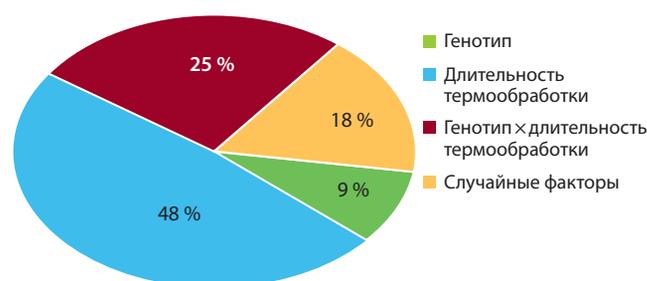


Рис. 4. Влияние факторов «генотип», «длительность термообработки» и их взаимодействия на процесс индукции эмбриогенеза редиса европейского в культуре микроспор *in vitro*.

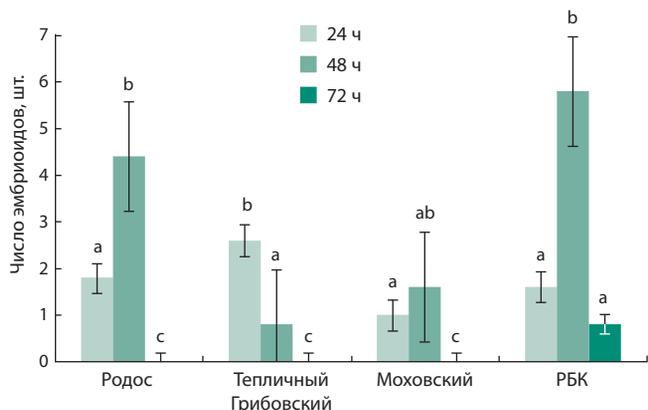


Рис. 3. Влияние длительности термообработки изолированных микроспор в термостате при 32 °С на образование эмбрионов в культуре микроспор у разных генотипов редиса европейского.

Достоверность отличий: фактор А (сорт) – $F_{\text{факт}} 11.1 > F_{\text{теор}} 2.7$; фактор В (длительность термообработки) – $F_{\text{факт}} 58.9 > F_{\text{теор}} 2.8$; взаимодействие А × В – $F_{\text{факт}} 9.8 > F_{\text{теор}} 2.0$.

У сортообразцов Моховский и РБК лучшие результаты были получены на стандартной среде NLN-13: максимальный выход составил три и восемь эмбрионов на чашку Петри соответственно.

Чтобы инициировать процесс переключения микроспор с гаметофитного пути развития на спорофитный, на них оказывают стрессовое воздействие повышенной температурой. При этом изолированные микроспоры либо останавливаются в своем развитии и погибают, либо продолжают развиваться по гаметофитному пути. Темпера-

турный стресс применяется на стадии, предшествующей первому гаплоидному митозу, или во время него, что, как правило, происходит в первые восемь часов после введения микроспор в культуру, поэтому они считаются критическими. Подбирая оптимальный режим для каждого индивидуального образца, мы проанализировали влияние на эмбриогенез температурной обработки изолированных микроспор в термостате при 32 °С в течение одних-четырех суток сразу после начала культивирования (рис. 3).

Так, для сортообразцов Родос, Моховский и РБК оптимальной была термообработка продолжительностью двое суток, а для сортообразца Тепличный Грибовский – одни сутки. Инкубация эмбрионов в течение трех суток существенно замедляла скорость развития эмбрионов у сортообразца РБК и приводила к полному их отсутствию у остальных сортообразцов. При увеличении времени температурной обработки до четырех суток ни у одного генотипа образования эмбрионов не происходило.

Внутри каждого генотипа влияние эффекта длительности термообработки на выход эмбрионов было высокозначимым и составило 48 %, а сортовая специфичность была отмечена за счет взаимодействия факторов (25 %) «генотип × длительность термообработки» (рис. 4).

На примере сортообразца редиса европейского «Розово-красный с белым кончиком» (РБК) показаны наиболее наглядные результаты формирования эмбрионов внутри одного сортообразца в культуре микроспор *in vitro* в зависимости от продолжительности температурного стресса (рис. 5). В данном варианте при обработке в течение одних суток максимальный выход достигал трех эмбрионов на чашку Петри, при экспозиции двое суток

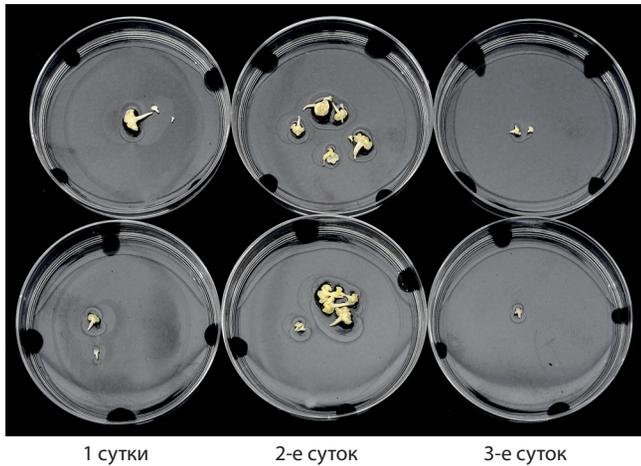


Рис. 5. Влияние длительности термообработки изолированных микроспор в термостате при 32 °С на эмбриогенез (выход эмбриоидов) в культуре микроспор у сортообразца редиса европейского РБК в среде NLN-13.

составлял до восьми хорошо развитых эмбриоидов, а в течение трех суток – до двух слаборазвитых эмбриоидов на чашку Петри.

Разработка схемы регенерации эмбриоидов, полученных в культуре микроспор *in vitro*

После этапа культивирования на индукционных жидких средах эмбриоиды переносили на твердые питательные среды для регенерации. Прямое прорастания эмбриоидов в растения-регенеранты не происходило, поэтому на начальном этапе было необходимо запустить процесс вторичного эмбриогенеза и формирования вторичных точек роста с последующим побегообразованием (Шумилина и др., 2015; Домблидес и др., 2016). Иногда вторичные эмбриоиды и точки роста образовывались на безгормональной среде, но использование различных экзогенных регуляторов роста оказывает дополнительную стимуляцию на морфогенез. В нашем эксперименте применялись следующие твердые питательные среды: МС безгормональная, МС с 1 мг/л БАП; МС с 0.2 мг/л ТДЗ; МС с 0.1 мг/л ГК и 1 мг/л БАП.

Частота образования вторичных точек роста и эмбриогенеза с последующим побегообразованием варьировала от 30 до 80 % в зависимости от генотипа и состава питательной среды. У большинства сортообразцов лучшие результаты (от 69 до 80 %) были получены на средах с совместным добавлением БАП и ГК. Исключение составил сортообразец Тепличный Грибовский, где лучший результат (до 63 %) был получен на среде с добавлением БАП (рис. 6).

Включение в состав среды тиадизурина дало отрицательный эффект, хотя в некоторых статьях описаны успешные опыты по регенерации на среде МС с добавлением 0.8 % агара, 3 % сахарозы, 0.2 мг/л ТДЗ (Бунин, Шмыкова, 2004). В нашем опыте все эмбриоиды, пересаженные на эту среду, темнели и останавливались в своем развитии в течение трех-пяти суток.

В связи с отсутствием прямого эмбриогенеза сформированным побегам и почкам требуется отдельный этап

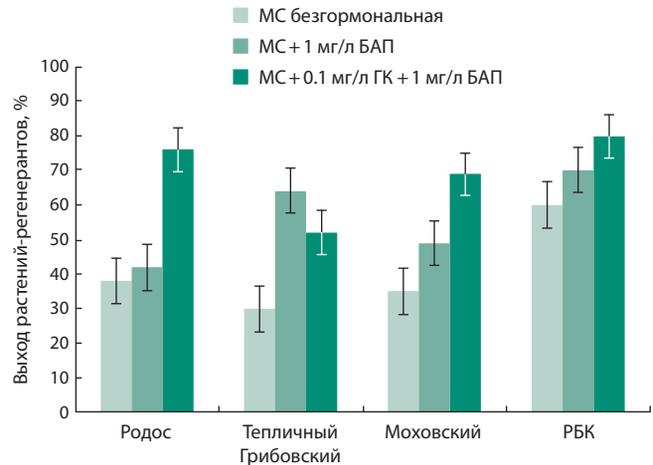


Рис. 6. Выход растений-регенерантов редиса европейского на первом этапе регенерации в зависимости от состава питательной среды и генотипа.

укоренения. Для этого сформированные почки и побеги переносили на твердую безгормональную среду МС. Образование нормально развитой корневой системы наблюдалось редко. У большинства эмбриоидов начинала утолщаться нижняя часть гипокотыля, формируя каллусные структуры с плохо развитыми корнями; такие растения плохо приживались в условиях *in vivo*.

Анализ полученных растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер показал, что 69 % растений были удвоенными гаплоидами, 9 % – гаплоидами, 22 % – миксо- и анеуплоидами. У удвоенных гаплоидов и некоторых миксоплоидов самоопылением было получено семенное потомство, в котором все растения R1 имели диплоидный набор хромосом ($2n = 2c = 18$).

Заключение

Смена пути развития микроспор зависит от множества факторов, степень влияния каждого из которых у разных культур может существенно различаться.

Для редиса европейского одним из важнейших факторов является стадия развития микроспор в бутонах. Показано, что линейный размер бутонов, содержащих максимальную концентрацию микроспор на восприимчивой к эмбриогенезу стадии развития, генотип-специфичен. Ввиду этого необходимо проводить рекогносцировочное определение оптимального размера бутонов путем изучения качественного состава микроспор в бутонах различной длины у каждого отдельного генотипа.

В культуре редиса европейского установлена также выраженная генотип-специфическая отзывчивость к эмбриогенезу и обнаружено влияние состава среды на интенсивность эмбриогенеза с высокой степенью взаимодействия этих факторов. Поэтому следует тестировать различные индукционные среды для каждого сортообразца. Так, у сортообразца РБК эмбриогенез индуцировался только на стандартной среде NLN-13 (Lichter, 1982), дополненной активированным углем, которая рекомендована для видов рода *Brassica* L. (Домблидес и др., 2016), а у сортообразца Родос – на среде МС с 13 % сахарозой и 500 мг/л гидро-

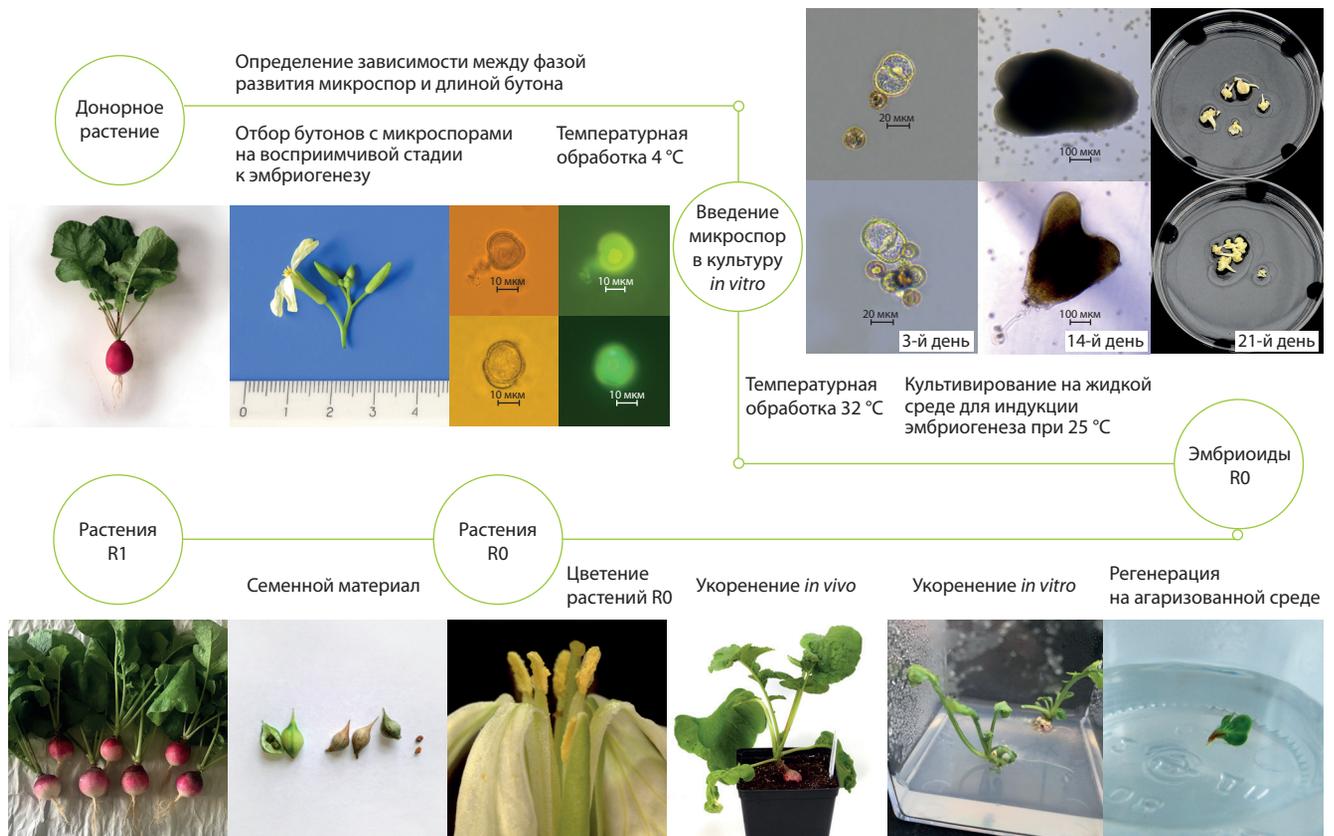


Рис. 7. Полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре микроспор *in vitro* на примере сортообразца РБК (Розово-красный с белым кончиком).

лизата казеина, используемой в корнеплодных культурах рода *Daucus* L. У других сортообразцов эмбриогенез наблюдали на обеих средах, но с различным выходом эмбрионидов: у сортообразца Тепличный Грибовский выход был выше на среде МС с гидролизатом казеина – до 8 эмбрионидов на чашку Петри (160 эмбрионидов/100 бутонов), у сортообразца Моховский самый высокий выход получен на среде NLN-13 – до 3 эмбрионидов на чашку Петри (60 эмбрионидов/100 бутонов).

Влияние продолжительности теплового шока 32 °С на индукцию эмбриогенеза также генотип-специфично. Однако при использовании оптимально подобранной среды для каждого сортообразца наблюдается общая тенденция влияния длительности термообработки. В большинстве случаев оптимален температурный шок в течение 48 ч. Инкубация микроспор более двух суток приводит к замедлению скорости развития эмбрионидов, а увеличение времени температурной обработки до четырех суток – к полному ингибированию процесса, т. е. поиск оптимума продолжительности теплового шока разных генотипов редиса можно сузить до одних-двух суток.

Несмотря на оптимизацию отдельных элементов технологии (размер бутонов, состав среды и продолжительность термообработки), выход эмбрионидов у отзывчивых генотипов редиса европейского был достаточно низким и не превысил 160 шт. на 100 бутонов. Одна из причин – неравномерное развитие микроспор в бутонах, что изначально ограничивает потенциал множественного образования

эмбрионидов ввиду низкой доли микроспор, способных к эмбриогенезу ($\leq 51.2\%$). Не переключившиеся на спорофитный путь развития микроспоры погибают, что влечет за собой образование токсинов и изменение pH среды (Chun et al., 2011; Шмыкова и др., 2015), препятствуя нормальному развитию эмбрионидов. В литературе имеются данные о добавлении в индукционную среду различных адсорбентов токсинов (Chun et al., 2011; Шмыкова и др., 2015) и буферных соединений, стабилизирующих уровень pH. Однако при использовании различных добавок возникает проблема адсорбции из среды вместе с токсинами необходимых веществ для эмбриогенеза. Поэтому требуется найти способ эффективного разделения популяции микроспор на фракции по стадиям развития еще до введения их в культуру *in vitro*.

На этапах регенерации и укоренения ДН-растений в культуре редиса европейского выявлено, что запустить и стабилизировать процессы вторичного эмбриогенеза можно с помощью регуляторов роста. Но важно учитывать, что направленность и эффективность действия некоторых из них могут существенно отличаться от результатов, ранее приведенных в литературе (Бунин, Шмыкова, 2004). Так, в наших опытах лучшие положительные результаты были получены при совместном внесении в среду МС регуляторов роста БАП и ГК, а добавление ТДЗ привело к отрицательному эффекту.

На этапе корнеобразования и укоренения были наибольшие потери растений-регенерантов. В силу биологических

особенностей развития редис очень чувствителен к повреждению точки роста главного корня. То есть помимо состава питательной среды необходимо усовершенствовать элементы техники переноса эмбриоидов на твердую питательную среду и приемы высадки растений-регенерантов в почву. Также следует отметить преимущество получения растений путем вторичного эмбриогенеза, поскольку из каждого эмбриоида можно получить несколько растений редиса, и в данном случае чаще происходит спонтанное удвоение хромосом, что позволяет уже в первом поколении провести их более полную оценку и собрать большее количество семян.

Растения-регенеранты, образованные при использовании культуры *in vitro*, были разнообразны по уровню плоидности. Большая часть растений относилась к удвоенным гаплоидам, одна пятая часть была представлена миксо- и анеуплоидами, причем некоторые миксоплоиды оказались фертильными и завязывали семена. Более того, все имбредное потомство (R1) миксоплоидных форм перешло в диплоидную форму. То есть в культуре редиса европейского миксоплоидные растения могут тоже представлять ценность и использоваться в селекционном процессе. Все семенное потомство включено в селекционный процесс, осуществляемый под руководством лаборатории корнеплодных культур (ФБНУ ФНЦО).

Таким образом, нам впервые удалось завершить полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса в культуре микроспор *in vitro* (рис. 7), выявить основные проблемы на разных этапах этой технологии и обозначить направление дальнейших исследований для разработки методики создания DH-растений с высокой эффективностью.

Список литературы / References

Бунин М.С., Шмыкова Н.А. Использование биотехнологических методов для получения исходного материала капусты. М.: Росинформагротех, 2004.
[Bunin M.S., Shmykova N.A. The Use of Biotechnological Methods to Obtain the Source Material of Cabbage. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2004. (in Russian)]

Вюртц Т.С., Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Федорова М.И., Кан Л.Ю., Домблидес А.С. Получение DH-растений в культуре микроспор моркови. Овощи России. 2017;5(38):25-30. DOI 10.18619/2072-9146-2017-5-25-30.
[Vjurtts T.S., Domblides E.A., Shmykova N.A., Fedorova M.I., Kan L.Ju., Domblides A.S. Production of DH-plants in culture of isolated microspore in carrot. Ovoshchi Rossii = Vegetables of Russia. 2017;5(38):25-30. DOI 10.18619/2072-9146-2017-5-25-30. (in Russian)]

Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Н.А., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные (методические рекомендации). М.: ВНИИССОК, 2016.
[Domblides E.A., Shmykova N.A., Shumilina N.A., Zayachkovskaya T.V., Mineykina A.I., Kozar E.V., Ahramenko V.A., Shevchenko L.L., Kan L.Ju., Bondareva L.L., Domblides A.S. A technology for obtaining doubled haploids in microspore cultures of the Brassicaceae family (guidelines). Moscow: VNISSOK Publ., 2016. (in Russian)]

Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.

[Ignatova S.A. Cell Technologies in Crop Production, Genetics and Breeding of Cultivated Plants: Tasks, Opportunities, and Development of *in vitro* Systems. Odessa: Astroprint Publ., 2011. (in Russian)]

Пивоваров В.Ф., Бондарева Л.Л., Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Минейкина А.И. Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов. С.-х. биология. 2017;52:143-151. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.143rus.
[Pivovarov V.F., Bondareva L.L., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Mineykina A.I. New generation hybrids of white cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) based on doubled haploids. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52:143-151. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.143eng.]

Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Бондарева Л.Л., Заблочкая Е.А. Совершенствование DH-технологии получения удвоенных гаплоидов капусты брокколи. Селекция и семеноводство овощных культур. 2015;46:601-608.
[Shmykova N.A., Shumilina D.V., Bondareva L.L., Zablotskaya E.A. Improvement of DH-technology of development of double haploid plants of broccoli. Seleksiya i Semenovodstvo Ovoshchnykh Kul'tur = Selection and Seed Farming of Vegetable Crops. 2015;46:601-608. (in Russian)]

Шумилина Д.В., Шмыкова Н.А., Бондарева Л.Л., Супрунова Т.П. Влияние генотипа и компонентов среды на эмбриогенез в культуре микроспор китайской капусты *Brassica rapa* ssp. *chinensis* сорта Ласточка. Изв. РАН. Сер. биол. 2015;4:368-375. DOI 10.7868/S00023291504013X.
[Shumilina D.V., Shmykova N.A., Bondareva L.L., Suprunova T.P. Effect of genotype and medium culture content on microspore-derived embryo formation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) cv. Lastochka. Biology Bulletin. 2015;42:302-309. DOI 10.1134/S1062359015040135.]

Alexander M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain Technol. 1969;44(3):117-122. DOI 10.3109/10520296909063335.

Asif M. Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production. Springer, 2013. DOI 10.1007/978-3-319-00732-8_1.

Bhatia R., Dey S.S., Parkash C., Sharma K., Sood S., Kumar R. Modification of important factors for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid production in field grown white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) genotypes in India. Sci. Hortic. (Amsterdam). 2018;233:178-187. DOI 10.1016/j.scienta.2018.01.017.

Cao M.Q., Charlot F., Dore C. Embryogenesis and plant regeneration of sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) via *in vitro* isolated microspore culture. C.R. Acad. Sci. Paris. 1990;310:203-209.

Chun C., Park H., Na H. Microspore-derived embryo formation in radish (*Raphanus sativus* L.) according to nutritional and environmental conditions. Hort. Environ. Biotechnol. 2011;52(5):530-535. DOI 10.1007/s13580-011-0080-1.

Domblides E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Vjurtts T.S., Kozar E.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Domblides A.S., Pivovarov V.F., Soldatenko A.V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops. In: VIII Int. Sci. Agric. Symp. "Agrosym 2017", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, Oct. 2017: Book of Proceedings. 2017;452-460.

Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica. 1992;60:45-55. DOI 10.1007/BF00022257.

Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. 2010;8:377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.

Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011;104:301-309. DOI 10.1007/s11240-010-9800-y.

- Ferrie A.M.R., Möllers C. Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:375-386. DOI 10.1007/s11240-010-9831-4.
- Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. In: Janick J. (Ed.). *Plant Breeding Reviews*. Vol. 25. John Wiley & Sons, 2005;57-88.
- Han N., Kim S.U., Park H.Y., Na H. Microspore-derived embryo formation and morphological changes during the isolated microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2014;32(3):382-389. DOI 10.7235/hort.2014.13170.
- Han N., Na H., Kim J. Identification and variation of major aliphatic glucosinolates in doubled haploid lines of radish (*Raphanus sativus* L.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2018;36(2):302-311. DOI 10.12972/kjhst.20180030.
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1982;105:427-434. DOI 10.1016/S0044-328X(82)80040-8.
- Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breed.* 1989;103(2):119-123. DOI 10.1111/j.1439-0523.1989.tb00359.x.
- Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Springer Science+Business Media, 2003. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4.
- Masuda K., Kikuta Y., Okazawa Y.A. Revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ., Jpn.* 1981;60(3):183-193.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and big assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 1988;74(2):377-384. DOI 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00646.x.
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.* 1991;74:235-242. DOI 10.1016/0168-9452(91)90051-9.
- Takahata Y., Komatsu H., Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 1996;16(3-4):163-166. DOI 10.1007/BF01890859.
- Tuncer B. Callus formation from isolated microspore culture in radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Anim. Plant Sci.* 2017;27(1):277-282.
- Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;107:305-315. DOI 10.1007/s11240-011-9981-z.
- Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.V., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012;110:69-76. DOI 10.1007/s11240-012-0131-z.
- Zhang W., Qiang F., Xigang D., Manzhu B. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2008;117:69-72. DOI 10.1016/j.scienta.2008.03.023.

ORCID ID

E.V. Kozar orcid.org/0000-0001-5447-5341
E.A. Domblides orcid.org/0000-0002-2695-190X
A.V. Soldatenko orcid.org/0000-0002-9492-6845

Благодарности. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90034. Авторы выражают благодарность М. Скапцову за помощь в оценке растений-регенерантов методом проточной цитометрии клеточных ядер.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.06.2019. После доработки 02.10.2019. Принята к публикации 02.10.2019.

Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы

Т.П. Жужжалова, Е.О. Колесникова , Е.Н. Васильченко, Н.Н. Черкасова

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия

 e-mail: kolelkb@mail.ru

Аннотация. Рассмотрены аспекты использования в селекционном процессе сахарной свеклы биотехнологических методов, позволяющих ускоренно создавать, размножать и сохранять растения с улучшенными или новыми признаками. Представлен обзор работ, проведенных по данным направлениям во Всероссийском НИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова. Показана тесная взаимосвязь морфофизиологических исследований культивируемых *in vitro* органов и тканей с селекционными признаками, обеспечивающая разработку экспериментальных систем реконструкции растений без полового скрещивания. Рассмотрено воздействие условий культуры *in vitro* на гаплоидные клетки неоплодотворенных семязачатков сахарной свеклы в процессе получения удвоенных гаплоидных линий с высокой степенью гомозиготности и сохранением ценных селекционных свойств. В отличие от классического инбридинга, время создания гомозиготного растительного материала с помощью данного метода было сокращено с 10–12 до 3–5 лет. Исследования по культивированию зиготических зрелых зародышей сахарной свеклы на основе селективных систем *in vitro* позволили повысить адаптивные свойства растений и обеспечить комплексную устойчивость к стрессовым факторам внешней среды. Благодаря жесткому отбору в условиях абиотического стресса созданы изогенные линии сахарной свеклы с толерантностью к засухе, засолению и кислотности почвы. Предложена оригинальная схема массового микроклонального размножения и депонирования *in vitro* элитных растений – компонентов высокопродуктивных гибридов, которая может служить для получения выровненного селекционного материала улучшенного качества. Разработанные технологии являются приоритетным и инновационным направлением исследований, так как внедрение данных разработок в селекционный процесс сахарной свеклы будет способствовать получению конкурентоспособных гибридов с комплексом хозяйственно полезных признаков. Сочетание биотехнологических подходов, в том числе культуры тканей, с методами традиционной селекции даст возможность получать новый исходный материал для создания отечественных сортов и гибридов нового поколения с гетерозисным эффектом и широким спектром устойчивости, сохраняющимися в ряду поколений.

Ключевые слова: сахарная свекла; гаплоидный партеногенез; абиотические стрессы; селективные агенты; морфогенез; микроразмножение; штеклинги; селекционные линии; семена элиты.

Для цитирования: Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1): 40-47. DOI 10.18699/VJ20.593

Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding

T.P. Zhuzhhalova, E.O. Kolesnikova , E.N. Vasilchenko, N.N. Cherkasova

A.L. Mazlumov All-Russia Research Institute of Sugar Beet, VNISS, Ramon raion, Voronezh oblast, Russia

 e-mail: kolelkb@mail.ru

Abstract. Here we consider aspects of the application of biotechnological methods to rapid creation, propagation, and maintenance of plants with improved or new traits in sugar beet breeding. The results of the works carried out in these fields by the Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russia Research Institute of Sugar Beet" are reviewed. A close association between morphological and physiological changes in *in vitro* cultured organs and tissues, on the one hand, and breeding traits, on the other hand, which allows the development of experimental systems for non-amphimictic plant reconstruction is shown. The influence of *in vitro* growth conditions on haploid cells of unfertilized sugar beet ovules in the course of obtaining doubled haploid lines with high degree of homozygosity and maintenance of valuable breeding properties is considered. As compared to common inbreeding, this method shortens the time for development of homozygous material from 10–12 to 3–5 years, which is of great importance for speeding-up the breeding process. The results of studies on the culturing of mature sugar beet zygotic embryos based on *in vitro* selective systems have made it possible to improve the adaptive potential of plants and to provide complex resistance to environmental stress factors. Strict selection under abiotic

stress conditions allowed creation of sugar beet isogenic lines with tolerance of drought, salinity, and soil acidity. It is shown that the proposed original design of mass-scale microclonal *in vitro* reproduction and deposition of elite plants as components of highly productive hybrids can be used to obtain seeds of uniform high-quality breeding material. The technologies developed by biotechnological methods are a topical and innovative direction of inquiry, since the application of these techniques to sugar beet breeding will promote obtaining of competitive hybrids with a set of commercially valuable traits. The combination of biotechnology methods, including tissue culture, and traditional breeding techniques is expected to provide an opportunity to obtain a new starting material to develop domestic varieties and hybrids of new generation with heterosis effect and a wide resistance spectrum persisting across generations.

Key words: sugar beet; haploid parthenogenesis; abiotic stresses; selective agents; morphogenesis; micropropagation; stecklings; breeding lines; elite seeds.

For citation: Zhuzhzhlova T.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):40-47. DOI 10.18699/VJ20.593

Введение

Одно из главных направлений селекции сахарной свеклы в современных условиях развития сельскохозяйственного производства – это создание высокопродуктивных гибридов на линейной основе. Поэтому традиционный селекционный процесс направлен на длительный отбор самоопыленных линий с выровненными морфологическими признаками, хозяйственно полезными свойствами (урожайность, сахаристость и др.) и высоким качеством семян. Однако используемые методы селекции долговременны и трудоемки, что обусловлено двухлетним циклом развития растений, инбредной депрессией, явлением само- и перекрестной несовместимости, вызывающих трудности при сохранении генетической однородности полученного материала. В связи с этим для создания, стабилизации и сохранения ценных признаков селекционного материала приоритетными признаны биотехнологические методы, основанные на культивировании органов и тканей *in vitro*. Применение биотехнологий в селекционном процессе позволит сократить, а затем и ликвидировать отставание от зарубежных стран по различным показателям сельскохозяйственного производства.

Получение удвоенных гаплоидов сахарной свеклы в культуре тканей обеспечивает создание гомозиготных линий с комплексом хозяйственно полезных признаков. Этот важный этап в селекции сахарной свеклы должен быть разработан и включен в технологический процесс.

Перспективным направлением биотехнологии в селекции сахарной свеклы является также использование селективных систем *in vitro*, способствующих получению растений с высокой устойчивостью к абиотическим стрессам, что основано на способности растительных организмов к созданию механизмов защиты от неблагоприятных факторов среды на клеточном уровне (Духовский и др., 2003; Lamaoui et al., 2018).

К главным направлениям работ по культуре изолированных тканей в практической селекции сахарной свеклы относится совершенствование биотехнологических методов массового размножения и длительного сохранения селекционно ценных форм. В основе таких методов лежит уникальное свойство тотипотентности растительных клеток, характеризующее весь потенциал признаков, который при культивировании реализуется различными путями морфогенеза: эмбриоидогенез, органоидогенез и гистогенез (Батыгина, 2000). В связи с этим морфогенетическая ком-

петенция культивируемых тканей и органов растений сахарной свеклы может способствовать определённому пути развития, что требует особого внимания при микроклонировании созданного материала.

Для исследований по вышеперечисленным направлениям был привлечен целый ряд международных научных учреждений. Так, в США для улучшения зародышевой плазмы сахарной свеклы применяются методы создания удвоенных гаплоидов (ДН), оценки устойчивости к стрессам, молекулярной биологии и др. Все разработки курирует Служба сотрудников Министерства сельского хозяйства – USDA ARS (Козловская и др., 2016). Международный интерес к гаплоидным растениям в Евросоюзе подтвержден созданием программы GOST 851 «Гаметные клетки и молекулярная селекция для улучшения растений». Во всех селекционно-семеноводческих фирмах Европы (Strube, KWS, Syngenta, Fiorimond Despres и др.), занимающихся созданием гибридов сахарной свеклы и семенного материала, включаются в работу гомозиготные линии. Получение гаплоидных и удвоенных гаплоидных форм (х/хх) сахарной свеклы является неотъемлемой частью работ научно-исследовательского центра Planta. Там проводят изучение основных направлений биотехнологии, включая разработку методов отбора сахарной свеклы с устойчивостью к стрессам. Селекционные материалы сахарной свеклы с применением биотехнологий получены в Германии, Турции (Gürel et al., 2003), Польше (Tomaszewska-Sowa, 2012), Болгарии (Kikindonov et al., 2016) и других странах. Интерес представляют технологические показатели селекционного материала, созданного с помощью удвоенных гаплоидов сахарной свеклы в Беларуси, демонстрирующие положительные результаты селекции на уровне (или выше) обычных гибридов. При испытании было установлено статистически достоверное превышение по урожайности (43 и 45 т/га) и сахаристости (20.9 и 21.1 %) по сравнению с диплоидным стандартом (Кильчевский, Хотылева, 2012). Многолетнее изучение гибридов, созданных с использованием ДН-линий в Болгарии, показало их высокую продуктивность по сравнению с обычными гибридами. Урожай корнеплодов у дигаплоидных гибридов превысил контрольный уровень на 11.4–13.7 %, а сбор сахара варьировал на уровне стандарта (Kikindonov et al., 2016). Данные результаты являются практическим достижением, которое обуславливает внедрение в селекционный процесс технологий на

основе методов культуры тканей для ускоренного получения селекционного материала с ценными признаками.

Таким образом, весьма актуальны исследования по разработке и включению в отечественный селекционный процесс сахарной свеклы биотехнологий направленного получения генетически улучшенного исходного материала для создания перспективных гибридов нового поколения. Успех таких исследований может быть обеспечен при учете специфики морфогенетических потенций развития определенных органов растений, проявляющих в условиях *in vitro* склонность к активным процессам регенерации и размножения.

Гаплоидный партеногенез

В процессе многолетних исследований в ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова» были разработаны методические приемы индукции гаплоидного партеногенеза *in vitro* и определены оптимальные условия культивирования эксплантов сахарной свеклы (Васильченко и др., 2018). Важное условие – выбор исходных растений-доноров эксплантов по фенотипическим характеристикам, включающим морфологический габитус семенных растений, высокую степень раздельноцветковости и завязываемости семян. Первичными эксплантами для культивирования *in vitro* являлись семязачатки, расположенные в бутонах на центральном колосе кистевидной части плейохазия. Использование цитозембриологических исследований (Барыкина и др., 2004) позволило установить, что формирование гаплоидных эмбриоидов *in vitro* происходило на всех этапах развития ядер и клеток зародышевого мешка. Этому способствовали хорошо выраженная полярность и высокая компетентность гаплоидных ядер к развитию. Наибольшую активность к формированию гаплоидных эмбриоидов проявляли семязачатки, содержащие в зародышевых мешках 8 гаплоидных ядер или 7 клеток (но тоже 8-ядерных). Согласно современным представлениям, в этот период возможно переключение гаметофитной программы развития на спорофитную (Батыгина, Васильева, 2002). Этот процесс стимулируется предобработкой материала низкими положительными температурами в течение 2–4 суток.

Ключевым моментом при культивировании семязачаток оказался прием чередования питательных сред B_5 различной консистенции. Содержание в жидкой питательной среде гиббереллина в высокой концентрации вызывало прямую регенерацию гаплоидных эмбриоидов с образованием первичного корешка и семядольных листьев. При пересадке на твердую питательную среду формировались ростовые побеги. Присутствие в жидкой среде 6-БАП приводило к образованию каллусной ткани, в которой при пересадке на твердую питательную среду с добавлением кинетина (Кн) и 2.4 Д происходило развитие регенерантов путем гемморизогенеза. Применение данного приема способствовало сохранению жизнеспособности культивируемых эксплантов до 4–6 месяцев при активизации процессов пролиферации и дифференциации ядер женского гаметофита. Специализация возникающих новообразований растительных тканей обеспечивала увеличение выхода гаплоидных регенерантов через прямой эмбриоидогенез до 18.9 %, а путем каллусогенеза – до 11.0 %. При этом

дифференциация клеток ускорилась на 25–30 %, количество сформированных регенерантов увеличилось до 13–19 % (Васильченко, 2016).

Следующий этап заключался в отборе морфологически развитых гаплоидных регенерантов, а затем в переводе их на диплоидный уровень. Процесс сопровождался отборами по цитологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим признакам (Жужжалова и др., 2016). О получении гаплоидных растений известно давно. Ранее плоидность определяли путем непосредственного подсчета хромосом на метафазных пластинках (Ницше, Венцель, 1980; Паушева, 1988). Анализ яДНК методом проточной цитометрии на анализаторе плоидности, основанный на флуоресцентном окрашивании ядер растений (Tomaszewska-Sowa, 2010), дал возможность быстро и эффективно выделять регенеранты с гаплоидным набором хромосом ($n = 9$), а после колхицинирования провести отбор удвоенных гаплоидов ($2n = 18$). Следует заметить, что после мутагенеза у гаплоидов часто наблюдались нарушения в процессах деления клеток, приводящие к варьированию у регенерантов количества хромосом и возникновению миксоплоидных, анеуплоидных форм, которые браковались (Жужжалова и др., 2016).

Биохимическая оценка позволила выявить различия в активности ферментов у опытных образцов. По сравнению с исходными диплоидными формами гаплоидные растения характеризовались увеличенным в 1.6 раза количеством белка и большей активностью ферментов пероксидазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы. У регенерантов после удвоения хромосом эти показатели возвращались к уровню контроля или незначительно превышали его (Землянухина и др., 2016). Можно предположить, что изменение активности ферментов у гаплоидных регенерантов сахарной свеклы было обусловлено метилированием ДНК участков генома, связанных с функционированием белка. Установленные различия отражали более глубокие изменения, вызванные клеточной дифференцировкой при культивировании тканей (Ванюшин, 2010). Данный вопрос требует глубокого изучения.

После проведения диплоидизации регенерантов существенное значение имело выявление генетических изменений, которые не проявлялись фенотипически. PCR и RFLP-анализ с использованием рестриктазы Hind III (Beckman, Sollen, 1983) позволили идентифицировать тип цитоплазмы по числу рестриктов при удвоении хромосом. У микроклонов с нормальной цитоплазмой амплифицировался один фрагмент (800 п. н.). У форм со стерильным типом цитоплазмы обнаруживались два продукта рестрикции – 320 и 480 п. н. Удвоенные гаплоиды, у которых этот фрагмент не рестрицировался Hind III, были представлены полностью фертильными формами с нормальной цитоплазмой (N) и ядерными генами в рецессивном состоянии (rf). В остальных образцах наблюдался полиморфизм фрагментов, что предполагало наличие у соответствующих гаплоидных форм стерильной цитоплазмы (S) и разное сочетание рецессивных и доминантных аллелей ядерных генов Rf_1/rf_1 и Rf_2/rf_2 . Выявление типа цитоплазмы у регенерантов на ранних этапах культивирования облегчало создание линий с ЦМС, представляя

значительный интерес для селекции сахарной свеклы (Васильченко, 2016; Васильченко и др., 2018).

Последний этап культивирования *in vitro* включал процессы клонирования регенерантов с удвоенной плоидностью и последующее их укоренение на питательной среде с измененным гормональным составом. Отобранные микроклоны с мощной корневой системой и хорошо развитой листовой поверхностью высаживали в грунт в условиях теплицы. Благодаря высокой влажности воздуха удалось сохранить до 72 % микроклонов. В дальнейшем осуществляли выращивание растений в течение 3 месяцев до получения штеклингов массой 70–100 г, которые затем яровизировали 45 дней. В начале стеблеобразования температуру воздуха в теплице повышали до 14–20 °С, поддерживая непрерывное освещение на протяжении месяца. В этот период отмечался активный рост и развитие семенных растений. Затем наблюдались процессы бутонизации и цветения. Высота растений достигала 1.5 м и больше, толщина основного цветоносного стебля – около 3 см, цветение происходило одновременно и интенсивно. Фертильность пыльцевых зерен варьировала от 87 до 92 %. Через 8–10 недель формировались семена с высокой разделноплодностью.

Проведенные исследования позволили выявить основные условия для проведения гаплоидного партеногенеза и разработать трехлетний технологический цикл создания гомозиготных ДН-линий. Полученные семена четырех ДН-линий послужили новым исходным материалом и в настоящее время используются в селекционной работе. Создание гомозиготных линий сахарной свеклы будет способствовать ускоренному получению гибридов с комплексом хозяйственно ценных признаков (Колесникова и др., 2018б).

Селективные системы *in vitro*

В результате наших научных экспериментов разработан метод селективного отбора *in vitro* форм сахарной свеклы, позволяющий создавать оригинальный селекционный материал с устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды (Черкасова, Жужжалова, 2011). В основу метода положено двукратное пассирование регенерантов в жестких селективных условиях, при которых количество выживших регенерантов в условиях хлоридного засоления достигало 66.0–81.7 %. Дальнейшее пассирование солетолерантных форм на питательной среде с добавлением неионного осмотика (0.45 М) способствовало повышению адаптивных механизмов защиты растений в условиях осмотического стресса. Выживаемость генотипов в данном случае повышалась в два раза при увеличении уровня общей адаптации регенерантов к абиотическому стрессу (засуха + засоление) до 59.0 %. Пассирование полученных регенерантов в условиях повышенной кислотности (рН 3.5) происходило при активном развитии ростовых побегов, что свидетельствовало о высокой устойчивости 69.1–87.5 % микроклонов. Уровень общей адаптации регенерантов к более сложному стрессу (засуха + кислотность) повышался в 10 раз (Черкасова и др., 2018).

Существенное значение при разработке метода имели эксперименты, позволившие установить, что культиви-

рование неспециализированных растительных тканей (черешки листьев, ростовые почки, незрелые зародыши и т. д.) на селективных питательных средах с добавлением морской соли (2 %) и сорбита (0.45 М при рН 4.0) приводило почти к полной деградации растительного материала. Появление регенерантов с устойчивостью наблюдалось при первичном отборе только у 2–4 % эксплантов, в качестве которых использовали зрелые зародыши. Этот период сопровождался медленным формированием ростовых побегов у выживших эксплантов, что было связано с замедлением процессов растяжения клеток и клеточных делений, приводившим к торможению развития регенерантов (Shabala, Munns, 2017). Эффективным оказался повторный отбор, позволивший в жестких селективных условиях также увеличить степень устойчивости регенерантов.

Дальнейший системный массовый отбор регенерантов по индексу длины корней (Косарева, 2012), который в опытах варьировал от 1.0 до 1.2, позволил повысить количество выживших толерантных растений до 87.5–89.2 %. Регенеранты, отобранные по длине корня в условиях, моделирующих повышенную кислотность почвы (рН 3.5) и засуху, отличались, наряду с выравненностью листового аппарата, хорошо развитой корневой системой. Процесс формирования корней в условиях осмотического стресса был менее подвержен изменению, чем развитие листьев. После воздействия осмолитиков скорость удлинения корней восстанавливалась быстрее. Активное развитие корневой системы в условиях осмотического стресса было обусловлено усилением роста боковых корней, обеспечивающих лучший доступ к воде и питательным веществам (Rahnama et al., 2011).

Выявленные особенности морфологического развития регенерантов сахарной свеклы были связаны с изменением целого ряда биохимических процессов, вызывающих активацию работы ферментов окислительного стресса, увеличение интенсивности синтеза белка (Землянухина и др., 2017), а также накопление свободного пролина (Bates et al., 1973).

Пролин в условиях водного дефицита повышал осмотическое давление клеточного сока, что свидетельствовало о его осморегуляторной функции (Сошникова и др., 2013). У солетолерантных регенерантов сахарной свеклы в условиях абиотического стресса накопление пролина (от 36.9 до 79.3 мкг/г) было связано с генотипом. При этом коэффициент стойкости (К), определяемый по отношению количества пролина при стрессе к исходному его содержанию, у солеустойчивых форм превышал контроль в 5.8–10 раз. Дальнейшее пассирование солетолерантных форм в присутствии сорбита в концентрации 0.40–0.45 М способствовало увеличению коэффициента стойкости в 1.9–1.5 раза. Общая осмотическая устойчивость генотипов сахарной свеклы при проведении системного отбора (засуха + засоление) увеличивалась в 7–12 раз. Полученные данные позволили использовать количественное содержание пролина как показатель адаптации регенерантов сахарной свеклы к стрессу и индикатор солеустойчивых компонентов (Черкасова, Жужжалова, 2014).

На заключительном этапе отобранные формы с хорошо развитой корневой системой выращивали в условиях за-

крытого грунта для получения корнеплодов, а затем из них – семенных растений.

Представленные разработки позволяют осуществлять селективный отбор форм сахарной свеклы с устойчивостью к эдафическим факторам внешней среды для создания изогенных линий в течение 3–4 лет вместо традиционных 8–10 лет. Это имеет большое значение в процессе селекции при создании новых гибридов сахарной свеклы с устойчивостью к абиотическим стрессам.

Микроразмножение

Исследования показали, что при культивировании черешков или листьев молодых проростков, а также зародышей сахарной свеклы в период создания изогенных линий с устойчивостью к стрессам воспроизведение нового организма шло путем эмбриоидогенеза (Жужжалова и др., 2006). Главное отличие возникающих зародышеподобных структур от гаплоидных эмбриоидов заключалось в особенности их формирования из диплоидных соматических клеток растений без участия половых гамет. Процесс морфогенеза происходил на основе образования в эпидермисе инициальных клеток, имеющих плотную цитоплазму и крупное ядро. При дальнейшем делении формировался двуклеточный проэмбрио, а затем соматический эмбриоид шаровидной формы. На следующем этапе наблюдалось образование сердцевидного эмбриоида и проростка с развитием стебля с зародышевыми листьями. По-видимому, стрессовая ситуация, создаваемая условиями *in vitro*, вызывала реализацию морфогенеза путем соматического эмбриоидогенеза. Возникшие гаметофитные и соматические эмбриоиды, независимо от происхождения, представляли собой зачатки новых организмов и являлись элементарными структурными единицами размножения растений по аналогии с меристематическими клетками (Батыгина, Васильева, 2002; Батыгина и др., 2010). В связи с этим ключевым моментом в процессе микроразмножения *in vitro* созданного растительного материала сахарной свеклы выступает этап индуцирования эмбриоидов.

Известно, что сахарная свекла в естественных условиях размножается только семенным способом и для выживания вида имеет лишь резервный способ вегетативного размножения путем травматической партикуляции. В прошлом веке данный прием широко применялся в селекционной практике для вегетативного размножения корнеплодов – родоначальников (педигри) ценного исходного материала с сохранением наиболее важных признаков: высокой сахаристости, продуктивности, формы корнеплода и др. На сегодняшний день научно доказано, что типы, способы и формы семенного размножения могут определять репродуктивную способность любого вида растений при активном взаимоотношении с вегетативным (Батыгина и др., 2010). Наиболее продуктивны лишь те виды, у которых сочетаются генеративная и вегетативная репродукция. Поэтому использование у сахарной свеклы размножения растений путем микроклонирования может способствовать улучшению репродуктивной способности и повышению как семенной продуктивности, так и других ценных признаков и свойств.

В настоящее время микроразмножение *in vitro* на основе культуры меристем является основным методом для уско-

ренного размножения селекционно ценных материалов и длительного их сохранения (Жужжалова и др., 2018). Применение микроклонирования в практической селекции позволяет сохранить в культуре, размножить и включить в селекционный процесс целый ряд исходных линий с признаками ЦМС, закрепительной способностью, гладкой поверхностью корнеплода, плотным расположением семян на семенных растениях и др. (Знаменская, 2010).

Значительный практический интерес имели исследования по использованию микроразмножения и депонирования *in vitro* для улучшения морфогенетического потенциала компонентов гибридов, создаваемых согласно трехлинейной селекционной схеме. Включение в селекционный процесс культуры тканей обеспечивало как повышение репродуктивной способности компонентов создаваемых гибридов, так и получение семян сахарной свеклы улучшенного качества (Колесникова и др., 2018а).

На первом этапе осуществляли выделение элитных генотипов из трех компонентов высокопродуктивного гибрида: линий с цитоплазматической мужской стерильностью, опылителя О-типа с закрепительной способностью ЦМС и фертильного опылителя, способного в F₁ стимулировать эффект гетерозиса. При отборе генотипов применяли экспресс-диагностику по морфологическим и цитозембриологическим признакам, отражающим фазы развития семенных растений, отдельно-сростноцветковость, фертильность пыльцевых зерен, синхронность цветения, плоидность и др. Для введения в культуру *in vitro* отобранных генотипов использовали апексы цветonoсных побегов в количестве 10–20 шт. с одного семенного растения. Основными индукторами развития ростовых побегов из верхушечной меристемы служили гормональные компоненты питательной среды Гамборга и Мурасиге–Скуга (Бутенко, 1964). Присутствие в ростовой питательной среде гормонов роста (6-бензиламинопурина, кинетина и гиббереллина) способствовало образованию до 8 адвентивных побегов на один эксплант; высота регенерантов достигала 60–73 мм. В конце процесса стабилизации сформированные регенеранты имели интенсивно зеленые листья, оптимальное соотношение черешка и листовой пластинки, хорошую кустистость и развитую точку роста. Такие микроклоны успешно формировали множество пазушных побегов, а затем необходимое количество элитных регенерантов ЦМС-формы, О-типа и ОП (Колесникова, Жужжалова, 2018).

Необходимое количество морфологически развитых регенерантов линейных компонентов гибрида параллельно культивировали в коллекции элитных клонов *in vitro* путем депонирования. Это позволяло длительное время сохранять в чистоте линейные компоненты гибрида на уровне первого поколения. Культивирование регенерантов без пересадок осуществляли на безгормональной питательной среде с увеличенным содержанием агара при слабом освещении (500–600 люкс), фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь.

Второй этап включал массовое микроразмножение, укоренение регенерантов и получение штекерлинов компонентов гибрида. Для массового размножения элитные регенеранты, прошедшие депонирование, пересаживали на гормональную питательную среду В₅, которая акти-

визировала меристемы и обеспечивала пролиферацию боковых побегов. Многократная пересадка побегов давала возможность создавать необходимое количество микроклонов. Наибольшее число регенерантов получали от раздельноплодных фертильных линий (в среднем 48 побегов на 1 эксплант), наименьшее – от МС-линий и опылителей (16 и 13 побегов соответственно). Следует заметить, что формы с ЦМС оказались очень чувствительными к изменению условий выращивания и погибали чаще по сравнению с фертильными генотипами. Их было сложнее стабилизировать в условиях *in vitro* и в дальнейшем репродуцировать (Колесникова и др., 2018а).

Укоренение регенерантов было связано с индуцированием адвентивных корней, что достигалось изменением гормонального состава питательной среды. Процесс корнеобразования длился 3–4 недели. Полученные микроклоны сахарной свеклы с мощной корневой системой и хорошо развитой надземной частью переводили в нестерильные условия почвенного субстрата, где осуществляли адаптацию микроклонов. Приживаемость микроклонов, их рост и развитие в период адаптации определяли условиями гидратации микроклонов. Создание высокой влажности воздуха после посадки позволяло сохранить 80–100 % микроклонов. Растения, формирующиеся в теплице, характеризовались выровненностью морфологических признаков в пределах линии. Развитые растения линейных компонентов гибрида выращивали в условиях закрытого грунта до формирования штеклингов. Заключительным важным процессом данного этапа была уборка штеклингов и их яровизация, которую осуществляли путем хранения корнеплодов в холодильниках.

На третьем этапе семенные растения, полученные из штеклингов, использовались селекционерами для гибридизации в полевых условиях на отдельных специализированных участках, согласно схемам при получении семян простого гибрида и многосемянного опылителя улучшенного качества (Жужжалова и др., 2017).

Разработка биотехнологических приемов массового размножения и депонирования *in vitro* селекционных материалов сахарной свеклы имеет приоритетное и инновационное значение, так как дает возможность получать линии сахарной свеклы с высокой генетической однородностью и улучшенным качеством семенного материала. Реализация данного приема, в два раза ускоряющего продолжительность селекционного процесса, внесет ощутимый вклад в создание высокопродуктивных гибридов для коммерциализации, а также в семеноводческий процесс, обеспечивая сохранение высоких показателей хозяйственно полезных свойств создаваемого селекционного материала.

Заключение

В данном обзоре мы описываем основные биотехнологические приемы, которые в настоящее время используются для получения и размножения нового исходного материала сахарной свеклы. Инновационным и перспективным в селекционной работе является метод гаплоидного партеногенеза. Исключая многократное самоопыление растений, метод позволил сократить в два раза время создания гомозиготного материала с ценными селекционными

признаками. На его основе созданы линии удвоенных гаплоидов и получены выровненные раздельноплодные семена компонентов гибридов сахарной свеклы.

Существенное значение имели исследования, которые легли в основу методики селективного отбора *in vitro*, повышающего устойчивость регенерантов сахарной свеклы к сильному засолению, засухе и кислотности почвы. Благодаря проведенным исследованиям в течение трех лет были созданы изогенные линии с высокой осмотической устойчивостью к абиотическим факторам внешней среды.

Значительный практический интерес для внедрения в селекцию сахарной свеклы представляет массовое микроразмножение и депонирование *in vitro* элитных компонентов гибридов при использовании трехлинейной селекционной схемы. Этот прием дает возможность не только повысить продуктивную способность семенных растений, но и получать семена сахарной свеклы улучшенного качества.

Внедрение в селекционно-семеноводческий процесс сахарной свеклы данных технологий является приоритетным и инновационным направлением, позволяющим повышать уровень гомозиготности линий и качественные признаки семенного материала при сохранении высокой продуктивности создаваемых гибридов.

Список литературы / References

- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. <http://bookre.org/reader?file=1483744&pg=1>
- [Barykina R.P. Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhililova Kh.Kh., Ilyina G.M., Chubatova N.V. The Handbook of Botanic Microtechniques: Fundamentals and Methods. Moscow: Publ. House of Moscow State University, 2004. Available at <http://bookre.org/reader?file=1483744&pg=1> (in Russian)]
- Батыгина Т.В. Эмбриодогения – новый тип вегетативного размножения. В: Батыгина Т.В. (ред.). Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. СПб.: Мир и Семья, 2000;334-349. <https://www.twirpx.com/file/435188/>
- [Batygina T.V. Embryoidogeny is a new type of a vegetative propagation. In: Batygina T.V. (Ed.). Embryology of Flowering Plants: Terminology and Concepts. Vol. 3. Reproductive Systems. St. Petersburg: Mir i Semya Publ., 2000;334-349. Available at <https://www.twirpx.com/file/435188/> (in Russian)]
- Батыгина Т.В., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002.
- [Batygina T.V., Vasilyeva V.E. Plant Reproduction. St. Petersburg: St. Petersburg University Publ., 2002. (in Russian)]
- Батыгина Т.В., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдирирова О.А. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010.
- [Batygina T.V., Kruglova N.N., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Sel-dimirova O.A. From a Microspore to a Variety. Moscow: Nauka Publ., 2010. (in Russian)]
- Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964.
- [Butenko R.G. Isolated Tissue Culture and Physiology of Plant Morphogenesis. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)]
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК – эпигенетическая регуляция роста и развития растений. В: Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции: Материалы Междунар. конф.,

- посвящ. 50-летию юбилею Лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН (13–16 дек. 2010 г.). М.: Т-во науч. изданий КМК, 2010;41-43.
- [Vanyushin B.F. DNA methylation is an epigenetic regulation of growth and development of plants. In: Development Biology: Morphogenesis of Reproductive Structures and a Role of Somatic, Stem Cells in Ontogenesis and Evolution: Proceedings of the Int. conf. dedicated to the 50th anniversary of the Laboratory of Embryology and Reproductive Biology, Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (December 13–16, 2010). Moscow: KMK Association of Scientific Editions. 2010;41-43. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н. Индуцирование гаплоидной партеногамии сахарной свеклы в условиях *in vitro*. Сахарная свекла. 2016;6:2-4. [Vasilchenko E.N. Induction of haploid partenogeny of sugar beet *in vitro*. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2016;6:2-4. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Ващенко Т.Г., Колесникова Е.О. Технология создания реституционных линий сахарной свеклы. Вестн. ВГАУ. Воронеж, 2018;1(56):42-50. DOI 10.172338/issn2071-2243.2018.1.56. [Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Vashchenko T.G., Kolesnikova E.O. The technology of creating restitution sugar beet lines. Vestnik VGU = Bulletin of Voronezh State Agrarian University. 2018;1(56):42-50. DOI 10.172338/issn2071-2243.2018.1.56. (in Russian)]
- Духовский П., Юкнис Р., Бразайтите А., Жукаускайте И. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессов. Физиология растений. 2003;2:165-173. [Dukhovskiy P., Yuknis R., Brazaitite A., Zukauskaite I. Plant response to integrated impact of natural and anthropogenic stress factors. Fiziologiya Rasteniy = Russ. J. Plant Physiol. 2003;50(2): 147-154.]
- Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Ошевнев В.П., Грибанова Н.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Инновационный прием микроклонирования *in vitro* сахарной свеклы в селекционном процессе. Сахарная свекла. 2017;4:12-18. [Zhuzhzhhalova T.P., Znamenskaya V.V., Oshevnev V.P., Gribanova N.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. An innovative method of sugar beet *in vitro* micropropagation in the breeding process. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2017;4:12-18. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Подвигина О.А., Ярмолук Г.И. Репродуктивная биология сахарной свеклы. Воронеж: Сотрудничество, 2006. [Zhuzhzhhalova T.P., Znamenskaya V.V., Podvigina O.A., Yarmolyuk G.I. Reproductive Biology of Sugar Beet. Voronezh: Sotrudnichestvo Publ., 2006. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Аспекты использования микроклонирования в селекции сахарной свеклы. В: Селекционно-генетическая наука и образование (Парижские чтения): Материалы VII междунар. науч. конф., 19–21 марта 2018. Умань, Украина, 2018:78-81. [Zhuzhzhhalova T.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Issues of microcloning use in sugar beet breeding. Proceedings of the VII International Scientific Conference “Breeding and Genetic Science and Education: Pariyskiy readings. March 19–21, 2018. Uman, Ukraine, 2018:78-81. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Подвигина О.А., Знаменская В.В., Васильченко Е.Н., Карпеченко Н.А., Землянухина О.А. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.): факторы и диагностические признаки. С.-х. биология. 2016;51(5):636-644. DOI 10.15389/agrobiol.2016.5.636rus. [Zhuzhzhhalova T.P., Podvigina O.A., Znamenskaya V.V., Vasilchenko E.N., Karpechenko N.A., Zemlyanukhina O.A. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) haploid parthenogenesis *in vitro*: factors and diagnostic characters. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2016;51(5):636-644. DOI 10.15389/agrobiol. 2016.5.636eng.]
- Землянухина О.А., Васильченко Е.Н., Карпеченко Н.А., Жужжалова Т.П., Карпеченко И.Ю., Калаев В.Н. Молекулярно-биохимические признаки гаплоидных и дигаплоидных растений-регенерантов сахарной свеклы. В: Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции Adflim. ActaNaturae (специальный выпуск). 2016;2:59. [Zemlyanukhina O.A., Vasilchenko E.N., Karpechenko N.A., Zhuzhzhhalova T.P., Karpechenko I.Yu., Kalaev V.N. Molecular-biochemical characters of haploid and dihaploid sugar beet regenerant plants. In: Proc. of the V Congress of CIS physiologists, V Congress of Russia biochemists, Adflim Conferences. ActaNaturae (spec. iss.). 2016;2:59. (in Russian)]
- Землянухина О.А., Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Калаев В.Н. Биохимические и морфологические признаки кислотоустойчивых растений – регенерантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Вестн. ВГУ. Воронеж. 2017;2:59-67. [Zemlyanukhina O.A., Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kalaev V.N. Biochemical and morphological traits of sugar beet acid-resistant plants-regenerants (*Beta vulgaris* L.). Vestnik VGU = Bulletin of Voronezh State University. 2017;2:59-67. (in Russian)]
- Знаменская В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы. В: Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Сова, 2010;420-437. [Znamenskaya V.V. *In vitro* microcloning as a method of maintenance and reproduction of sugar beet lines. In: Encyclopedia of *Beta* Genus. Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sov Publ., 2010;420-437. (in Russian)]
- Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. (ред.). Генетические основы селекции растений. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. Минск: Беларус. наука, 2012;203-216. [Kilchevskiy A.V., Hotyleva L.V. (Eds.). Genetical Basis of Plant Breeding. Vol. 3. Biotechnology in Plant Breeding. Cell Engineering. Minsk: Belarus. Navuka Publ., 2012;203-216. (in Russian)]
- Козловская В.Ф., Апасов И.В., Жужжалова Т.П., Федулова Т.П. Основные направления и результаты селекции сахарной свеклы в США. Сахарная свекла, 2016;8:35-41. [Kozlovskaya V.F., Apasov I.V., Zhuzhzhhalova T.P., Fedulova T.P. Main directions and results of sugar beet breeding in USA. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2016;8:35-41. (in Russian)]
- Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Возможности использования биотехнологических приемов для сахарной свеклы в селекционном процессе. В: Научное обеспечение отрасли растениеводства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле» (Несвиж, 5–6 сент. 2018 г.). Минск: Беларус. наука, 2018a;40-48. [Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Possibilities of using biotechnology methods for sugar beet in breeding process. In: Scientific Support of Beet-Growing Industry: Proc. of the Int. scientific-practical conf. dedicated to the 90th anniversary of the Sugar Beet Experimental Research Station (Nesvizh, September 5–6, 2018). Minsk: Byelarus. Navuka Publ., 2018a;40-48. (in Russian)]
- Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П. Микроклонирование и сохранение линейного материала в селекционном процессе сахарной свеклы. В: Материалы IV(XII) Междунар. ботан. конф. молодых ученых в Санкт-Петербурге 22–28 апреля 2018 года. СПб., 2018;267-268. [Kolesnikova E.O., Zhuzhzhhalova T.P. Microcloning and maintenance of lines material in sugar beet breeding process. In: Proc. of IV (XII) Int. Botanical Conf. of Young Scientists in St. Petersburg, April 22–28, 2018. St. Petersburg, 2018;267-268.]
- Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П., Черкасова Н.Н., Васильченко Е.Н. Перспективные технологии культуры изолированных тканей в селекционном процессе сахарной свеклы. Рос. с.-х. наука. 2018b; 6:13-17. DOI 10.31857/S250026270001825-2.

- [Kolesnikova E.O., Zhuzhzhhalova T.P., Cherkasova N.N., Vasilchenko E.N. Perspective technologies of isolated tissue culture in sugar beet breeding process. Rossiyskaya Selskokhozyaystvennaya Nauka = Russian Agricultural Sciences. 2018b;6:13-17. DOI 10.31857/S250026270001825-2 (in Russian)]
- Косарева И.А. Изучение коллекции сельскохозяйственных культур и диких родичей по признакам устойчивости к токсическим элементам кислых почв. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2012;170:35-45.
- [Kosareva I.A. The study of crops and wild relatives collections for signs of resistance to toxic elements of acid soils. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selekcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2012;170:35-45. (in Russian)]
- Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. М.: Колос, 1980.
- [Nitzsche W., Wenzel G. Haploids in Plant Breeding. Berlin; Hamburg, 1977. (Russ. ed. Nitsche V., Ventsel' G. G. Gaploidy v selekcii rasteniy. Moscow: Kolos Publ., 1980.)]
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988.
- [Pausheva Z.P. Workshop on Plant Cytology. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988. (in Russian)]
- Сошникова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе. Физиология растений. 2013;60(1):47-60. DOI 10.7868/S0015330313010090.
- [Soshnikova T.N., Radyukina N.L., Korolkova D.V., Nosov A.V. Proline and functioning of an antioxidant plant system and cultivated cells of *Thellungiella salsuginea* during oxidative stress. Russ. J. Plant Physiol. 2013;60(1):41-54. DOI 10.1134/S1021443713010093.]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Получение осмоустойчивых растений сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Сахарная свекла. 2011;7:22-24.
- [Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P. Obtaining osmosis-resistant sugar beet plants under *in vitro* culture. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2011;7:22-24. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Моделирование селективных условий *in vitro* для создания форм сахарной свеклы, устойчивых к стрессовым факторам. Сахарная свекла. 2014;6:16-18.
- [Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P. Modeling of *in vitro* breeding conditions to develop sugar beet forms resistant to environment stress factors. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2014;6:16-18. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О. Создание растений-регенерантов сахарной свеклы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов. Сахар. 2018;5:28-30.
- [Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kolesnikova E.O. Development of sugar beet regenerant plants resistant to a set of stress factors. Sakhar = Sugar. 2018;5:28-30. (in Russian)]
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 1973;39:205-207. DOI 10.1007/BF00018060.
- Beckmann J.S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 1983;67:35-43. DOI 10.1007/BF00303919.
- Gürel S., Gürel E., Kaya Z., Erdal M., Güler E. Effects of antimittotic agents on haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2003;17(2):97-101. DOI 10.1080/13102818.2003.10817065.
- Kikindonov G., Kikindonov Tz., Enchev S. Economical qualities of crosses between doubled haploid sugar beet lines. Agric. Sci. Technol. 2016;8(2):107-110. DOI 10.15547/ast.2016.02.018.
- Lamaoui M., Jemo M., Datla R., Bekkaoui E. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. Front. Chem. 2018;6:26. DOI 10.3389/fchem.2018.00026.
- Rahnama A., Munns R., Poustini K., Watt M. A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient. J. Exp. Bot. 2011;62:69-77. DOI 10.1093/jxb/erq359.
- Shabala S., Munns R. Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. In: Shabala S. (Ed.). Plant Stress Physiology. 2nd edn. CABI, 2017;24-64.
- Tomaszewska-Sowa M. Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants regenerated from unfertilized ovules cultured *in vitro*. Plant Breed. 2010;2:231-235.
- Tomaszewska-Sowa M. Effect of growth regulators and other components of culture medium on morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in unfertilised ovule *in vitro* cultures. Acta Agrobotanica. 2012;65(4):91-100. DOI 10.5586/aa.2012.025.

ORCID ID

E.O. Kolesnikova orcid.org/0000-0002-7926-5129

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.05.2019. После доработки 01.08.2019. Принята к публикации 09.08.2019.

Морфотипы и генетическая изменчивость *Dendrobaena schmidti* (Lumbricidae, Annelida)

С.В. Шеховцов^{1, 2, 3}✉, И.Б. Рапопорт⁴, Т.В. Полубаярова^{1, 2}, А.П. Гераскина⁵, Е.В. Голованова⁶, С.Е. Пельтек¹

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

² Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Институт экологии горных территорий им. А.К. Темботова Российской академии наук, Нальчик, Россия

⁵ Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов Российской академии наук, Москва, Россия

⁶ Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия

✉ e-mail: shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Аннотация. *Dendrobaena schmidti* – полиморфный вид дождевых червей, обитающий на Кавказе и в сопредельных регионах. Особи *D. schmidti* отличаются большим диапазоном размеров (от 1.5 до 10 см и более) и пигментации (от интенсивной пурпурово-фиолетовой окраски до полного ее отсутствия). В связи с этим исследователями описано множество подвидов *D. schmidti*, правомерность выделения большинства из которых в настоящее время оспаривается. В настоящей работе нами изучена генетическая изменчивость выборки *D. schmidti* из семи точек Северо-Западного Кавказа с использованием митохондриальной (фрагмент гена цитохромоксидазы I) и ядерной (внутренний рибосомальный транскрибируемый спейсер 2) ДНК. По обоим маркерам выборка разделилась на две группы. В первую вошли более крупные (3–7.5 см) черви, непигментированные или со слабо выраженной на передней половине тела окраской у зафиксированных в спирте особей. Вторую группу представляли только мелкие (1.7–3.5 см) особи с выраженной пурпурной пигментацией (тоже у фиксированных в спирте образцов). В одной из изученных географических точек обе группы сосуществовали в симпатрии. При этом абсолютных различий между данными видами ни по внешнему виду (пигментированные/непигментированные, мелкие/крупные), ни по диагностическим признакам установить не удалось: хотя выборки особей первой и второй групп различались по размеру (в первой группе большинство особей имело длину 5–6 см, во второй – 2–3 см), они, тем не менее, перекрывались по этому параметру. По пигментации между найденными группами также возможно заметное перекрытие, учитывая, что оценку окраски червей на практике осуществляют посмертно после фиксации, которая влияет на результаты анализа. Таким образом, на основании полученных нами данных можно заключить, что в пределах вида *D. schmidti* существуют как минимум два вида, сходных по диагностическим признакам, но различающихся внешне.

Ключевые слова: дождевые черви; *Dendrobaena schmidti*; *cox1*; ITS2; филогения.

Для цитирования: Шеховцов С.В., Рапопорт И.Б., Полубаярова Т.В., Гераскина А.П., Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Морфотипы и генетическая изменчивость *Dendrobaena schmidti* (Lumbricidae, Annelida). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):48-54. DOI 10.18699/VJ20.594

Morphotypes and genetic diversity of *Dendrobaena schmidti* (Lumbricidae, Annelida)

S.V. Shekhovtsov^{1, 2, 3}✉, I.B. Rapoport⁴, T.V. Poluboyarova^{1, 2}, A.P. Geraskina⁵, E.V. Golovanova⁶, S.E. Peltek¹

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

² Institute of Biological Problems of the North of Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Tembotov Institute of Ecology of Mountain Territories of the Russian Academy of Sciences, Nalchik, Russia

⁵ Center for Forest Ecology and Productivity of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁶ Omsk State Paedagogical University, Omsk, Russia

✉ e-mail: shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Abstract. *Dendrobaena schmidti* (Michaelsen, 1907) is a polymorphic earthworm species from the Caucasus and adjacent regions. Adult *D. schmidti* individuals have highly variable body size (from 1.5 to well over 10 cm) and color (from dark purple to total lack of pigmentation), so a lot of subspecies of *D. schmidti* have been described; however, the existence of most of them is currently under dispute. We studied the genetic diversity of *D. schmidti* from seven locations from the Western Caucasus using mitochondrial (a fragment of the cytochrome oxidase I gene) and nuclear (internal ribosomal transcribed spacer 2) DNA. For both genes studied, we found that our sample was split into two groups. The first group included somewhat bigger (3–7.5 cm) individuals that were only slightly pigmented or totally unpigmented (when fixed by ethanol). The second group contained small (1.7–3.5 cm) specimens with dark

purple pigmentation. In one of the studied locations these two groups were found in sympatry. However, there were no absolute differences either in general appearance (pigmented/unpigmented, small/big) or among diagnostic characters. Although the two groups differed in size (the majority of individuals from the first group were 5–6 cm long, and of the second one, 2–3 cm), the studied samples overlapped to a certain degree. Pigmentation, despite apparent differences, was also unreliable, since it was heavily affected by fixation of the specimens. Thus, based on the obtained data we can conclude that *D. schmidti* consists of at least two species that have identical states of diagnostic characters, but differ in general appearance.

Key words: earthworms; *Dendrobaena schmidti*; *cox1*; ITS2; phylogeny.

For citation: Shekhovtsov S.V., Rapoport I.B., Poluboyarova T.V., Geraskina A.P., Golovanova E.V., Peltek S.E. Morphotypes and genetic diversity of *Dendrobaena schmidti* (Lumbricidae, Annelida). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):48–54. DOI 10.18699/VJ20.594

Введение

Среди всего разнообразия кольчатых червей дождевые черви изучены, пожалуй, наиболее хорошо и полно. Это связано с их важной ролью не только в почвах и почвообразовании, но и во многих наземных экосистемах в целом, а также с тем, что из всех кольцецов они представляют собой наиболее доступную для изучения группу. Оценки видового разнообразия фауны дождевых червей в отдельном регионе и принципы разделения видов у разных исследователей могут различаться. Причины этого – малое количество морфологических признаков при их большой внутривидовой изменчивости, нередко перекрывающей межвидовые различия; неприменимость биологической концепции вида в случае партеногенетических популяций и практическая сложность ее проверки в случае амфимиктеских популяций.

Центральные морфологические видовые признаки дождевых червей – положение пояса и пубертатных валиков (Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997). При этом иногда в одном районе и даже в одном биотопе могут встречаться особи, которые по этим признакам относятся к одному виду, но существенно различаются размерами и окраской. Интересный пример морфологического полиморфизма такого рода – *Dendrobaena schmidti* (Michaelsen, 1907), кавказский эндемик, который во многих биотопах является доминантным видом. Для этого вида Михаэльсен отметил существование пурпурных и неокрашенных форм и описал две из них как *D. schmidti* forma *surbienensis* и *D. schmidti* forma *montana* (Michaelsen, 1907). Широко варьируют и размеры тела (от 35 до 160 мм), причем разные формы часто встречаются симпатрично. В 1966 г. непигментированные особи, у которых начало пояса сдвинуто к головному концу тела на один сегмент, были выделены из *D. schmidti* как партеногенетический подвид *D. schmidti tellermanica* (Перель, 1966). Оказалось, что данный подвид имеет гораздо больший ареал, чем пигментированная форма, и встречается далеко за пределами Кавказа. Впоследствии были найдены популяции *D. schmidti tellermanica* со зрелыми сперматозоидами и сперматофорами, в связи с чем в 2003 г. он вынесен в отдельный вид *D. tellermanica* (Всеволодова-Перель, 2003).

Э.Ш. Квавадзе (1985) разделил *D. schmidti* на восемь подвидов: ранее существовавшие *D. schmidti schmidti* и *D. schmidti tellermanica*; описанные Михаэльсеном *D. schmidti surbienensis* и *D. schmidti montana*; и четыре новых подвида – *D. schmidti colchica*, *D. schmidti marinae*, *D. schmidti malevichi* и *D. schmidti jaloniensis*. Основами для разделения послужили изменчивость в

окраске, различия в положении пубертатных бугорков (которые могли объясняться разной стадией жизненного цикла исследованных особей), отверстий семяприемников относительно щетинок *d* и в количестве пар семенных пузырьков, а впоследствии – форма двигательных и половых щетинок, установленная при помощи сканирующей электронной микроскопии (Квавадзе, 1985; Kvavadze et al., 2007). Правомерность выделения этих подвидов оспаривалась, так как различие в диагнозах было весьма небольшим, за исключением окраски и количества пар семенных пузырьков (Всеволодова-Перель, 2003). К спорным родственным таксонам можно отнести и вид *Dendrobaena baksanensis* Pizl, 1984, описанный по образцам из Баксанского ущелья. Однако более поздними исследователями этот вид в данной точке не был обнаружен.

И. Рапопорт (Rapoport, 2009) разделила *D. schmidti* на три морфологические формы: подстилочную, почвенно-подстилочную и почвенную. Различия в условиях обитания этих форм отражаются в их размерах, окраске и форме тела и времени ответной реакции на раздражение. Кроме того, некоторые различия отмечены и по положению щетинок пучка *ab* на папиллах.

Таким образом, в настоящее время не существует общепринятого разделения *D. schmidti sensu lato* на более мелкие таксоны (за исключением *D. tellermanica*), так как их разграничение затруднено отсутствием четких морфологических отличий и возможной географической изменчивостью: результаты разных авторов зависят от изученной популяции и использованных методов. Т.С. Перель (1982) предположила, что различия между формами, возможно, обусловлены разной пloidностью. В то же время, по данным Н. Бахтадзе с соавторами (Bakhtadze et al., 2003, 2005, 2008), число хромосом у разных подвидов *D. schmidti* одинаково ($2n = 36$), тогда как *D. tellermanica* является тетраплоидом ($4n = 72$).

Важнейшим дополнительным методом в систематике давно стал анализ последовательностей ДНК. Они универсальны и лучше отражают филогению, чем признаки, выявляемые методами цитогенетики, хемосистематики или электронной микроскопии. Особенно справедливо это в отношении дождевых червей, для которых было показано и описано очень большое скрытое генетическое разнообразие (King et al., 2008; Pérez-Losada et al., 2009; Shekhovtsov et al., 2016b, 2019). В этой работе мы исследовали генетическое разнообразие особей *D. schmidti*, различающихся размерами и окраской, из нескольких популяций Западного Кавказа.



Рис. 1. Точки сбора образцов. Номера точек соответствуют номерам в таблице.

Материалы и методы

Образцы *D. schmidti* были собраны в семи точках на Западном Кавказе (рис. 1, см. таблицу). Морфологическое определение проводили по ключу Всеволодовой-Перель (1997). С хвостового конца каждой особи был вырезан фрагмент ткани массой 10–50 мкг таким образом, чтобы сохранялась возможность проводить морфологическое определение, измерение длины тела и количества сегментов. Геномную ДНК выделяли на колонках фирмы «БиоСилика»

(Новосибирск) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Для амплификации фрагмента митохондриального гена *cox1* использовали универсальные праймеры HCO2198 (5'-TAAAC-TTCAG-GGTGA-CCAAA-AAATC-A-3') и LCO1490m (5'-ТАСТС-ААСАА-АТСАС-ААА GA-TATTG-G-3') (Folmer et al., 1994; Shekhovtsov et al., 2013). Смесь для амплификации содержала 1.5 мМ MgCl₂, 65 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.05 % Tween-20, 0.2 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0.3 мМ праймеров и 1 ед. рекомбинантной полимеразы TaqSE («Сибэнзим», Новосибирск).

Фрагмент рибосомальной ДНК, содержащий последовательность внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2) и фрагменты фланкирующих генов 5,8S и 28S рРНК, нарабатывали при помощи универсальных праймеров E28S-2 (5'-CC(G/T)CT-TCACT-CGCCG-TTA-3') и E58S-F1 (5'-ATCAC-TGGGT-TCGTG-CGT-3') (Shekhovtsov et al., 2016a). В смесь

Исследованная выборка *D. schmidti*

Точка	Место сбора	N	Длина × ширина (см)	Окраска
Группа I				
1	Хоста	2	5.1 × 0.5 6.4 × 0.8	Не пигментированы
2	Солохаул	3	7.5 × 0.8 7.0 × 0.7 –	Буроватая пигментация на дорзальной части передней половины тела
		1	–	Не пигментированы
3	Гуамское ущелье	3	5.1 × 0.5 5.1 × 0.5 5.3 × 0.5	Буроватая пигментация на дорзальной части передней половины тела
		1	5.1 × 0.5	Не пигментирован
5	Уруп	1	2.9 × 0.6	Не пигментирован
6	Преградная	4	7.0 × 0.6 4.8 × 0.5 5.3 × 0.5 3.6 × 0.5	Слабо пигментированы до пояса Не пигментированы
7	Эльбрусский	2	5.4 × 0.7 5.5 × 0.7	Пурпурная пигментация до пояса
Группа II				
1	Хоста	2	2.9 × 0.2 2.1 × 0.2	Выраженная пурпурная пигментация на передней половине тела, заходит и на вентральную часть
		1	2.5 × 0.2	Полностью пурпурная пигментация до хвоста
4	Мезмай	4	1.7 × 0.2 3.5 × 0.2 2.6 × 0.2 2.2 × 2.0	Полностью пурпурная пигментация до хвоста

Примечание. Номера точек сбора соответствуют номерам на рис. 1. N – число особей; прочерк – червь был оборван, поэтому длина не указана.

для амплификации был добавлен 5 % ДМСО, необходимый для разрушения стабильных вторичных структур, образуемых этим фрагментом ДНК.

Образцы секвенировали по методу Сэнгера при помощи набора BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез полученных продуктов проведен в Межинститутском центре секвенирования СО РАН. Обработку и редактирование секвенограмм выполняли в программе Chromas (Technelysium Pty Ltd). Полученные последовательности были депонированы в базу данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под номерами MN340181–MN340200, MN340202–MN340205 (*cox1*) и MN340207–MN340230 (ITS2). Выравнивание последовательностей проводили при помощи программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Филогенетические деревья строили байесовским методом в программе MrBayes v.3.2.6 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). В качестве внешних групп использовали последовательности из базы данных GenBank, относящиеся к различным видам рода *Dendrobaena*; для *cox1*: *D. octaedra* (MH755678), *D. attemsi* (KJ772502), *D. veneta* (FJ214233), *D. karacadagi* (MH476311), *D. semitica* (MH476309), *D. pavlicecki* (MH476308), *D. pantaleonis* (MH476307), *D. orientalis* (MH476306), *D. hrabei* (MH476305); для ITS2: *D. octaedra* (KX651399), *D. byblica* (KX651415), *D. attemsi* (KX651397), *D. platyura* (KT823916), *D. pen-*

theri (KT823915), *D. ganglbaueri* (KT823909), *D. alpina* (KX651396, MH469554), *D. pantaleonis* (MH469555), *D. orientalis* (MH469553), *D. hortensis* (MH469549), *D. semitica* (MH469552), *D. karacadagi* (MH469547), *D. veneta* (MH469546). Кроме того, мы взяли последовательности вида *Eisenia fetida* (*cox1*: JX531618; ITS2: JX531571). Для обоих маркеров программой MrModeltest v.2 (Nylander, 2004) выбрана модель замен GTR+I+G. Проведено по 10 млн реплик анализа, разделенных на две цепи; первые 25 % реплик были отброшены. После выполнения анализов значения среднеекватрического отклонения расщепленных частот составили менее 0.01. Узлы с апостериорными вероятностями меньше 0.5 были сведены в политомию.

Значения критериев Стьюдента и Крамера–Уэлча вычисляли при помощи пакета программ MathPortal (www.mathportal.org).

Результаты

Нами получены нуклеотидные последовательности *cox1* и ITS2 для 24 половозрелых особей *D. schmidti* с выраженными половыми признаками. Все последовательности *cox1* имели идентичную длину (658 п. н.). На филогенетическом дереве образцы разбиваются на две клады, названные нами группой I и группой II (рис. 2). Обе клады характеризовались высокими значениями апостериорных

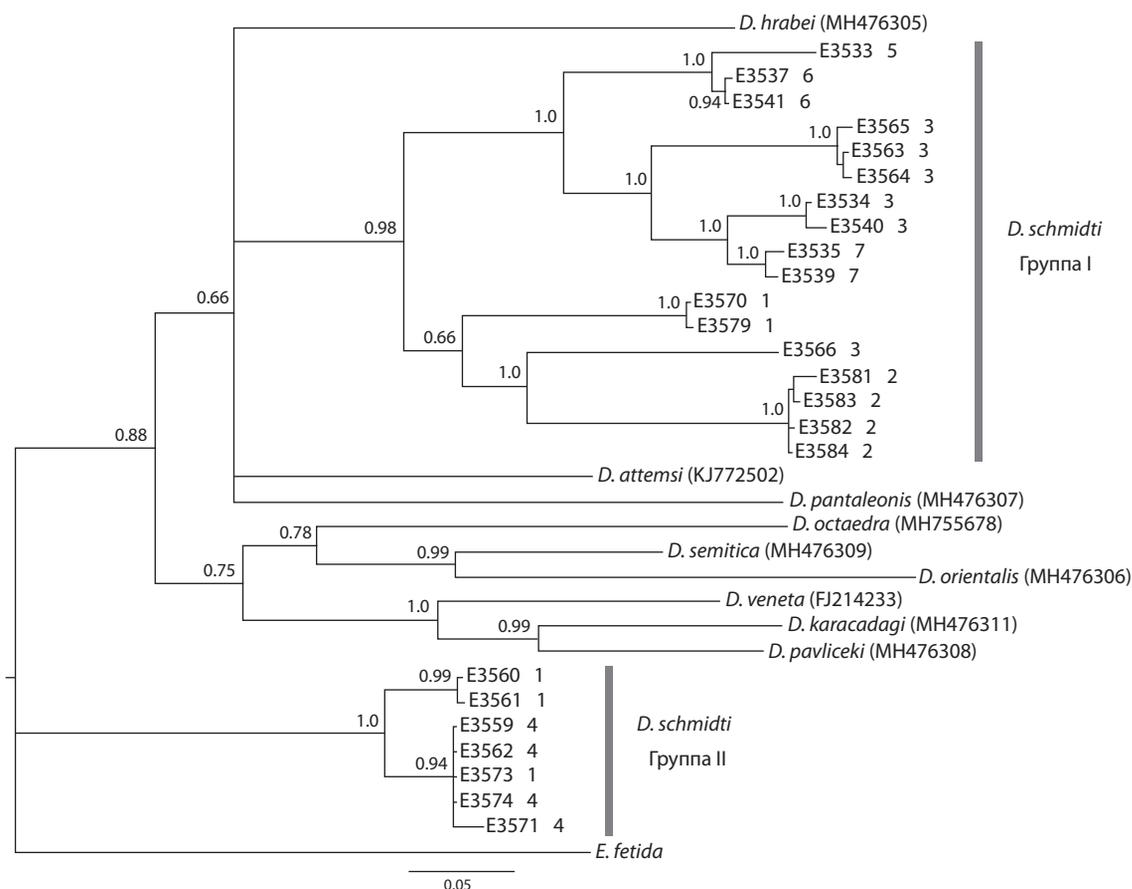


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1* байесовским методом.

Здесь и на рис. 3: в узлах приведены значения апостериорных вероятностей >0.5; цифры возле ОТЕ обозначают номера популяций, указанные в таблице и на рис. 1.

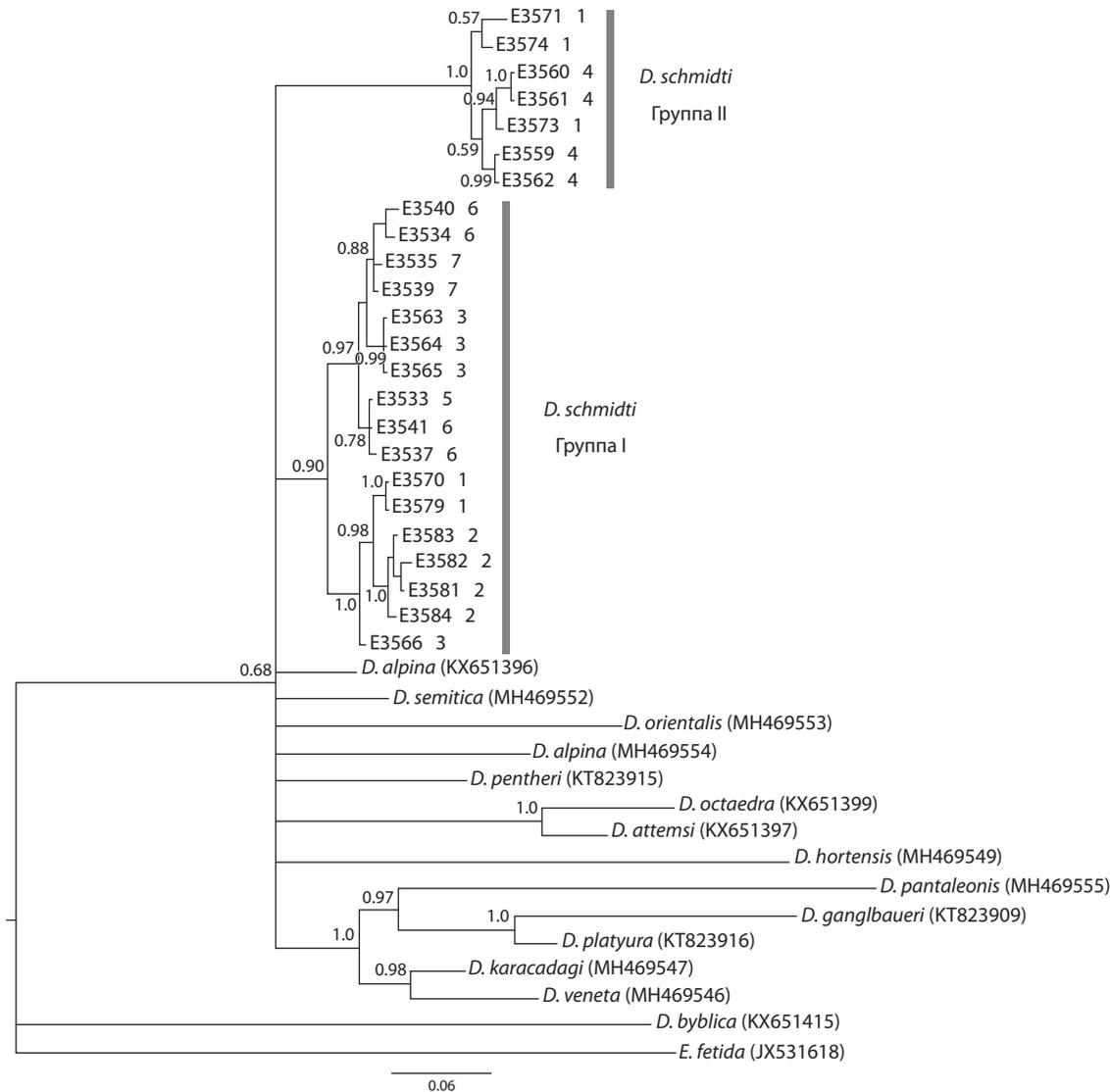


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям ITS2 байесовским методом.

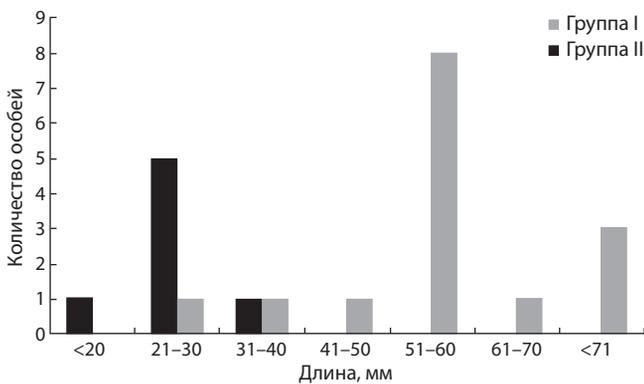


Рис. 4. Гистограмма распределения длин исследованных особей.

вероятностей. Каждая из ветвей *D. schmidti*, в свою очередь, подразделяется на ряд более мелких групп.

Длина последовательностей ITS2 варьировала в широких пределах (549–621 п. н.). Необходимо отметить,

что как гены рибосомальной РНК, так и разделяющие их транскрибируемые спейсеры обладают сложной вторичной структурой. Из-за этого их амплификация проблематична и не проходит без добавления денатурирующих агентов, например ДМСО. Но даже с его добавлением в последовательностях группы II образовывалась шпилька, из-за чего некоторые последовательности при синтезе их секвензой были укорочены и содержали внутреннюю делецию длиной около 78 нуклеотидов. В связи с этим данный участок не мог быть прочитан качественно и в полученных последовательностях нами пропущен и исключен также из выравнивания.

По последовательностям ITS2 исследованные образцы разделились на те же две группы, что и на дереве, построенном по фрагменту гена *cox1* (рис. 3). Представители обеих групп были найдены только в точке 1 (см. рис. 1).

Все изученные особи имели типичный для *D. schmidti* диагноз. Некоторые морфологические отличия наблюдались у представителей выявленных групп I и II (см.

таблицу). Группа I в основном включает в себя непигментированных и слабо пигментированных червей. В случае наличия бурой (пурпурной) окраски она доходит только до пояса, в то время как черви группы II пигментированы полностью или почти полностью, а сама окраска выражена заметно сильнее. Наблюдаются и некоторые различия в размерах тела: у большей части особей, относящихся к группе I, длина тела более 5 см, а у относящихся к группе II – менее 3 см (рис. 4). Значения критериев Стьюдента и Крамера–Уэлча для имеющихся выборок показали, что различия между ними достоверны при $p < 0.01$.

Обсуждение

Систематика и морфологическая идентификация дождевых червей бывают проблематичными в тех случаях, когда в группе близкородственных видов внутривидовая изменчивость перекрывает межвидовую. Применение молекулярно-генетических методов позволило повысить надежность идентификации, однако вновь подняло проблему применения концепции вида к данной группе: внутривидовая нуклеотидная изменчивость часто бывает весьма велика (Shekhovtsov et al., 2018), что и было отмечено нами для *D. schmidti*. Это влечет за собой вопрос, где же проводить границу между потенциальными видами-двойниками. По нашему мнению, на данном этапе молекулярно-генетические данные могут быть основой для дробления вида лишь в случае его полифилии. В связи с этим можно констатировать, что в изученной нами выборке с Западного Кавказа выделяются две группы, которые следовало бы считать отдельными видами; тем не менее пока мы воздержимся от их формального описания. При этом нуклеотидная изменчивость внутри этих групп также велика, особенно в случае группы I, нуклеотидные дистанции между образцами которой по гену *cox1* выше чем, например, между видами *D. karacadagi* и *D. pavlicei* (см. рис. 2), так что потенциальное количество видов внутри *D. schmidti* может оказаться и выше.

В пользу последнего утверждения говорит и тот факт, что в рассматриваемой выборке все особи имели типичное состояние диагностических признаков, характерное для *D. s. schmidti*. Почти все описанные в литературе подвиды несколько отличаются от типового диагноза и распространены в южной части ареала, главным образом в Грузии, а следовательно, более обширная по географическому охвату выборка наверняка выявит еще более глубокое генетическое разнообразие этого комплекса.

Несмотря на отсутствие изменчивости по диагностическим признакам между группами I и II, их представители характеризуются различиями по размеру и окраске тела. Эти различия несомненны и статистически достоверны, но тем не менее перекрываются. Таким образом, дифференциация выявленных групп только по внешнему виду проблематична и может быть применена лишь для больших выборок.

Заключение

На основании полученных данных мы пришли к заключению, что из *D. schmidti* можно выделить как минимум два отдельных вида, сходных по диагностическим признакам, но различающихся внешним видом и последова-

тельными ДНК. Выскажем предположение, что таких видов может оказаться больше, так как нами исследована лишь малая часть обширного ареала *D. schmidti*.

Список литературы / References

- Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви России: кадастр и определитель. М.: Наука, 1997.
[Vsevolodova-Perel T.S. Earthworms of Russia: Inventory and Key. Moscow: Nauka Publ., 1997. (in Russian)]
- Всеволодова-Перель Т.С. Дополнение к фауне дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) Северного Кавказа. Зоол. журн. 2003; 82(2):275-280.
[Vsevolodova-Perel T.S. Addition to the fauna of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) of the Northern Caucasus. Zoologicheskii Zhurnal = Zoological Journal. 2003;82(2):275-80. (in Russian)]
- Квавадзе Э.Ш. Дождевые черви (Lumbricidae) Кавказа. Тбилиси: Мецниереба, 1985.
[Kvavadze E.Sh. Earthworms (Lumbricidae) of the Caucasus. Tbilisi: Mezniereba Publ., 1985. (in Russian)]
- Перель Т.С. Дождевые черви в почвах лесов Северо-Западного Кавказа. В: Влияние животных на продуктивность лесных биогеоценозов. М.: Наука, 1966;146-165.
[Perel T.S. Earthworms in forest soils of the Northwestern Caucasus. In: The Impact of Animals on the Productivity of Forest Biogeocenoses. Moscow: Nauka Publ., 1966;146-165. (in Russian)]
- Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. М.: Наука, 1979.
[Perel T.S. Range and Regularities in the Distribution of Earthworms of the USSR Fauna. Moscow: Nauka Publ., 1979. (in Russian)]
- Перель Т.С. Географические особенности размножения дождевых червей сем. Lumbricidae (Oligochaeta). Журн. общ. биологии. 1982;5:649-658.
[Perel T.S. Geographical patterns of the reproduction of Lumbricidae earthworms (Oligochaeta). Zhurnal Obshchey Biologii = Journal of General Biology. 1982;5:649-658. (in Russian)]
- Bakhtadze N., Bakhtadze G., Kvavadze E. Results of karyologic investigation of *Dendrobaena (C.) marinae* Kvavadze, 1985 (Oligochaeta, Lumbricidae). Bull. Georgian Acad. Sci. 2003;167(2):315-316.
- Bakhtadze N., Bakhtadze G., Kvavadze E. The results of study of the genus *Dendrobaena* (Oligochaeta: Lumbricidae) species chromosome numbers. Bull. Georgian Acad. Sci. 2005;172(1):141-143.
- Bakhtadze N.G., Bakhtadze G.I., Kvavadze E.S. The chromosome numbers of Georgian earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae). Comp. Cytogenet. 2008;2(1):79-83.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994;3(5):294-299.
- King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. Mol. Ecol. 2008;17(21):4684-4698. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x.
- Kvavadze E., Bakhtadze N., Bakhtadze G. About validity of genus *Omodeoia* Kvavadze, 1993 (Oligochaeta, Lumbricidae). Proc. Georgian Acad. Sci. Ser. B. 2007;5:1-7.
- Michaelsen W. Die Lumbriciden des Kaukasisches Museum in Tiflis. Izv. Kavk. Mus. 1907;3:81-93.
- Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Evol. Biol. Centre, Uppsala Univ. 2004.
- Pérez-Losada M., Ricoy M., Marshall J.C., Domínguez J. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 2009;52(2):293-302. DOI 10.1016/j.ympev.2009.04.003.
- Pizl V. *Dendrobaena baksanensis* sp. n. (Oligochaeta, Lumbricidae), a new earthworm from Caucasus, USSR. Vestn. Cesk. Spol. Zool. 1984;48(2):115-117.

- Rapoport I.B. Morpho-ecological forms of *Dendrobaena schmidti* Michaelsen, 1907 (Oligochaeta, Lumbricidae) of North Caucasus. In: Fourth International Oligochaete Taxonomy Meetings: Book of Abstracts. Diyarbakir, Turkey, 2009;39.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic interference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19:1572-1574. DOI 10.1093/bioinformatics/btg180.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bazarova N.E., Bulakhova N.A., Porco D., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Eur. J. Soil. Biol.* 2016a;75: 151-156. DOI 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Vinokurov N.N., Peltek S.E. Phylogeography of *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) from the north of Asia. *Polar Biol.* 2018;41:237-247. DOI 10.1007/s00300-017-2184-2.
- Shekhovtsov S.V., Ershov N.I., Vasiliev G.N., Peltek S.E. Transcriptional analysis confirms differences among nuclear genomes of cryptic earthworm lineages living in sympatry. *BMC Evol. Biol.* 2019;19(S1):50. DOI 10.1186/s12862-019-1370-y.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiöld's earthworm, *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2013;58: 13-18. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.05.004.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic. *Biol. Inv.* 2016b;18(3):751-761. DOI 10.1007/s10530-015-1045-6.

ORCID ID

S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
I.B. Rapoport orcid.org/0000-0002-6766-1482
T.V. Poluboyarova orcid.org/0000-0002-5652-0553
A.P. Geraskina orcid.org/0000-0002-8365-5787
E.V. Golovanova orcid.org/0000-0003-0871-9274
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Благодарности. Авторы благодарят двух анонимных рецензентов за важные замечания. Работа поддержана РФФИ (гранты № 18-04-00961_a и 19-04-00661_a), а также бюджетным проектом 0324-2019-0040-С-01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.07.2019. После доработки 23.08.2019. Принята к публикации 25.09.2019.

Detection of *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. in *Hyalomma anatolicum* ticks collected in Tajikistan

M.Yu. Kartashov^{1, 2}, Yu.V. Kononova^{1, 3}, I.D. Petrova¹, N.L. Tupota¹, T.P. Mikryukova^{1, 3}, V.A. Ternovoi^{1, 3}, F.H. Tishkova⁵, V.B. Loktev^{1, 2, 3, 4} 

¹ State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁵ Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Tajikistan

 e-mail: loktev@vector.nsc.ru

Abstract. The objectives of our study were to survey the prevalence of genetic markers for *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., and *Theileria* spp. in *Hyalomma anatolicum* ticks collected in southwestern Tajikistan and to perform sequencing and phylogenetic analysis of fragments of the 16S rRNA gene and *groESL* operon from *Ehrlichia* spp. and fragments of the 18S rRNA gene of *Theileria* spp. detected in *H. anatolicum* ticks. *Hyalomma anatolicum* ticks collected in the Tursunzade and Rudaki districts of Tajikistan were tested for DNA of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., and *Theileria* spp. by PCR with specific primers. The amplified fragments were sequenced and analyzed. DNA of *Ehrlichia* spp. (3.3 %) and *Theileria* spp. (3.3 %) was detected only in *H. anatolicum* ticks collected from the Rudaki district, and DNA of *Ehrlichia* spp. (0.7 %) was found in *H. anatolicum* ticks from the Tursunzade district. Sequence analysis of fragments of the 16S rRNA gene and *groESL* operon from *Ehrlichia* spp. revealed high similarity to *Ehrlichia* spp. The Tajik isolates of *Theileria* spp. were genotyped as *Theileria annulata* based on the analysis of 18S rRNA gene sequences. The phylogenetic analysis demonstrates that *Ehrlichia* spp. isolates are highly similar to *Ehrlichia* spp. circulating in China and Brazil. The isolate Tajikistan-5 is closely related to the putative novel species *Ehrlichia mineirensis*. The Tajik isolates of *Theileria* spp. were clustered with *T. annulata* isolates from Turkey, Iran, Pakistan, and China by phylogenetic analyses.

Key words: *Hyalomma anatolicum*; tick-borne infections; *Ehrlichia* spp.; *Theileria* spp.; Tajikistan.

For citation: Kartashov M.Yu., Kononova Yu.V., Petrova I.D., Tupota N.L., Mikryukova T.P., Ternovoi V.A., Tishkova F.H., Loktev V.B. Detection of *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. in *Hyalomma anatolicum* ticks collected in Tajikistan. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):55-59. DOI 10.18699/VJ20.595

Выявление *Ehrlichia* spp. и *Theileria* spp. в клещах *Hyalomma anatolicum*, собранных в Таджикистане

М.Ю. Карташов^{1, 2}, Ю.В. Кононова^{1, 3}, И.Д. Петрова¹, Н.Л. Тупота¹, Т.П. Микрюкова^{1, 3}, В.А. Терновой^{1, 3}, Ф.Х. Тишкова⁵, В.Б. Локтев^{1, 2, 3, 4} 

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁵ Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины, Душанбе, Таджикистан

 e-mail: loktev@vector.nsc.ru

Аннотация. Исследовано наличие генетического материала *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. и *Theileria* spp. в клещах *Hyalomma anatolicum*, собранных в юго-западной части Таджикистана, с последующим секвенированием и филогенетическим анализом фрагментов 16S рРНК гена и *groESL* оперона для *Ehrlichia* spp. и фрагмента гена 18S рРНК для *Theileria* spp., обнаруженного в изученных клещах. Клещи *H. anatolicum* были собраны в районах Турсунзаде и Рудаки и исследованы с использованием специфичных праймеров с помощью ПЦР на наличие генетического материала *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. и *Theileria* spp. Выделенные ПЦР-фрагменты генов 16S рРНК, *groESL* оперона и 18S рРНК были секвенированы и проведен их филогенетический анализ с целью генотипирования обнаруженных изолятов клещевых патогенов. В клещах, собранных в районе Рудаки, обнаружена ДНК *Ehrlichia* spp. (3.3 %) и *Theileria* spp. (3.3 %), а в Турсунзаде – ДНК *Ehrlichia* spp. (0.7 %). Секвенирование фрагментов гена 16S рРНК и *groESL* оперона *Ehrlichia* spp. показало высокий уровень гомологии нуклеотидной последовательности с известными последовательностями *Ehrlichia* spp. Таджикские изоляты *Theileria* spp. были генотипированы как *Theileria annulata* на основе анализа последовательности гена 18S рРНК. Филогенетический анализ показал,

что таджикские изоляты *Ehrlichia* spp. очень близки с изолятами *Ehrlichia* spp., циркулирующими в Китае и Бразилии. Изолят Таджикистан-5 кластеризуется с предполагаемым новым видом *Ehrlichia mineirensis*. Таджикские изоляты *Theileria* spp. были генетически схожи с вариантами *T. annulata*, циркулирующими в Турции, Иране, Пакистане и Китае.

Ключевые слова: *Hyalomma anatolicum*; клещевые инфекции; *Ehrlichia* spp.; *Theileria* spp.; Таджикистан.

Introduction

Ixodid ticks transmit various pathogens to both humans and animals in Asia (Tishkova et al., 2012; Wu et al., 2013). Twenty-three species of ixodid ticks have been described in this region of Central Asia, with the predominant ixodid tick species being *Hyalomma anatolicum* Koch, 1844 (Rasulov, 2007). The Crimean-Congo hemorrhagic fever, Sindbis, and Wad Medani viruses were previously detected in ixodid ticks in Tajikistan and other Asian countries (Begum et al., 1970; Gresikova et al., 1978; Petrova et al., 2013). *Hyalomma anatolicum* ticks are also known to transmit bacterial and parasite infections such as Lyme disease, babesiosis, piroplasmosis, theileriosis, and anaplasmosis (Tishkova et al., 2012; Wu et al., 2013). *Theileria annulata* (Piroplasmida: Family Theileriidae, Genus *Theileria*) is the causative agent of theileriosis in domestic animals, which is transmitted by 15 species of ixodid ticks of the genus *Hyalomma* (Robinson, 1982). *Ehrlichia* spp. (Family Anaplasmataceae, Genus *Ehrlichia*) are intracellular Gram-negative bacteria, ecologically associated with ixodid ticks and their animal hosts (Parola et al., 2001). The pathogenicity to domestic and wild animals, as well as to humans, has been demonstrated in *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* and *E. ruminantium* (Aguiar et al., 2014; Cabezas-Cruz et al., 2014). Currently, there are no published studies on genetic markers and genotyping of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., and *Theileria* spp. in *H. anatolicum* ticks in Tajikistan.

The objectives of this study were to survey the prevalence of genetic markers for these tick-borne infections in *H. anatolicum* ticks collected in southwestern Tajikistan, and to perform sequence and phylogenetic analysis of *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. detected in the ticks.

Materials and methods

Tick harvesting. Adult ticks were collected from domestic animals in several villages of the Rudaki district (Somoniyon N 38°26'27", E 68°46'28") and the Tursunzade district (Tursunzade N 38°30'39", E 68°13'49") in southwestern Tajikistan in July 2009 (Fig. 1). The ticks were transported and samples for analysis were prepared as described in (Petrova et al., 2013). Tick species were identified by morphological examination with subsequent confirmation by PCR and sequencing of PCR products of a 16S rRNA fragment of the mitochondrial genome of the ticks.

PCR detection of genetic markers. DNA was isolated from tick homogenates by phenol/chloroform extraction using a commercial kit (Lytech, Moscow, Russia) following manufacturer's instructions. It was kept at -20 °C until use. The genetic markers of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in ticks were detected by PCR with specific primers (see the Table). The PCR fragments were purified using Wizard SV Gel and a PCR Clean-Up System kit (Promega, USA) according to manu-

facturer's instructions. All PCR fragments were sequenced in a 3130 Genetic Analyzer automated capillary sequencer (Applied Biosystems Inc.). DNA sequencing reactions were performed with BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied BioSystems, USA). Both strands of each gene fragment were directly sequenced; each sample was sequenced twice. Precautions were taken at all steps of analysis to avoid cross-contamination among samples.

Nucleotide sequences and phylogenetic analyses. DNA sequences were compared with sequences available in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) on <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Evolutionary analyses were conducted with MEGA5 software (Tamura et al., 2011). Multisequence alignments were performed using ClustalX. For each analyzed gene a phylogram was constructed by the maximum likelihood method. Phylogenetic distances between homologous sequences were calculated using Kimura's two-parameter model. Confidence levels for individual branches of the resulting tree were determined by bootstrap analysis with 1000 replicates.

Results and discussion

Tick harvesting

Adult *H. anatolicum* ticks (138 females and 244 males) were collected and grouped in 137 pools. Tick species were identified by sequencing a fragment of 16S rRNA mitochondrial gene for all pools. Two original variants of 16S rRNA mitochondrial gene fragment sequences found in these ticks were submitted to GenBank (accession numbers KP059123 and KP059124). The nucleotide fragments showed 99.9 % similarity to the corresponding *H. anatolicum* sequences from GenBank. These tick pools were tested by PCR for genetic markers of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., and *Theileria* spp. and other ticks were used for genotyping. Of those ticks, 290 (179 males and 111 females)



Fig. 1. Tick collection sites in Tajikistan: 1, Tursunzade district; 2, Rudaki district.

Primers used for PCR identification of ticks and tick-borne infections in the present study

Species detected	Gene	Primers	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size, bp	Reference
<i>Hyalomma</i> spp. (ticks)	16S rRNA gene (mitochondrial)	H16Mf	GATTCTCATCGGTCTAACTCAG	425	This study
		H16Mr	AGTATTTTGACTATACAAGGTATTG		
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	CS409d	CCTATGGCTATTATGCTTGC	765	Roux et al., 1997
		RP1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
<i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp.	18S rRNA gene	BS1	GACGGTAGGGTATTGGCCT	1120	Rar et al., 2005
		BS2	ATTCACCGGATCACTCGATC		
<i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.	16S rRNA gene	Erl1	GAACGAACGCTGGCGGCAAGC	1375	Rar et al., 2010
		Erl6	GACCCAACCTTAAATGGCTGC		
		Erl7	TAACACATGCAAGTCGAACG		
		Erl8	CTTCGAGTTAAGCCAATTCC		
	<i>groESL</i> operon	HS1-f	CGYCACTGGGCTGTAATGAA	1340	Sumner et al., 1997
		HS6-r	CCWCCWGGTACWACACCTTC		

were collected in the Tursunzade district and 92 (65 males and 27 females) from the Rudaki district. The PCR tests for *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. were positive in the range 0.7–3.3 %. The PCR tests for *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., and *Babesia* spp. were negative in all tick samples.

Theileria identification

Theileria spp. was detected in 3.3 % ticks from Rudaki but not in ticks from Tursunzade. The amplified PCR fragments of 18S rRNA (1090–1092 bp) were isolated and sequenced (GenBank accessions KM288517–KM288519). The sequences were 100 % identical to isolates of *Theileria annulata* circulating in Turkey (AY508463) and Iran (KF429799, HM628581), similar by 99.9 % to isolated from Pakistan (JQ743630) and China (EU073963) and by 99.7 % to isolates from Spain (DQ287944). Phylogenetic analysis confirmed that *Theileria* spp. isolates from the Rudaki district of Tajikistan belonged to *Th. annulata* (Fig. 2). The analysis of 18S rRNA gene fragment for three isolates of *Th. annulata* from southwestern Tajikistan showed that all isolates were genetically identical (100 % similarity).

Ehrlichia identification

The presence of *Ehrlichia* spp. has not been previously documented in ticks and animals in Tajikistan. DNA of *Ehrlichia* spp. was detected in five pools of *H. anatolicum* ticks collected in the Rudaki and Tursunzade districts. The infection rates for *Ehrlichia* spp. were 3.3 % in Rudaki and 0.7 % in Tursunzade. The fragments of the 16S rRNA gene (1291–1352 bp) and *groESL* operon (1248–1315 bp) were sequenced (KM995818–KM995821, KP059122, KJ930191–KJ930195). The nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments were highly conserved (99.5–100 %) among studied isolates. The similarity levels of the studied 16S rRNA fragments to *E. chaffeensis* (CP007478), *E. canis* (KJ513197), and *E. muris* (NR121714) were 99.2, 99.2, and 99.3 %, respectively.

The phylogenetic tree generated using *Ehrlichia* spp. *groESL* operon fragment sequences was markedly different

from the tree based on 16S rRNA sequences (Fig. 2, b, c). The 16S rRNA gene fragment analysis (1140 nucleotides) showed that all isolated *Ehrlichia* spp. were genetically close (see Fig. 2, b). The studied isolates grouped in the same branch of the phylogenetic tree as isolates from the Fujian province in Southeastern China (DQ324547) and the Tibet Autonomous Region of China (AF414399). The Tibetan isolate was grouped with the *E. canis* branch, which is genetically close to the species *E. chaffeensis*, pathogenic for humans (Wen et al., 2002). We note that the Tajik isolates were most similar to Chinese isolates from regions of China that do not border Tajikistan. The phylogenetic tree generated using *Ehrlichia* spp. *groESL* operon fragment sequences was markedly different from the tree based on 16S rRNA sequences (see Fig. 2, c). The nucleotide sequences of *groESL* operon *Ehrlichia* spp. found in Tajikistan are separated into three groups. Tajikistan 1 and 2 isolates were closest to two isolates *Ehrlichia* spp. from different regions of China (Xinjiang, *Hyalomma asiaticum*; Yunnan, *Rhipicephalus microplus*), Tajikistan 3 and 4 cluster with a different Chinese isolate (Xinjiang, *Hyalomma asiaticum*). Tajikistan 5 showed high similarity to *Ehrlichia* spp. (JX629806) isolated in Brazil from a *Rhipicephalus microplus* tick (Cruz et al., 2012). Tajikistan 5 has 13 nucleotide and 2 amino acid substitutions in comparison to the Brazilian isolate. The American isolate was previously identified as a new species of *Ehrlichia* spp. named *E. mineirensis*. It causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis in experimentally infected calf (Aguiar et al., 2014).

Tajikistan 1–4 isolates clustered with Chinese isolates from Xinjiang and Yunnan Provinces. Xinjiang Province shares borders with Tajikistan in southwestern China, unlike Yunnan. Tajikistan 5 isolate was the most genetically distinct from other *Ehrlichia* spp. grouping with UFMG-EV and UFMT-BV isolates from Brazil and BOV2010 isolate from Canada (Gajadhar et al., 2010; Aguilar et al., 2014; Cabezas-Cruz et al., 2014). We infer that Tajikistan 5 isolate belongs to the putative novel species of *Ehrlichia* spp. previously named *E. mineirensis*.

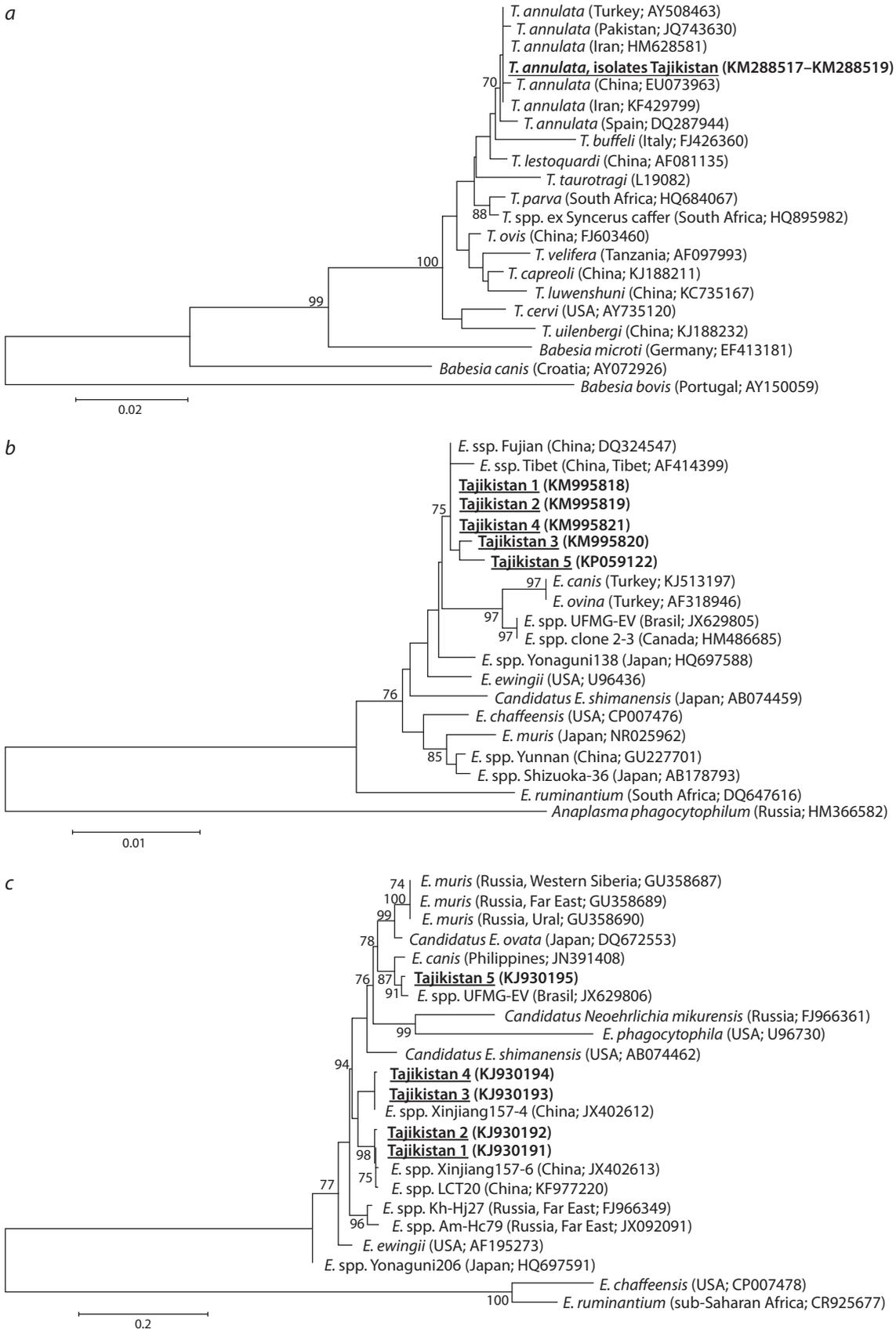


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Theileria* spp. and *Ehrlichia* spp. isolates: *a*, based on 18S rRNA of *Theileria* spp.; *b*, based on the 16S rRNA gene of *Ehrlichia* spp.; *c*, based on the *groESL* operon of *Ehrlichia* spp.

For each gene analyzed, a phylogram was constructed by the maximum likelihood method. Phylogenetic distances between homologous sequences were calculated using Kimura's two-parameter model. Confidence values for individual branches of the resulting tree were determined by bootstrap analysis with 1000 replicates.

Conclusions

Hyalomma anatolicum ticks collected in Tajikistan were tested by PCR for markers of tick-borne bacterial and protozoan infections. DNA of *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. was detected in ticks collected from the Rudaki and Tursunzade districts. The infection rates for *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp. DNA markers ranged within 0.7–3.3 % according to PCR. Fragments of the 16S rRNA gene and *groESL* operon from *Ehrlichia* spp. and of the 18S rRNA gene from *Theileria* spp. were isolated and sequenced from *H. anatolicum* ticks. Phylogenetic analysis demonstrated that *Ehrlichia* spp. isolates were highly similar to *Ehrlichia* spp. circulating in China and Brazil. Isolate Tajikistan 5 was closely related to the putative novel species *E. mineirensis*. The Tajik isolates of *Theileria* spp. were genotyped as *Theileria annulate*, and fragments of the 18S rRNA gene from these isolates were highly similar to the 18S rRNA gene of *T. annulata* isolates from Turkey, Iran, Pakistan and China.

References

- Aguiar D.M., Ziliani T.F., Zhang X., Melo A.L., Braga I.A., Witter R. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(5):537-544. DOI 10.1016/j.ttbdis.2014.03.010.
- Begum F., Wissemann C.J., Casals J. Tick-borne viruses of West Pakistan: IV. Viruses similar to or identical with, Crimean hemorrhagic fever (Congo-Semunya), Wad Medani and Pak Argas 461 isolated from ticks of the Changa Manga Forest, Lahore District, and of Hunza, Gilgit Agency, W. Pakistan. *Am. J. Epidemiol.* 1970;92(3):197-202.
- Cabezas-Cruz A., Valdes J.J., de la Fuente J. The glycoprotein TRP36 of *Ehrlichia* sp. UFMG-EV and related cattle pathogen *Ehrlichia* sp. UFMT-BV evolved from a highly variable clade of *E. canis* under adaptive diversifying selection. *Parasit. Vectors.* 2014;7:584. DOI 10.1186/s13071-014-0584-5.
- Cruz A.C., Zweygarth E., Ribeiro M.F., da Silveira J.A., de la Fuente J., Grubhoffer L., Valdes J.J., Passos L.M. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasit. Vectors.* 2012;11(5):291. DOI 10.1186/1756-3305-5-291.
- Gajadhar A.A., Lobanov V., Scandrett W.B., Campbell J., Al-Adhami B. A novel *Ehrlichia* genotype detected in naturally infected cattle in North America. *Vet. Parasitol.* 2010;173(3-4):324-329. DOI 10.1016/j.vetpar.2010.06.034.
- Gresikova M., Sekeyova M., Tempera G., Guglielmino S., Castro A. Identification of a Sindbis virus strain isolated from *Hyalomma marginatum* ticks in Sicily. *Acta Virol.* 1978;22(3):231-232.
- Parola P., Inokuma H., Camicas J.L., Brouqui P., Raoult D. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae and *Ehrlichiae* in African ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 2001;7(6):1014-1017. DOI 10.3201/eid0706.010616.
- Petrova I.D., Kononova Iu.V., Chausov E.V., Shestopalov A.M., Tishkova F.Kh. Genetic variants of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus circulating in endemic areas of Southern Tajikistan in 2009. *Molecular Genetics, Microbiology, and Virology.* 2013;(3):29-36. DOI 10.3103/S0891416813030063.
- Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in the Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010;1(1):57-65. DOI 10.1016/j.ttbdis.2010.01.002.
- Rar V.A., Maksimova T.G., Zakharenko L.P., Bolykhina S.A., Dobrotvorskyy A.K., Morozova O.V. *Babesia* DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in southwestern Siberia, Russia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2005;5(3):285-287. DOI 10.1089/vbz.2005.5.285.
- Rasulov I. Ticks status in Central Asia with a special emphasis on Uzbekistan. *Parasitol. Res.* 2007;101(Suppl.2):183-186.
- Robinson P.M. Theileriosis annulata and its transmission – a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 1982;14(1):3-12.
- Roux V., Rydkina E., Eremeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997;47(2):252-261. DOI 10.1099/00207713-47-2-252.
- Sumner J.W., Nicholson W.L., Massung R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(8):2087-2092.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011;28(10):2731-2739. DOI 10.1093/molbev/msr121.
- Tishkova F.H., Belobrova E.A., Valikhodzhaeva M., Atkinson B., Hewson R., Mullojonova M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Tajikistan. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2012;12(9):722-726. DOI 10.1089/vbz.2011.0769.
- Wen B., Jian R., Zhang Y., Chen R. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(9):3286-3290. DOI 10.1128/jcm.40.9.3286-3290.2002.
- Wu X.B., Na R.H., Wei S.S., Zhu J.S., Peng H.J. Distribution of tick-borne diseases in China. *Parasit. Vectors.* 2013;6:119. DOI 10.1186/1756-3305-6-119.

ORCID ID

M.Yu. Kartashov orcid.org/0000-0002-7857-6822
Yu.V. Kononova orcid.org/0000-0002-3677-3668
I.D. Petrova orcid.org/0000-0002-0276-9839
N.L. Tupota orcid.org/0000-0001-6150-370X

T.P. Mikryukova orcid.org/0000-0003-4350-4260
V.A. Ternovoi orcid.org/0000-0003-1275-171X
F.H. Tishkova orcid.org/0000-0001-5034-5005
V.B. Loktev orcid.org/0000-0002-0229-321X

Acknowledgements. This work was supported in part by the Federal Targeted Program “Scientific Potential of Higher Schools” (projects 2.1.1.7515 and 2.1.1/2743), State contract 6.657.2014/K, and the Russian Foundation for Basic Research, project 15-34-50113. The authors also acknowledge the support from the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

Conflict of interest. The authors of this study have no commercial associations that might create a conflict of interest to the present work. All authors are working in non-profit federal organizations. No competing financial interests exist.

Received July 5, 2019. Revised August 5, 2019. Accepted August 5, 2019.

Wild pea (*Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn. s.l.) at the periphery of its range: Zagros Mountains

O.E. Kosterin^{1,2}✉, V.S. Bogdanova¹, A.V. Mglinets¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: kosterin@bionet.nsc.ru

Abstract. Characteristics of wild peas and their habitats at the periphery of the range are interesting with respect to their potential importance for pre-breeding programs aimed at selection for different environmental conditions. However, wild pea diversity in peripheral regions is insufficiently represented in the existing germplasm collections. In such regions, wild pea populations are rare, small in size and suffer from climatic change and land exploitation, hence their focused search is strongly desirable. A two-week-long expedition to Iran in May 2017 revealed two small populations of the wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) in the Zagros Mts, in Aligudarz and Khorramabad Districts of Lorestan Province, Iran, at elevations of 1841 and 1971 m a.s.l., respectively. Their habitats are briefly described. Two pea accessions derived from them, CE9 and CE10, were characterised for some visible and molecular characters. These peas appeared to belong to the evolutionary lineage B, recognised by us earlier in *P. sativum* as opposed to the so-called lineage AC. They contain a unique non-conservative substitution in subtype 5 of histone H1 and turned to be most related to some wild pea accessions originating from southern and south-eastern Turkey and Golan Heights. Scarce information available on wild pea occurrence in Iran suggests their existence in the south-western principal slope of Zagros Mts and southern principal slopes of Elborz and Kopet Dagh Mts. It was found that wild peas representing the evolutionary lineage B produce poorly open and poorly coloured flowers (as reported by us earlier) only in the greenhouse conditions but normally pigmented and open flowers in the wild and mesh houses at open air in Israel. Some issues of pea taxonomy are discussed.

Key words: *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn.; *Pisum sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano; *Lathyrus oleraceus* L. subsp. *biflorus* (Rafin.) Coulot et Rabaute; pea; crop wild relatives; Iran; Zagros Mountains; Fertile Crescent.

For citation: Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Mglinets A.V. Wild pea (*Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn. s.l.) at the periphery of its range: Zagros Mountains. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):60-68. DOI 10.18699/VJ20.596

Дикий горох (*Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn. s.l.) на периферии ареала: горы Загрос

О.Э. Костерин^{1,2}✉, В.С. Богданова¹, А.В. Мглинец¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: kosterin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Местообитания и признаки диких сородичей гороха на периферии их ареала небезынтересны ввиду их возможного значения для селекции на соответствие различным условиям среды. В то же время разнообразие дикого гороха из периферийных регионов недостаточно представлено в мировых коллекциях генетического материала. На периферии ареала его популяции встречаются редко, невелики по размеру и страдают от землепользования и изменений климата, поэтому весьма желателен их целенаправленный поиск. В ходе двухнедельной экспедиции в Иран в мае 2017 г. были обнаружены две популяции дикого посевного гороха (*Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn.) в горах Загрос, в районах Алигударз и Хоррамабад провинции Луристан, Иран, на высоте 1841 и 1971 м над уровнем моря соответственно. Приведены краткие описания их местообитаний. Полученные из этих популяций линии гороха, CE9 и CE10, охарактеризованы в отношении некоторых внешних и молекулярных признаков. Они принадлежат к эволюционной линии В, выявленной нами ранее и противопоставленной так называемой линии АС в пределах вида *P. sativum*, имеют уникальную неконсервативную замену в субтипе 5 гистона Н1 и наиболее родственны некоторым образцам из южной и юго-восточной Турции и Голанских высот. Имеющаяся в литературе скудная информация о местонахождениях дикого гороха в Иране свидетельствует, что он распространен в этой стране на юго-западном макросклоне гор Загрос и на южных макросклонах гор Эльбурс и Копетдаг. Обнаружено, что представители эволюционной

линии В дикого гороха формируют плохо раскрытые и слабо пигментированные цветки в условиях теплицы, тогда как в природе и сеточных растильнях на открытом воздухе в условиях г. Реховот, Израиль, они производят нормально раскрытые и пигментированные цветки. Обсуждаются некоторые актуальные вопросы таксономии гороха.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn.; *Pisum sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano; *Lathyrus oleraceus* L. subsp. *biflorus* (Rafin.) Coulot et Rabaute; горох; дикие сородичи культурных растений; Иран; горы Загрос; Плодородный полумесяц.

Introduction

The pea (*Pisum sativum* L.) is an important crop of higher latitudes useful as vegetable, grain, fodder and natural soil fertiliser in crop rotation and was among the founder crops first domesticated in the Near East in the course of the so-called 'Neolithic revolution' (Zohary, Hopf, 2000; Weiss, Zohary, 2011). The cultivated pea was the first genetic object and has accumulated enormous genetic and phenotypic variation (Blixt, 1972; Makasheva, 1979; Kosterin, 2016a). At the same time, representatives of the same species, *P. sativum*, still exist in the wild, enjoying a broad range in the Mediterranean in the broad sense, stretching from Portugal in the west (ca 9° W) to Turkmenistan in the east (ca 60°30' E) and from Normandy in the north (48°44' N) to Sinai in the south (ca 34° N).

Taxonomical attribution of wild representatives of *P. sativum* was equivocal until some temporary stabilisation under a compromise system by Maxted and Ambrose (2001), who lumped all them under subspecies *P. sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. & Graebn. in a broad sense, defined solely by the fact of being wild and thus inevitably paraphyletic since the cultivated pea, *P. sativum* L. subsp. *sativum*, was derived from a wild representative of the same species. This treatment, however, disregards the fact that according to the rules of the botanical nomenclature (International Code..., 2012), the correct name of wild peas in a subspecies rank should be *P. sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano rather than *P. sativum* subsp. *elatius* (Soldano, 1992). Moreover, the comprehensive molecular phylogenetic analysis of the tribe Fabeae by Schaefer et al. (2012) suggested that the genera *Pisum* L. and *Vavilovia* A. Fed. form a branch inside the genus *Lathyrus* L. so making the latter paraphyletic. As a consequence, Coulot and Rabaute (2016) made an attempt to revise the Fabeae taxonomy to make it phylogenetically consistent and, in particular, downgraded *Pisum* to the section *Lophotropis* (Jaubert et Spach) H. Schaefer, Coulot et Rabaute of the genus *Lathyrus* L. Kosterin (2017) pointed out that the section name *Lophotropis* was incorrect and corrected its name to *Lathyrus* sectio *Pisum* (L.) Kosterin, which was accepted by Coulot and Rabaute (2017). Although phylogenetically consistent, this revised system (Coulot, Rabaute, 2016, 2017; Kosterin, 2017), where the pea gets the name *Lathyrus oleraceus* Lamarck and its wild representatives the name *L. oleraceus* Lamarck subsp. *biflorus* (Rafinesque) H. Schaefer, Coulot et Rabaute, is practically inconvenient as downgrading the small genera *Pisum* L. and *Lens* L. which contained such important crops as pea and lentil, respectively. Hence scholars whose interest to these two groups is motivated, at least to some extent, by practical agricultural aspects are either reluctant to adopt so radically revised a system or, more frequently, have no idea of it. In this paper we will keep to the habitual although somewhat outdated system by Maxted & Ambrose (2001) and denote wild representatives as *P. sativum* subsp. *elatius*.

As crop wild relatives, wild peas are practically important as a source of genetic diversity potentially valuable for pea breeding, first of all genes for resistance to various pests, diseases and draught (Kosterin, 2016b). No doubt, any information on the wild pea natural populations and their habitats is of importance, both theoretical and practical, i. e. for preliminary conjectures about selectively useful genes in a given population.

In spite of the great natural range of wild peas, in most parts of it they are rare plants with small populations (Maxted, Kell, 2009), strongly affected by sheep and goat grazing and, supposedly, by global warming (Coyne et al., 2011). Information on their habitat and ecology is scattered over local floras where it is provided in few general words at most. At the same time, it may be useful for at least a preliminary evaluation of usefulness of particular wild pea stocks for pre-breeding focused on certain traits. Two works from Israel, nearly the core of diversity of wild peas and the country where they are perhaps most common, contain more detailed information. Ben-Ze'ev and Zohary (1973) provided information on the habitat from where each wild pea accession involved into their study originated. Abbo et al. (2008) provided most detailed information on Israeli habitats of wild peas including the rock and soil types. Zlatcović et al. (2010) characterised the habitat and population of *P. sativum* subsp. *elatius* at the Pčinja River in SE Serbia.

We found populations of the wild pea subspecies *P. sativum* subsp. *elatius* in a number of regions at the periphery of its range. For the time being these are, from west to east, Portugal, Crimea, the Caucasus within Krasnodarskiy Kray, and Iran. The information on the wild pea habitat and population found in NE Portugal is published in 'Materials and methods' in Zaytseva et al. (2015) and a photo of a withered pea plant of that population is published in Kosterin (2016b, Fig. 1). This paper concerns the wild pea findings in the Zagros Mts in Iran. Populations of crop wild relatives from Zagros are of special interest since these mountains are considered the eastern part of the so-called Fertile Crescent, the area of origin of the 'Neolithic Revolution' in the Near East (Zohary, Hopf, 2000).

On May 18–31, 2017, the first author had an opportunity to join a dipterological expedition to Iran focused at long-legged flies (Dolichopodidae) by Igor Y. Grichanov from All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia, and Azam Ahmadi from Baran Plant Protection Institute, Arak, Ostan-e Markazi, Iran. The entomological results were published in Grichanov et al. (2017) and Kosterin, Ahmadi (2018); the latter source contains detailed descriptions of the localities examined.

Materials and methods

Search for wild pea populations. The expedition was based at Arak City, the capital of Markazi (Central) Ostan (province)

and visited Markazi, Lorestan and Esfahan Ostans. In total, 33 localities were examined, mostly associated with running water (because of the entomological focus). Four times, on May 23, 25, 26 and 31, the first author had an opportunity to visit Lorestan and to examine the first outposts of the Mediterranean vegetation in the valleys of the Higher Zagros (the peaks of which were still covered by snow). The Silakhor Plain lying north-west of the Higher Zagros is in its rain shadow and both the valley itself (except for the floodplains of few rivers) and the bordering mountain slopes lack natural arboreal vegetation (only that associated with human activity is present). At the same time, in the upper parts of the valleys dividing the south-western slope of the Higher Zagros at ca 2000 m above sea level (a.s.l.), an open stand of the Persian Oak (*Quercus brantii* Lindl.) appears, with the participation of the Montpellier Maple (*Acer monspessulanum* L.), Christ's Thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.) and *Prunus* sp. At lower levels of those valleys this oak parkland covers the slopes entirely. The first author examined four valleys and found wild pea populations in two of them.

Plant growing and derivation of wild pea accessions.

Seeds collected in nature in two populations found in Iran (at Kagelestan-e Bar Aftab and Istgah-e Bisheh, see below) were sowed in the greenhouse in autumn generation (October–December) 2017. One plant from each of these two populations was chosen, their progenies were propagated in the same greenhouse in spring generation (February–May) 2018, and gave rise to accessions CE9 and CE10, respectively.

The prefix 'CE' was at first introduced by us for wild pea accessions derived from wild populations found in 1991 in Crimea (Kosterin, Bogdanova, 2008), abbreviated from 'Crimean *elatius*'. It appeared convenient to adopt it for the entire collection of confirmed wild peas of our Laboratory of Genetics and Evolution of Legumes at ICG SB RAS with its meaning reconsidered as *certa exempla*, that means 'true, reliable specimens' in Latin. (The above-mentioned wild pea accession derived from a population from NE Portugal, published as "PE1" (Zaytseva et al., 2015, p. 236), with a synonym JI3557 in John Innes Centre collection, gets in this system the accession number CE11.) This collection is a part of GENAGRO collection at this institute.

Molecular procedures. DNA isolation, PCR and CAPS analysis of the plastid gene *rbcL* and mitochondrial gene *coxI* were carried out as described in Kosterin, Bogdanova (2008). The nuclear gene *His5* of histone H1 subtype 5 was sequenced according to Zaytseva et al. (2012); the plastid spacer *psbA-trnH*, according to Zaytseva et al. (2017).

DNA sequences obtained in these works are stored in public databases with the following accession numbers: MK933283, MK933284 (*psbA-trnH* spacer), MK952766, MK952765 (gene *His5*) for CE9 and CE10, respectively.

Results

Natural populations of wild pea

(*Pisum sativum* subsp. *elatius* s. l.) in Zagros

A wild pea population was found on May 23, 2017 in Iran, Ostan-e [Province of] Lorestan, Shakhrestan-e [County of] Aligudarz, Bakhsh-e [District of] Besharat, 700 m N of the centre of Kagelestan-e Bar Aftab village, at 33°02'13" N,



Fig. 1. The habitat of wild peas in Iran, Ostan-e Lorestan, Shakhrestan-e Aligudarz, Bakhsh-e Besharat, at Kagelestan-e Bar Aftab village.

49°39'23" E, 1841 m a.s.l. The wild peas were found in the lower part of the steep NW slope of the left (opposite to the village) board of the valley of the Rudbar-e Aligudarz River (a Dez River tributary). The slope had large rock (supposedly dolomite) outcrops and was covered with annual Gramineae vegetation and sparse bushes of a wild almond *Prunus scoparia* Schneider (Fig. 1). About 40–50 plants were found on an area ca 10 × 10 m at the bases of spiny almond bushes seemingly protecting them from being grazed by cattle, the paths of which were numerous on that slope. The plants were at the final vegetation stage, with the vegetative parts withered, pods ripen, about half of them dried out and about quarter of them dehisced (Fig. 2). In total 193 seeds were collected, 48 of which later appeared to be infested by the pea weevil (*Bruchus pisorum* L.). One of those seeds gave rise to accession CE9 (= W6 56889 in the USDA GRIN).

In the same habitat and also at the almond bush bases another crop wild (distant) relative, *Cicer anatolicum* Alef. occurred, at the stage of flowering and young pods. (The unripen seeds were collected and later sowed in the greenhouse, one plants emerged but too late to be allowed to produce seeds, a DNA sample being isolated from it.)

The second wild pea population was found on May 31, 2017 in Iran, Ostan-e Lorestan, Shakhrestan-e Khorram-



Fig. 2. Plants of *P. sativum* subsp. *elatius* of the population at Kagelestan-e Bar Aftab village.



Fig. 3. The habitat of wild peas in Ostan-e Lorestan, Shakhrestan-e Khorramabad, Bakhsh-e Papi, 6.7 km NW of Istgah-e Bisheh village.

abad, Bakhsh-e Papi, 6.7 km NW of Istgah-e Bisheh village (broadly known as simply Bisheh), 33°22'12" N, 48°49'34" E, 1971 m a.s.l. (this is 85 km NW of the previous locality), in a rocky dell with a stony/detritous bottom with rock outcrops, its upper part becomes a small gorge between large cliffs (Fig. 3). The vegetation was dry Persian Oak stand; annual Poaceae, already withered, predominated in the grass layer. Wild pea plants occurred on the detritous bottom and at the base of the rocky right slope of the dell, in a stripe ca 110 m long but not more than 10 m wide; they alternate with plants

of some perennial vetch (*Vicia* sp.). Not less than a hundred plants were found. They were completely withered (Fig. 4), with all normally developed pods already open, with on average one seed per plant found captured in the rolled pod walls (see Fig. 4, top left). Only some pods which dried underdeveloped, had the walls not opened. Also about a dozen of ripen but not yet dried pods were found, bearing traces of pea weevil eggs, traces of burrowed young larvae (up to 20 per pod), and solitary neoplastic pustules caused by the *Np* gene (see Fig. 4, top right) and being the plant's defense reaction



Fig. 4. Plants of *P. sativum* subsp. *elatius* of the population at Istgah-e Bisheh village.



Fig. 5. The seeds of wild pea accessions CE9, originating from a population at Kagelestan-e Bar Aftab village (a), and CE10, originating from a population 6.7 km NW of Istgah-e Bisheh village (b).

to weevil oviposition (Berdnikov et al., 1992). In total 87 seeds were collected, of them 24 appeared infested by the pea weevil. One of those seeds gave rise to accession CE10 (= W6 56890 in the USDA GRIN).

It should be noted that on May 25, 2017 in the environs of Hayan village (33°47' N, 48°54'25" E, 1644 m a.s.l.) (Shakhrestan-e Borujerd), also in Lorestan but at the NE foothills of the Inner Zagros Range facing the Silakhor Plain, in a roadside herbaceous vegetation under a stripe of poplars, the first author found several plants of obviously feral peas escaped from cultivation. They had two

small non-dehiscing pods (phenotype dpo; the character of cultivated peas) per inflorescence, seeds with anthocyanin coloration (phenotype Fs), marble pattern (phenotype M), and non-gritty testa (phenotype gty). Locals told that in that place peas had been grown for fodder 7–8 years ago.

Characters of wild peas from Zagros

We scored accessions CE9 and CE10 for some molecular characters involved in our previous studies. Both lacked the recognition sites for *HspAI* endonuclease in the plastidic *rbcl* and the site for *PsiI* restriction endonuclease in the mitochondrial *cox1* gene. The sequence of *psbA-trnH* plastidic spacer of CE9 was identical to its consensus in peas (Zaytseva et al., 2017) while that of CE10 had a substitution A→T in position 128. The sequences of the *His5* gene coding for histone H1 subtype 5 obtained from CE9 and CE10 were compared to those obtained in the course of our earlier works (Zaytseva et al., 2012, 2015; Bogdanova et al., 2018). The *His5* sequences in CE9 and CE10 appeared identical to each other and most close to those of JI1794 (Golan Heights) and P012 (Turkey, Adiyaman Province) (also identical to each other), differing from them only by an A→C substitution in position 452 resulting in a non-conservative substitution of lysine to threonine in the globular domain of the molecule (protein position 111). This substitution was not found in any other pea accession. One more *His5* sequence very close to the above mentioned, that from accession JI3233 (Syria), differed from them by the T→C substitution in position 722 leading to the valine→alanine amino acid substitution in the C-terminal domain.

The seeds of both accessions CE9 and CE10 (Fig. 5) have gritty testa (phenotype Gty, a wild character), black hilum (PI), a brownish marble pattern (M), violet specks (Fs), no furca pattern (rf). Those of CE9 in addition have conspicuous violet stripes (Ust) (see Fig. 5, a). The young seed ground colour is rather pale greenish-grey in CE9 (see Fig. 5, a) and brownish-grey in CE10 (see Fig. 5, b); the shape is slightly irregular, not perfectly sphaeric. If scarified and sowed after 1–2 month after formation, they readily germinated, earlier than most other peas.

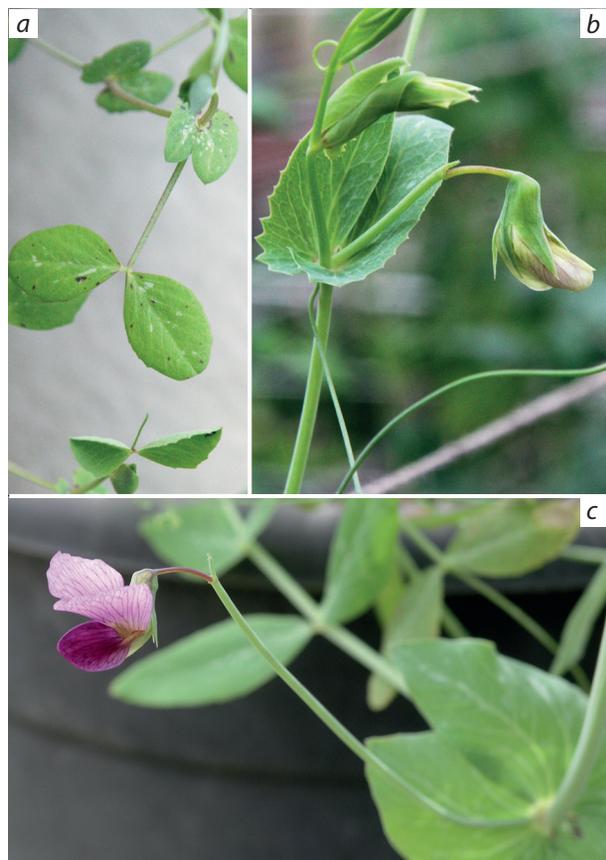


Fig. 6. Pea accession CE9: leaflets and stipulae of a young plant (a) and flowers (b) in the ICG hydroponic greenhouse and in an outdoor mesh house at Agronomy Faculty of Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 07.05.2019 (c).

The plants found in the Kagelestan-e Bar Aftab population (CE9) in nature were up to 70 cm in height, those in the Bisheh population (CE10) only up to 40 cm. In the intraspecific taxonomy of wild representatives of *P. sativum* used in the past and based on the plant height, they would be classified as '*Pisum humile*' (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973) or *P. sativum* subsp. *syriacum* Berger (Makasheva, 1979). In the conditions of the greenhouse spring vegetation the difference in plant height retained but had a lesser magnitude of ca 30 %: the CE9 plants were 69–122 cm tall (mean 106.0 ± 13.2 ; $n = 39$), flowered from 14th–19th node (mean 16.7 ± 1.0) and totally had 18–23 nodes on the main stem (mean 21.0 ± 1.2); the same parameters of CE10 had the following values: 40–94 (mean 74.1 ± 16.7 ; $n = 37$), 14–18 (mean 15.7 ± 1.0) and 17–21 (mean 19.2 ± 1.1), respectively. The plants were elegant, with long internodes, narrow stipulae only moderately dentate at base, rather narrow rhomboid-oval very slightly dentate leaflets (larger in CE10), had numerous aerial cameras on both stipulae and leaflets and outer anthocyanin rings (but no inner rings) at the base of stipulae (manifestation of some of the dominant alleles of the gene *D*). Besides, CE9 (but not CE10) had tiny but conspicuous violet specks on leaflets (Fig. 6, a). The plants moderately branched at the base and the main stem below flowering nodes, had medium-long peduncles, with one or two (at the middle of the range of flowering nodes) flowers. The pods dehiscenced explosively upon ripening (phenotype Dpo, a



Fig. 7. Flowers of pea accession CE10 in the ICG hydroponic greenhouse (a) and in a mesh house at Agronomy Faculty of Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 07.05.2019 (b).

wild character); their walls bore sparse and small neoplastic pustules caused by the *Np* gene in the greenhouse conditions (while in the wild as a response to the weevil oviposition) (Berdnikov et al., 1992).

The flowers of both Zagros accessions grown in the greenhouse never opened fully and were greenish (Figs 6, b, 7, a). At the same time in the natural-like conditions of an outdoor mesh house at Agronomy Faculty of the Hebrew University of Jerusalem in Rehovot, Israel, these accessions provided large, fully open and well coloured flowers (Figs 6, c, 7, b).

Discussion

Wild peas in Iran

Most part of the huge territory of Iran is in the rain shadow of Zagros Mts, which captures precipitation from the Mediterranean, and hence is too arid for wild peas. The Iranian Plateau and the north-eastern (inner) principal slope of Zagros have mostly Irano-Turanian rather than Mediterranean vegetation, mostly its desert versions (Zohary, 1973). The Mediterranean vegetation and flora, to which wild peas belong, is present only in the sea-facing outer principal slopes of the Iranian mountain systems: the south-western slope of Zagros Mts and the northern slope of Elborz Mts. These are the regions where wild pea populations should be sought for. (According

to observations by the first author, the vegetation change is obvious when crossing the Higher Zagros Range in Lorestan. In the south-west of this province the most widespread vegetation is the Persian Oak (*Q. brantii*) parkland extending to ca 2000 m a.s.l., while in the north-eastern part any natural arboreal vegetation is missing even as low as at 1700 m a.s.l.) The presence of wild peas in the Iranian southern slope of Kopet Dagh is also possible but is probably marginal in those rather hostile arid mountains.

Reports of wild peas from Iran are found in two multi-volumed Floras: "Flora Iranica" published in Latin/English and "Flora of Iran" published in Farsi; curiously, data in these reports do not overlap. The volume devoted to the tribe Viciae (currently Fabae) (Reichinger, 1979) contains seven locations for *P. sativum* subsp. *elatius*: three in Lorestan in western Iran (Bisheh, 2100 m a.s.l. [near which but at 1971 m a.s.l. CE10 was collected by us]; "Dou Rud" [Dorud]; Shah-Bazan, 600 m a.s.l., but the latter is presently in Khuzestan Ostan) and four in northern Iran, one in Gorgan Province (now Golestan Province) (Ziarat env.) and three in Gilan Province (Bandar-e Pahlavi (now Bandar-e Anzali); Lake Mordab westerly of Bandar-e Pahlavi, 26 m a.s.l.; Astara). The 33th volume of "Flora of Iran" (Pakravan et al., 2000) contains different localities for the same taxon: one in Ostan-e Kurdistan (Sanandaj, 1380 m a.s.l.), three in Ostan-e Azerbaijan (Arasbaran, 63 m a.s.l.; Sardasht; Ighon, 1200–1500 m a.s.l.), one in Ostan-e Golestan (Gombat, 750 m a.s.l.) and two in Ostan-e Fars (Nurabad and Doshman Ziari, 1800 m). Occurrence of wild peas as southerly as Fars, if true, was unexpected.

Both sources do not report for Iran *P. sativum* subsp. *elatius* var. *pumilio* Meikle or its synonyms. At the same time the map in Maxted, Kell (2009, Fig. 18) shows in western Iran five localities of *P. sativum* subsp. *elatius* var. *pumilio* but none of *P. sativum* subsp. *elatius* var. *elatius*. As the source of information for that map an unpublished thesis by A.S. Mumtaz is indicated, which was defended in 2005 in Birmingham University. Most probably here we face an equivocal treatment of intra-species taxonomy of *P. sativum* by different authors.

World germplasm collections hitherto contained only four accessions claimed to represent wild peas from the huge territory of Iran. Accession IG65050 (Iran, Lorestan, 33.667° N 48.55° E) is from ICARDA collection and originated from Zagros Mts. The coordinates adduced refer to a south-western slope at 1800 m a.s.l. in the northern environs of Beyravand-e Jonubi village in Khorramabad Shahrestan. Accession PI143673 was derived from plants collected in 1940 in Dorud, Lorestan. For accession JI1030 (=PI140295), coordinates 34° N and 56° E and provenance "Khorassan" were indicated, but the coordinates are most probably erroneous as referring to the low and deserted Tebess Mts between Dash-e Kavir and Dasht-e Lut Deserts in South Khorasan Province. (It is not excluded that the coordinates were arbitrarily indicated for the centre of the historical Khorasan region.) For accession JI2105 (ITPDB 104333, = PI227258) only coordinates 32.659° N, 51.671° E are provided by the online database of John Innes Centre collection; they refer to the Esfahan City environs. However, we grew out the latter accession and found it to represent a cultivated pea with non-dehiscing pods (Kosterin et al., 2010). The two untested accessions from Lorestan perhaps represent true wild peas. At least their provenance is

close to our findings: CE9 was collected 120 km SE and CE10 43 km SE of Beyravand-e Jonubi, the presumed provenance of IG65050.

Thus, wild peas are reliably known in Iran from the south-western principal slope of Zagros and the western and eastern parts of Elborz, although in general Iran plus Turkmenistan occupy about one third of the *Pisum* natural range by longitude. It is broadly accepted that in the western Eurasia, productive farming arose and plant domestication occurred in the so-called Tauro-Zagros Arch or Fertile Crescent, a mountain belt including Golan Heights, Taurus and Anti-Taurus Ranges and Zagros Mts (Zohary, Hopf, 2000). Formally the Zagros Mts comprise about one third of the Arch and most of these mountains are in the territory of Iran, from which they only protrude to the Iraqi Kurdistan. However, only the south-western principal slope of Zagros has the Mediterranean vegetation and can be attributed to the Fertile Crescent. Based on literature, the southern border of the wild pea range in Iran can be extrapolated to cross Ostan-e Fars.

Wild pea habitats

The CE10 locality is 75 km NW and the CE9 locality 47 km SE of the Oshtorankuh Mountain (4050 m a.s.l.), the highest summit of Lorestan. At the same time, the mountains situated to the south and south-east of these localities do not exceed 2000–2500 m a.s.l. Thus the wild pea habitats found are not situated in the main rain shadow of the Higher Zagros, that is the reason of the appearance of arboreal vegetation of the Mediterranean type, which is absent to the north and north-east of them at any elevations. One can note that all wild pea findings in Lorestan were made at close elevations a.s.l.: 2100 m (Reichinger, 1979), 1971 m, 1841 m (our findings) and 1800 m (reconstructed from coordinates of accession IG65050). The former value refers to the upper limit of arboreal vegetation in this area.

Occurrence of wild peas in oak parkland was expectable since this is one of the primary habitats of at least some wild pea ecotypes elsewhere, e.g. in Israel (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; Abbo et al., 2008). It remains unclear if a slope with spiny almond bushes is a regular habitat of wild peas (and *C. anatolicum*) in Iran since the first author failed to examine more examples of such habitats.

The analysis of regional literature suggests that wild peas are associated with calcareous habitats on limestone or dolomites throughout their vast range but also with igneous rocks and volcanic slag in Israel (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; Abbo et al., 2008) and East Turkey (Abbo et al., 2013). The Higher Zagros is composed mostly by the Mesozoic dolomites that conforms the notion of predominant calciphily of *P. sativum* subsp. *sativum*.

Relationships of Zagros wild peas

Such characters as dehiscing pods (Dpo) and gritty seed testa (Gty) evidence that both small populations found among Mediterranean vegetation represent genuine wild peas. Absence of the target restriction sites in the plastidic *rbcL* and mitochondrial *coxI* genes (Kosterin, Bogdanova, 2008) in CE9 and CE10 suggests their belonging to the so-called evolutionary lineage B of wild *P. sativum*. This lineage was revealed by us earlier, as a monophyletic clade opposed to the



Fig. 8. Flowers of the pea accession JI1794 originating from Tell Abu Nida Hill in Golan Heights in the conditions of the ICG hydroponic greenhouse (a) and in the wild population of Tell Abu Nida, 11.05.2019 (b, c).

so-called lineage AC, in the phylogenetic reconstruction based on the histone H1 genes (Zaytseva et al., 2012, 2015, 2017) and plastid genomes (Bogdanova et al., 2018) and is identifiable by convenient molecular markers from different cellular genomes (Kosterin, Bogdanova, 2008; Kosterin et al., 2010). The lineage B includes a great number of wild peas as well as the cultivated pea subspecies (*P. sativum* subsp. *sativum*). At the same time, as expected for wild peas, CE9 and CE10 had no 7-bp deletion in the plastid *psbA-trnH* spacer which, with only two known exceptions, is specific to (a synapomorphy of) the cultivated subspecies (Zaytseva et al., 2017). The A→T substitution in position 128 of this spacer in CE10 is shared by wild pea accessions JI1794 (Golan Heights) and P017 (Turkey, Mersin Province) (unfortunately, this substitution was not mentioned by Zaytseva et al. (2017)). The *His5* gene of both CE9 and CE10 contains the same nucleotide substitution resulting in the lysine→threonine replacement in the globular domain not found in any other pea accession; otherwise their *His5* sequence is identical to those of accessions JI1794 and P012 (Turkey, Adiyaman Province). One more very close *His5* sequence, differing from the above mentioned ones in one substitution, belongs to accession JI3233 (Syria).

We may conclude that the wild peas found by us in Zagros represent some subtle evolutionary branch of the lineage B also occurring at least in southern and southeastern Turkey, Golan Heights and Syria. It is noteworthy that JI1794 is a low plant, P017, CE9 and CE10 are moderately high and JI3233 is a high plant, which once again stresses the inapplicability of plant height to evaluate relatedness of wild peas (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973). Also some genetic difference already found between CE9 and CE10 originating from the populations 85 km apart is noteworthy: the substitution in position 128 of *psbA-trnH* in CE10 and the violet stripes (Ust) on the seed testa, violet specks on leaflets and a greater plant height in CE9.

Flowers of peas of evolutionary lineage B

Zaytseva et al. (2017) claimed that most of wild peas of the evolutionary lineage B have flowers poorly pigmented and opened, in contrast to well open and coloured flowers of cultivated peas, belonging to the same lineage, and wild peas of the 'evolutionary lineage AC'. It turned out that this statement is true only of our greenhouse conditions. Accessions CE9 and CE10 grown in our greenhouse and in the mesh house in

Rehovot, where the conditions were close to natural, have, respectively, poorly open greenish (see Figs 6, b, 7, a) versus well open, coloured and large (see Figs 6, c, 7, b) flowers. Analogously, the photos taken by S.A. Litvinskaya (pers. comm.) of wild peas of the lineage B in two populations at the Black Sea Coast of Krasnodarskiy Krai, Russia, show large, well open and coloured flowers, while the flowers of the plants grown in our greenhouse from seeds from these populations are poorly opened and coloured, as in the case of Iranian wild peas. Finally, accession JI1794 originating from the Tell Abu Nida Hill, Golan Heights, northern Israel, also produced poorly open greenish flowers in the greenhouse (Fig. 8, a), while plants in the natural habitat at Tell Abu Nida have well opened and strikingly coloured flowers, deep purple including the standard, most saturated among peas (Fig. 8, b, c). (In fact, some representatives of the lineage AC also produce poorly open and less coloured flowers in our greenhouse, e. g. accessions WG 26109 (Georgia), Pe 013 (Turkey) and sometimes also JI1096 (Greece) and JI3557 (Portugal).)

The factor that prevents the normal development of the flower corolla of wild representatives of the lineage B (but not affecting the pods) in our greenhouse is still unclear. Our preliminary experiment ruled out the involvement of the temperature of germination. An edaphic factor can also be excluded, since the Black Sea natural habitats of wild peas are on limestone while the Tel Abu Nida habitat is on the basalt and volcanic ash. For the time being the temperature and illumination regime at the onset of flowering is the most probable candidate.

Conclusion

In this paper we report findings of two wild pea population in the Zagros Mts comprising the eastern part of the Fertile Crescent which is considered to be an area where the founder crops were domesticated and the productive farming appeared in the Near East. Indeed, these populations represented the same evolutionary lineage of the species *P. sativum* to which the cultivated pea also belongs. However, another result of this study is the observed paucity of wild peas in these mountains and their occurrence only in their south-western principal slopes which offers suitable habitats. This is in contrast to their frequent occurrence and diversity in the western (e. g. Israel) and northern (SE Turkey) parts of the Fertile Crescent.

References

- Abbo S., Lev-Yadun S., Heun M., Gopher A. On the 'lost crops' of the neolithic Near East. *J. Exp. Bot.* 2013;64:815-822. DOI 10.1093/jxb/ers373.
- Abbo S., Zesak I., Schwartz E., Lev-Yadun S., Gopher A. Experimental harvesting of wild peas in Israel: implications for the origins of Near East farming. *J. Archaeol. Sci.* 2008;35:922-929. DOI 10.1016/j.jas.2007.06.016.
- Ben-Ze'ev N., Zohary D. Species relationship in the genus *Pisum* L. *Israel J. Botany.* 1973;2:73-91.
- Berdnikov V.A., Trusov Y.A., Bogdanova V.S., Kosterin O.E., Rozov S.M., Nedel'kina S.V., Nikulina Y.N. The neoplastic pod gene (*Np*) may be a factor for resistance in pea to the pest *Bruchus pisorum* L. *Pisum Genetics.* 1992;24:37-39.
- Blixt S. Mutation genetics in *Pisum*. *Agri Hortique Genetica.* 1972;30:1-294.
- Bogdanova V.S., Mglinets A.V., Shatskaya N.V., Kosterin O.E., Solovyev V.I., Vasiliev G.V. Cryptic divergences in the genus *Pisum* L. (peas), as revealed by phylogenetic analysis of plastid genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018;129:280-290.
- Coulot P., Rabaute P. Monographie de Leguminosae de France. 4. Tribus des Fabaeae, des Cicereae et des Genisteae. *Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest.* 2016;46:1-902.
- Coulot P., Rabaute P. Deuxièmes compléments à la Monographie des Leguminosae de France. *Le Monde des Plantes.* 2017;516:11-35.
- Coyne C.J., McGee R.J., Redden R.J., Ambrose M.J., Furman B.J., Miles C.A. Genetic adjustment to changing climate: pea. In: Yadav S.S., Redden J.H., Lotze-Campen H., Hall A.J. (Eds.). *Crop Adaptation to Climate Change.* New York: John Wiley & Sons, 2011;238-250.
- Grichanov I.Y., Ahmadi A., Kosterin O.E. New records of long-legged flies (Diptera, Dolichopodidae) from Central and North-Eastern Iran. *Acta Biologica Sibirica.* 2017;3(4):99-112.
- International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Oberreifenberg: Koeltz Scientific Books, 2012.
- Kosterin O.E. Under the reign of the Pea King (the difficult fate of the first genetical object. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016a;6(1):1-14. DOI 10.1134/S2079059716010081.
- Kosterin O.E. Prospects of the use of wild relatives for pea breeding. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016b;6(3):233-243. DOI 10.1134/S2079059716030047.
- Kosterin O.E. Abyssinian pea (*Lathyrus schaeferi* Kosterin nom. nov. pro *Pisum abyssinicum* A. Br.) is a problematic taxon. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(2):158-169. DOI 10.18699/VJ17.234. (in Russian).
- Kosterin O.E., Ahmadi A. Odonata observed in Central Zagros, Iran, in late May 2017. *International Dragonfly Fund Report.* 2018;117:1-65.
- Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genet. Res. Crop Evol.* 2008;55:735-755. DOI 10.1007/s10722-007-9281-y.
- Kosterin O.E., Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Ambrose M. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Beib.) Schmahl. *Genet. Res. Crop Evol.* 2010;57:733-739. DOI 10.1007/s10722-009-9511-6.
- Makasheva R.Kh. Cultivated Flora of the USSR. Vol. IV. Pulse and Legume Cultures. Part I. Pea. Leningrad: Kolos Publ., 1979. (in Russian).
- Maxted N., Ambrose M. Peas (*Pisum* L.). In: Maxted N., Bennett S.J. (Eds.). *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean* (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. 39). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 2001;181-190.
- Maxted N., Kell S.P. Establishment of a global network for the *in situ* conservation of crop wild relatives: status and needs. *FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome, 2009.* DOI 10.1023/B:BIOC.0000011719.03230.17.
- Pakravan M., Jalilian N., Neamati M. Flora of Iran, No. 33. Papilionaceae (Viciaeae). Ministry of Agriculture, Islamic Republic of Iran, Tehran, 2000. (in Farsi)
- Reichinger K.H. *Pisum*. In: Chrtková-Žertová A., van der Maesen L.J.G., Reichinger K.H. *Papilionaceae I – Viciaeae. Flora des Iranischen Hochlandes und der umranchenden Gebirge. Persien, Afghanistan, Teile von West-Pakistan, Nord-Iraq, Azerbaijan, Turkmenistan.* No. 140. *Academische Druck und Verlagsanstalt, Graz, 1979;83-86.*
- Schaefer H., Hechenleitner P., Santos-Guerra A., Menezes de Sequeira M., Pennington R.T., Kenicer G., Carine M.A. Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabaeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evol. Biol.* 2012;12:250. DOI 10.1186/1471-2148-12-250.
- Soldano A. Riproposizione di taxa sottospecifici prioritari dovuti a botanici italiani. *Natura Bresciana (Ann. Mus. Civ. Sci. Nat., Brescia).* 1992;27:51-56.
- Weiss E., Zohary D. The Neolithic Southwest Asian founder crops, their biology and archaeobotany. *Curr. Anthropol.* 2011;52(Suppl.4):S237-S254. DOI 10.1086/658367.
- Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecific levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. *Gene.* 2012;504:192-202. DOI 10.1016/j.gene.2012.05.026.
- Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Refinement of the collection of wild peas (*Pisum* L.) and search for the area of pea domestication with a deletion in the plastidic *psbA-trnH* spacer. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2017;64:1417-1430. DOI 10.1007/s10722-016-0446-4.
- Zaytseva O.O., Gunbin K.V., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Divergence and population traits in evolution of the genus *Pisum* L. as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution. *Gene.* 2015;556:235-244.
- Zlatcović B., Mikić A., Smýkal P. Distribution and new records of *Pisum sativum* subsp. *elatius* in Serbia. *Pisum Genetics.* 2010;42:15-17.
- Zohary D. *Geobotanical foundations of the Middle East.* I-II. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1973.
- Zohary D., Hopf M. *Domestication of Plants in the Old World.* 3rd edn. Clarendon Press, Oxford, 2000.

ORCID ID

O.E. Kosterin orcid.org/0000-0001-5955-4057

Acknowledgements. The work is supported by Russian State Scientific Project No. 0324-2019-0039-C-01 at the Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Novosibirsk, and the project No. 19-04-00162 of the Russian Fund for Fundamental Research. The first author is grateful to Azam Ahmadi and Igor Grichanov for the opportunity to join their expedition to Iran and great help in the field. Shahal Abbo kindly made it possible to take photos of the flowers of CE9 and CE10 grown in a mesh house in Rehovot as well as of wild peas in a natural habitat at Tell Abu Nida Mt., Israel.

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

Received May 20, 2019. Revised September 18, 2019. Accepted September 18, 2019.

Характеристика полногеномной последовательности рекомбинантного норовируса генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012, выявленного в России

Е.В. Жираковская¹, А.Ю. Тикун¹, С.Н. Соколов^{1,2}, Б.И. Кравчук¹, Е.И. Краснова³, Н.В. Тикун¹ ✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Аннотация. Норовирусы (сем. *Caliciviridae*) считаются частой причиной острого гастроэнтерита у людей всех возрастов. Эти небольшие безоболочечные вирусы с одноцепочечным (+)РНК-геномом характеризуются высокой генетической вариабельностью. По всему миру наблюдается постоянное изменение генетического разнообразия циркулирующих норовирусов и появление новых рекомбинантных вариантов. Недавно опубликованы данные о распространении рекомбинантных штаммов норовируса, в которых новая полимеразы генотипа GII.P16 сочеталась с капсидными белками VP1 разных генотипов. В рамках мониторинга спорадических случаев острых гастроэнтеритов в Новосибирске в 2016 г. было протестировано 46 клинических образцов от детей с диареей. Методом ОТ-ПЦР норовирус детектирован в шести клинических образцах от госпитализированных детей. Выявленные норовирусы путем секвенирования региона перекрывания ORF1/ORF2 были классифицированы как рекомбинантные варианты GII.P21/GII.3, GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и GII.P16/GII.4_Sydney_2012. Появление нового рекомбинантного генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 впервые зафиксировано в Новосибирске весной 2016 г. До этого исследования в базе данных GenBank было доступно всего четыре полногеномные последовательности российских штаммов норовируса генотипа GII.P16/GII.3. В настоящей работе была определена полная последовательность генома российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 (GenBank KY210980). Сравнение нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей показало высокую гомологию этого российского штамма со штаммами генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 из других регионов мира. Сравнительный анализ показал, что уникальные замены произошли в последовательностях генов полимеразы генотипа GII.P16, N-терминального белка р48 и минорного капсидного белка VP2, при этом существенных изменений в гене основного капсидного белка VP1 не наблюдалось. Анализ функциональной значимости этих изменений позволил предположить, что широкое распространение штаммов с новой полимеразой GII.P16, возможно, связано как с несколькими аминокислотными заменами в активном центре полимеразы, так и со вставкой остатка глутаминовой кислоты или глицина в N-терминальном белке р48, который блокирует секреторный иммунитет эпителиальных клеток кишечника. Дальнейший мониторинг генотипов позволит оценить распространение рекомбинантных норовирусов с полимеразой GII.P16 на территории России. Ключевые слова: норовирус; полный геном; полимеразы; белок р48; капсидные белки; филогенетический анализ; острый гастроэнтерит; мониторинг генотипов.

Для цитирования: Жираковская Е.В., Тикун А.Ю., Соколов С.Н., Кравчук Б.И., Краснова Е.И., Тикун Н.В. Характеристика полногеномной последовательности рекомбинантного норовируса генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012, выявленного в России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):69-79. DOI 10.18699/VJ20.597

Characterization of the complete genome sequence of the recombinant norovirus GII.P16/GII.4_Sydney_2012 revealed in Russia

E.V. Zhirakovskaia¹, A.Y. Tikunov¹, S.N. Sokolov^{1,2}, B.I. Kravchuk¹, E.I. Krasnova³, N.V. Tikunov¹ ✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

³ Novosibirsk State Medical University, Department of Infectious Diseases, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Abstract. Noroviruses (the *Caliciviridae* family) are a common cause of acute gastroenteritis in all age groups. These small non-envelope viruses with a single-stranded (+)RNA genome are characterized by high genetic variability. Continuous changes in the genetic diversity of co-circulating noroviruses and the emergence of new recombinant variants are observed worldwide. Recently, new recombinant noroviruses with a novel GII.P16 polymerase associated with different capsid proteins VP1 were reported. As a part of the surveillance study of sporadic cases of acute gastroenteritis in Novosibirsk, a total of 46 clinical samples from children with diarrhea were screened in 2016. Norovirus was detected in six samples

from hospitalized children by RT-PCR. The identified noroviruses were classified as recombinant variants GII.P21/GII.3, GII.Pe/GII.4_Sydney_2012, and GII.P16/GII.4_Sydney_2012 by sequencing of the ORF1/ORF2 junction. In Novosibirsk, the first appearance of the new recombinant genotype GII.P16/GII.4_Sydney_2012 was recorded in spring 2016. Before this study, only four complete genome sequences of the Russian GII.P16/GII.3 norovirus strains were available in the GenBank database. In this work, the complete genome sequence of the Russian strain Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 (GenBank KY210980) was determined. A comparison of the nucleotide and the deduced amino acid sequences showed a high homology of the Russian strain with GII.P16/GII.4_Sydney_2012 strains from other parts of the world. A comparative analysis showed that several unique substitutions occurred in the GII.P16 polymerase, N-terminal p48 protein, and minor capsid protein VP2 genes, while no unique changes in the capsid VP1 gene were observed. A functional significance of these changes suggests that a wide distribution of the strains with the novel GII.P16 polymerase may be associated both with several amino acid substitutions in the polymerase active center and with the insertion of glutamic acid or glycine in an N-terminal p48 protein that blocks the secretory immunity of intestinal epithelial cells. Further monitoring of genotypes will allow determining the distribution of norovirus recombinants with the polymerase GII.P16 in Russia.

Key words: norovirus; complete genome; polymerase; protein p48; capsid proteins; phylogenetic analysis; acute gastroenteritis; monitoring of genotypes.

For citation: Zhirakovskaia E.V., Tikunov A.Y., Sokolov S.N., Kravchuk B.I., Krasnova E.I., Tikunova N.V. Characterization of the complete genome sequence of the recombinant norovirus GII.P16/GII.4_Sydney_2012 revealed in Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):69-79. DOI 10.18699/VJ20.597

Введение

Норовирусы (сем. *Caliciviridae*, род *Norovirus*) считаются одной из частых причин вспышек и спорадических случаев острых гастроэнтеритов (ОГЭ) у людей всех возрастов (Bartsch et al., 2016). Норовирусная инфекция может вызывать тяжелые формы болезни с неблагоприятным исходом у детей раннего возраста и пожилых людей, а также хроническую диарею продолжительностью от нескольких месяцев до нескольких лет у пациентов с иммунодефицитом, онкологией и после трансплантации органов (Brown et al., 2017; Woodward et al., 2017; Petrigiani et al., 2018). Низкая инфицирующая доза (~10–100 вирусных частиц) и высокая устойчивость в окружающей среде способствуют быстрому распространению норовирусов контактно-бытовым путем, через пищевые продукты и воду (Kirby et al., 2015; Towers et al., 2018). Метаанализ эпидемиологических данных из многих стран показал, что встречаемость норовирусной инфекции у пациентов с ОГЭ в 2008–2014 гг. составляла 17–20 % вне зависимости от возраста больных (Ahmed et al., 2014). Распространенность бессимптомной формы норовирусной инфекции варьирует от 4 до 18 % в различных регионах мира (Qi et al., 2018).

Полиаденилированный одноцепочечный (+)РНК-геном норовируса (~7.5 тыс. н.) содержит три перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF1–ORF3) (Green, 2013). ORF1 кодирует длинный полипротеин, который посттрансляционно расщепляется вирусной протеазой на шесть неструктурных белков, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp). ORF2 и ORF3 кодируют основной (VP1) и минорный (VP2) белки капсида соответственно. Выявлено два механизма генетической изменчивости норовирусов: точечные мутации и рекомбинация (Bull, White, 2011). Рекомбинационные события в норовирусном геноме чаще всего происходят в регионе, который включает участок перекрывания 3'-конца ORF1 (RdRp) и 5'-конца ORF2 (VP1), поэтому в настоящее время принята двойная номенклатура норовирусов, обозначающая генотипы RdRp/VP1 (Kroneman et al., 2013).

Норовирусы проявляют значительное генетическое и антигенное разнообразие, и в настоящее время на основе

аминокислотной последовательности VP1 их разделяют на семь геногрупп GI–GVII, которые далее подразделяют на более чем сорок генотипов (Kroneman et al., 2013). Установлено, что заболевание у людей могут вызывать норовирусы трех геногрупп – GI, GII и GIV (Green, 2013; Parra et al., 2017). В самой распространенной геногруппе GII выделяют 31 генотип RdRp и 23 генотипа VP1, их комбинация обозначается как GII.Px/GII.x (Kroneman et al., 2013; Vinje, 2015; RIVM, <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>). Средняя продолжительность генотип-специфического иммунитета после норовирусной инфекции может варьировать от 4 до 8 лет (Simmons et al., 2013), однако из-за существования широкого спектра генетических вариантов последующее заражение другими антигенными вариантами или «иммунотипами» норовируса может происходить через более короткий период времени (Parra et al., 2017).

Начиная с 1990-х гг. преобладающим считался норовирус GII.4, несколько эпидемических вариантов GII.P4/GII.4 которого сменяли друг друга с периодичностью в 2–3 года в течение двух десятилетий (Eden et al., 2013; Hoa Tran et al., 2013). В 2012 г. появился новый рекомбинантный вариант норовируса GII.4, классифицированный как GII.Pe/GII.4_Sydney_2012, который позже стал доминирующим штаммом во всем мире (van Beek et al., 2013). В последние годы в молекулярной эпидемиологии норовируса стали наблюдаться изменения. В зимний сезон 2014/2015 новый штамм GII.P17/GII.17, впервые зарегистрированный в Китае, быстро вытеснил вариант GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и распространился сначала в азиатских странах, а затем и в других регионах мира (de Graaf et al., 2015). Недавно появились сообщения из разных географических регионов о распространении новых рекомбинантных штаммов норовируса, в которых полимеразы генотипа GII.P16 связана с капсидным белком различных генотипов, включая вариант GII.4_Sydney_2012 (Barreira et al., 2017; Bidalot et al., 2017; Ruis et al., 2017; Han et al., 2018; Hata et al., 2018).

Многолетний мониторинг генетического разнообразия энтеропатогенных вирусов в Новосибирске показал, что норовирусы генотипа GII.P4/GII.4 были одной из частых

причин спорадических случаев ОГЭ в 2003–2012 гг., тогда как норовирусы с полимеразой GII.P16 встречались крайне редко (Zhirakovskaia et al., 2015, 2019). Весной 2016 г. нами зафиксировано появление в Новосибирске нового рекомбинантного варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012. До этого исследование в международной базе данных GenBank было доступно всего четыре полногеномные последовательности рекомбинантных норовирусов генотипа GII.P16/GII.3 из России (Zhirakovskaia et al., 2015, 2019). Цель настоящей работы – определение полной последовательности генома российского штамма нового генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 и сравнительный анализ с аналогичными штаммами из других регионов мира и с российскими изолятами 2005–2012 гг., в которых полимеразы генотипа GII.P16 находилась в сочетании с другими вариантами VP1.

Материалы и методы

Происхождение вирусных штаммов. В рамках мониторинга генетического разнообразия энтеропатогенных вирусов были собраны клинические образцы от детей с диареей, госпитализированных в Детскую городскую клиническую больницу № 3 и находившихся на амбулаторном лечении в 2016 г. От каждого родителя/опекуна ребенка получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, с соблюдением добровольности в соответствии с Федеральным законом РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Выявление и дифференциация РНК различных энтеропатогенных вирусов проведены методом ОТ-ПЦР с использованием верифицированной лабораторной панели праймеров, как описано ранее (Zhirakovskaia et al., 2019).

Секвенирование. Выявленные изоляты норовируса были охарактеризованы методом прямого секвенирования фрагмента генома (~1400 н.), включающего участок (20 н.) перекрытия ORF1/ORF2. Нуклеотидные последовательности определены методом Сэнгера с использованием BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Секвенирование полной нуклеотидной последовательности генома штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 выполнено primer-walking методом с использованием панели новых разработанных праймеров. Полученные данные проанализированы с помощью программы FinchTV (Geospiza, США). Секвенированные фрагменты генома были собраны в общую нуклеотидную последовательность в приложении SeqMan из пакета программы Lasergene Evolution Suite (DNASTAR, Мэдисон, США). Генотип норовируса был определен с помощью сервиса Norovirus Typing Tool v. 2.0 (RIVM; <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) (Kroneman et al., 2013).

Филогенетический анализ. Поиск гомологичных последовательностей проведен с использованием сервиса BLAST 2.9.0+ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей по алгоритму ClustalW и филогенетический анализ сделаны в программе MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/>). Филогенетические деревья построены методом Neighbor-Joining с использованием Kimura 2-parameter модели. Оценка

достоверности узлов выполнена с бутстреп-анализом 1000 псевдореплик данных; на филограммах приведены статистические индексы поддержки более 80 %. Степень идентичности нуклеотидной и аминокислотной последовательностей рассчитывалась в программе BioEdit v7.2.6 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Вариативность выведенных аминокислотных последовательностей полипротеина, включающего полимеразу генотипа GII.P16, а также капсидных белков VP1 и VP2 варианта GII.4_Sydney_2012, была определена с помощью приложения Sequence Data Explorer из программы MEGA 7.

Полученные в данном исследовании нуклеотидные последовательности были аннотированы и зарегистрированы в международной базе данных GenBank с номерами доступа KY210919, KY210976–KY210980, KY210983, MG892912 и MG892914.

Результаты

Методом ОТ-ПЦР было протестировано 46 образцов фекалий от детей в возрасте от 1 мес до 8 лет. Энтеропатогенные вирусы выявлены в 15 (32.6 %) образцах. Норовирусная инфекция диагностирована у шести госпитализированных детей в возрасте от 1 до 9 мес. Анализ нуклеотидных последовательностей (~1400 н.), включающих область перекрытия ORF1/ORF2, на ресурсах BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и RIVM (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) показал, что выявленные изоляты норовируса относились к трем рекомбинантным вариантам (табл. 1).

Нуклеотидные последовательности штаммов норовируса, наиболее гомологичные последовательностям, полученным в этом исследовании, были определены в результате поиска на сервисе BLAST. Изолят NS16-C32 генотипа GII.P21/GII.3 имел высокую степень гомологии со штаммами, циркулировавшими в Новосибирске (97.6–98.9 %) в 2010–2012 гг. (Zhirakovskaia et al., 2019) и в Европе (96.5–97.2 %) в 2014–2016 гг. (Brown et al., 2019). Два изолята, NS16-C12 и NS16-C13, генотипированные как GII.Pe/GII.4_Sydney_2012, имели высокую степень гомологии (99.3–99.5 %) с последовательностями штаммов 2014–2016 гг. из Юго-Восточной Азии и Великобритании (Brown et al., 2019) и 96.9–97.1 % идентичности со штаммами, циркулировавшими в Новосибирске ранее (Zhirakovskaia et al., 2019). Нуклеотидные последовательности еще трех изолятов – NS16-C36, NS16-C37 и NS16-C38, принадлежащих к новому генотипу GII.P16/GII.4_Sydney_2012, имели 100 % идентичность между собой и 96.2 % гомологию с последовательностями изолятов NS16-C12 и NS16-C13. Генетическое сходство изолятов NS16-C36, NS16-C37 и NS16-C38 со штаммами GII.P16/GII.4_Sydney_2012 из других регионов составило 97.4–98.9 % по нуклеотидной последовательности.

На основе полных последовательностей норовирусов, доступных в GenBank, было создано несколько наборов оригинальных праймеров для секвенирования полных последовательностей ORF1, RdRp, ORF2 и ORF3 различных генотипов. Для двух изолятов, NS16-C13 и NS16-C32, определены нуклеотидные последовательности (~4300 н.), включающие RdRp, ORF2 и ORF3, которые были зарегистрированы в базе данных GenBank как

Таблица 1. Эпидемиологические данные норовирус-положительных случаев острого гастроэнтерита в Новосибирске в 2016 г.

№	Изолят норовируса	Пациент		Генотип RdRp/VP1	GenBank ID
		Возраст, мес	Пол		
1	NS16-C12	9	Ж	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	KY210976
2	NS16-C13	4	Ж	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	KY210977
3	NS16-C32	7	Ж	GII.P21/GII.3	KY210919
4	NS16-C36	1	Ж	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	KY210978
5	NS16-C37	4	М	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	KY210979
6	NS16-C38	3	М	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	KY210980

штаммы Hu/GII.Pe-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C13/2016 (GenBank KY210977) и Hu/GII.P21-GII.3/RUS/Novosibirsk/NS16-C23/2016 (GenBank KY210919).

Для изолята NS16-C38 была определена полная нуклеотидная последовательность генома (7560 н.), включая 3'-нетранслируемую (47 н.) область, которая зарегистрирована как штамм Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 (GenBank KY210980). Анализ выведенных аминокислотных последовательностей показал, что ORF1 (5100 н.) кодировала полипротеин длиной 1700 аминокислотных остатков (а.о.); ORF2 (1623 н.) и ORF3 (807 н.) кодировали капсидные белки VP1 (541 а.о.) и VP2 (269 а.о.) соответственно. Полная нуклеотидная последовательность генома российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 имела высокую степень гомологии (98–99 %) с последовательностями рекомбинантных штаммов GII.P16/GII.4_Sydney_2012, появившихся в США и Великобритании в зимнем сезоне 2015/2016. Поскольку исследуемый штамм был рекомбинантным, сравнительный молекулярно-генетический анализ проводился отдельно для каждой ORF.

Сравнительный анализ ORF1

Филогенетический анализ доступных в GenBank полных нуклеотидных последовательностей ORF1 с полимеразой генотипа GII.P16 показал, что изучаемые штаммы разделились на три кластера (I, II и III), внутри которых с индексами поддержки >85 % отдельные клады были сформированы штаммами с одинаковым генотипом VP1 (рис. 1). Кластер III содержал современные рекомбинантные штаммы, у которых полимеразы генотипа GII.P16 была в сочетании с VP1 четырех различных генотипов – GII.1, GII.2, GII.3 и GII.4_Sydney_2012. Гомология ORF1 российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 со штаммами кластера III составила 97.9–99 %.

При сравнительном анализе обнаружено, что длина полных последовательностей ORF1 у штаммов с полимеразой генотипа GII.P16 варьировала от 5094 н. (референсный штамм AY772730_Hu/GII.P16-GII.16/DEU/Neustrelitz/2000) до 5100 н. (кластер III). В результате выравнивания анализируемых последовательностей у рекомбинантных штаммов генотипа GII.P16/GII.17 (кластер I) и у всех штаммов из кластера II была обнаружена вставка

триплета GAA в регионе, кодирующем неструктурный белок p48 (N-terminal protein p48). У современных рекомбинантных штаммов из кластера III в этой же области гена белка p48 была выявлена вставка еще одного триплета GAA или GGA. В ходе анализа нуклеотидных последовательностей ORF1 определено 1317 (25.8 %) переменных сайтов, из которых 906 (17.7 %) были информативными, т. е. встречались в двух и более штаммах.

При анализе выведенных аминокислотных последовательностей полипротеина обнаружено 182 (10.7 %) переменных сайта, из которых 104 (6.1 %) были информативными (табл. 2). Согласно сравнительному анализу, 14 переменных сайтов специфичны для новой появившейся линии полимеразы генотипа GII.P16 (кластер III), причем замены в семи позициях (52, 53, 644, 845, 853, 1546 и 1549) приводили к изменению класса аминокислоты. При оценке функциональной значимости обнаруженных изменений было определено, что три несинонимичные замены (в позициях 52, 53 и 165) и вставка ⁷⁷E/G обнаружены в белке p48, который играет роль в процессе проникновения вируса через мембрану клетки-хозяина (Fernandez-Vega et al., 2004). Из пяти несинонимичных замен, произошедших в полимеразе GII.P16, четыре (в позициях 1482, 1521, 1546 и 1549) были расположены в ее активном центре (см. табл. 2), и это, возможно, повлияло на трансмиссивность вируса.

Сравнительный анализ ORF2

Помимо последовательностей, определенных в этой работе, в филогенетический анализ ORF2 были включены штаммы различных капсидных генотипов, выявленные в комбинации с полимеразой генотипа GII.P16. На филогенетическом дереве частичных нуклеотидных последовательностей ORF2 видно, что анализируемые штаммы сформировали отдельные кластеры в соответствии с генотипом капсидного белка, внутри которых далее разделились на отдельные клады в зависимости от генотипа RdRp (рис. 2).

Нуклеотидные последовательности штаммов генотипа GII.4 разделились на две большие клады. Первая, наиболее полиморфная клада объединила штаммы с полимеразой генотипа GII.P4, которые ранее циркулировали в Новосибирске и относились к шести различным эпидемическим вариантам генотипа GII.4: Farmington_

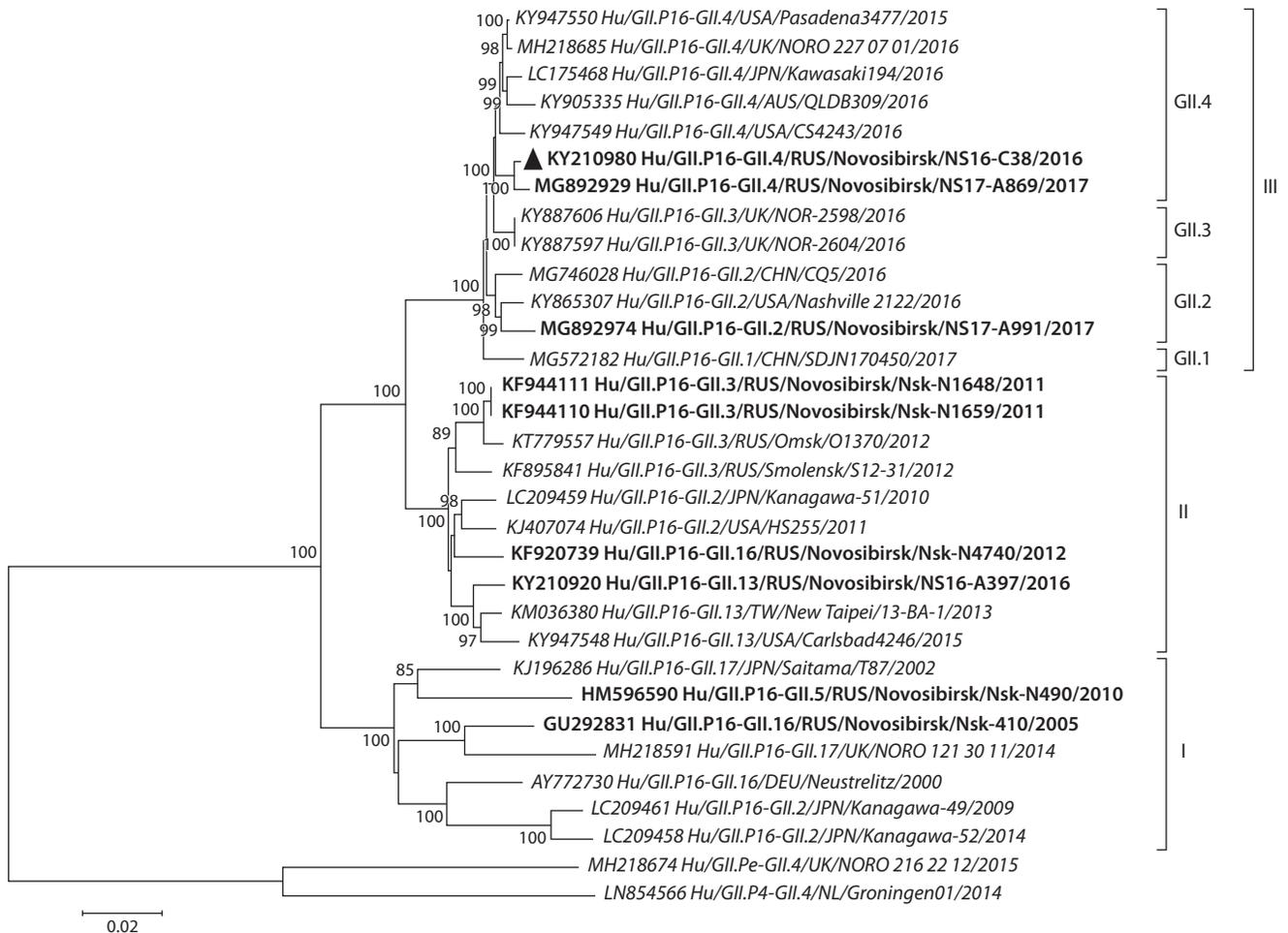


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе полных (5100 н.) последовательностей ORF1 норовирусов с GII.P16 RdRp. Новосибирские штаммы выделены жирным шрифтом, анализируемый штамм отмечен треугольником. Референтные штаммы обозначены курсивом; внешними последовательностями служат штаммы с полимеразой GII.P4 и GII.Pe.

Hills_2002, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, Apeldoorn_2007 и New-Orleans_2009 (Zhirakovskaia et al., 2015). Вторую кладу сформировали штаммы с генотипом капсида GII.4_Sydney_2012, которые далее с высоким индексом поддержки (99–100 %) разделились на два отдельных кластера – GII.Pe и GII.P16 в зависимости от генотипа полимеразы.

Гомология ORF2 российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 со штаммами генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012 из других регионов составила 98.8–99%. При сравнении полных нуклеотидных последовательностей ORF2 штаммов GII.P16/GII.4_Sydney_2012 с вариантами GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и GII.P4/GII.4_New_Orleans_2009 было обнаружено 236 (14.5 %) переменных сайтов, из которых 132 (8.1 %) оказались информативными. Анализ выведенных аминокислотных последовательностей капсидного белка VP1 показал, что у варианта GII.4_Sydney_2012 можно выделить восемь характерных переменных позиций (15, 310, 341, 359, 368, 373, 377 и 396), отличающих их от варианта GII.4_New_Orleans_2009. Из них два сайта (позиции 368 и 373) были расположены в гиперпеременной эпитопе А (табл. 3). Следует отметить, что только один переменный

сайт в позиции 540 был специфичен для нового варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012, однако он не располагался в антигенных регионах основного белка капсида VP1.

Сравнительный анализ ORF3

Филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей ORF3 штаммов с полимеразой генотипа GII.P16 показал, что рассматриваемые последовательности разделились на отдельные кластеры в зависимости от генотипа VP1 (рис. 3). В рамках каждого генотипа VP1 штаммы с разными генетическими вариантами RdRp были сгруппированы в отдельные клады. В результате сравнения полных нуклеотидных последовательностей ORF3 штаммов GII.P16/GII.4_Sydney_2012 с вариантами GII.Pe/GII.4_Sydney_2012 и GII.P4/GII.4_New_Orleans_2009 выявлено 109 (13.5 %) переменных сайтов, из которых 55 (6.8 %) были информативными.

В ходе анализа выведенных аминокислотных последовательностей минорного капсидного белка VP2 у штаммов варианта GII.4_Sydney_2012 выявлено восемь характерных переменных сайтов в позициях 81, 108, 148, 149, 158, 164, 205 и 241 (табл. 4), отличающих их от варианта GII.4_New_Orleans_2009. Кроме этого, еще два переменных

Таблица 2. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей N-терминального белка р48 и РНК-зависимой РНК полимеразы GII.P16 различных штаммов норовируса GII

GenBank ID/Genotype/Country/Year	Белок		p48																																		
	Кластер ^b	Позиция а.о. ^a	9	47	51	52	53	57	67	68	73	77	78	82	85	89	91	96	105	106	132	161	165	168	169	188	191	223	248	275	305	312	327	328			
AY772730 GII.P16-GII.16/DEU/2000	I		S	P	D	N	S	P	R	V	P	-	-	V	F	S	I	E	V	T	L	I	K	M	T	D	R	S	M	I	L	F	G	E			
GU292831 GII.P16-GII.16/RUS/2005			T	I	.	.	-	A	R	.	.	K	
LC209461 GII.P16-GII.2/JPN/2009			T	I	.	.	-	D	.	I	.	.	L	A	.	K	.	I	.	F	Y	.	.	.		
LC209458 GII.P16-GII.2/JPN/2014			T	.	.	P	.	.	.	I	.	-	D	A	.	I	.	L	A	.	K	.	.	F	Y	.	.	.			
KJ196286 GII.P16-GII.17/JPN/2002			I	.	-	E	E	K			
MH218591 GII.P16-GII.17/UK/2014			T	I	.	-	E	A	A	K			
HM596590 GII.P16-GII.5/RUS/2010			T	.	.	.	S	K	I	.	-	K	.	.	G	V	.	M	E	K	.	V				
KF920739 GII.P16-GII.16/RUS/2012	II		T	I	.	-	E	Y	A	.	.	.	L	.	E	.	N	.	L	D			
KM036380 GII.P16-GII.13/TW/2013			T	I	.	-	E	Y	A	.	.	.	L	.	E	.	N	.	L	D			
KY210920 GII.P16-GII.13/RUS/2016			T	I	.	-	E	Y	N	.	.	.	A	.	.	.	L	.	E	.	N	.	L	D			
LC209459 GII.P16-GII.2/JPN/2010			N	S	I	.	-	E	Y	A	.	.	.	L	A	E	.	N	.	L	.	.	E	D				
KJ407074 GII.P16-GII.2/USA/2011			N	S	I	.	-	E	A	Y	G	.	.	A	.	.	.	L	A	E	.	N	V	L	.	E	D					
KF944111 GII.P16-GII.3/RUS/2011			T	I	S	.	-	E	Y	V	.	.	.	A	V	.	L	.	E	.	N	.	L	D				
KF944110 GII.P16-GII.3/RUS/2011			T	I	S	.	-	E	Y	V	.	.	.	A	V	.	L	.	E	.	N	.	L	D				
KT779557 GII.P16-GII.3/RUS/2012			T	L	.	.	.	I	S	.	-	E	Y	V	.	.	.	A	V	.	L	.	E	.	N	.	L	D				
KF895841 GII.P16-GII.3/RUS/2012			T	I	S	.	-	E	Y	A	.	.	.	L	.	E	.	N	.	L	D				
KY947549 GII.P16-GII.4/USA/2016	III		T	.	E	P	.	.	I	.	-	E	Y	A	.	R	L	.	E	L	D				
KY210980 GII.P16-GII.4/RUS/NS16-C38/2016			T	.	G	E	P	.	.	I	.	-	E	E	Y	.	.	.	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				
MG892929 GII.P16-GII.4/RUS/NS17-A869/2017			T	.	G	E	P	.	.	I	.	-	E	E	Y	.	.	.	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				
KY947550 GII.P16-GII.4/USA/2015			T	.	E	P	.	.	I	.	-	G	E	Y	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				
MH218685 GII.P16-GII.4/UK/2016			T	.	E	P	.	.	I	.	-	G	E	Y	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				
LC175468 GII.P16-GII.4/JPN/2016			T	.	E	P	.	.	I	.	-	G	E	Y	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	F	.	.	.	D				
KY887606 GII.P16-GII.3/UK/2016			T	.	E	P	L	K	I	.	-	E	E	Y	A	.	R	L	A	E	.	.	.	L	D				
KY887597 GII.P16-GII.3/UK/2016			T	.	E	P	L	.	I	.	-	E	E	Y	A	.	R	L	A	E	.	.	.	L	D				
MG746028 GII.P16-GII.2/CHN/2016			T	.	K	P	.	.	I	.	-	E	E	Y	A	.	V	R	L	.	E	.	.	L	D				
KY865307 GII.P16-GII.2/USA/2016			T	.	K	P	.	.	I	.	-	E	E	Y	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				
MG892974 GII.P16-GII.2/RUS/2017			T	.	K	P	.	.	I	.	-	E	E	Y	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				
MG572182 GII.P16-GII.1/CHN/2017			T	.	K	P	.	.	I	.	-	E	E	Y	A	.	R	L	.	E	.	.	.	L	D				

GenBank ID/Genotype/Country/Year	Белок		RdRp																													
	Кластер ^b	Позиция а.о. ^a	1223	1268	1270	1310	1312	1314	1326	1335	1340	1362	1364	1367	1382	1387	1404	1463	1482	1501	1515	1521	1546	1549	1552	1575	1585	1616	1691			
AY772730 GII.P16-GII.16/DEU/2000	I		T	R	S	H	H	A	I	K	F	D	I	R	V	A	V	T	S ^c	T	N	V ^c	K ^c	T ^c	R	D	S	N	S			
GU292831 GII.P16-GII.16/RUS/2005			Y	.	K		
LC209461 GII.P16-GII.2/JPN/2009			T	R	.	.	K	.	I	.	.	S			
LC209458 GII.P16-GII.2/JPN/2014			T	.	.	.	K	.	I	.	.	S			
KJ196286 GII.P16-GII.17/JPN/2002			.	K	N	.	.	V	V	.	.	.	K	I	N	.	.			
MH218591 GII.P16-GII.17/UK/2014			Y	.	.	K	K	.	S	.		
HM596590 GII.P16-GII.5/RUS/2010			.	K	N	Y	.	V	T	.	.	.	K	I	A	S	.			
KF920739 GII.P16-GII.16/RUS/2012	II		.	K	.	.	.	V	T	R	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KM036380 GII.P16-GII.13/TW/2013			V	T	.	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KY210920 GII.P16-GII.13/RUS/2016			.	.	.	Y	V	T	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
LC209459 GII.P16-GII.2/JPN/2010			V	T	.	.	.	K	I	S	.	V	.	A	K	K	N	T	.	N		
KJ407074 GII.P16-GII.2/USA/2011			Y	V	T	.	.	.	V	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N		
KF944111 GII.P16-GII.3/RUS/2011			M	.	Y	.	.	V	T	.	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N	
KF944110 GII.P16-GII.3/RUS/2011			M	.	Y	.	.	V	T	.	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N	
KT779557 GII.P16-GII.3/RUS/2012			M	.	T	.	.	V	T	.	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N	
KF895841 GII.P16-GII.3/RUS/2012			V	T	.	.	.	V	K	I	S	.	I	.	A	K	K	N	T	.	N	
NC039477 GII.P16-GII.4/GBR/2016	III		V	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
KY947549 GII.P16-GII.4/USA/2016			V	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
KY210980 GII.P16-GII.4/RUS/NS16-C38/2016			V	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
MG892929 GII.P16-GII.4/RUS/NS17-A869/2017			V	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
KY947550 GII.P16-GII.4/USA/2015			V	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
MH218685 GII.P16-GII.4/UK/2016			V	T	.	.	.	E	.	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K	N	T	.	N		
LC175468 GII.P16-GII.4/JPN/2016			T	.	.	.	E	V	K	I	S	.	I	T	A	K	I	Q	A	K						

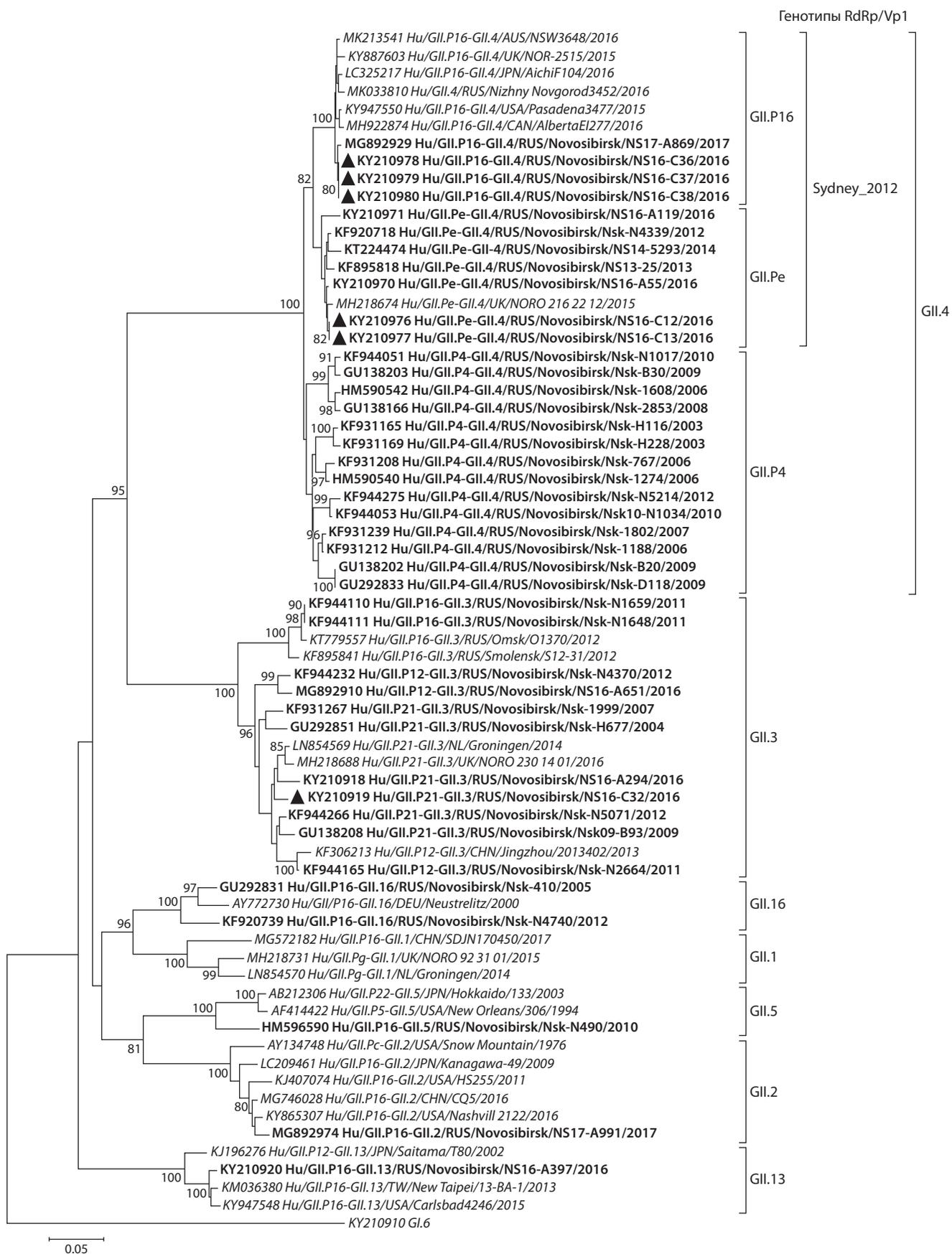


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе частичных (~600 н.) последовательностей ORF2 норовирусов GII.

Здесь и на рис. 3: новосибирские штаммы выделены жирным шрифтом; штаммы 2016 г. отмечены треугольником; референсные штаммы выделены курсивом; внешняя последовательность – норовирус GI.6.

Таблица 3. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей VP1 норовирусов генотипов GII.4_Sydney_2012 и GII.4_New_Orleans_2009

GenBank ID/Country/Year	Домен VP1 Генотип норовируса	Shell (S)				Protruding P2										P1					
		15	119	145	174	297	309	310	333	340	341	359	368	372	373	377	393	396	414	539	540
JN595867 USA/2010 KP244321 ITA/2012	GII.P4/GII.4_New Orleans_2009	T	I	I	P	R ^b	N	S	V	T	N	S	A ^b	D ^b	N ^b	T	S ^c	P ^c	H	A	L
KC175323 HK/2012 KJ451059 TW/2013 KU311158 CAN/2014 MH218674 UK/2015 KU678203 TW/2016	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	A	V	V	.	.	S	N	.	.	D	A	E	.	R	A	.	H	P	.	.
KY210977 RUS/NS16-C13/2016 MG214988 CHN/2017		A	V	V	S	H	S	N	.	.	D	A	E	N	.	A	G	H	P	.	.
KY947550 USA/2015 KY887603 UK/2015 MH922874 CAN/2016 LC325217 JPN/2016 MK213541 AUS/2016	GII.P16/GII.4_Sydney_2012	A	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V
KY210980 RUS/NS16-C38/2016 MG892929 RUS/NS17-A869/2017		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V
		A	.	.	S	.	N	M	.	.	D	A	E	.	H	A	.	H	.	.	V

^a Позиции, в которых замены а.о. были выявлены в двух и более штаммах.

^b Гипервариабельный эпитоп A (Mallory et al., 2019).

^c Вариабельный эпитоп D, который регулирует аффинность к HBGA (Mallory et al., 2019).

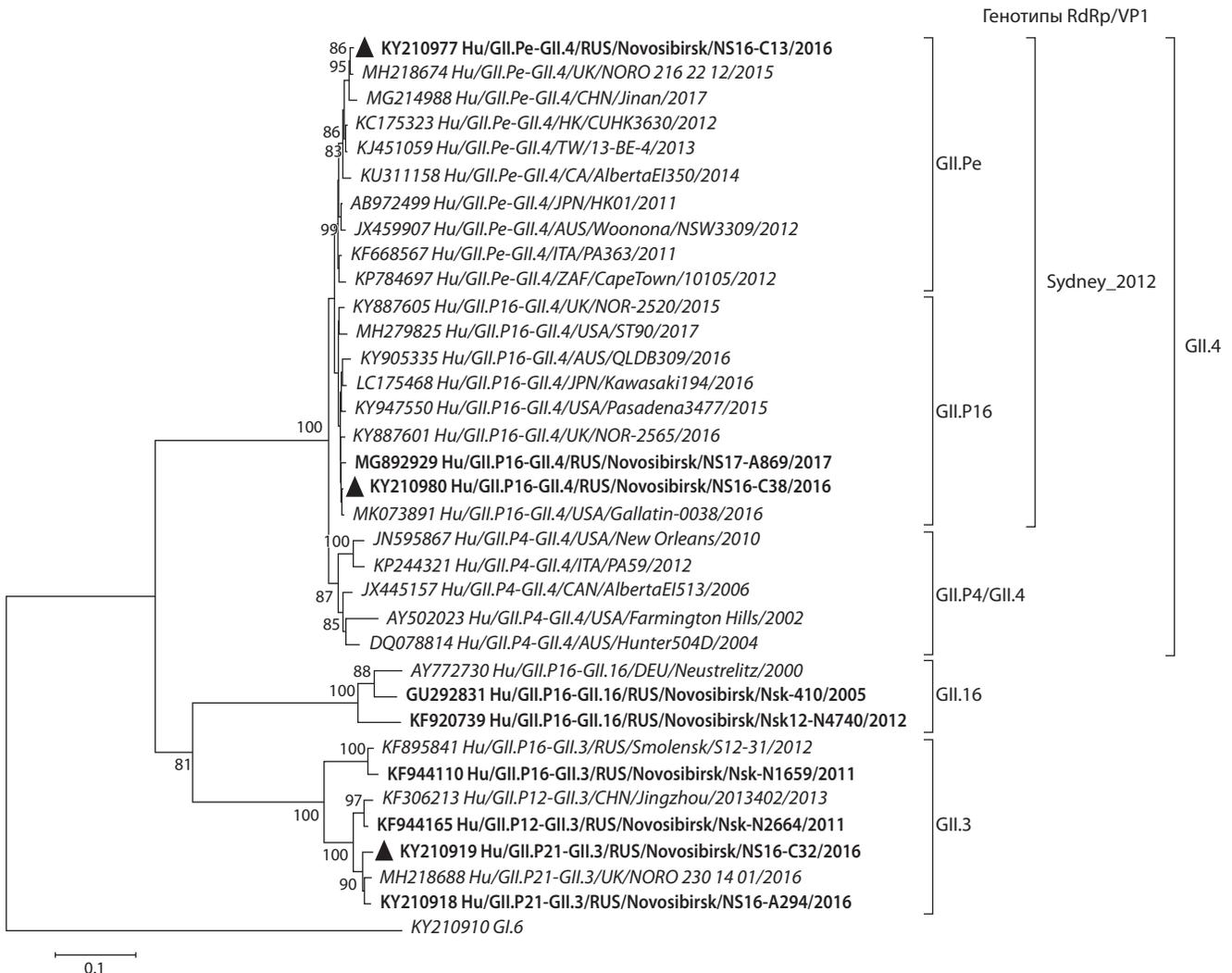


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе полных (807 н.) последовательностей ORF3 норовирусов GII.

Таблица 4. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей VP2 норовирусов генотипов GII.4_Sydney_2012 и GII.4_New_Orleans_2009

GenBank ID/Country/Year	Генотип норовируса	Позиция а.о.*																
		51	73	81	108	139	148	149	155	157	158	164	174	191	205	241	268	
JN595867 USA/2010	GII.P4/GII.4_New Orleans_2009	S	K	R	T	A	A	T	S	S	T	I	T	L	N	V	V	
KP244321 ITA/2012		N	A
AB972499 JPN/2011	GII.Pe/GII.4_Sydney_2012	N	.	K	A	V	D	A	.	.	K	T	.	.	S	I	.	
KC175323 HK/2012		N	R	K	A	V	D	A	.	.	K	T	.	F	S	I	A	
KU311158 CAN/2014		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	T	.	F	S	I	.	
MH218674 UK/2015		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	A	I	F	S	I	A	
KY210977 RUS/NS16-C13/2016		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	T	I	F	S	I	A	
MG214988 CHN/2017		N	R	K	A	.	D	A	.	.	K	T	I	F	S	I	.	
KY887605 UK/2015		GII.P16/GII.4_Sydney_2012	N	.	K	I	.	D	A	P	N	K	.	I	.	S	I	A
KY947550 USA/2015			N	.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.
KY887601 UK/2016			N	.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.
KY905335 AUS/2016			N	.	.	A	.	D	A	P	N	K	A	I	.	S	I	.
LC175468 JPN/2016	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.	
MK073891 USA/2016	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.	
KY210980 RUS/NS16-C38/2016	.		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.	
MG892929 RUS/NS17-A869/2017	N		.	K	A	.	D	A	P	N	K	T	I	.	S	I	.	

* Позиции, в которых замены а.о. были выявлены в двух и более штаммах.

ных сайта в позициях 155 и 157 были специфичны для нового варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012.

Обсуждение

Настоящая работа является частью многолетнего мониторинга генетического разнообразия норовирусов, ассоциированных со спорадическими случаями ОГЭ в Новосибирске. В марте 2016 г. в фекалиях госпитализированных детей впервые был выделен норовирус нового генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012. В образцах от госпитализированных взрослых этот генотип впервые детектирован осенью 2016 г. (GenBank KY210983, MG892912, MG892914). Поиск в базе данных GenBank показал, что в европейской части России подобные GII.4_Sydney_2012 норовирусы (GenBank MK033810–MK033811) были обнаружены в образцах детей из Нижнего Новгорода также в конце 2016 г.; к сожалению, генотип полимеразы для этих изолятов не определен.

Норовирусы с полимеразой генотипа GII.P16 долгое время считались не очень распространенными, хотя опубликованы сообщения о том, что норовирусы генотипа GII.P16/GII.2 вызвали локальные вспышки ОГЭ (2009/2010 и 2012/2014 гг.) в Японии (Iritani et al., 2012; Motomura et al., 2016), а генотипа GII.P16/GII.13 (2009/2010 г.) – в Непале (Hoа-Tran et al., 2015). За 10-летний период (2003–2012) мониторинга генотипов норовируса в Новосибирске (Zhirakovskaia et al., 2015) изоляты с полимеразой генотипа GII.P16 были выявлены всего в пяти образцах: GII.P16/GII.16 (GenBank GU292831, KF920739), GII.P16/GII.3 (GenBank KF944110, KF944111) и GII.P16/GII.5 (GenBank HM596590). До 2016 г. в Российской Федерации, кроме Новосибирска, норовирусы генотипа GII.P16/GII.3 в единичных случаях были выявлены в Омске (GenBank KT779557, KY362198) и Смоленске (GenBank KF895841), а генотипа GII.P16/GII.16 – в Москве и Санкт-Петербурге (GenBank FJ383842, FJ383877). В Новосибирске рекомбинантные норовирусы с новой полимеразой генотипа GII.P16, которая отличалась от варианта 2010–2012 гг. и была в сочетании с капсидами нескольких генотипов (GII.13, GII.2 и GII.4_Sydney_2012), стали часто детекти-

роваться в образцах от взрослых пациентов с ОГЭ начиная с 2016 г. (данные не опубликованы). Наши результаты подтверждают гипотезу о распространении вновь возникших рекомбинантных штаммов норовируса с новой GII.P16 полимеразой в разных регионах мира (Barreira et al., 2017; Bidalot et al., 2017; Cannon et al., 2017; Choi et al., 2017; Ruis et al., 2017; Hata et al., 2018; Lun et al., 2018).

До начала этого исследования в международной базе данных GenBank было доступно всего четыре полногеномных последовательности российских штаммов норовируса рекомбинантного генотипа GII.P16/GII.3 (Zhirakovskaia et al., 2015, 2019). В данной работе была определена полная нуклеотидная последовательность генома российского штамма Hu/GII.P16-GII.4/RUS/Novosibirsk/NS16-C38/2016 нового рекомбинантного генотипа GII.P16/GII.4_Sydney_2012. Сравнительный анализ показал, что уникальные изменения произошли в аминокислотных последовательностях двух неструктурных белков – N-терминальном белке р48 и полимеразе GII.P16, а также в минорном капсидном белке VP2. При этом существенных изменений в основном белке капсида VP1 генотипа GII.4_Sydney_2012 обнаружено не было.

РНК-зависимая РНК-полимераза играет критическую роль в репликации генома норовируса. Регион, кодирующий полимеразу, изменяется достаточно быстро, при этом наблюдается отличие в скорости накопления мутаций для различных генотипов (Ozaki et al., 2018). Полученные нами данные согласуются с гипотезой Ruis et al. (2017) о том, что необычное распространение по всему миру штаммов с новым вариантом полимеразы GII.P16 связано в основном с изменениями, произошедшими в активном центре полимеразы, которые могли повысить трансмиссивность норовируса. Однако мы предполагаем, что изменения в N-терминальном белке р48 тоже сыграли свою роль в распространении этого нового генетического варианта норовируса. Ранее было показано, что белок р48 может связываться в инфицированной клетке с факторами, ответственными за разрушение вируса (host restriction factors), способствуя уходу норовируса от иммунной системы, а кодирующий его регион имеет более высокую

скорость эволюции, чем геном норовируса в целом (Cotten et al., 2014). Кроме того, белок р48 способен блокировать местный секреторный иммунитет эпителиальных клеток кишечника, индуцировать дезинтеграцию аппарата Гольджи и нарушать внутриклеточный трафик белков (Fernandez-Vega et al., 2004; Roth, Karst, 2016). Мы предполагаем, что вставка глутаминовой кислоты в область, уже содержащую четыре последовательных остатка глутаминовой кислоты, увеличивает отрицательный заряд на N-конце белка р48, и это могло повлиять как на способность норовируса проникать через мембранные структуры эпителиальных клеток кишечника, так и на скорость дезинтеграции клеточного аппарата Гольджи.

Минорный белок капсида VP2, играя важную роль в процессе репликации вируса (Vongprunsawad et al., 2013) и в стабильности вириона (Lin et al., 2014), также участвует в модуляции иммунного ответа хозяина (Roth, Karst, 2016). Скорость накопления мутаций в этом белке превышает таковую для основного белка капсида VP1 (Cotten et al., 2014). Выявленные нами аминокислотные замены могли повлиять на способность VP2 подавлять презентацию антигенов на клеточных мембранах и общую индукцию защитного иммунитета человека.

Заклучение

В результате многолетнего мониторинга генотипов RdRp/VP1 норовирусов было зафиксировано появление в России нового рекомбинантного варианта GII.P16/GII.4_Sydney_2012. Проведенный анализ показал, что распространение GII.P16/GII.4_Sydney_2012 не связано с изменением антигенного профиля основного капсидного белка VP1 норовируса, которое обычно приводило к появлению новых эпидемических вариантов GII.4. В случае GII.P16/GII.4_Sydney_2012, вероятно, определенную роль сыграли изменения в минорном белке VP2, которые могли повлиять на антигенный состав вириона и способствовали уходу от иммунного ответа. Кроме того, накопление мутаций в неструктурных белках – N-терминальном белке р48 и полимеразе, возможно, повысило трансмиссивность норовирусов с новым вариантом полимеразы GII.P16. Дальнейший мониторинг генотипов позволит оценить распространение вновь возникших рекомбинантных норовирусов с новой полимеразой GII.P16 на территории Российской Федерации и предсказать эпидемический потенциал появившихся штаммов.

Список литературы / References

Ahmed S.M., Hall A.J., Robinson A.E., Verhoef L., Premkumar P., Parashar U.D., Koopmans M., Lopman B.A. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014;14(8):725-730. DOI 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.

Barreira D.M.P.G., Fumian T.M., Tonini M.A.L., Volpini L.P.B., Santos R.P., Ribeiro A.L.C., Leite J.P.G., Souza M.T.B.M., Brasil P., da Cunha D.C., Miagostovich M.P., Spano L.C. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One.* 2017; 12(12):e0189504. DOI 10.1371/journal.pone.0189504.

Bartsch S.M., Lopman B.A., Ozawa S., Hall A.J., Lee B.Y. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS One.* 2016;11(4): e0151219. DOI 10.1371/journal.pone.0151219.

Bidalot M., Théry L., Kaplon J., de Rougemont A., Ambert-Balay K. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2017; 22(15):pii=30508. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30508.

Brown J.R., Roy S., Shah D., Williams C.A., Williams R., Dunn H., Hartley J., Harris K., Breuer J. Norovirus transmission dynamics in a pediatric hospital using full genome sequences. *Clin. Infect. Dis.* 2019;68(2):222-228. DOI 10.1093/cid/ciy438.

Brown J.R., Roy S., Tutill H., Williams R., Breuer J. Super-infections and relapses occur in chronic norovirus infections. *J. Clin. Virol.* 2017;96:44-48. DOI 10.1016/j.jcv.2017.09.009.

Bull R.A., White P.A. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol.* 2011;19:233-240. DOI 10.1016/j.tim.2011.01.002.

Cannon J.L., Barclay L., Collins N.R., Wikswo M.E., Castro C.J., Magana L.C., Gregoricus N., Marine R.L., Chhabra P., Vinje J. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2017;55(7):2208-2221. DOI 10.1128/JCM.00455-17.

Choi Y.S., Koo E.S., Kim M.S., Choi J.D., Shin Y., Jeong Y.S. Re-emergence of a GII.4 norovirus Sydney 2012 variant equipped with GII.P16 RdRp and its predominance over novel variants of GII.17 in South Korea in 2016. *Food Environ. Virol.* 2017;9(2):168-178. DOI 10.1007/s12560-017-9278-4.

Cotten M., Petrova V., Phan M.V., Rabaa M.A., Watson S.J., Ong S.H., Kellam P., Baker S. Deep sequencing of norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting. *J. Virol.* 2014; 88(19):11056-11069. DOI 10.1128/JVI.01333-14.

de Graaf M., van Beek J., Vennema H., Podkolzin A.T., Hewitt J., Bucardo F., Templeton K., Mans J., Nordgren J., Reuter G., Lynch M., Rasmussen L.D., Iritani N., Chan M.C., Martella V., Ambert-Balay K., Vinje J., White P.A., Koopmans M.P. Emergence of a novel GII.17 norovirus – end of the GII.4 era? *Euro Surveill.* 2015; 20(26):pii=21178. DOI 10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178.

Eden J.S., Tanaka M.M., Boni M.F., Rawlinson W.D., White P.A. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J. Virol.* 2013;87(11):6270-6282. DOI 10.1128/JVI.03464-12.

Fernandez-Vega V., Sosnovtsev S.V., Belliot G., King A.D., Mitra T., Gorbalenya A., Green K.Y. Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J. Virol.* 2004;78(9):4827-4837. DOI 10.1128/JVI.78.9.4827-4837.2004.

Green K.Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Racaniello V.R., Roizman B. (Eds.). *Fields Virology*. 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013;582-608.

Han J., Wu X., Chen L., Fu Y., Xu D., Zhang P., Ji L. Emergence of norovirus GII.P16-GII.2 strains in patients with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2016–2017. *BMC Infect. Dis.* 2018;18(1):342. DOI 10.1186/s12879-018-3259-6.

Hata M., Nakamura N., Kobayashi S., Onouchi A., Saito T., Hirose E., Adachi H., Saito N., Ito M., Yasui Y., Matsumoto M., Minagawa H. Emergence of new recombinant noroviruses GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 in Aichi, Japan, during the 2016/17 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018;71(4):319-322. DOI 10.7883/yoken.JJID.2017.520.

Hoang-Tran T.N., Nakagomi T., Sano D., Sherchand J.B., Pandey B.D., Cunliffe N.A., Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses detected in Nepalese children with acute diarrhea between 2005 and 2011: increase and predominance of minor genotype GII.13. *Infect. Genet. Evol.* 2015;30:27-36. DOI 10.1016/j.meegid.2014.12.003.

Hoang-Tran T.N., Trainor E., Nakagomi T., Cunliffe N.A., Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 2013;56(3):269-277. DOI 10.1016/j.jcv.2012.11.011.

Iritani N., Kaida A., Abe N., Sekiguchi J., Kubo H., Takakura K., Goto K., Ogura H., Seto Y. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009–2010 season in Osaka City, Japan. *J. Med. Virol.* 2012;84(3):517-525. DOI 10.1002/jmv.23211.

- Kirby A.E., Teunis P.F., Moe C.L. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 2015;211(1):166-167. DOI 10.1093/infdis/jiu385.
- Kroneman A., Vega E., Vennema H., Vinje J., White P.A., Hansman G., Green K., Martella V., Katayama K., Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 2013; 158:2059-2068. DOI 10.1007/s00705-013-1708-5.
- Lin Y., Fengling L., Lianzhu W., Yuxiu Z., Yanhua J. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *J. Microbiol.* 2014;52(11): 970-975. DOI 10.1007/s12275-014-4323-6.
- Lun J.H., Hewitt J., Yan G.J.H., Enosi T.D., Rawlinson W.D., White P.A. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 was the dominant norovirus identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses.* 2018; 10(10):548. DOI 10.3390/v10100548.
- Mallory M.L., Lindesmith L.C., Graham R.L., Baric R.S. GII.4 human norovirus: surveying the antigenic landscape. *Viruses.* 2019;11(2): 177. DOI 10.3390/v11020177.
- Motomura K., Boonchan M., Noda M., Tanaka T., Takeda N. Norovirus epidemics caused by new GII.2 chimera viruses in 2012–2014 in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2016;42:49-52. DOI 10.1016/j.meegid.2016.04.026.
- Ozaki K., Matsushima Y., Nagasawa K., Motoya T., Ryo A., Kuroda M., Katayama K., Kimura H. Molecular evolutionary analyses of the RNA-dependent RNA polymerase region in norovirus genogroup II. *Front. Microbiol.* 2018;9:3070. DOI 10.3389/fmicb.2018.03070.
- Parra G.I., Squires R.B., Karangwa C.K., Johnson J.A., Lepore C., Sosnovtsev S.V., Green K.Y. Static and evolving norovirus genotypes: implications for epidemiology and immunity. *PLoS Pathog.* 2017; 13(1):e1006136. DOI 10.1371/journal.ppat.1006136.
- Petrignani M., Verhoef L., de Graaf M., Richardus J.H., Koopmans M. Chronic sequelae and severe complications of norovirus infection: a systematic review of literature. *J. Clin. Virol.* 2018;105:1-10. DOI 10.1016/j.jcv.2018.05.004.
- Qi R., Huang Y., Liu J., Sun Y., Sun X., Han H., Qin X., Zhao M., Wang L., Li W., Li J., Chen C., Yu X. Global prevalence of asymptomatic norovirus infection: a meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2018;2(2-3):50-58. DOI 10.1016/j.eclinm.2018.09.001.
- Roth A.N., Karst S.M. Norovirus mechanisms of immune antagonism. *Curr. Opin. Virol.* 2016;16:24-30. DOI 10.1016/j.coviro.2015.11.005.
- Ruis C., Roy S., Brown J.R., Allen D.J., Goldstein R.A., Breuer J. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179572. DOI 10.1371/journal.pone.0179572.
- Simmons K., Gambhir M., Leon J., Lopman B. Duration of immunity to norovirus gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;19(8):1260-1267. DOI 10.3201/eid1908.130472.
- Towers S., Chen J., Cruz C., Melendez J., Rodriguez J., Salinas A., Yu F., Kang Y. Quantifying the relative effects of environmental and direct transmission of norovirus. *R. Soc. Open Sci.* 2018;5(3):170602. DOI 10.1098/rsos.170602.
- van Beek J., Ambert-Balay K., Botteldoorn N., Eden J.S., Fonager J., Hewitt J., Iritani N., Kroneman A., Vennema H., Vinje J., White P.A., Koopmans M., on behalf of NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance.* 2013; 18(1):pii=20345. Available online: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.18.01.20345-en>.
- Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(2):373-381. DOI 10.1128/JCM.01535-14.
- Vongpunsawad S., Venkataram Prasad B.V., Estes M.K. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *J. Virol.* 2013;87(9):4818-4825. DOI 10.1128/JVI.03508-12.
- Woodward J., Gkrania-Klotsas E., Kumararatne D. Chronic norovirus infection and common variable immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2017;188(3):363-370. DOI 10.1111/cei.12884.
- Zhirakovskaia E.V., Tikunov A.Y., Bodnev S.A., Klemesheva V.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003–2012. *J. Med. Virol.* 2015;87(5):740-753. DOI 10.1002/jmv.24068.
- Zhirakovskaia E., Tikunov A., Tymentsev A., Sokolov S., Sedelnikova D., Tikunova N. Changing pattern of prevalence and genetic diversity of rotavirus, norovirus, astrovirus, and bocavirus associated with childhood diarrhea in Asian Russia, 2009–2012. *Infect. Genet. Evol.* 2019;67:167-182. DOI 10.1016/j.meegid.2018.11.006.

ORCID ID

E.V. Zhirakovskaia orcid.org/0000-0001-6787-8393
A.Y. Tikunov orcid.org/0000-0001-5613-5447
E.I. Krasnova orcid.org/0000-0003-2625-5442
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

Благодарности. Работа поддержана проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 (№ АААА-Ф17-117020210027-9). Авторы выражают благодарность медицинскому персоналу Детской городской клинической больницы № 3 за сбор образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.05.2019. После доработки 13.06.2019. Принята к публикации 23.06.2019.

Нокаут гена *shp-2* приводит к повышению CAR-опосредованной цитотоксичности НК-клеток линии YT

В.Г. Субракова^{1,2}✉, С.В. Кулемзин¹✉, Т.Н. Беловежец^{1,2}, А.Н. Чикаев¹, Н.А. Чикаев¹, О.А. Коваль^{1,3},
А.А. Горчаков^{1,2}, А.В. Таранин^{1,2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: subrakova.vera@gmail.com; skulemzin@mcb.nsc.ru

Аннотация. Одна из самых распространенных причин смертей пациентов в России, наряду с болезнями системы кровообращения, – это онкологические заболевания. Перспективным средством в борьбе с раковыми клетками представляются НК-клетки (естественные киллеры), однако для успешного применения в терапии онкологических заболеваний необходимо обеспечить их накопление в опухолевых очагах, устойчивость к иммуносупрессивному микроокружению, а также более высокую цитотоксическую активность. Известно, что НК-лимфоциты уничтожают раковые клетки, экспрессирующие специфические стресс-лиганды; при этом баланс сигналов от ингибирующих и активирующих рецепторов на поверхности НК-клетки определяет, будет ли запущена цитотоксическая реакция. Один из теоретически возможных способов повышения цитотоксичности состоит в том, чтобы при помощи генетического редактирования усилить активационные сигнальные каскады в НК-клетках и/или ослабить ингибирующие, таким образом сместив баланс сигналов в сторону активации лимфоцитов и лизиса мишеней. НК-клетки с таким модифицированным цитотоксическим потенциалом могут эффективнее уничтожать раковые мишени, обладающие так называемой устойчивостью к лизису. В этой работе мы предлагаем дважды модифицировать НК-клетки. Во-первых, при помощи системы CRISPR/Cas9 проводить нокаут гена *shp-2* (*PTPN11*), кодирующего белок Shp-2 – негативный регулятор активации НК-клеток; во-вторых, при помощи лентивирусных векторов интегрировать кассету, кодирующую CAR (химерный антигенный рецептор), способный специфично связываться с антигенами на поверхности раковой мишени и генерировать активирующий сигнал. В качестве модельной НК-клеточной линии нами была выбрана перевиваемая линия НК-подобного фенотипа YT, поскольку эти клетки не нуждаются в специфических цитокинах для культивирования и могут проявлять перфорин/гранзим-опосредованную цитотоксическую активность. Мы показали, что сочетание нокаута гена *shp-2* и экспрессии CAR повышает цитотоксичность эффекторных клеток на модели НК-устойчивой клеточной линии аденокарциномы простаты человека Du-145, экспрессирующей специфично узнаваемый CAR антиген, белок PSMA. Подобные линии с «усиленным» цитотоксическим фенотипом в перспективе могут быть использованы для нужд противораковой терапии.

Ключевые слова: НК-клетки; CRISPR/Cas9; CAR-NK; Shp-2.

Для цитирования: Субракова В.Г., Кулемзин С.В., Беловежец Т.Н., Чикаев А.Н., Чикаев Н.А., Коваль О.А., Горчаков А.А., Таранин А.В. Нокаут гена *shp-2* приводит к повышению CAR-опосредованной цитотоксичности НК-клеток линии YT. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):80-86. DOI 10.18699/VJ20.598

shp-2 gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK-cells

V.G. Subrakova^{1,2}✉, S.V. Kulemzin¹✉, T.N. Belovezhets^{1,2}, A.N. Chikaev¹, N.A. Chikaev¹, O.A. Koval^{1,3},
A.A. Gorchakov^{1,2}, A.V. Tarantin^{1,2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: subrakova.vera@gmail.com; skulemzin@mcb.nsc.ru

Abstract. In Russia, cancer is the second leading cause of death following cardiovascular diseases. Adoptive transfer of NK cells is a promising approach to fight cancer; however, for their successful use in cancer treatment, it is necessary to ensure their robust accumulation at tumor foci, provide resistance to the immunosuppressive tumor microenvironment, and to engineer them with higher cytotoxic activity. NK lymphocytes are known to kill cancer cells expressing a number of stress ligands; and the balance of signals from inhibitory and activating receptors on the surface of the NK cell determines whether a cytotoxic reaction is triggered. We hypothesized that stronger cytotoxicity of NK cells could be achieved via gene editing aimed at enhancing the activating signaling cascades and/or weakening the inhibitory ones, thereby shifting the balance of signals towards NK cell activation and target cell lysis. Here, we took advantage of the CRISPR/Cas9 system to introduce mutations in the coding sequence of the *shp-2* (*PTPN11*) gene encoding the

signaling molecule of inhibitory pathways in NK cells. These *shp-2* knock-out NK cells were additionally transduced to express a chimeric antigen receptor (CAR) that selectively recognized the antigen of interest on the target cell surface and generated an activating signal. We demonstrate that the combination of *shp-2* gene knockout and CAR expression increases the cytotoxicity of effector NK-like YT cells against human prostate cancer cell line Du-145 with ectopic expression of PSMA protein, which is specifically targeted by the CAR.

Key words: NK cells; CRISPR/Cas9; CAR-NK; Shp-2.

For citation: Subrakova V.G., Kulemzin S.V., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Chikaev N.A., Koval O.A., Gorchakov A.A., Taranin A.V. *shp-2* gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK-cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):80-86. DOI 10.18699/VJ20.598

Введение

Клетки – естественные киллеры (НК) представляют собой цитотоксические лимфоциты, способные уничтожать инфицированные или трансформированные клетки. Цитотоксическая активность НК-лимфоцитов регулируется взаимодействием активирующих и ингибирующих рецепторов с лигандами на поверхности клеток-мишеней (Malarkannan, 2006; Lee, Gasser, 2010; Becker et al., 2016; Del Zotto et al., 2017).

Ингибирующие рецепторы играют важную роль в функционировании НК-клеток, поскольку лигандами большинства из них являются молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС-I, присутствующие на поверхности большей части клеток организма, но, как правило, отсутствующие на опухолевых или зараженных вирусом клетках (Hewitt, 2003; de Charette et al., 2016). Таким образом, клетки организма не подвергаются уничтожению, а клетки, утратившие МНС-I, уничтожаются (Kärre et al., 1986; Hanke et al., 1999). Однако способность НК-клеток к лизису мишеней не всегда коррелирует с отсутствием экспрессии МНС-I и зависит также от наличия лигандов к активирующим рецепторам (Serwenka et al., 2001; Paul, Lal, 2017). Передача сигналов от ингибирующих рецепторов осуществляется с помощью фосфатаз, в основном таких, как SH2-содержащая инозитолфосфатаза-1 (SHIP-1), и тирозинфосфатаз Shp-1 и Shp-2. Происходит это за счет дефосфорилирования фосфатазами тирозинов в ITAM-мотивах активирующих рецепторов, после чего передача активирующего сигнала прекращается (Rehman et al., 2018).

Естественные киллеры успешно используют в терапии онкологических заболеваний (Rezvani et al., 2017). Тем не менее вследствие иммуносупрессии, вызванной опухолевыми клетками и опухолевым микроокружением, цитотоксичность НК-клеток заметно снижается (Mamessier et al., 2011; Pasero et al., 2016; Suen et al., 2018). Усиление их цитотоксичности может быть достигнуто различными способами: модификацией сигнальных путей, рецепторов НК-клеток или опосредованной цитокинами активацией НК-клеток (Igarashi et al., 2004; Childs, Carlsten, 2015; Yang et al., 2017; Freund-Brown et al., 2018; Nayyar et al., 2019). Мы предположили, что модификация ингибирующего сигнального пути через нокаутирование гена *shp-2* приведет к значительному ослаблению ингибирующего сигналинга и, соответственно, усилению цитотоксической активности модельных НК-клеток.

Материалы и методы

Клеточные линии и их культивирование. Клеточные линии YT, Du-145-PSMA и HEK293T культивировали

в среде Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Конструирование векторов. Для конструирования протоспейсеров *shp-2* специфичных сгРНК (единой направляющей РНК) был проведен поиск последовательностей сгРНК с помощью нескольких инструментов, предсказывающих эффективность гРНК (направляющей РНК) (Mogeno-Mateos et al., 2015; Doench et al., 2016). Выбраны следующие две последовательности мишеней: gtgcagatcctacctctgaaagg и acagtactacaactcaagcagg (PAM-сайт выделен подчеркиванием).

Для экспрессии Cas9 и сгРНК использовали вектор lentiCRISPRv2, предоставленный проф. Feng Zhang (Addgene #52961, США) (Sanjana et al., 2014). Синтезированные олигонуклеотиды, соответствующие выбранным мишеням, переводили попарно в дуплексное состояние денатурацией на кипящей водяной бане с последующей медленной ренатурацией и клонировали в вектор lentiCRISPRv2 по сайтам рестрикции BsmBI.

Плазмидная ДНК клонов lentiCRISPRv2-Shp2g1 и lentiCRISPRv2-Shp2g2, включающих в себя *shp2*-специфичные сгРНК1 и сгРНК2, была смешана с ДНК вспомогательных плазмид psPAX2 и pMD2.G (предоставлены проф. D. Trono) в массовом соотношении 10:10:7.5:2.5, в суммарном количестве 3 мкг. С помощью метода кальций-фосфатной трансфекции (Kutner et al., 2009) полученная смесь плазмидных ДНК была доставлена в клетки линии HEK293T. Супернатанты, содержащие псевдотипированные лентивирусные частицы, собирали через 48 ч после трансфекции, фильтровали через PES-фильтры 0.45 мкм и использовали в свежем виде либо хранили при –70 °С.

Трансдукция клеток YT. Для улучшения трансдукции применяли протокол спинокуляции (O'Doherty et al., 2000). Клетки YT высевали в 24-луночные планшеты (1 × 10⁵ клеток) в присутствии полибрена (8 мкг/мл) с последующим добавлением супернатантов, содержащих псевдотипированные лентивирусные частицы. Клетки центрифугировали при 500 g в течение 40 мин при 32 °С и инкубировали 16 ч в CO₂-инкубаторе. На следующий день супернатант заменяли свежей культуральной средой. Через 3 дня проводили селекцию в 5 мг/мл пурамицина (Invitrogen, США) в течение 1 недели; нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контроля.

Вестерн-блот анализ. Трансдуцированные клетки YT и контрольные нетрансдуцированные клеточные линии YT-wt и HEK293T лизировали в буфере для лизиса (100 мМ Трис, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % β-меркаптоэтанол, 15 % гли-

церол). Клеточные лизаты центрифугировали, кипятили на водяной бане в течение 5 мин, разделяли с помощью SDS-PAGE в 10 % полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare, США). Мембрану, заблокированную в 3 % молоке на PBST, инкубировали с моноклональными антителами кролика против Shp-2 (1:3000, #3397S, Cell Signaling Technology, США), а затем с HRP-меченым вторичным антителом «коза-против кролика» (1:8000, лаборатория иммуногенетики). Равномерность загрузки образцов оценивали, используя гибридизацию с контрольными антителами против β -актина (1:3000, #ab3280, Abcam, США). Мембраны визуализировали и документировали с использованием субстрата ECL-prime в соответствии с рекомендациями производителя (GE Healthcare) и прибора Amersham Imager 600 с экспозицией 1 мин.

Проточная цитометрия. Для фенотипирования клеточных линий CAR-YT^{shp-2-/-} 10⁵ клеток промывали в PBS и инкубировали 30 мин в присутствии биотинилированного белка L (3.3 мкг/мл) (M00097, Genscript, США) при температуре 4 °C. Далее клетки отмывали и инкубировали со стрептавидином-APC (Thermo Fisher, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Витальный краситель 7AAD (Biolegend, США) был использован для исключения мертвых клеток из анализа. Образцы анализировали с помощью прибора BD FACSCanto® II (Becton Dickinson and Company) и программного обеспечения BD FACSDiva.

Анализ цитотоксичности в реальном времени (RTCA). Прикрепленные клетки-мишени высевали в 8-луночные сенсорные планшеты (ACEA Biosciences, Корея) в количестве 5 × 10⁴ клеток на лунку и инкубировали 16–18 ч. На следующий день среду удаляли и заменяли свежей, содержащей 1 × 10⁵ клеток-эффекторов. Проводили мониторинг роста клеток в течение 24 ч с помощью системы RTCA iCELLigence для анализа клеток в реальном времени. Цитотоксичность рассчитывали по формуле: [CI (клеток-мишеней без эффекторных клеток) – CI (клеток-мишеней с эффекторными клетками)] × 100 / CI (клеток-мишеней без эффекторных клеток), где CI – нормализованное значение импеданса в лунках планшета (Golubovskaya et al., 2017).

Анализ цитотоксичности при помощи проточной цитометрии. Необходимое количество клеток-мишеней метили при помощи агента Cell Proliferation Dye eFluor 670 (Thermo Fisher). В 96-луночный планшет вносили по 50000 клеток-мишеней на лунку, после чего добавляли равное количество эффекторов, оставляя в нескольких лунках клетки-мишени без эффекторов для контроля. Клетки инкубировали 4 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. После этого в каждую лунку добавляли витальный краситель 7AAD и измеряли процент живых клеток-мишеней на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII.

Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Prism software (GraphPad version 8.0). С использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) были выявлены различия между контрольными линиями, не несущими нокаута гена *shp-2*, и нокаутными линиями. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Результаты

В качестве модели NK-лимфоцитов нами была выбрана человеческая иммортализованная перевиваемая линия с NK-подобным фенотипом YT. Эти клетки обладают способностью к перфорин-опосредованному лизису мишеней; при этом они не зависят от наличия IL-2 в среде при культивировании и не экспрессируют Fc-рецепторы (Yodoi et al., 1985; Deaglio et al., 2002; Edsparr et al., 2010). Для редактирования гена *shp-2* мы использовали систему CRISPR/Cas9. Были подобраны две специфичные последовательности sgRNA, комплементарные кодирующим участкам гена *shp-2* в области третьего и пятого экзонов. Последовательности ДНК, кодирующие соответствующие протоспейсеры sgRNA, были клонированы в лентивирусный вектор lentiCRISPRv2 (Sanjana et al., 2014). Далее с использованием полученных таким образом конструкций lentiCRISPRv2-Shp2g1 и lentiCRISPRv2-Shp2g2 были наработаны лентивирусные частицы и произведена ко-трандукция клеток YT. Поскольку lentiCRISPRv2-Shp2g1 и lentiCRISPRv2-Shp2g2 несут ген устойчивости к пуromицину, на следующем этапе была проведена селекция пуromицин-устойчивых клеток, экспрессирующих одну или обе целевые кассеты. Далее клетки были моноклонированы, после чего панель моноклонов анализировали таргетным секвенированием целевого района гена *PTPN11* для отбора сублиний с биаллельными мутациями в данном локусе (рис. 1, а).

Получено четыре сублинии (B1, C1, C3, C4), в которых мутации приводят к сдвигу или обрыву рамки считывания в кодирующей области гена *shp-2* (см. рис. 1, а). Для верификации нокаута в этих линиях был проведен вестерн-блот анализ, который подтвердил факт отсутствия полноразмерного белка Shp-2 (см. рис. 1, б).

Эффективным подходом для специфического перенацеливания цитотоксической активности NK-клеток является эктопическая экспрессия CAR (химерного антигенного рецептора). CAR индуцирует проактивационный сигналинг в NK-клетке после контакта с мишенью, даже если мишень не экспрессирует типичные стресс-маркеры. Мы использовали химерный антигенный рецептор структуры scFv(J591)-CD8шарнир-CD28TM-CD28-CD3z (Kulemzin et al., 2019). Этот CAR второго поколения позволяет перенаправлять активность T- или NK-клеток против клеток-мишеней, экспрессирующих PSMA, поверхностный маркер клеток рака простаты (Chang, 2004; Gorchakov et al., 2019). Нами получены линии клеток с экспрессией указанного CAR на основе клеток YT дикого типа и четырех сублиний YT^{shp-2-/-}. Экспрессия CAR на поверхности полученных линий была верифицирована при помощи проточной цитометрии (рис. 2).

Далее нами была изучена цитотоксическая активность трех из четырех полученных линий – B1-CAR, C1-CAR и C4-CAR. Для этого в качестве мишени выбирались клетки Du-145 с эктопической экспрессией белка PSMA. Линия клеток Du-145 считается резистентной к лизису NK-клетками (Hood et al., 2019) и, как следствие, является хорошим субстратом для оценки активности «усиленных» NK-лимфоцитов. Для анализа специфической цитотоксичности использовали платформу iCELLigence (ACEA Biosciences, Корея). Обнаружено что CAR-YT^{shp-2-/-} клет-

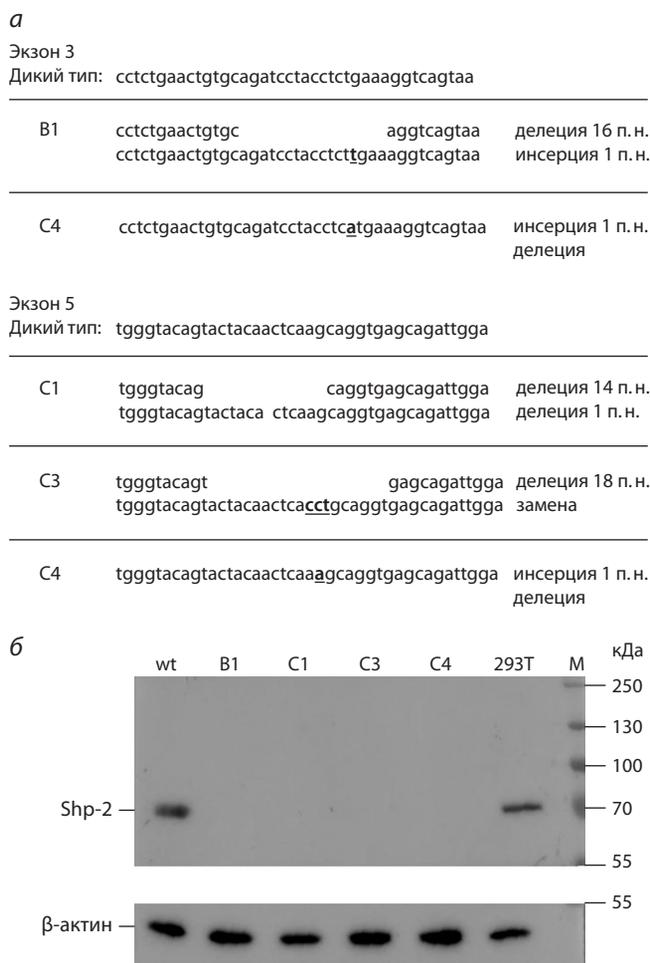


Рис. 1. Подтверждение нокаута гена *shp-2* в моноклональных дериватах НК-клеточной линии YT.

а – нуклеотидные последовательности CRISPR/Cas9-индуцированных мутаций в экзонах 3 и 5 гена *shp-2*; *б* – вестерн-блот гибридизация лизатов клеток, нокаутированных по *shp-2* (B1, C1, C3, C4), а также контрольных линий НЕК293Т (293Т) и YT (немодифицированные клетки линии YT, wt) с антителами против Shp-2 или бета-актина (контроль загрузки).

ки проявляют значимо большую цитотоксичность, чем CAR-YT клетки без мутации в гене *shp-2*, при этом наблюдаемый эффект воспроизводился для всех трех субклонов линий CAR-YT^{*shp-2*-/-}, независимо от природы внесенных мутаций (рис. 3).

Для того чтобы оценить литическую активность CAR-YT^{*shp-2*-/-} в отношении клеток здоровых тканей, мы провели цитотоксический тест, в котором мишенями выступали периферические лимфоциты крови здорового донора. Было обнаружено, что гибель клеток-мишеней при коинкубации с CAR-YT^{*shp-2*-/-} клетками достоверно не отличается от таковой в контроле без добавления эффекторов, равно как и от контролей при коинкубации с клетками CAR-YT или YT^{*shp-2*-/-} (рис. 4).

Обсуждение

Цитотоксическая активность НК-клеток регулируется балансом сигналов от ингибирующих и активирующих рецепторов на их поверхности (Lee, Gasser, 2010; Sivori et al., 2019). Цитотоксическая реакция может происходить

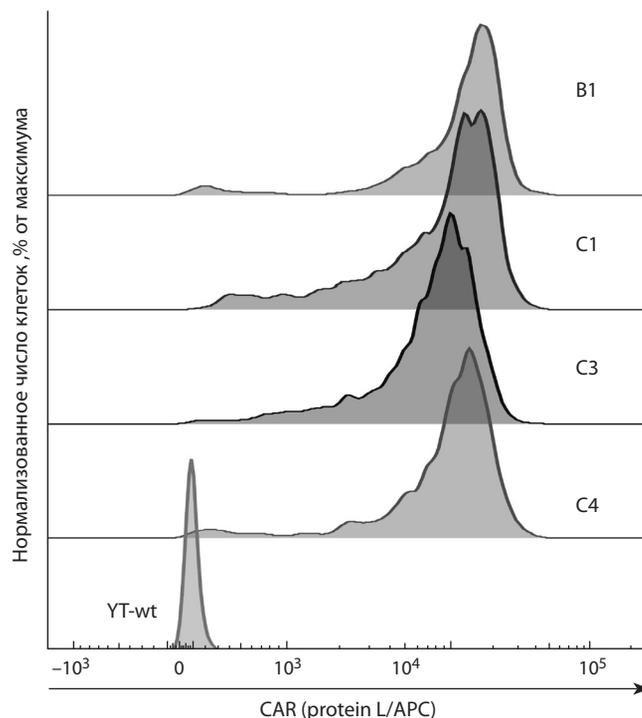


Рис. 2. Детекция уровня поверхностной экспрессии CAR в CAR-YT клетках, нокаутных по *shp-2* (B1, C1, C3, C4), и в негативном контроле (немодифицированная клеточная линия YT (YT-wt)).

лишь в том случае, если присутствует активирующий сигнал, иными словами, если клетка-мишень экспрессирует лиганды активирующих рецепторов и при этом отсутствует или ослаблен ингибирующий сигнал, т. е. клетка-мишень не экспрессирует лиганды ингибирующих рецепторов либо НК-клетка в принципе не имеет ингибирующего рецептора к данному лиганду (Chester et al., 2015; Pasero et al., 2016). В случае, если нет сигналов от активирующих рецепторов или избыточны сигналы от ингибирующих, цитотоксическая реакция не происходит, что применительно к клеточной терапии означает выживание опухоли (Pasero et al., 2016; Del Zotto et al., 2017).

Проблема нехватки активирующего сигнала может быть успешно решена при помощи экспрессии CAR, что уже активно применяется на практике (Imai et al., 2005; Rusakiewicz et al., 2013; Quintarelli et al., 2018; Ingegner et al., 2019), однако клетки-мишени с повышенной экспрессией лигандов ингибирующих рецепторов продолжают оставаться неуязвимыми для НК-клеточного лизиса (Rezvani et al., 2017).

Одним из вариантов решения этой проблемы могло бы стать создание НК-клеток, нокаутных по ингибирующим рецепторам, однако, принимая во внимание разнообразие последних, это потребует внесения множественных мутаций. Более простой путь – удаление фосфатазы Shp-2, которая является одним из ключевых негативных регуляторов НК-клеточной активности (Yusa, Campbell, 2003; Purdy, Campbell, 2009). Полученные нами дериваты НК-клеточной линии YT, нокаутные по гену *shp-2*, продемонстрировали высокий уровень CAR-опосредованной цитотоксичности в отношении НК-устойчивой линии аде-

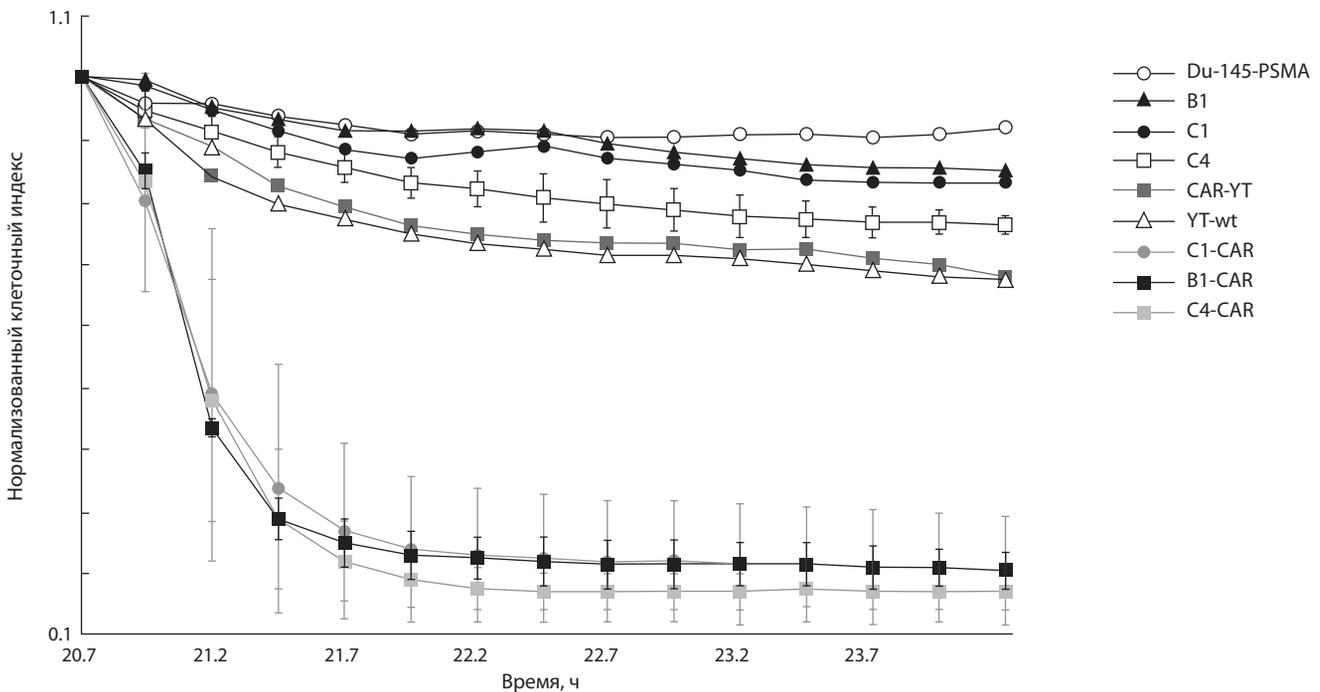


Рис. 3. Анализ цитотоксичности в реальном времени (RTCA) нокаутных по *shp-2* сублиний B1, C1, C4, их CAR-модифицированных вариантов и линий CAR-YT и YT-wt на модели Du-145-PSMA.

График приведен со времени добавления эффекторов к клеткам-мишеням.

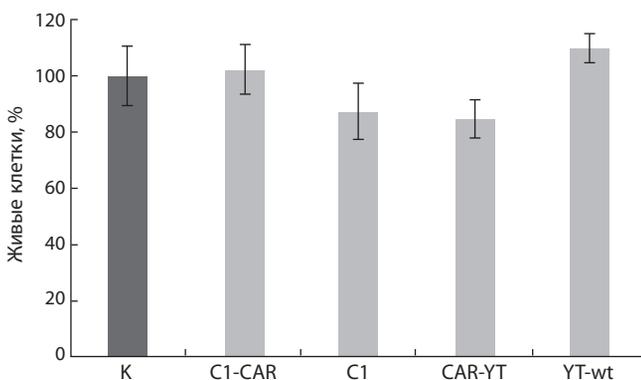


Рис. 4. Анализ цитотоксической активности YT клеток, нокаутных по *shp-2* (C1-CAR, C1), а также CAR-YT и YT дикого типа в отношении лимфоцитов периферической крови здорового донора.

Коинкубация 4 ч в соотношении 1:1. К – инкубация клеток-мишеней без эффекторных клеток. Приведено среднее значение по меньшей мере трех независимых повторностей и стандартная ошибка среднего.

нокарциномы простаты Du-145-PSMA (Hood et al., 2019), при этом CAR-модификация YT клеток дикого типа не увеличила их цитотоксичность (см. рис. 3). Это указывает на тот факт, что линия Du-145-PSMA обладает высокой плотностью лигандов ингибирующих рецепторов, и ингибирующий сигналинг тормозит активирующий, даже с учетом сигналов от CAR. И действительно, известно, что линия Du-145 экспрессирует мало лигандов к активирующим рецепторам NKp30 и NKp46 NK-клеток и значительное количество молекул MHC-I (Pasero et al., 2015).

Немаловажным является вопрос безопасности полученных клеток. Можно предположить, что нокаут по

гену *shp-2*, приводящий к ослаблению ингибирующего сигналинга, вызовет повышение цитотоксической активности NK-клеток в отношении здоровых тканей. Чтобы в полной мере ответить на этот вопрос, необходимо проверить цитотоксическую активность CAR-YT^{*shp-2*-/-} клеток в отношении обширной панели нормальных клеток, однако получение многих типов тканей от здоровых доноров является непростой задачей с технической и этической точек зрения. В настоящем исследовании мы проверили цитотоксическую активность CAR-YT^{*shp-2*-/-} клеток в отношении лимфоцитов здорового донора и не обнаружили ее достоверного повышения. Вероятно, ослабление ингибирующего сигналинга не опасно при отсутствии активирующих лигандов на поверхности клетки-мишени. В то же время окончательный ответ на вопрос о безопасности полученных нами клеток может быть дан только после их всестороннего исследования. Возможно, дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в различные типы тканей позволит получить представительную панель здоровых клеток-мишеней для таких исследований.

Заключение

Таким образом, оптимальным вариантом усиления цитотоксической активности NK-клеток может быть экспрессия CAR для индукции активирующих сигналов в сочетании с супрессией ингибирующего сигналинга за счет удаления одного из ключевых его медиаторов – белка Shp-2. В дальнейшем необходимо всесторонне изучить безопасность модифицированных лимфоцитов, в частности исследовать их цитотоксическую активность в отношении большего спектра здоровых тканей.

Список литературы / References

- Becker P.S.A., Suck G., Nowakowska P., Ullrich E., Seifried E., Bader P., Tonn T., Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016;65(4):477-484. DOI 10.1007/s00262-016-1792-y.
- Cerwenka A., Baron J.L., Lanier L.L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(20):11521-11526. DOI 10.1073/pnas.201238598.
- Chang S.S. Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev. Urol.* 2004;6(Suppl.10):S13-S18.
- Chester C., Fritsch K., Kohrt H.E. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 2015;6:601. DOI 10.3389/fimmu.2015.00601.
- Childs R.W., Carlsten M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015;14:487. DOI 10.1038/nrd4506.
- De Charette M., Marabelle A., Houot R. Turning tumour cells into antigen presenting cells: the next step to improve cancer immunotherapy? *Eur. J. Cancer.* 2016;68:134-147. DOI 10.1016/j.ejca.2016.09.010.
- Deaglio S., Zubiatur M., Gregorini A., Bottarel F., Ausiello C.M., Dianzani U., Sancho J., Malavasi F. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood.* 2002;99(7):2490-2498.
- Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2017;92(2):100-114. DOI 10.1002/cyto.b.21508.
- Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):184-191. DOI 10.1038/nbt.3437.
- Edsparr K., Speetjens F.M., Mulder-Stapel A., Goldfarb R.H., Basse P.H., Lennernäs B., Kuppen P.J.K., Albertsson P. Effects of IL-2 on MMP expression in freshly isolated human NK cells and the IL-2-independent NK cell line YT. *J. Immunother.* 2010;33(5):475-481. DOI 10.1097/CJI.0b013e3181d372a0.
- Freund-Brown J., Chirino L., Kambayashi T. Strategies to enhance NK cell function for the treatment of tumors and infections. *Crit. Rev. Immunol.* 2018;38(2):105-130. DOI 10.1615/CritRevImmunol.2018025248.
- Golubovskaya V., Berahovich R., Zhou H., Xu S., Harto H., Li L., Chao C.C., Mao M.M., Wu L. CD47-CAR-T cells effectively kill target cancer cells and block pancreatic tumor growth. *Cancers (Basel).* 2017;9(10):139. DOI 10.3390/cancers9100139.
- Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Kochneva G.V., Tarani A.V. Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T-cell therapy for metastatic prostate cancer. *Eur. Urol.* 2019. DOI 10.1016/j.eururo.2019.08.014.
- Hanke T., Takizawa H., McMahon C.W., Busch D.H., Pamer E.G., Miller J.D., Altman J.D., Liu Y., Cado D., Lemonnier F.A., Bjorkman P.J., Raulat D.H. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity.* 1999;11(1):67-77. DOI 10.1016/S1074-7613(00)80082-5.
- Hewitt E.W. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology.* 2003;110(2):163-169. DOI 10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x.
- Hood S.P., Foulds G.A., Imrie H., Reeder S., Mcardle S.E.B., Khan M., Pockley A.G. Phenotype and function of activated natural killer cells from patients with prostate cancer: patient-dependent responses to priming and IL-2 activation. *Front. Immunol.* 2019;9:3169. DOI 10.3389/fimmu.2018.03169.
- Igarashi T., Wynberg J., Srinivasan R., Becknell B., McCoy J.P., Takahashi Y., Suffredini D.A., Linehan W.M., Caligiuri M.A., Childs R.W. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood.* 2004;104(1):170. DOI 10.1182/blood-2003-12-4438.
- Imai C., Iwamoto S., Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood.* 2005;106(1):376-383. DOI 10.1182/blood-2004-12-4797.
- Ingegnere T., Mariotti F.R., Pelosi A., Quintarelli C., De Angelis B., Tumino N., Besi F., Cantoni C., Locatelli F., Vacca P., Moretta L. Human CAR NK cells: a new non-viral method allowing high efficient transfection and strong tumor cell killing. *Front. Immunol.* 2019;10:957. DOI 10.3389/fimmu.2019.00957.
- Kärre K., Ljunggren H.G., Piontek G., Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986;319(6055):675-678. DOI 10.1038/319675a0.
- Kulemzin S.V., Matvienko D.A., Sabirov A.H., Sokratyan A.M., Chernikova D.S., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Tarani A.V., Gorchakov A.A. Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and CAR NK-cell lines. *BMC Med. Genomics.* 2019;12(Suppl.2):44. DOI 10.1186/s12920-019-0489-4.
- Kutner R.H., Zhang X.-Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 2009;4(4):495-505. DOI 10.1038/nprot.2009.22.
- Lee S.K., Gasser S. The role of natural killer cells in cancer therapy. *Front. Biosci. (Elite Ed).* 2010;2:380-391.
- Malarkannan S. The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions. *Semin. Immunol.* 2006;18(3):186-192. DOI 10.1016/j.smim.2006.04.002.
- Mamessier E., Sylvain A., Thibault M.-L., Houvenaeghel G., Jacquemier J., Castellano R., Gonçalves A., André P., Romagné F., Thibault G., Viens P., Birnbaum D., Bertucci F., Moretta A., Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 2011;121(9):3609-3622. DOI 10.1172/JCI45816.
- Moreno-Mateos M.A., Vejnar C.E., Beaudoin J.D., Fernandez J.P., Mis E.K., Khokha M.K., Giraldez A.J. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat. Methods.* 2015;12(10):982-988. DOI 10.1038/nmeth.3543.
- Nayyar G., Chu Y., Cairo M.S. Overcoming resistance to natural killer cell based immunotherapies for solid tumors. *Front. Oncol.* 2019;9:51. DOI 10.3389/fonc.2019.00051.
- O'Doherty U., Swiggard W.J., Malim M.H. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J. Virol.* 2000;74(21):10074-10080. DOI 10.1128/jvi.74.21.10074-10080.2000.
- Pasero C., Gravis G., Granjeaud S., Guerin M., Thomassin-Piana J., Rocchi P., Salem N., Walz J., Moretta A., Olive D. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6(16):14360-14373. DOI 10.18632/oncotarget.3965.
- Pasero C., Gravis G., Guerin M., Granjeaud S., Thomassin-Piana J., Rocchi P., Paciencia-Gros M., Poizat F., Bentobji M., Azario-Cheillan F., Walz J., Salem N., Brunelle S., Moretta A., Olive D. Inherent and tumor-driven immune tolerance in the prostate microenvironment impairs natural killer cell antitumor activity. *Cancer Res.* 2016;76(8):2153. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-15-1965.
- Paul S., Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 2017;8:1124. DOI 10.3389/fimmu.2017.01124.

- Purdy A.K., Campbell K.S. SHP-2 expression negatively regulates NK cell function. *J. Immunol.* 2009;183(11):7234-7243. DOI 10.4049/jimmunol.0900088.
- Quintarelli C., Sivori S., Caruso S., Carlomagno S., Boffa I., Orlando D., Guercio M., Cembrola B., Pitisci A., Di Cecca S., Li Pira G., Vinti L., De Angelis B., Moretta L., Locatelli F. CD19 redirected CAR NK cells are equally effective but less toxic than CAR T cells. *Blood.* 2018;132(Suppl.1):3491. DOI 10.1182/blood-2018-99-118005.
- Rehman A.U., Rahman M.U., Khan M.T., Saud S., Liu H., Song D., Sultana P., Wadood A., Chen H.F. The landscape of protein tyrosine phosphatase (Shp2) and cancer. *Curr. Pharm. Des.* 2018;24(32):3767-3777. DOI 10.2174/1381612824666181106100837.
- Rezvani K., Rouce R., Liu E., Shpall E. Engineering natural killer cells for cancer immunotherapy. *Mol. Ther.* 2017;25(8):1769-1781. DOI 10.1016/j.ymthe.2017.06.012.
- Rusakiewicz S., Semeraro M., Sarabi M., Desbois M., Locher C., Mendez R., Vimond N., Concha A., Garrido F., Isambert N., Chaigneau L., Le Brun-Ly V., Dubreuil P., Cremer I., Caignard A., Poirier-Colame V., Chaba K., Flament C., Halama N., Jäger D., Eggermont A., Bonvalot S., Commo F., Terrier P., Opolon P., Emile J.-F., Coindre J.-M., Kroemer G., Chaput N., Le Cesne A., Blay J.-Y., Zitvogel L. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2013;73(12):3499. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-0371.
- Sanjana N.E., Shalem O., Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods.* 2014;11(8):783-784. DOI 10.1038/nmeth.3047.
- Sivori S., Vacca P., Del Zotto G., Munari E., Mingari M.C., Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.* 2019;16(5):430-441. DOI 10.1038/s41423-019-0206-4.
- Suen W.C.W., Lee W.Y.W., Leung K.T., Pan X.H., Li G. Natural killer cell-based cancer immunotherapy: a review on 10 years completed clinical trials. *Cancer Invest.* 2018;36(8):431-457. DOI 10.1080/07357907.2018.1515315.
- Yang L., Shen M., Xu L.J., Yang X., Tsai Y., Keng P.C., Chen Y., Lee S.O. Enhancing NK cell-mediated cytotoxicity to cisplatin-resistant lung cancer cells via MEK/Erk signaling inhibition. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7958. DOI 10.1038/s41598-017-08483-z.
- Yodoi J., Teshigawara K., Nikaido T., Fukui K., Noma T., Honjo T., Takigawa M., Sasaki M., Minato N., Tsudo M., Uchiyama T., Maeda M. TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL-2 receptor on a natural-killer-like cell-line (YT-cells). *J. Immunol.* 1985;134(3):1623-1630.
- Yusa S.-I., Campbell K.S. Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells. *J. Immunol.* 2003;170(9):4539. DOI 10.4049/jimmunol.170.9.4539.

ORCID ID

O.A. Koval orcid.org/0000-0001-7788-2249
A.A. Gorchakov orcid.org/0000-0003-2830-4236
A.V. Taranin orcid.org/0000-0002-9184-4238

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, Соглашение № 075-15-2019-1246, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0169.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.10.2019. После доработки 26.11.2019. Принята к публикации 26.11.2019.

Лонгитюдные генетические исследования когнитивных характеристик

Р.Н. Мустафин¹✉, А.В. Казанцева², Р.Ф. Еникеева², С.Б. Малых^{3,4}, Э.К. Хуснутдинова^{2,4}

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

³ Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ e-mail: ruji79@mail.ru

Аннотация. Рассмотрена роль лонгитюдных исследований когнитивных характеристик в определении причин, влияющих на познание, с целью возможной их коррекции для улучшения познавательных навыков. В данных исследованиях показано, что на развитие когнитивных функций влияют такие средовые факторы, как качество нутриентов, стресс во время гестации и характер социального окружения. Выявлены специфические эпигенетические изменения, выступающие в качестве посредников между генотипом и средой в реализации когнитивных функций. В связи с важным значением эпигенома перспективна разработка методов терапии когнитивных расстройств с использованием агентов, влияющих на метилирование и модификации гистонов. Развивающимся направлением в этой области является изучение некодирующих РНК, которые способны модифицировать эпигенетические факторы. За последние годы проведены широкомасштабные метаанализы результатов исследовательской роли генетических ассоциаций с различными когнитивными характеристиками. Показано значение активно экспрессирующихся в головном мозге генов, таких как *BDNF*, *COMT*, *CADM2*, *CYP2D6*, *APBA1*, *CHRNA7*, *PDE1C*, *PDE4B*, *PDE4D*. С физиологическим познанием оказались ассоциированы гены, вовлеченные в развитие психических заболеваний (*MEF2C*, *CYP2D6*, *FAM109B*, *SEPT3*, *NAGA*, *TCF20*, *NDUFA6*). В развитии психических заболеваний с когнитивным дефицитом вовлечены гены, участвующие в метилировании ДНК (*DNMT1*, *DNMT3B*, *FTO*), модификации гистонов (*CREBBP*, *CUL4B*, *EHMT1*, *EP300*, *EZH2*, *HLCS*, *HUWE1*, *KAT6B*, *KMT2A*, *KMT2D*, *KMT2C*, *NSD1*, *WHSC1*, *UBE2A*) и моделировании хроматина (*ACTB*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX*, *CHD2*, *CHD7*, *CHD8*, *SMARCA2*, *SMARCA4*, *SMARCB1*, *SMARCE1*, *SRCAP*, *SS18L1*), которые имеют значение в регуляции когнитивных функций у здоровых людей. Приведены данные, позволяющие предположить, что трансгенерационное наследование когнитивных характеристик связано с некодирующими РНК, а также со способностью мобильных элементов, инсертированных в межгенные области, влиять на регуляцию функционирующих в головном мозге генов за счет процессинга транскриптов транспозонов в некодирующие РНК. Особенности состава, количества и распределения в геноме мобильных элементов, которые не изменяют нуклеотидные последовательности белок-кодирующих генов, но влияют на их экспрессию, могут передаваться из поколения в поколение.

Ключевые слова: головной мозг; когнитивные характеристики; лонгитюдные исследования; транспозоны.

Для цитирования: Мустафин Р.Н., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. Лонгитюдные генетические исследования когнитивных характеристик. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):87-95. DOI 10.18699/VJ20.599

Longitudinal genetic studies of cognitive characteristics

R.N. Mustafin¹✉, A.V. Kazantseva², R.F. Enikeeva², S.B. Malykh^{3,4}, E.K. Khusnutdinova^{2,4}

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

³ Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow, Russia

⁴ M.V. Lomonosov Moscow State University, Laboratory of psychology of professions and conflicts, Moscow, Russia

✉ e-mail: ruji79@mail.ru

Abstract. The present review describes longitudinal studies of cognitive traits and functions determining the causes of their variations and their possible correction to prevent cognitive impairment. The present study reviews the involvement of such environmental factors as nutrition, prenatal maternal stress, social isolation and others in cognitive functioning. The role of epigenetic factors in the implementation of environmental effects in cognitive characteristics is revealed. Considering the epigenome significance, several studies were focused on the design of substances affecting methylation and histone modification, which can be used for the treatment of cognitive disorders. The appropriate correction of epigenetic factors related to environmental differences in cognitive abilities requires to determine the mechanisms of chromatin modifications and variations in DNA methylation. Transposons representing stress-sensitive DNA elements appeared to mediate the environmental influence on epigenetic modifications. They can explain the mechanism of transgenerational transfer of information on cognitive abilities. Recently, large-scale meta-analyses

based on the results of studies, which identified genetic associations with various cognitive traits, were carried out. As a result, the role of genes actively expressed in the brain, such as *BDNF*, *COMT*, *CADM2*, *CYP2D6*, *APBA1*, *CHRNA7*, *PDE1C*, *PDE4B*, and *PDE4D* in cognitive abilities was revealed. The association between cognitive functioning and genes, which have been previously involved in developing psychiatric disorders (*MEF2C*, *CYP2D6*, *FAM109B*, *SEPT3*, *NAGA*, *TCF20*, *NDUFA6* genes), was revealed, thus indicating the role of the similar mechanisms of genetic and neural networks in both normal cognition and cognitive impairment. An important role in both processes belongs to common epigenetic factors. The genes involved in DNA methylation (*DNMT1*, *DNMT3B*, and *FTO*), histone modifications (*CREBBP*, *CUL4B*, *EHMT1*, *EP300*, *EZH2*, *HLCS*, *HUWE1*, *KAT6B*, *KMT2A*, *KMT2D*, *KMT2C*, *NSD1*, *WHSC1*, and *UBE2A*) and chromatin remodeling (*ACTB*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX*, *CHD2*, *CHD7*, *CHD8*, *SMARCA2*, *SMARCA4*, *SMARCB1*, *SMARCE1*, *SRCAP*, and *SS18L1*) are associated with increased risk of psychiatric diseases with cognitive deficiency together with normal cognitive functioning. The data on the correlation between transgenerational epigenetic inheritance of cognitive abilities and the insert of transposable elements in intergenic regions is discussed. Transposons regulate genes functioning in the brain due to the processing of their transcripts into non-coding RNAs. The content, quantity and arrangement of transposable elements in human genome, which do not affect changes in nucleotide sequences of protein encoding genes, but affect their expression, can be transmitted to the next generation.

Key words: brain; cognitive functions; longitudinal studies; transposable elements.

For citation: Mustafin R.N., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Longitudinal genetic studies of cognitive characteristics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1): 87-95. DOI 10.18699/VJ20.599

Стабильность и изменчивость когнитивных функций в онтогенезе

В последнее время наряду с высокоинформативными молекулярно-биологическими методами исследования, позволяющими выявлять специфические локусы и гены, вовлеченные в формирование когнитивных функций (КФ) на полногеномном уровне, особый интерес приобрели работы по обнаружению генетических детерминант в свете лонгитюдного концепта. Лонгитюдные исследования (ЛИ) позволяют получить конкретные объективные данные в динамике, а также оценить вклад генетических и средовых факторов в изменения когнитивных характеристик (КХ) в онтогенезе человека. КХ включают в себя восприятие информации (гнозис), речь, интеллект, память, внимание и праксис (двигательные навыки) (Medaglia et al., 2015), способность к пространственному восприятию, словарный запас, скорость обработки информации и исполнительную функцию. Для их измерения используют специфические когнитивные тесты в сочетании с мультивариативным генетическим анализом, совокупность которых обладает большой надежностью (Plomin, Deary, 2015).

Согласно результатам метаанализов ЛИ, в развитии КХ важную роль играют генетические факторы (Bergen et al., 2007; Haworth et al., 2010; Franić et al., 2015), влияние среды (Wong et al., 2010) и возраста (Briley, Tucker-Drob, 2013; Tucker-Drob, Briley, 2014). Известно, что средний уровень КХ меняется при развитии индивида, значительно повышаясь от младенчества до подросткового периода и постепенно снижаясь в зрелом возрасте (Tucker-Drob, Briley, 2014). Одним из первых сообщений о резком увеличении лонгитюдной стабильности КХ от младенчества до подросткового возраста была статья N. Bayley (1949). Данная работа продемонстрировала большую изменчивость уровня общего интеллекта в раннем детстве, который достигал относительной стабильности к школьному возрасту (Bayley, 1949). Подтверждением полученных данных стал результат последующего метаанализа, основанного на лонгитюдных исследованиях КХ с использованием объективных когнитивных тестов (Tucker-Drob, Briley, 2014). Исследовались такие КХ и методы, как общий интеллект, активный словарный запас, вербальные и невербальные

способности (в том числе IQ), избирательное и постоянное внимание, рабочая и локационная память, визуальная внимательность, подстановка цифровых символов, тесты на вращение, синонимы, разрядность цифр, имена и лица, цифровые символы и рисунки. Результаты, полученные на 15 независимых лонгитюдных выборках, свидетельствовали о том, что корреляции вклада генетического компонента и общей среды с уровнем КХ с течением времени были низкими и умеренными в раннем детстве и резко возрастали в процессе индивидуального развития ребенка, достигая высокого уровня к подростковому возрасту и сохраняя его до поздней зрелости. Корреляции с течением времени для компонентов индивидуальной среды были низкими в детстве и постепенно увеличивались до умеренных у взрослых. Причем возрастающая фенотипическая стабильность КХ с течением развития ребенка была почти полностью опосредована генетическими факторами (Tucker-Drob, Briley, 2014).

Характерен широкий диапазон популяционной и онтогенетической изменчивости различных КХ. Коэффициент генетической корреляции для разных КХ составляет в среднем 0.6, фенотипической корреляции – 0.3. Наибольшей степенью наследуемости отличается общий интеллект (фактор “g”): от 40 % в детском возрасте до 80 % у взрослых. Для измерения этих параметров использовались тесты Scholastic Assessment Test и American College Test (Zabaneh et al., 2018). Для каждой КХ характерны специфические особенности изменения при индивидуальном развитии, а также различный вклад средового и генетического компонентов. Например, для математических способностей (измерялось умение читать и изучать математику при помощи комбинации сетевых тестов) вклад общей среды составил 0.21, коэффициент наследуемости – 0.51, тогда как для способности к чтению данные показатели составили 0.14 и 0.66 соответственно (измерялись с помощью теста на эффективность чтения (TOWRE) – одного из четырех тестов из анализа TEDS) (Davis et al., 2014).

Среди всех КХ наибольшее значение придается исследованию интеллекта в клинически значимых изменениях, поскольку для его оценки используют объективные

тесты с определением стандартных показателей IQ. Так, при IQ < 50 диагностируется тяжелая интеллектуальная недостаточность (ID – intellectual disability), поражающая 0.4 % популяции (около половины из них связаны с хромосомными и моногенными болезнями) (Kleefstra et al., 2014). Ассортативные скрещивания накапливают генетическую дисперсию в популяции в каждом поколении, способствуя аддитивной генетической дисперсии интеллекта. В отличие от психических расстройств, интеллект нормально распределяется с позитивным результатом исключительной характеристики, что является моделью для «позитивной генетики» (Plomin, Deary, 2015). Наследуемость интеллекта значительно варьирует в зависимости от изучаемой популяции. Например, оценки наследуемости IQ в близнецовых исследованиях, проведенных в СССР, оказывались выше, чем сопоставимые оценки, полученные в США. Данные особенности объясняются сравнительно одинаковыми условиями проживания людей в СССР. Наследуемость варьирует и в зависимости от социально-экономического статуса: значительно выше в семьях с более высоким его уровнем. Считается также, что социальные различия разных рас обуславливают различия в IQ, хотя «черно-белые» различия в IQ в США составляют всего 1 стандартное отклонение (15 пунктов IQ) (Sternberg, 2012).

Молекулярно-генетические исследования используются для оценки онтогенетической изменчивости КХ. Так, в 2007 г. был проведен метаанализ шести ЛИ роли наследственных факторов в развитии когнитивных способностей с двумя и более временными интервалами для минимизации вариативности по возрасту. В результате выявлен возрастающий вклад наследуемости от 13 (55 %) до 25 (70 %) лет, что свидетельствует в пользу возрастающего значения взаимодействий генотипа и среды (Bergen et al., 2007). В другом метаанализе при исследовании 11 000 близнецовых пар было показано, что наследуемость общих когнитивных способностей увеличивается от 41 % в возрасте 9 лет до 55 % в 12 лет и 66 % в 17 лет. Общие когнитивные способности оценивались при помощи шкалы интеллекта Стэнфорда–Бинета, включая измерение словарного запаса, анализ паттернов, запоминание предложений и цифр, количественные тесты (Haworth et al., 2010). Для специфических КХ было показано, что, например, наследуемость интеллекта линейно возрастает от 20 % в младенческом возрасте до 40 % в подростковом и 60 % в зрелом, увеличиваясь до 80 % у пожилых и далее снижаясь до 60 % после 80 лет. GCTA (genome-wide complex trait analysis) и близнецовый метод показали разную степень наследуемости для определенных КХ: для интеллекта – 35 и 47 % соответственно, для чтения – 16 и 59 %, для математических способностей – 32 и 48 %, для языковых навыков – 35 и 41 % (Plomin, Deary, 2015).

Увеличение роли генетического компонента в развитии КХ с младенчества до подросткового возраста может быть объяснено с точки зрения амплификационных и инновационных эффектов, обусловленных действием наследственности еще в младенчестве. В частности, масштабный метаанализ, основанный на результатах 16 ЛИ роли генетического и средового компонентов в вариациях КФ у 11 500 пар близнецов и сибсов, оцененных дважды

в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, выявил, что в раннем детстве преобладают инновационные эффекты адаптации в ответ на наличие новых средовых факторов, которые быстро уменьшаются к подростковому возрасту. Наоборот, амплификационные эффекты, характеризующие перенос влияния факторов, действовавших еще в младенчестве, на последующие этапы в онтогенезе, усиливаются при дальнейшем развитии. Для измерения КХ в данных исследованиях использовались тесты на интеллект и объективное познание (Briley, Tucker-Drob, 2013).

Каковы же механизмы, лежащие в основе индивидуальных различий КХ во времени? Некоторые исследователи предполагают, что стабильность индивидуальных различий КФ во времени обусловлена последовательным воздействием одних и тех же экзогенных факторов среды. То есть стабильность КХ – результат стабильности социального, образовательного и экономического контекстов. Согласно другой точке зрения, стабильность индивидуальных различий в КХ в онтогенезе обусловлена непрерывным эффектом эндогенных факторов (гены), а экзогенные воздействия имеют тенденцию к нерегулярности и проходящим эффектам. Таким образом, экзогенные и эндогенные факторы, способствуя общей стабильности в различной степени, могут вносить разный вклад в изменение КХ с возрастом (Tucker-Drob, Briley, 2014).

Исследования генетического компонента в регуляции когнитивных функций

Результаты проведенных GWAS (genome-wide association study) при изучении КХ показали относительно мало значимых ассоциаций, а полигенные оценки составляют около 1 % дисперсии КФ. В различных работах показан незначительный эффект отдельных вариантов ДНК в развитии КХ, однако могут быть созданы полигенные оценки, аккумулирующие эффекты специфических вариантов ДНК для прогнозирования генетической предрасположенности для каждого индивида (Zabaneh et al., 2018). В отдельных исследованиях получены данные о значимых ассоциациях аллелей специфических генов с КХ, что может стать отправной точкой для дальнейших экспериментальных работ возможного таргетного воздействия на продукты этих генов. С клинической точки зрения наибольший интерес представляют гены нейромедиаторных систем, так как их участие в специфических КХ позволит прогнозировать фармакотерапию нарушенных компонентов познания из имеющегося в настоящее время арсенала лекарственных препаратов.

Были проведены генетические исследования для отдельных КХ с целью выявить роль определенных генов в развитии специфических когнитивных способностей. При оценке ассоциаций SNP с такими КХ, как память, образовательная подготовка и вербально-числовые способности, были выявлены значительные ассоциации с аллелями генов, играющих важную роль в развитии и функционировании головного мозга. К таким генам относятся *CADM2* (кодирует белок синаптической клеточной адгезии в ЦНС), *CYP2D6* (кодирует цитохром, метаболизирующий серотонин и нейростероиды) и *APBA1* (кодирует белок, взаимодействующий с амилоидным прекурсором болезни Альцгеймера). Вербально-числовые способности измеря-

лись при помощи теста из 13 пунктов, представленных на компьютере с сенсорным экраном. Память измерялась с помощью задачи «сопоставление пар» – участники наблюдали в течение 5 секунд случайную сетку из 12 карт с шестью парами совпадающих символов. Для измерения образовательной подготовки участникам задавали вопрос «Какая из следующих квалификаций у вас есть?» с перечнем возможных ответов (Davies et al., 2016). Были выявлены ассоциации аллелей генов *COMT* (кодирует катехол-О-метилтрансферазу) и *BDNF* (кодирует нейротрофический фактор головного мозга) со временем реакции (Das et al., 2014). Аллели гена *COMT* оказались также ассоциированы с исполнительным познанием и когнитивным контролем (измерены при помощи задач префронтального типа). Выявлена ассоциация аллелей гена *CHRNA7* (кодирует рецептор альфа-7 никотиновой субъединицы) со стробированием внимания; измерение проводилось при помощи H50 ERP (электрофизиологическое событие, возникающее в височно-лимбической коре) (Goldberg, Weinberger, 2004). Проведенный в 2019 г. метаанализ с вовлечением 1.1 млн здоровых людей показал ассоциацию аллелей генов *BDNF* и фосфодиэстераз *PDE1C*, *PDE4B*, *PDE4D* с развитием таких КХ, как уровень образования и математические способности. Измерение выполнялось с помощью нормализованных оценок по когнитивным тестам (Gurney, 2019).

С КХ у здоровых индивидов выявляются ассоциации аллелей генов, вовлеченных также в развитие психических расстройств. Так, при исследовании 78308 людей при помощи GWAS было определено 336 SNP, ассоциированных с КХ. При этом выявлены значительные ассоциации с аллелями генов, связанных с развитием болезни Альцгеймера (гены *MEF2C* и *EXOC4*) и шизофренией (гены *MEF2C*, *CYP2D6*, *FAM109B*, *SEPT3*, *NAGA*, *TCF20*, *NDUFA6*). Оценка КХ проводилась различными тестами для измерения жидкого интеллекта, основанными на опросных листах («сенсорный экран» или «веб-интерфейс») с определением количества правильных ответов из 13 вопросов (Snickers et al., 2017). Когнитивные нарушения наблюдаются не только при психических заболеваниях, но и при расстройствах поведения. Например, при синдроме дефицита внимания и гиперактивности (ADHD – attention deficit hyperactivity disorder) выявляется патология интеллекта (Claesdotter et al., 2018). Согласно литературным данным, ADHD ассоциирован с аллелями генов, связанных также с нормальными КХ: *DRD4*, *SLC6A3* (Junkiert-Czarnecka, Haus, 2016), *5-HTTLPR* (Owens et al., 2012). Это говорит о перспективах исследования данных генов для уточнения механизмов влияния генных сетей в путях формирования нейромедиаторных систем головного мозга в норме и при широком перечне патологии головного мозга. Предполагается, что генетическая архитектура нормальных и патологических когнитивных способностей является во многом общей, что дает основание для использования данных о когнитивной патологии для исследования нормальных КХ. Кроме того, выявлено, что гены, функционирующие как звенья для поддержания нормального интеллекта, участвуют также в развитии ID. Исходя из анализа базы данных OMIM, около половины всех генетических заболеваний человека имеют

неврологический компонент, нередко включая различные аспекты ID (Stabtree, 2013).

Необходимо отметить, что проведенные к настоящему времени молекулярно-генетические работы в области когнитивных нарушений и вариаций нормальных КХ (Franić et al., 2015) свидетельствуют в пользу «гипотезы универсальных генов» (Generalist genes hypothesis), предложенной в 2005 г. профессором Робертом Пломиним (Plomin, Kovas, 2005), согласно которой один и тот же набор генов в значительной степени влияет на разные области когнитивных способностей. Кроме того, индивидуальные вариации и изменения в способности к чтению и изучению языков и общих КХ имеют тенденцию к взаимной корреляции, что говорит об общности в их этиологии (Chow et al., 2013).

Нарушения когнитивных способностей (CD – cognitive disorders) представляют собой гетерогенную группу заболеваний, генетические причины которых активно изучаются. Благодаря этому идентифицируются общие механизмы этих болезней, а также молекулярные процессы, лежащие в основе познания человека. Большое значение в данных системах имеют гены, продукты которых вовлечены в эпигенетическую регуляцию. Они участвуют в построении и поддержании работы головного мозга, необходимой для адаптации к изменяющимся физическим и социальным условиям. Обнаружено, что эти гены играют роль как в нормальном когнитивном развитии, так и в этиопатогенезе CD с выраженной генетической предрасположенностью к расстройствам аутистического спектра, ID и задержке интеллектуального развития и шизофрении. К настоящему времени описано 55 таких генов с ЭГ функциями. Они распределены по четырем категориям: 1) «писатели» (writers); 2) «стиратели» (erasers); 3) гены ремоделирования хроматина (chromatin remodelers) семейства DEAD/Н АТФазы; 4) другие читатели и ремодуляторы хроматина (other readers and chromatin remodelers). К категории «писателей» ЭГ модификаций относятся гены, участвующие в метилировании ДНК (*DNMT1*, *DNMT3B*, *FTO*) и вовлеченные в добавление боковых групп аминокислотных остатков гистонов (*CREBBP*, *CUL4B*, *EHMT1*, *EP300*, *EZH2*, *HLCS*, *HUWE1*, *KAT6B*, *KMT2A*, *KMT2D*, *KMT2C*, *NSD1*, *WHSC1*, *UBE2A*). Боковыми группами называют молекулы, которые присоединяются к центральному атому углерода аминокислотного остатка, меняя его биохимические свойства. За счет этого усиливается или ослабевает взаимосвязь гистонов с молекулами ДНК. К категории «стирателей» относятся гены *HDAC4*, *HDAC8*, *KDM5C*, *KDM6A*, *PHF8*, продукты которых удаляют боковые группы гистонов. Гены семейства DEAD/Н АТФазы, моделирующие хроматин, вовлечены в регуляцию позиции нуклеосомы; это *ACTB*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX*, *CHD2*, *CHD7*, *CHD8*, *SMARCA2*, *SMARCA4*, *SMARCB1*, *SMARCE1*, *SRCAP*, *SSI18L1*. К категории других читателей и ремодуляторов хроматина относятся гены *ASXL1*, *BCOR*, *CHMP1*, *CTCF*, *GATAD2B*, *HCFC1*, *KANSL1*, *MBD5*, *MECP2*, *PHF6*, *POGZ*, *SKI*, *MED12*, *MED17*, *MED23*, *NIPBL*, *RAD21*, *SALL1*, *SMC1A*, *SMC3*. Была показана роль перечисленных генов в этиопатогенезе ряда CD (Kleefstra et al., 2014), что имеет большое значение для дальнейших работ по возможной

коррекции ID при помощи таргетной терапии, так как ЭГ модификации обратимы.

Эпигенетическая регуляция когнитивных функций

Изменения КФ в онтогенезе могут быть обусловлены ЭГ механизмами, которые являются центральными для развития, формирования структуры и функций головного мозга, поскольку обеспечивают специфическую для возраста и типа клеток регуляцию генной экспрессии (Dauncey, 2014). Например, нарушение ЭГ регуляции наблюдается при когнитивном старении в результате изменений метилирования ДНК, экспрессии некодирующих РНК (нкРНК) и посттрансляционной модификации гистонов (Mather et al., 2014). В настоящее время к ЭГ механизмам относят метилирование ДНК, модификации гистонов, комплексы ремоделирования хроматина на основе АТФ, белковые комплексы Поликомб-Триторакс, нкРНК, потенциальные прионы, связывание транскрипционных факторов и другие механизмы, вовлеченные в генерацию и поддержание наследуемой структуры хроматина и его присоединение к ядерному матриксу (Bell, Spector, 2011). ЭГ процессы относят к обратимой регуляции различных геномных функций, которые необходимы для дифференцировки тканей и долгосрочной регуляции функций генов; они являются динамичными при развитии под влиянием множества факторов, включая средовые воздействия, вариации последовательностей ДНК и стохастические события (Wong et al., 2010).

Степень влияния наследственных и средовых факторов на локус-специфические особенности изменения метилирования ДНК в настоящее время является перспективным объектом изучения. В частности, были проведены количественные измерения метилирования ДНК в промоторных областях генов рецептора D4 дофамина (*DRD4*), переносчика серотонина (*SLC6A4*) и моноаминоксидазы А (*MAOA*) с использованием образцов ДНК 46 пар монозиготных и 45 пар дизиготных близнецов в возрасте от 5 до 10 лет (Wong et al., 2010). Для аллелей данных генов была выявлена ассоциация с КХ и в других исследованиях (Owens et al., 2012; Junkiert-Czarnecka, Haus, 2016), что повышает значимость полученных данных. Различия в метилировании ДНК определяются уже в раннем детстве даже у генетически идентичных индивидов, не являясь стабильными во времени. Полученные результаты ЛИ позволяют предположить, что средовые воздействия служат важными факторами балансирования различий в метилировании ДНК отдельных индивидов и оказывают разное влияние на структуры генома. Наблюдение динамических изменений метилирования ДНК во времени подчеркивает важность ЛИ эпигенетических факторов (Wong et al., 2010). Так, в результате анализа метилирования ДНК более 27 000 CpG сайтов в геноме 387 доноров в возрасте от 1 до 102 лет (в лобной и височной коре, варолиевом мосту и мозжечке) была продемонстрирована положительная корреляция между возрастом и метилированием ДНК в различных структурах мозга. Идентифицированы CpG локусы, проявляющие выраженную постоянную корреляцию между метилированием ДНК и хронологическим возрастом (Hernandez et al., 2011). Полученные данные показали,

что средовые факторы оказывают более значимый эффект на метилирование ДНК в детском возрасте по сравнению с взрослым периодом (Lupu et al., 2012).

Согласно недавним исследованиям, определенная динамическая регуляция структуры хроматина, происходящая в ответ на нервную стимуляцию, связана с обучением и памятью. Модификация хроматина, индуцированная обучением, включает ацетилирование, фосфорилирование и метилирование гистонов. Помимо гистонов, в модификации хроматина участвуют негистоновые белки, которые играют важную роль в регуляции транскрипционной активности нейронов при формировании памяти. К ним относятся субъединица p65/RelA ДНК-связывающего комплекса NF-κB, транскрипционный фактор p53, рецептор эстрогена альфа (ERα), ДНК-метилтрансфераза (DNMT1), тубулин, деацетилаза гистонов (HDAC1), рецептор глюкокортикоидов, (гистоновая ацетилтрансфераза) HATs, p300/CBP-ассоциированный белок (Rudenko, Tsai, 2014).

Роль средовых воздействий в развитии КХ, включая питание, действие токсических веществ, стресс в пре- и постнатальный периоды, предполагает участие ЭГ механизмов в регуляции экспрессии генов при функционировании мозга (Fine, Sung, 2014). На протяжении всей жизни на головной мозг влияют особенности питания, которые способны вызвать глубокие изменения КФ, вплоть до деменции. Этот эффект опосредуется изменениями экспрессии множества генов, а реакция на нутриенты, в свою очередь, зависит от индивидуальной генетической вариативности. Продукты питания могут оказывать немедленное и долгосрочное воздействие на эпигеном. Например, микронутриенты, такие как фолат, витамины B6 и B12, холин и метионин, участвуют в метилировании ДНК (Dauncey, 2014).

Один из важных средовых факторов, оказывающих влияние на регуляцию КФ, – воздействие опиоидов и других токсических веществ в пренатальный период. Так, проведенное ЛИ детей, подвергшихся действию токсических веществ, указывает на сохранение этого воздействия даже в возрасте 1, 2, 3, 4^{1/2}, 8^{1/2} лет, свидетельствуя о снижении показателей IQ по сравнению с контрольной группой детей (Nygaard et al., 2015). Пренатальное воздействие токсических веществ на когнитивное развитие детей наиболее вероятно связано с изменением ЭГ факторов. В частности, результаты исследования детей с ADHD свидетельствуют о связи изменения профиля метилирования более 1600 CpG-островков с приемом парацетамола в течение более 20 дней во время беременности (Gervin et al., 2017). Курение матерей при гестации ассоциировано со специфическим метилированием селективных областей генов *AHRR* (aryl-hydrocarbon receptor repressor) и *CYP1A1* (cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1) у их детей с ADHD в постнатальном периоде (Sengupta et al., 2017).

Лонгитюдные исследования показали, что дети, чьи матери испытывали пренатальный стресс в ранние сроки беременности, проявляли более медленные темпы развития и снижение КХ в первый год жизни (если стресс и повышенные уровни кортизола присутствовали в ранние сроки беременности). Однако повышенные уровни кортизола у матерей в конце беременности были ассоциированы

с ускоренным когнитивным развитием и более высокими показателями КХ через 12 месяцев. Полученные данные свидетельствуют о том, что материнский кортизол и специфическая для беременных тревожность оказывают программированное влияние на развивающийся плод (Davis, Sandman, 2010), которое может быть опосредовано ЭГ факторами. Социальная изоляция в раннем детстве вызывает множество изменений в развитии КХ путем ЭГ влияния на экспрессию важных для функционирования головного мозга генов, таких как *BDNF* (Li et al., 2016).

Перечисленные результаты исследований свидетельствуют о важнейшей роли ЭГ факторов в развитии когнитивных способностей в онтогенезе. При этом каждый человек характеризуется индивидуальными особенностями ЭГ реагирования на средовые стимулы, что проявляется в его КХ. В связи с этим встает вопрос о механизмах трансгенерационной передачи ЭГ регуляции КФ, в особенности по мужской линии. Можно предположить, что к структурам, участвующим в передаче предрасположенности к КХ следующим поколениям, могут быть отнесены транспозоны (TE – transposable elements), играющие важную роль в регуляции ЭГ процессами (Мустафин, Хуснутдинова, 2017). Об этом говорят факты трансгенерационного ЭГ программирования поведенческих проявлений от родителей, испытавших мощное стрессовое воздействие среды, своим потомкам третьего и четвертого поколения (Савватеева-Попова и др., 2015), так как ТЕ являются чувствительными к стрессу структурами, особенности межгенных инсерции которых отражаются в особенностях реакции на стресс у потомков (Мустафин, Хуснутдинова, 2019). При нейрогенезе ТЕ, в зависимости от особенностей их расположения в геноме, способны к сайт-специфической интеграции (Feng et al., 2013; Fujiwara, 2015). Это влияет на экспрессию генов дифференцирующихся в гиппокампе нейрональных стволовых клеток (Jacques et al., 2013; Gerdes et al., 2016), где определяется высокая активность ТЕ (Faulkner, 2011; Kurnosov et al., 2015) и перемещения ТЕ под действием стресса (Hunter et al., 2012), связанные с геномной пластичностью (Muotri et al., 2005; Singer et al., 2010) и познанием (Aimone et al., 2014; Pastuzyn et al., 2018). Данные эффекты опосредованы взаимодействием ТЕ с ЭГ факторами, в том числе нкРНК (Kapusta et al., 2013; Samantarrai et al., 2013; Zhang et al., 2015).

Изменение ЭГ регуляции работы генома подразумевает отсутствие структурных перестроек в генах, так как оно обусловлено главным образом модификациями гистонов, РНК-интерференцией или метилированием ДНК. ТЕ могут оказывать влияние на данные механизмы, не нарушая последовательностей нуклеотидов в экзонах, но оказывая свое регуляторное воздействие на экспрессию генов при инсерциях в межгенных областях (de Souza et al., 2013; Chuong et al., 2017; Barry, 2018). В онтогенезе эти свойства способствуют тканеспецифической дифференцировке клеток (Trizzino et al., 2018). В отношении функционирования головного мозга было показано, что в центре нейрогенеза, гиппокампе, наибольшая активность ТЕ может быть связана с регуляцией ЭГ программирования транскрипционной активности генов для функциональной перестройки дифференцирующихся

нейронов (Faulkner, 2011; Kurnosov et al., 2015; Upton et al., 2015). Кроме того, в экспериментах на мышах выявлено, что вальпроевая кислота, пренатальный прием которой значительно повышает риск задержки развития нервной системы и аутизма, оказывает свой трансгенерационный эффект при использовании на десятый день гестации за счет изменения экспрессии большинства эндогенных ретровирусов (ERV) (Tartaglione et al., 2019). Для реализации регуляторного эффекта ТЕ важное значение имеет процессинг их транскриптов в нкРНК (Yuan et al., 2010, 2011; Qin et al., 2015).

В отношении трансгенерационной передачи ЭГ регуляции КХ по материнской линии показана роль стресс-факторов (Braun et al., 2017; Misra, Ganesh, 2018) и употребления алкоголя (Doehner et al., 2017; Abbott et al., 2018) на развивающийся плод. Изменения проявляются у потомства через одно поколение, так как во внутриутробном периоде происходит закладка и ЭГ трансформация генома клеток женской половой линии следующего поколения. Наиболее вероятными факторами, влияющими на трансгенерационную передачу КХ, являются нкРНК (Daxinger, Whitelaw, 2012; Bohacek, Mansuy, 2015). В головном мозге человека экспрессируется не менее 40 % всех длинных нкРНК, из которых, например, *KCN2AS* и *BCI/200* (Briggs et al., 2015), *BDNF*, *GDNF*, *EPHB2*, *KCNA2* (Pereira Fernandes et al., 2018) участвуют в регуляции синаптической пластичности (зависящих от опыта изменениях силы синаптических связей), играющей важную роль в формировании КХ (Woldemichael, Mansuy, 2016). Транскрипты длинных нкРНК могут процессироваться в микроРНК, которые также играют роль в развитии когнитивных способностей (Barry, 2014). Было показано, что динамические изменения уровней микроРНК влияют на экспрессию генов, принимающих участие в развитии таких КХ, как память и обучение (Woldemichael, Mansuy, 2016). В синапсах микроРНК взаимодействуют более чем с 90 % синаптических белков (Woldemichael, Mansuy, 2016).

Значение микроРНК в трансгенерационной передаче КХ можно объяснить их ролью в регуляции дифференцировкой нейронов за счет изменения профиля экспрессии определенных генов (Stappert et al., 2015). Были доказаны специфические для типов нейронов уровни микроРНК (Smirnova et al., 2005). Характерная для головного мозга miR-134 участвует в регуляции памяти посредством воздействия на экспрессию белка CREB (Gao et al., 2010). Длительная экспрессия miR-132 вызывает когнитивный дефицит благодаря ингибированию активности ацетилхолинэстеразы (Shaltiel et al., 2013); miR-182 подавляет долговременную память путем взаимодействия с актин-регулирующими белками (Griggs et al., 2013); miR-124 влияет на обучение и память за счет регуляции экспрессии мРНК гена ГТФаз-активирующего белка *IQGAPI* (Yang et al., 2014). С особенностями КХ ассоциированы также уровни экспрессии miR2113 (Andrews et al., 2017), miR-151a-3p, miR-212-3p, miR-1274b (Mengel-From et al., 2018). Исследование роли ЭГ факторов в трансгенерационной передаче особенностей КХ перспективно для разработки возможных подходов профилактики нарушений когнитивного развития в следующих поколениях. Так, в

экспериментах показано, что употребление природного фитохалкана ресвератрола самками мышей предотвращало развитие когнитивных дисфункций в F₁ и F₂ поколениях за счет влияния на сигнальные пути и ЭГ факторы (Izquierdo et al., 2019).

Заключение

Для оценки онтогенетической изменчивости КХ большую роль играют молекулярно-генетические исследования с оценкой полученных данных в динамике. Благодаря ЛИ было показано, что возрастающая фенотипическая стабильность КХ при развитии человека опосредована генетическими факторами. Выявлен возрастающий вклад наследуемости КХ – от 41 % в 9 лет до 70 % в 25 лет. В раннем детстве определено преобладание инновационных эффектов адаптации на средовые факторы. Степень наследуемости отличается для специфических КХ, для выявления ассоциации с которыми генетических вариантов были проведены GWAS. С памятью, образовательной подготовкой и вербально-числовыми способностями ассоциированы аллели генов *CADM2*, *CYP2D6*, *APBA1*; со временем реакции – *BDNF* и *COMT*, со стробированием внимания – *CHRNA7*, с уровнем образования и математическими способностями – *BDNF* и *PDE1C*, *PDE4B*, *PDE4D*. Кроме того, с КХ здоровых людей определена ассоциация генов, мутации которых вовлечены в развитие психических расстройств (*MEF2C*, *EXOC4*, *CYP2D6*, *FAM109B*, *SEPT3*, *NAGA*, *TCF20*, *NDUFA6*). При исследовании генов, связанных с нарушением CD, обнаружена роль вовлеченных в ЭГ регуляцию генов (участвующие в метилировании ДНК, модификации гистонов и ремоделировании хроматина).

Изучению роли ЭГ факторов в формировании КХ в последние годы придается большое значение, так как они выступают в качестве посредников влияния средовых факторов на процессы познания за счет динамической регуляции хроматина. Воздействие может оказывать немедленный и долгосрочный эффект на эпигеном как в постнатальном, так и в пренатальном периоде. Эффект от воздействия негативных средовых факторов в пренатальном периоде на когнитивные функции может быть также связан с изменением метилирования специфических локусов ДНК. Предполагается, что определенную роль в трансгенерационной передаче особенностей КХ могут играть особенности межгенного распределения ТЕ и экспрессия специфических нкРНК. Значение микроРНК для развития КХ позволяет предположить возможность их применения как биомаркеров для оценки особенностей КХ в норме и при патологии, а также для разработки потенциальных терапевтических агентов.

Список литературы / References

Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-0.
[Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6): 742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-0. (in Russian)]

Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506.
[Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under influence of stress. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506. (in Russian)]

Савватеева-Попова Е.В., Никитина Е.А., Медведева А.В. От нейрогенетики к нейроэпигенетике. Генетика. 2015;51(5):613-624.
[Savvateeva-Popova E.V., Nikitina E.A., Medvedeva A.V. Neurogenetics and neuroepigenetics. Russ. J. Genet. 2015;51(5):518-528. DOI 10.1134/S1022795415050075].

Abbott C.W., Rohac D.J., Bottom R.T., Patadia S., Huffman K.J. Prenatal ethanol exposure and neocortical development: a transgenerational model of FASD. Cereb. Cortex. 2018;28(8):2908-2921.

Aimone J.B., Li Y., Lee S.W., Clemenson G.D., Deng W., Gage F.H. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. Physiol. Rev. 2014;94(4):991-1026.

Andrews S.J., Das D., Anstey K.J., Eastale S. Association of *AKAP6* and *MIR2113* with cognitive performance in population-based sample of older adults. Genet. Brain Behav. 2017;16:472-478. DOI 10.1111/gbb.12368.

Barry G. Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease. Mol. Psychiatry. 2014;19:410-416. DOI 10.1038/mp.2013.196.

Barry G. Small RNAs and transposable elements are key components in the control of adaptive evolution in eukaryotes. Bioessays. 2018; 40(8):e1800070.

Bayley N. Consistency and variability in the growth of intelligence from birth to 18 years. J. Genet. Psychol. 1949;75:165-196.

Bell J.T., Spector T.D. A twin approach to unraveling epigenetics. Trends Genet. 2011;27:116-125.

Bergen S.E., Gardner C.O., Kendler K.S. Age-related changes in heritability of behavioral phenotypes over adolescence and young adulthood: a meta-analysis. Twin. Res. Hum. Genet. 2007;10(3):423-433.

Bohacek J., Mansuy I.M. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. Nat. Rev. Genet. 2015;16(11):641-652.

Braun K., Bock J., Wainstock T., Matas E., Gaisler-Salomon I., Fegert J., Ziegenhain U., Segal M. Experience-induced transgenerational (re-)programming of neuronal structure and functions: impact of stress prior and during pregnancy. Neurosci. Biobehav. Rev. 2017;pii:S0149-7634(16)30731-X. DOI 10.1016/j.neubiorev.2017.05.021.

Briggs J.A., Wolvetang E.J., Mattick J.S., Rinn J.L., Barry G. Mechanisms of long non-coding RNAs in mammalian nervous system development, plasticity, disease, and evolution. Neuron. 2015;88:861-877. DOI 10.1016/j.neuron.2015.09.045.

Briley D.A., Tucker-Drob E.M. Explaining the increasing heritability of cognitive ability across development: a meta-analysis of longitudinal twin and adoption studies. Psychol. Sci. 2013;24:1704-1713.

Chow B.W., Ho C.S., Wong S.W., Waye M.M., Bishop D.V. Generalist genes and cognitive abilities in Chinese twins. Dev. Sci. 2013;16: 260-268.

Chuang E.B., Elde N.C., Feschotte C. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. Nat. Rev. Genet. 2017; 18:71-86.

Claesdotter E., Cervin M., Akerlund S., Rastam M., Lindvall M. The effects of ADHD on cognitive performance. Nord. J. Psychiatry. 2018; 72(3):158-163.

Crabtree G.R. Our fragile intellect. Part I. Trends Genet. 2013;29(1):1-3.

Das D., Tan X., Bielak A.A., Cherbuin N., Eastale S., Anstey K.J. Cognitive ability, intraindividual variability, and common genetic variants of catechol-O-methyltransferase and brain-derived neurotrophic factor: a longitudinal study in a population-based sample of older adults. Psychol. Aging. 2014;29(2):393-403.

- Dauncey M.J. Nutrition, the brain and cognitive decline: insights from epigenetics. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014;68:1179-1185.
- Davies G., Marioni R.E., Liewald D.C., Hill W.D., Hagenaars S.P., Harris S.E., Ritchie S.J., Luciano M., Fawns-Ritchie C., Lyall D., Cullen B., Cox S.R., Hayward C., Porteous D.J., Evans J., McIntosh A.M., Gallacher J., Craddock N., Pell J.P., Smith D.J., Gale C.R., Deary I.J. Genome-wide association study of cognitive functions and educational attainment in UK Biobank ($N = 112\,151$). *Mol. Psychiatry.* 2016;21:758-767.
- Davis E.P., Sandman C.A. The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child. Dev.* 2010;81:131-148.
- Davis O.S., Band G., Pirinen M., Haworth C.M., Meaburn E.L., Kovas Y., Harlaar N., Docherty S.J., Hanscombe K.B., Trzaskowski M., Curtis C.J., Strange A., Wellcome Trust case Control Consortium, Donnelly P., Plomin R., Spencer C.C. The correlation between reading and mathematics ability at age twelve has a substantial genetic component. *Nat. Commun.* 2014;5:4204.
- Daxinger L., Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 2012;13(3):153-162.
- de Souza F.S., Franchini L.F., Rubinstein M. Exaptation of transposable elements into novel cis-regulatory elements: is the evidence always strong. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:1239-1251.
- Doehner W., Praefe L., Wolpers J., Bruckner M.K., Ueberham U., Arendt T. Transgenerational transmission of an anticholinergic endophenotype with memory dysfunction. *Neurobiol. Aging.* 2017;51:19-30. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2016.11.016.
- Faulkner G.J. Retrotransposons: mobile and mutagenic from conception to death. *FEBS Lett.* 2011;585:1589-1594.
- Feng G., Leem Y.E., Levin H.L. Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(2):775-789.
- Fine J.G., Sung C. Neuroscience of child and adolescent health development. *J. Couns. Psychol.* 2014;61:521-527.
- Franić S., Groen-Blokhuis M.M., Dolan C.V., Kattenberg M.V., Pool R., Xiao X., Scheet P.A., Ehli E.A., Davies G.E., van der Sluis S., Abdellaoui A., Hansell N.K., Martin N.G., Hudziak J.J., van Beijsterveldt C.E., Swagerman S.C., Hulshoff Pol H.E., de Geus E.J., Bartels M., Ropers H.H., Hottenga J.J., Boomsma D.I. Intelligence: shared genetic basis between Mendelian disorders and a polygenic trait. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23:1378-1383.
- Fujiwara H. Site-specific non-LTR retrotransposons. *Microbiol. Spectr.* 2015;3(2):MDNA3-0001-2014. DOI 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0001-2014.
- Gao J., Wang Y.W., Mao Y.W., Graff J., Guan J.S., Pan L., Mak G., Kim D., Su S.C., Tsai L.H. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature.* 2010;466:1105-1109. DOI 10.1038/nature09271.
- Gerdes P., Richardson S.R., Mager D.L., Faulkner G.J. Transposable elements in the mammalian embryo: pioneers surviving through stealth and service. *Genome Biol.* 2016;17:100.
- Gervin K., Nordeng H., Ystrom E., Reichborn-Kjennerud T., Lyle R. Long-term prenatal exposure to paracetamol is associated with DNA methylation differences in children diagnosed with ADHD. *Clin. Epigenetics.* 2017;9:77.
- Goldberg T.E., Weinberger D.R. Genes and the parsing of cognitive processes. *Trends Cogn. Sci.* 2004;8(7):325-335.
- Griggs E.M., Young E.J., Rumbaugh G., Miller C.A. MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation. *J. Neurosci.* 2013;33:1734-1740.
- Gurney M.E. Genetic association of phosphodiesterases with human cognitive performance. *Front. Mol. Neurosci.* 2019;12:22.
- Haworth C.M., Wright M.J., Luciano M., Martin N.G., de Geus E.J., van Beijsterveldt C.E., Bartels M., Posthuma D., Boomsma D.I., Davis O.S., Kovas Y., Corley R.P., Defries J.C., Hewitt J.K., Olson R.K., Rhea S.A., Wadsworth S.J., Iacono W.G., McGue M., Thompson L.A., Hart S.A., Petrill S.A., Lubinski D., Plomin R. The heritability of general cognitive ability increases linearly from childhood to young adulthood. *Mol. Psychiatry.* 2010;15:1112-1120.
- Hernandez D.G., Nalls M.A., Gibbs J.R., Arepalli S., van der Brug M., Chong S., Moore M., Longo D.L., Cookson M.R., Traynor B.J., Singleton A.B. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20:1164-1172.
- Hunter R.G., Murakami G., Dewell S., Seigsohn M., Baker M.E., Datson N.A., McEwen B.S., Pfaff D.W. Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:17657-17662.
- Izquierdo V., Palomera-Avalos V., López-Ruiz S., Canudas A., Pallàs M., Griñán-Ferré C. Maternal resveratrol supplementation prevents cognitive decline in senescent mice offspring. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(5):1134. DOI 10.3390/ijms20051134.
- Jacques P.E., Jeyakani J., Bourque G. The majority of primate-specific regulatory sequences are derived from transposable elements. *PLoS Genet.* 2013;9(5):e1003504.
- Junkiert-Czarnecka A., Haus O. Genetical background of intelligence. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016;70:590-598. DOI 10.5604/17322693.1204943.
- Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J., Zhuo X., Ramsay L., Bourque G., Yandell M., Feschotte C. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 2013;9(4):e1003470.
- Kleefstra T., Schenck A., Kramer J.M., van Bokhoven H. The genetics of cognitive epigenetics. *Neuropharmacology.* 2014;80:83-94.
- Kurnosov A.A., Ustyugova S.V., Nazarov V., Minervina A.A., Komkov A.Y., Shhugay M., Pogorely M.V., Khodosevich K.V., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. The evidence for increased L1 activity in the site of human adult brain neurogenesis. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117854.
- Li M., Du W., Shao F., Wang W. Cognitive dysfunction and epigenetic alterations of the BDNF gene are induced by social isolation during early adolescence. *Behav. Brain Res.* 2016;313:177-183.
- Lupu D.S., Tint D., Niculescu M.D. Perinatal epigenetic determinants of cognitive and metabolic disorders. *Aging Dis.* 2012;3:444-453.
- Mather K.A., Kwok J.B., Armstrong N., Sachdev P.S. The role of epigenetics in cognitive ageing. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2014;29:1162-1171. DOI 10.1002/gps.4183.
- Medaglia J.D., Lynall M.E., Bassett D.S. Cognitive network neuroscience. *J. Cogn. Neurosci.* 2015;27:1471-1491.
- Mengel-From J., Feddersen S., Halekoh U., Heegaard N.H.H., McGue M., Christensen K., Tan Q., Christiansen L. Circulating microRNA disclose biology of normal cognitive function in healthy elderly people – a discovery twin study. *Eur. J. Hum. Genet.* 2018;26:378-1387.
- Misra P., Ganesh S. Sex-biased transgenerational effect of maternal stress on neurodevelopment and cognitive functions. *J. Genet.* 2018;97(2):581-583.
- Muotri A.R., Chu V.T., Marchetto M.C., Deng W., Moran J.V., Gage F.H. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature.* 2005;435:903-910.
- Nygaard E., Moe V., Slinning K., Walhovd K.B. Longitudinal cognitive development of children born to mothers with opioid and poly-substance use. *Pediatr. Res.* 2015;78:330-335.
- Owens M., Goodyer I.M., Wilkinson P. 5-HTTLPR and early childhood adversities moderate cognitive and emotional processing in adolescence. *PLoS One.* 2012;7(11):e48482.
- Pastuzyn E.D., Day C.E., Kearns R.B., Kyrke-Smith M., Taibi A.V., McCormick J., Yoder N., Belnap D.M., Erlendsson S., Morado D.R., Briggs J.A.G., Feschotte C., Shepherd J.D. The neuronal gene *Arc* encodes a repurposed retrotransposon Gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell.* 2018;172:275-288. DOI 10.1016/j.cell.2017.12.024.
- Pereira Fernandes D., Bitar M., Jacobs F.M.J., Barry G. Long non-coding RNAs in neuronal aging. *Noncoding RNA.* 2018;4(2):E12. DOI 10.3390/nrna4020012.

- Plomin R., Deary I.J. Genetics and intelligence differences: five special findings. *Mol. Psychiatry*. 2015;20(1):98-108.
- Plomin R., Kovas Y. Generalist genes and learning disabilities. *Psychol. Bull.* 2005;131:592-617.
- Qin S., Jin P., Zhou X., Chen L., Ma F. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131365.
- Rudenko A., Tsai L.H. Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments. *Neuropharmacology*. 2014;80:70-82.
- Samantarrai D., Dash S., Chhetri B., Mallick B. Genomic and epigenomic cross-talks in the regulatory landscape of miRNAs in breast cancer. *Mol. Cancer Res.* 2013;11:315-328.
- Sengupta S.M., Smith A.K., Grizenko N., Joobor R. Locus-specific DNA methylation changes and phenotypic variability in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res.* 2017; 256:298-304. DOI 10.1016/j.psychres.2017.06.048.
- Shaltiel G., Hanan M., Wolf Y., Barbash S., Kovalev E., Shoham S., Soreq H. Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Struct. Funct.* 2013;218:59-72.
- Singer T., McConnell M.J., Marchetto M.C., Coufal N.G., Gage F.H. LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes. *Trends Neurosci.* 2010;33(8):345-354.
- Smirnova L., Grafe A., Seiler A., Schumacher S., Nitsch R., Wulczyn F.G. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* 2005;21(6):1499-1477.
- Sniekers S., Stringer S., Watanabe K., Jansen P.R., Coleman J.R.I., Krapohl E., Taskesen E., Hammerschlag A.R., Okbay A., Zabaneh D., Amin N., Breen G., Cesarini D., Chabris C.F., Iacono W.G., Ikram M.A., Johannesson M., Koellinger P., Lee J.J., Magnusson P.K.E., McGue M., Miller M.B., Ollier W.E.R., Payton A., Penedleton N., Plomin R., Rietveld C.A., Tiemeier H., van Duijn C.M., Posthuma D. Genome-wide association meta-analysis of 78,308 individuals identifies new loci and genes influencing human intelligence. *Nat. Genet.* 2017;49:1107-1112.
- Stappert L., Roeske-Koerner B., Brustle O. The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. *Cell. Tissue. Res.* 2015;359:47-64. DOI 10.1007/s00441-014-1981-y.
- Sternberg R.J. Intelligence. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2012;14(1): 19-27.
- Tartaglione A.M., Cipriani C., Chiarotti F., Perrone B., Balestrieri E., Matteucci C., Simibaldi-Vallebona P., Calamandrei G., Ricceri L. Early behavioral alterations and increased expression of endogenous retroviruses are inherited across generations in mice prenatally exposed to valproic acid. *Mol. Neurobiol.* 2019;56(5):3736-3750.
- Trizzino M., Kapusta A., Brown C.D. Transposable elements generate regulatory novelty in a tissue-specific fashion. *BMC Genomics*. 2018;19(1):468.
- Tucker-Drob E.M., Briley D.A. Continuity of genetic and environmental influences on cognition across the life span: a meta-analysis of longitudinal twin and adoption studies. *Psychol. Bull.* 2014;140: 949-979.
- Upton K.R., Gerhardt D.J., Jesuadian J.S., Richardson S.R., Sanchez-Luque F.J., Bodea G.O., Ewing A.D., Salvador-Paloeque C., van der Knaap M.S., Brennan P.M., Vanderver A., Faulkner G.J. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell*. 2015;161(2):228-239. DOI 10.1016/j.cell.2015.03.026.
- Woldemichael B.T., Mansuy I.M. Micro-RNAs in cognition and cognitive disorders: potential for novel biomarkers and therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* 2016;104:1-7.
- Wong C.C., Caspi A., Williams B., Craig I.W., Houts R., Ambler A., Moffitt T.E., Mill J. A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics*. 2010;5:516-526.
- Yang L., Zhang R., Li M., Wu X., Wang J., Huang L., Shi X., Li Q., Su B. A functional MiR-124 binding-site polymorphism in IQGAP1 affects human cognitive performance. *PLoS One*. 2014;9:e107065. DOI 10.1371/journal.pone.0107065.
- Yuan Z., Sun X., Jianq D., Ding Y., Lu Z., Gong L., Liu H., Xie J. Origin and evolution of a placental-specific microRNA family in the human genome. *BMC Evol. Biol.* 2010;10:346-358.
- Yuan Z., Sun X., Liu H., Xie J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. *PLoS One*. 2011;6(3):e17666. DOI 10.1371/journal.pone.0017666.
- Zabaneh D., Krapohl E., Gaspar H.A., Curtis C., Lee S.H., Patel H., Newhouse S., Wu H.M., Simpson M.A., Putallaz M., Lubinski D., Plomin R., Breen G. A genome-wide association study for extremely high intelligence. *Mol. Psychiatry*. 2018;23:1226-1232.
- Zhang G., Esteve P., Chin H.G., Terragni J., Dai N., Correa I.R., Pradhan S. Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(12):6112-6124.

ORCID ID

R.N. Mustafin orcid.org/0000-0002-4091-382X
A.V. Kazantseva orcid.org/0000-0002-3744-8058
R.F. Enikeeva orcid.org/0000-0002-4301-5283
S.B. Malykh orcid.org/0000-0002-3786-7447
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 17-78-30028 «Факторы успешности в обучении: лонгитюдное кросскультурное генетически информативное исследование».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.01.2019. После доработки 09.10.2019. Принята к публикации 11.10.2019.

Связь носительства аллельных вариаций по rs2228145 (A > C) гена *IL6R* с уровнем транскриптов генов *VCAM1* и *ICAM1* при эссенциальной артериальной гипертензии

Л.В. Топчиева¹ , В.А. Корнева², И.В. Курбатова¹

¹ Институт биологии – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия

² Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

 e-mail: topchieva67@mail.ru

Аннотация. При сердечно-сосудистых заболеваниях в плазме крови наблюдается повышение содержания интерлейкина 6 и его растворимых рецепторов, что указывает на усиление IL-6/sIL-6R сигнала в клетках и развитие хронического воспаления. Носительство аллельных вариаций по rs2228145 гена *IL6R* ассоциировано с изменением содержания растворимой и мембраносвязанной форм рецептора, опосредующих биологическую активность самого цитокина. IL-6 участвует в развитии эндотелиальной дисфункции посредством регуляции экспрессии генов *VCAM1* и *ICAM1*, кодирующих молекулы межклеточной адгезии. До настоящей работы данные об ассоциации эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) с аллельными вариациями по rs2228145 гена *IL6R* не были представлены. Цель исследования – изучить связь носительства аллельных вариаций по rs2228145 (A > C) с развитием ЭАГ и уровнем транскриптов генов *VCAM1*, *ICAM1*. Для этого нами использованы образцы ДНК, выделенной из цельной крови здоровых доноров (148) и пациентов с ЭАГ (I–II стадии) (152). Генотипирование проводили методом ПЦР-ПДРФ. Уровень транскриптов в лейкоцитах периферической крови оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Обнаружены различия в распределении частот генотипов по rs2228145 (A > C) в контрольной группе и группе пациентов с ЭАГ ($\chi^2 = 9.303$). Частота генотипа CC в группе больных людей оказалась выше, чем в группе здоровых (0.191 и 0.095 соответственно). Выявлено, что у носителей генотипа CC риск развития ЭАГ (I–II стадии) в 2.3 раза выше (ОШ = 2.257, 95 % доверительный интервал 1.100–4.468), чем у лиц, имеющих альтернативные генотипы. Уровень транскриптов генов *VCAM1*, *ICAM1* значимо выше в лейкоцитах периферической крови больных ЭАГ, чем здоровых людей. Содержание транскриптов гена *ICAM1* оказалось в 4 раза выше у больных ЭАГ с генотипом CC. С помощью дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса определено влияние на транскрипционную активность указанного гена генотипа по rs2228145 (A > C), что говорит о его роли в патогенезе эндотелиальной дисфункции и эссенциальной артериальной гипертензии.

Ключевые слова: интерлейкин 6; ген *IL6R*; эссенциальная артериальная гипертензия; эндотелиальная дисфункция.

Для цитирования: Топчиева Л.В., Корнева В.А., Курбатова И.В. Связь носительства аллельных вариаций по rs2228145 (A > C) гена *IL6R* с уровнем транскриптов генов *VCAM1* и *ICAM1* при эссенциальной артериальной гипертензии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):96-101. DOI 10.18699/VJ20.600

The relationship of the carriership of allelic variations in rs2228145 (A > C) of the *IL6R* gene with the levels of *VCAM1* and *ICAM1* gene transcripts in patients with essential hypertension

L.V. Topchieva¹ , V.A. Korneva², I.V. Kurbatova¹

¹ Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

² Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

 e-mail: topchieva67@mail.ru

Abstract. The levels of plasma interleukin 6 and its soluble receptors were found to be elevated in subjects with cardiovascular diseases, which points to amplification of the IL-6-mediated trans-signaling pathway in cells and the development of chronic inflammation. The allelic variation in the rs2228145 *IL6R* gene is associated with a change in the contents of the soluble and membrane-bound receptor forms mediating the biological activity of IL-6. Cytokine IL-6 is involved in the development of endothelial dysfunction by regulating the expression of the *VCAM1* and *ICAM1* genes, encoding intercellular adhesion molecules. Prior to this work, no data on the association of essential arterial hypertension (EAH) with rs2228145 allelic variations of the *IL6R* gene have been reported. The aim of our work was to study the relationship of the carriership of rs2228145 (A > C) allelic variations with the development of EAH and the *VCAM1* and *ICAM1* transcript levels. We analyzed samples of DNA isolated from the whole blood of 148 healthy donors and 152 patients with EAH (stages I–II). The genotyping was performed by PCR-RFLP. The level of transcripts in peripheral blood leukocytes (PBL) was assessed by real-time PCR. Differences in the frequency distributions of rs2228145 (A > C) genotypes between the control group and the group of patients with EAH ($\chi^2 = 9.303$) were found. The frequency of the CC genotype in EAH patients was higher than in healthy

people (0.191 and 0.095, respectively). The risk of EAH (I–II stages) development was shown to be 2.3 times higher in CC genotype carriers as compared to individuals with other genotypes (OR = 2.257, 95 % confidence interval 1.100–4.468). The levels of *VCAM1* and *ICAM1* gene transcripts in PBL of patients with EAH were significantly higher than in healthy people. The level of *ICAM1* gene transcripts was almost 4 times higher in patients with CC genotype. The Kruskal–Wallis analysis of variance revealed an effect of rs2228145 (A > C) genotype on the transcriptional activity of *ICAM1*, which argues for its role in the pathogenesis of endothelial dysfunction and essential hypertension.

Key words: interleukin 6; *IL6R* gene; essential arterial hypertension; endothelial dysfunction.

For citation: Topchieva L.V., Korneva V.A., Kurbatova I.V. The relationship of the carriership of allelic variations in rs2228145 (A > C) of the *IL6R* gene with the levels of *VCAM1* and *ICAM1* gene transcripts in patients with essential hypertension. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):96–101. DOI 10.18699/VJ20.600

Введение

Эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) характеризуется формированием постоянно повышенного систолического и диастолического артериального давления (более 140/90 мм рт. ст.) и сопровождается хроническим вялотекущим системным воспалением с увеличением провоспалительных белков в плазме крови и тканях сосудов (Bautista et al., 2005). Среди них значительный вклад в патогенез данного заболевания вносит интерлейкин 6 (IL-6). Он способен стимулировать продукцию белков острой фазы воспаления, усиливать адгезивные свойства клеток эндотелия сосудов и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов (Virdis et al., 2014). Повышенный уровень IL-6 вызывает усиление продукции активных форм кислорода, изменения в содержании атерогенных и антиатерогенных фракций липидов и их окисленных форм в плазме, способствуя атерогенезу. Важно отметить, что этот цитокин наряду с другими провоспалительными белками способствует снижению активности эндотелиальной синтазы оксида азота, что приводит к уменьшению продукции оксида азота эндотелием сосудов и нарушению вазомоторных функций сердечно-сосудистой системы (Didion, 2017).

Свои биологические эффекты интерлейкин 6 реализует посредством взаимодействия либо с трансмембранным рецептором (mbIL-6R), либо с растворимым рецептором (sIL-6R), которые связаны с другим компонентом рецепторного комплекса, гликопротеином 130 (GP130) (Wolf et al., 2014). Путь проведения сигнала от лиганда внутрь клетки посредством взаимодействия с mbIL-6R считается классическим; он присутствует только в ограниченном типе клеток, таких как гепатоциты, макрофаги, нейтрофилы и Т-лимфоциты. Проведение сигнала при помощи sIL-6R реализуется во всех типах клеток и называется трансигнальным путем. В условиях воспаления в плазме крови и тканях увеличивается концентрация sIL-6R за счет усиления протеолитического расщепления мембраносвязанной формы рецептора металлопротеазами семейства ADAM, при этом изменяется соотношение mbIL-6R и sIL-6R (Wolf et al., 2014).

На баланс мембраносвязанной и растворимой форм рецептора IL-6 оказывают влияние и некоторые мутации в гене *IL6R* (Rafiq et al., 2007; Ferreira et al., 2013). Так, однонуклеотидная замена (A > C) в экзоне 9 гена *IL6R* (rs2228145) приводит к замене аспарагина на аланин в позиции 358 аминокислотной последовательности белка и влияет на процесс эктодоменного шеддинга за счет изменения сайта расщепления полипептидной цепи рецептора протеазами ADAM10 и ADAM17 и формирования

разных сплайсосомных форм мРНК этого гена (Galicía et al., 2004; Rafiq et al., 2007; Ferreira et al., 2013). У носителей аллеля С концентрация sIL-6R выше, чем у носителей аллеля А (Galicía et al., 2004; Rafiq et al., 2007; Ferreira et al., 2013). Показано, что у носителей аллеля С по rs2228145 снижен риск развития коронарной болезни сердца (The Interleukin 6 receptor..., 2012). Однако сведения о связи носительства аллельных вариаций по указанному полиморфному варианту с развитием артериальной гипертензии на данный момент не представлены в литературе.

Интерлейкин 6 играет роль в стабильном повышении артериального давления за счет воздействия на ремоделирование сосудов и функционирование эндотелия (Didion, 2017). Комплекс IL-6/sIL-6R участвует в контроле за проницаемостью сосудов. Воздействуя на фибробласты и индуцируя продукцию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), IL-6 способен активировать эндотелиальные клетки (Nakahara et al., 2003). Эти клетки, активированные с помощью молекул межклеточной адгезии, связывают лейкоциты из кровотока, что приводит к усилению процесса их трансэндотелиальной миграции (Cook-Mills et al., 2011). Причем для развития артериальной гипертензии и нарушения функций сосудов существенное значение имеет инфильтрация моноцитов с провоспалительными свойствами (Wenzel et al., 2011). Попадая в интиму сосудов, моноциты дифференцируются в зависимости от микроокружения (концентрации хемокинов и цитокинов) в макрофаги с провоспалительным M1 или противовоспалительным M2 фенотипом. Поляризация макрофагов в M1 фенотип способствует атеросклеротическим процессам в стенках сосудов, что в свою очередь играет важную роль в формировании высокого давления крови (Moss, Ramji, 2016). Эти процессы сопряжены с развитием эндотелиальной дисфункции, маркером которой является повышенный уровень на поверхности эндотелиальных клеток и в плазме крови молекул межклеточной адгезии (Sprague, Khalil, 2009).

Показано, что уровень IL-6 в плазме крови положительно коррелирует с содержанием Е-селектина, VCAM-1 (молекула адгезии сосудистых клеток-1), ICAM-1 (межклеточная молекула адгезии-1) на поверхности эндотелиальных клеток (Weiss et al., 2013). В нормальных физиологических условиях эндотелий сосудов не препятствует свободной циркуляции иммунных клеток в кровотоке. При воспалении происходит нарушение этого процесса. Лейкоциты начинают взаимодействовать с клетками эндотелия, что в итоге приводит к их плотной адгезии на поверхности эндотелия, инфильтрации и аккумуляции в интиму сосудов. Этап закрепления лейкоцитов на по-

верхности эндотелия характеризуется взаимодействием интегринов с молекулами ICAM-1 и VCAM-1, которые относятся к суперсемейству иммуноглобулинов (Weiss et al., 2013). Этот процесс активируется при увеличении в плазме крови уровня цитокинов, активных форм кислорода, окисленных липопротеинов низкой плотности, а также при усилении скорости кровотока (Weiss et al., 2013).

Как уже было отмечено, rs2228145 влияет на содержание и биологическую активность интерлейкина 6 (Rafiq et al., 2007), выступающего в качестве одного из факторов усиления транскрипции генов межклеточной адгезии *ICAM1* и *VCAM1* (Cook-Mills et al., 2011). IL-6 индуцирует экспрессию генов молекул межклеточной адгезии за счет активации IL-6/STAT3 (signal transducers and activators of transcription3) сигнального пути (Wei et al., 2018). Кроме того, IL-6/sIL-6 комплекс через киназу JAK3 запускает сигнал для деградации комплекса «ингибитор ядерного фактора “каппа-би”/ядерный фактор “каппа-би”» (IkBa/NF-κB), что приводит к последующему усилению транскрипционной активности генов провоспалительных цитокинов и молекул межклеточной адгезии. Таким образом, модулирование активности IL-6 за счет повышения уровня растворимых рецепторов может существенным образом влиять на экспрессию молекул межклеточной адгезии и силу иммунного ответа на воспалительные стимулы. В связи с этим цель исследования – изучить связь носительства аллельных вариаций по rs2228145 с развитием эссенциальной артериальной гипертензии (I–II типа) и уровнем транскриптов генов *VCAM1*, *ICAM1*.

Материал и методы

Для генотипирования использовали 152 образца ДНК, выделенной из венозной крови пациентов с ЭАГ (I–II стадии) (80 мужчин и 72 женщины), и 148 образцов ДНК, выделенной из крови здоровых доноров (65 мужчин и 83 женщины). Материал для исследования получен при содействии кафедры факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии Медицинского института Петрозаводского государственного университета (ПетрГУ) и клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска. Диагноз ЭАГ устанавливался на основании клинических рекомендаций Всероссийского общества кар-

диологов (Диагностика..., 2010). Средний возраст доноров из контрольной группы составил 42.5 ± 10.6 года, пациентов с ЭАГ – 45.7 ± 13.1 года. Критерии включения, общие для доноров изучаемых групп: наличие информированного согласия, проживание в Республике Карелия. Критерии исключения, общие для доноров изучаемых групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение, сахарный диабет, индекс массы тела ≥ 30 кг/м².

ДНК выделяли из периферической крови на микроколлонках с помощью набора «К-Сорб» («Синтол», Россия). Качество и количество ДНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec (Bio-Rad, США). Генотипирование проводили методом ПЦР-ПДРФ. Условия ПЦР-ПДРФ анализа описаны в табл. 1. Праймеры синтезированы в фирме «Синтол». Для дизайна праймеров использована программа Beacon Designer 5.0. После рестрикции (обработка *Hinf*I (1 е. а.), 37 °С, 3 ч) фрагменты ДНК разделяли в 1.5 % агарозном геле, используя трисацетатный буфер. У части доноров, выбранных случайным образом, определяли уровень транскриптов генов *ICAM1*, *VCAM1* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК). С этой целью забор венозной крови проводился до назначения пациентам гипотензивных и противовоспалительных препаратов.

Для определения уровня транскриптов генов *ICAM1* и *VCAM1* использованы 36 образцов крови пациентов с ЭАГ (I–II стадии) в возрасте 42.42 ± 2.3 года и 40 образцов крови доноров контрольной группы в возрасте 39.82 ± 3.9 года. Тотальную РНК выделяли из ЛПК с помощью набора Extract RNA («Евроген», Россия), а затем обрабатывали ДНКазой (1 е. а.) («Сибэнзим», Россия). Первую цепь кДНК синтезировали применяя набор MMLV RT kit («Евроген»). Количество и качество РНК и кДНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpecPlus (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии генов *ICAM1*, *VCAM1* оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad) с помощью набора Screen-Mix SYBRGreen («Евроген»). В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *18S rRNA*. Последовательность праймеров приведена в табл. 1. Специфичность продуктов амплификации прове-

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР-ПДРФ анализа и ПЦР в режиме реального времени

Ген, SNV	Нуклеотидная последовательность праймера 5'..3', рестриктаза	Аллели, длина фрагментов, п. о.	Источник
<i>IL6R</i> rs2228145	F: CCTCTTTGTGCCTTGTG R: ATGGATTACCTCTTCGTGTC	A – 331, 239, 66, 74 C – 570, 66, 74	Собственный дизайн
<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC	226	»
<i>18S rRNA</i>	F: AGAAACGGCTACCACATCCA R: CACCAGACTTGCCCTCCA	169	Pinto et al., 2010
<i>ICAM1</i>	F: AGAGGTCTCAGAAGGGACCG R: GGGCCATACAGGACACGAAG	228	Rajan et al., 2008
<i>VCAM1</i>	F: ATGCCTGGGAAGATGGTCCG R: GACGGAGTCCCAATCTGAGC	129	»

ряли плавлением ПЦР-фрагментов. Эффективность ПЦР (98 %) оценивали по стандартной кривой. Уровень транскриптов генов вычисляли по $\Delta\Delta C_t$ (Livak, Schmittgen, 2001). Каждую ПЦР проводили не менее трех раз.

На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Минздрава Республики Карелия и ПетрГУ. Статистическую обработку данных проводили в программе Statgraphics 2.1. Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия χ^2 . Обнаружены отклонения значений биохимических показателей от нормального распределения (критерий Колмогорова–Смирнова, $p < 0.05$), в связи с чем для анализа достоверности различий этих показателей между группами был использован непараметрический критерий U Вилкоксона–Манна–Уитни. Влияние генотипов на уровень транскриптов оценивали с помощью дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса. Для оценки риска развития ЭАГ рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ) (Флетчер и др., 1998). Данные по уровню транскриптов представлены в виде средних значений со стандартной ошибкой. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

В ходе исследования в изученной выборке у гена *IL6R* (rs2228145) выявлены генотипы AA, AC и CC (рис. 1).

В изучаемых группах проводился тест на соответствие распределения равновесию Харди–Вайнберга. Отклонение частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга не наблюдалось в группе здоровых людей ($\chi^2 = 1.96$, $df = 2$, $p = 0.376$). В группе больных ЭАГ отмечено отклонение частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 7.02$, $df = 2$, $p = 0.093$).

Распределение аллелей по rs2228145 (A > C) у пациентов с ЭАГ и в контрольной группе не различалось (табл. 2). Встречаемость генотипов в исследуемых группах оказалась неодинаковой. Обнаружено, что частота генотипа CC по rs2228145 гена *IL6R* в группе больных ЭАГ существенно выше, чем в контрольной.

Согласно расчетам отношения шансов, риск развития ЭАГ у лиц с генотипом CC по rs2228145 увеличивается в 2.2 раза по сравнению с носителями других генотипов (табл. 3).

Установлено, что больные ЭАГ характеризуются более высоким уровнем экспрессии генов молекул адгезии *VCAM1* и *ICAM1* в ЛПК ($p = 0.005$ и

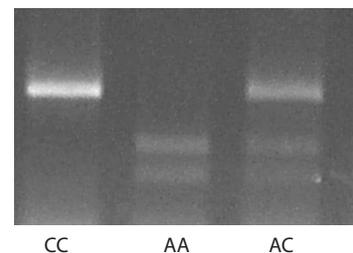


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов гена *IL6R* в 1.5 % агарозном геле после обработки эндонуклеазой рестрикции *Hinf I*. Аллелю А соответствуют фрагменты ДНК 331 и 239 п.н., аллелю С – 570 п.н.

$p = 0.0006$ соответственно) по сравнению с донорами из контрольной группы.

Уровни мРНК гена *VCAM1* в ЛПК индивидов, имеющих генотипы AA и AC+CC по rs2228145 гена *IL6R*, значимо не различались как в контрольной группе, так и в группе больных ЭАГ ($p = 0.292$ и $p = 0.071$ соответственно) (рис. 2). Выявлены различия в содержании мРНК гена *ICAM1* у больных ЭАГ с разными аллельными вариациями по rs2228145 гена *IL6R* (см. рис. 2). У лиц, имеющих аллель С, уровень транскриптов гена *ICAM1* в 4 раза выше, чем у лиц, имеющих альтернативные варианты по указанному полиморфному маркеру. Выявлено влияние генотипа по rs2228145 на содержание мРНК гена *ICAM1* (Test statistic = 4.74, $p = 0.029$).

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру A > C rs2228145 гена *IL6R* в группе пациентов с ЭАГ (I–II стадии) и в контрольной группе

Аллели и генотипы	Контрольная группа (n = 148)	Больные ЭАГ (n = 152)	Критерий χ^2
A	191 (0.646)*	190 (0.625)	0.266 (df = 1, $p > 0.05$)
C	105 (0.354)	114 (0.375)	
AA	57 (0.385)	67 (0.441)	9.303 (df = 2, $p < 0.01$)
AC	77 (0.520)	56 (0.368)	
CC	14 (0.095)	29 (0.191)	

* В скобках указана частота встречаемости.

Таблица 3. Доминантная и рецессивная модели распределения генотипов по rs2228145 (A > C) гена *IL6R*

Модель	Генотип	ЭАГ (n = 152)	Контрольная группа (n = 148)	χ^2	ОШ (95 % ДИ)
Доминантная	AA	67	57	0.958, $p = 0.328$	0.795 (0.501–1.260)
	AC+CC	85	91		
Рецессивная	AC+AA	123	134	5.651, $p = 0.018$	2.257 (1.100–4.468)
	CC	29	14		

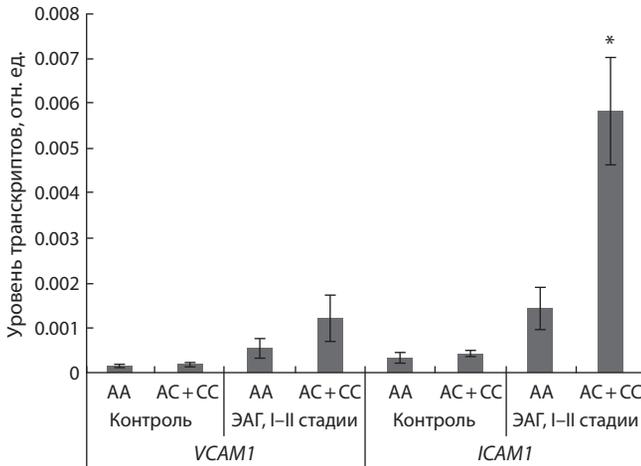


Рис. 2. Уровень транскриптов генов *VCAM1* и *ICAM1* в ЛПК здоровых людей и больных ЭАГ, носителей аллельных вариаций по rs2228145 гена *IL6R*.

* Различия значимы при сравнении с носителями генотипа AA ($p = 0.021$).

Обсуждение

Нами выявлена ассоциация аллельных вариаций rs2228145 гена *IL6R* с развитием у людей ЭАГ. Носители генотипа CC по этому аллелю характеризуются повышенным в 2.3 раза риском развития указанного заболевания. Интересно, что, согласно данным литературы, носительство аллеля С считается протективным в отношении развития коронарной болезни сердца, ревматоидного артрита (Jiang et al., 2010; Sarwar et al., 2012; Ferreira et al., 2013). Этот факт можно объяснить снижением экспрессии mbIL-6R на поверхности Т-лимфоцитов и моноцитов, которое приводит к ослаблению классического сигнального пути IL-6, выражающегося в уменьшении пула фосфорилированных форм транскрипционных факторов STAT1 (signal transducers and activators of transcription1) и STAT3 в этих клетках (Ferreira et al., 2013). Выявленный нами патогенетический эффект аллеля С по указанному полиморфному маркеру на формирование ЭАГ можно объяснить тем, что его носительство обуславливает более высокий уровень растворимых рецепторов IL-6 в плазме крови (Galicia et al., 2004; Rafiq et al., 2007; Ferreira et al., 2013) и может обеспечивать повышение стабильности IL-6 сигнализации. Приблизительно 70 % секретируемого IL-6 связывается с sIL-6R в крови (Gaillard et al., 1999). Таким образом, sIL-6R функционирует как молекула-носитель для IL-6. В клетках эндотелия сосудов данный цитокин реализует свои эффекты через IL-6/sIL-6R путь передачи сигнала. У больных с патологией сердечно-сосудистой системы уровень sIL-6R в плазме крови повышается (Sarwar et al., 2012). У лиц с генотипами AC и CC по rs2228145 это, в свою очередь, может привести к дополнительной активации сигнальных путей, реализующих воспалительный сигнал в клетках эндотелия. Известно, что IL-6/sILR-6 комплекс активирует p65 NF-κB и STAT3 транскрипционные факторы и способствует увеличению содержания мРНК генов *IL6*, *GPI30*, *STAT3* (Kim et al., 2011), таким образом усиливая локальные и системные воспалительные реакции.

Провоспалительные цитокины, такие как TNFα и IL-6, усиливают транскрипционную активность генов, кодирующих молекулы адгезии (*VCAM-1*, *ICAM-1*) (Sprague, Khalil, 2009). Инициация проведения сигналов от TNFα и IL-6 к ядерному аппарату клеток осуществляется через регуляцию активности НАДФ оксидазы 2 и продукцию активных форм кислорода (Cook-Mills et al., 2011; Wang et al., 2016). Усиление транскрипционной активности этих генов под влиянием провоспалительных факторов является основной причиной повышения содержания молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток (Sprague, Khalil, 2009). Уровень ICAM-1, VCAM-1 и Е-селектина связан с риском развития ишемической болезни сердца (Белокопытова и др., 2013), атеросклероза сосудов (Galkina, Ley, 2007), легочной гипертензии (Kato et al., 2005). Следовательно, модулирование активности интерлейкина 6 за счет изменения соотношения мембраносвязанных и растворимых форм его рецепторов, опосредованного наличием мутаций, влияющих на эктодоменный шеддинг, может существенным образом сказываться на содержании мРНК генов, кодирующих молекулы межклеточной адгезии. Действительно, нами обнаружено влияние генотипа по rs2228145 на транскрипционную активность гена *ICAM1* в лейкоцитах периферической крови. Полученные данные косвенно свидетельствуют об изменении транскрипционной активности этого гена и в клетках эндотелия и, по всей вероятности, указывают на развитие эндотелиальной дисфункции. Таким образом, полиморфный маркер rs2228145 гена *IL6R*, предположительно, вовлечен в генетическую предрасположенность людей к ЭАГ. Носительство аллеля С по указанному маркеру может стать причиной высокого уровня мРНК гена *ICAM1* у больных ЭАГ, что, вероятно, имеет значение в патогенезе дисфункции эндотелия и при развитии данной болезни.

Список литературы / References

- Белокопытова И.С., Москалец О.В., Палеев Ф.Н., Зотова О.В. Диагностическое значение растворимых молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 при ишемической болезни сердца. Атеросклероз и дислипидемии. 2013;4:62-65.
- [Belokopytova I.S., Moskaletz O.V., Paleev F.N., Zotova O.V. The diagnostic value of adhesive molecules sICAM-1 and sVCAM-1 in ischemic heart disease. Атеросклероз и Дислипидемии = Аtherosclerosis and Dyslipidemia. 2013;4:62-65. (in Russian)]
- Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (Четвертый пересмотр). (Рос. мед. о-во по артер. гипертензии; Всерос. науч. о-во кардиологов). Системные гипертензии. 2010;3:5-26.
- [Diagnosis and treatment of hypertension. Russian recommendations (Fourth revision). (Russian Medical Society on Arterial Hypertension; Russian Scientific Society of Cardiology). Sistemnye Gipertenzii = Systemic Hypertension. 2010;3:5-26. (in Russian)]
- Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: основы доказательной медицины. М., 1998.
- [Fletcher R., Fletcher S., Wagner E. Clinical Epidemiology. The essentials. Baltimore [etc.]: Williams & Wilkins: A Waverly Company, 1996. (Russ. ed. Fletcher R., Fletcher S., Wagner E. Klinicheskaya epidemiologiya: osnovy dokazatel'noy meditsiny. Moscow, 1998.)]
- Bautista L.E., Vera L.M., Arenas I.A., Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-α) and essential hypertension. J. Hum. Hypert. 2005; 19:149-154.

- Cook-Mills J.M., Marchese M.E., Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;15(6):1607-1638. DOI 10.1089/ars.2010.3522.
- Didion S.P. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(2563). DOI 10.3390/ijms18122563.
- Ferreira R.C., Freitag D.F., Cutler A.J., Howson J.M., Rainbow D.B., Smyth D.J., Kaptoge S., Clarke P., Boreham C., Coulson R.M., Pekalski M.L., Chen W.M., Onengut-Gumuscu S., Rich S.S., Butterworth A.S., Malarstig A., Danesh J., Todd J.A. Functional *IL6R* 358Aa allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet.* 2013;9(4):e1003444. DOI 10.1371/journal.pgen.1003444.
- Gaillard J., Pugnère M., Tresca J., Mani J., Klein B., Brochier J. Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum. *Eur. Cytokine Netw.* 1999;10(3):337-344.
- Galicia J.C., Tai H., Komatsu Y., Shimada Y., Akazawa K., Yoshie H. Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun.* 2004;5:513-516. DOI 10.1038/sj.gene.6364120.
- Galkina E., Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:2292-2301. DOI 10.1161/ATVBAHA.107.149179.
- Jiang C.Q., Lam T.H., Liu B., Lin J.M., Yue X.J., Jin Y.L., Cheug B.M.Y., Thomas G.N. Interleukin-6 receptor gene polymorphism modulates interleukin-6 levels and the metabolic syndrome: GBCS-CVD. *Obesity.* 2010;18(10):1969-1974. DOI 10.1038/oby.2010.31.
- Kato G.J., Martyr S., Blackwelder W.C., Nichols J.S., Coles W.A., Hunter L.A., Brennan M., Hazen S.L., Gladwin M.T. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br. J. Haematol.* 2005;130(6):943-953.
- Kim S.K., Park K.Y., Yoon W.C., Park S.H., Park K.K. Mellitin enhances apoptosis through suppression of IL-6/sIL-6R complex-induced NF- κ B and STAT3 activation and Bcl-2 expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2011;78:471-477. DOI 10.1016/j.jbspin.2011.01.004.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
- Moss J.W.E., Ramji D.P. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med. Chem.* 2016;8(11):1317-1330. DOI 10.4155/fmc-2016-0072.
- Nakahara H., Song J., Sugimoto M., Hagihara K., Kishimoto T., Yoshizaki K., Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1521-1529.
- Pinto J.P., Dias V., Zoller H., Porto G., Carmo H., Carvalho F., de Sousa M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology.* 2010;130(2):217-230. DOI 10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x.
- Rafiq S., Frayling T.M., Murray A., Hurst A., Stevens K., Weedon M.N., Henley W., Ferrucci L., Bandinelli S., Corsi A.M., Guralnik J.M., Melzer D. A common variant of the interleukin 6 receptor (IL-6r) gene increases IL-6r and IL-6 levels, without other inflammatory effects. *Genes Immun.* 2007;8:552-559. DOI 10.1038/sj.gene.6364414.
- Rajan S., Ye J., Bai S., Huang F., Guo Y.-L. NF- κ B, but not p38 MAP kinase, is required for TNF- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 2008;105(2):477-486. DOI 10.1002/jcb.21845.
- Sarwar N., Butterworth A.S., Freitag D.F., Gregson J., Willeit P., Gorman D.N., Gao P., ... Samani N.J., Kaptoge S., Di Angelantonio E., Harari O., Danesh J. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet.* 2012;379:1205-1213. DOI 10.1016/S0140-6736(11)61931-4.
- Sprague A.H., Khalil R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 2009;78(6):539-552. DOI 10.1016/j.bcp.2009.04.029.
- The Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6R MR) Consortium. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet.* 2012;379(9822):1214-1224. DOI 10.1016/S0140-6736(11)61931-4.
- Virdis A., Dell'Agnello U., Taddei S. Impact of inflammation on vascular disease in hypertension. *Maturitas.* 2014;78(3):179-183. DOI 10.1016/j.maturitas.2014.04.012.
- Wang Y., Nie W., Yao K., Wang Z., He H. Interleukin 6 induces expression of NADPH oxidase 2 in human aortic endothelial cells via long noncoding RNA MALAT1. *Pharmazie.* 2016;71(10):592-597. DOI 10.1691/ph.2016.6598.
- Wei Z., Jiang W., Wang H., Li H., Tang B., Liu B., Jiang H., Sun X. The IL-6/STAT3 pathway regulates adhesion molecules and cytoskeleton of endothelial cells in thromboangiitis obliterans. *Cell. Signal.* 2018;44:118-126. DOI 10.1016/j.cellsig.2018.01.015.
- Weiss T.W., Arnesen H., Seljeflot I. Components of interleukin-6 trans-signaling system are associated with the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Metab. Clin. Exp.* 2013;62:1008-1013. DOI 10.1016/j.metabol.2013.01.019.
- Wenzel P., Knorr M., Kossmann S., Stratmann J., Hausding M., Schuhmacher S., Karbach S.H., Schwenk M., Yogeve N., Schulz E., Oelze M., Grabbe S., Jonuleit H., Becker C., Daiber A., Waisman A., Münzel T. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation.* 2011;124(12):1370-1381. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034470.
- Wolf J., Rose-John S., Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine.* 2014;70:11-20. DOI 10.1016/j.cyto.2014.05.024.

ORCID ID

L.V. Topchieva orcid.org/0000-0001-8697-2086
V.A. Korneva orcid.org/0000-0003-2231-4695
I.V. Kurbatova orcid.org/0000-0001-7620-7065

Благодарности. Исследования выполнены в рамках госзадания (тема 0218-2019-0077) на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.03.2019. После доработки 19.09.2019. Принята к публикации 21.09.2019.

PlantLayout pipeline to model tissue patterning

M.S. Savina¹ , V.V. Mironova^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: savinams1991@gmail.com

Abstract. To study the mechanisms underlying developmental pattern formation in a tissue, one needs to analyze the dynamics of the regulators in time and space across the tissue of a specific architecture. This problem is essential for the developmental regulators (morphogens) that distribute over the tissues anisotropically, forming there maxima and gradients and guiding cellular processes in a dose-dependent manner. Here we present the PlantLayout pipeline for MATLAB software, which facilitates the computational studies of tissue patterning. With its help, one can build a structural model of a two-dimensional tissue, embed it into a mathematical model in ODEs, perform numerical simulations, and visualize the obtained results – everything on the same platform. As a result, one can study the concentration dynamics of developmental regulators over the cell layout reconstructed from the real tissue. PlantLayout allows studying the dynamics and the output of gene networks guided by the developmental regulator in specific cells. The gene networks could be different for different cell types. One of the obstacles that PlantLayout removes semi-automatically is the determination of the cell wall orientation which is relevant when cells in the tissue have a polarity. Additionally, PlantLayout allows automatically extracting other quantitative and qualitative features of the cells and the cell walls, which might help in the modeling of a developmental pattern, such as the length and the width of the cell walls, the set of the neighboring cells, cell volume and cell perimeter. We demonstrate PlantLayout performance on the model of phytohormone auxin distribution over the plant root tip.

Key words: mathematical modeling; image analysis; polarity; morphogen; pattern.

For citation: Savina M.S., Mironova V.V. PlantLayout pipeline to model tissue patterning. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):102-107. DOI 10.18699/VJ20.590

PlantLayout – программное средство для моделирования распределения веществ в тканях различной структуры

M.C. Савина¹ , В.В. Миронова^{1, 2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: savinams1991@gmail.com

Аннотация. Для изучения механизмов, лежащих в основе формирования паттернов развития в тканях, необходим анализ динамики распределения регуляторов во времени и пространстве в тканях сложной структуры. Наибольшее значение это имеет в случае регуляторов развития (морфогенов), которые распределены в ткани неравномерно, образуя максимумы и градиенты, и регулируют клеточные процессы по-разному в зависимости от дозы. Настоящая работа посвящена описанию программного средства PlantLayout на языке MATLAB, которое облегчает исследование формирования распределений регуляторов в тканях различного строения. С его помощью можно построить двумерную структурную модель ткани, внедрить ее в математическую модель, описанную в терминах обычных дифференциальных уравнений, выполнить численные расчеты модели и визуализировать полученные результаты – всё на одной платформе. В результате можно изучать динамику работы генных сетей и изменения концентрации регуляторов в каждой клетке клеточного ансамбля, воспроизводящего строение реальной ткани. Исследуемые генные сети могут различаться для разных типов клеток. Одной из задач, которую решает PlantLayout в полуавтоматическом режиме, является определение ориентации клеточной стенки, что имеет значение в случае присутствия в ткани поляризованных клеток. Кроме того, PlantLayout позволяет автоматически определять другие качественные и количественные характеристики клеток и клеточных стенок, такие как длина и ширина клеточных стенок, площадь сечения и периметр клеток, которые могут помочь в моделировании паттернов распределения регуляторов развития, а также список соседних клеток для каждой клетки. В данной работе продемонстрирована эффективность разработанного программного средства PlantLayout применительно к моделированию распределения фитогормона ауксина в кончике корня растения.

Ключевые слова: математическое моделирование; обработка изображений; полярность; морфоген; паттерн.

Introduction

Pattern formation requires the activity of developmental regulators to be controlled in time and space. This demands the application of computer modeling tools to predict the output

from complex regulatory circuits and to understand if different developmental scenarios exist under certain conditions (Tomlin, Axelrod, 2007; Bellomo, Carbonaro, 2011). Developmental biology attracted much attention from specialists in

mathematical modeling and computer sciences who built mathematical models to address fundamental problems in this field. One of the first mathematical models for tissue patterning formation was Turing’s reaction-diffusion model describing the interaction of two regulators: an activator and an inhibitor (Turing, 1952). This model helped understand the mechanisms of the pattern formation of the gap genes’ distribution during *Drosophila melanogaster* embryogenesis (Lacalli, 1990) and of the patterning of palatal ridges (Economou et al., 2012) or digits (Raspopovic et al., 2014) during mouse embryogenesis. Mathematical modeling of tissue patterning was also successfully used to study such processes as somitogenesis and neurogenesis for animals (Lewis, 2003; Shimojo, Kageyama, 2016) and phyllotaxis for plants (Jönsson et al., 2006; Smith et al., 2006). Nowadays, a number of professional tools and software have been developed to help the researchers in building more powerful computer models that take into account more experimental data. If the first mathematical models did not consider the cellular structure of the tissue at all, e. g. in Turing model (Turing, 1952), nowadays scientists are reducing the use of models with oversimplified rectangular tissues and start developing models on the realistic cell layouts.

According to the plant-image-analysis.org database, there are a large number of tools to do cell segmentation in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) analyses of tissue architecture (Lobet et al., 2013). Some of them are tissue-specific, for example, the plugin for ImageJ named Cefiler is intended for identification of cell files during wood anatomy analysis in 2D. Cefiler allows extracting data on the cell shape and the perimeter, the neighbors for each cell, the width of the cell walls (Brunel et al., 2012). ImageJ-plugin LSM-W2 is intended for wheat leaf structure analysis (Zubairova et al., 2019). The iRoCS Toolbox is a tool for 3D analysis of the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* (Schmidt et al., 2014). It allows identifying attachment of the cell to the definite tissue and measuring some quantitative characteristics like the volume of cell, radius, and position of the nuclei. Other tools can be used for different plant tissues and organs. DRACO-STEM is a pipeline for 3D segmentation (Cerutti et al., 2017). It allows getting only the topological structure of the tissue represented as a structural graph with vertices, edges, faces, and polyhedra as a node. MorphoGraphX is a free Linux application for the visualization and cell geometry analysis of organ surface in 3D (de Reuille et al., 2015). It allows performing the cell segmentation and time-lapse analysis of growth tissues. Balloon Plugin is a plugin for Fiji that allows extracting the lists of individual cell shapes and determining the cells being in contact with each other (Federici et al., 2012). CellSeT is a powerful software that can be used for the analysis of confocal images to provide quantitative data on the cell structure and expression intensity (Pound et al., 2012).

There are also several tools for mathematical modeling of plant tissues, for example VirtualLeaf (Merks et al., 2011), Cellzilla (Shapiro et al., 2013) and SimuPlant (Eckardt, 2014). On the one hand, these tools require the user to set the cell layout in a specific manner, they are not adapted to receive data from image processing programs. On the other hand, the image processing programs/tools have different data formats and their results require additional processing before being implemented into a mathematical modeling tool. For example,

Band and the coauthors (2014) used three individual programs and an additionally developed script to build a mathematical model of phytohormone auxin distribution over the root apex. Specifically, they used CellSeT for image analysis of optical sections of the root apex from confocal microscopy, then, via an additional Python script, they imported CellSeT output into the OpenAlea simulation environment (Pradal et al., 2008) for creating the computational structural model representing a multicellular root geometry. Finally, OpenAlea output data was ready to start SimuPlant simulation (Eckardt, 2014).

The recent trend is that more biologists are eager to study the developmental processes of their interest using computational modeling methods. That demands the development of user-friendly software that helps biologists build the structural model on the basis of the experimental image, embed it then into a mathematical model and then perform numerical simulation on the same platform. Here we present the PlantLayout pipeline for MATLAB software for such purposes.

Materials and methods

PlantLayout pipeline. PlantLayout is a pipeline built as four connected files (1.m–4.m) consisting of executable blocks in the MATLAB m-code programming language (Fig. 1). It uses MATLAB Image Processing Toolbox for creating two-dimensional (2D) computational structural models of plant tissues and organs, embed them into a mathematical model in ordinary differential equations (ODE) and facilitate their numerical analysis. Most of the executable blocks inside PlantLayout files contain detailed descriptions and examples.

The input data. PlantLayout uses a preprocessed microscopic image as input data. One can either use third-party tools for image segmentation (e. g. CellSeT (Pound et al., 2012) or MorphoGraphX (de Reuille et al., 2015)) or draw the tissue scheme using the experimental image as a readout. In the first

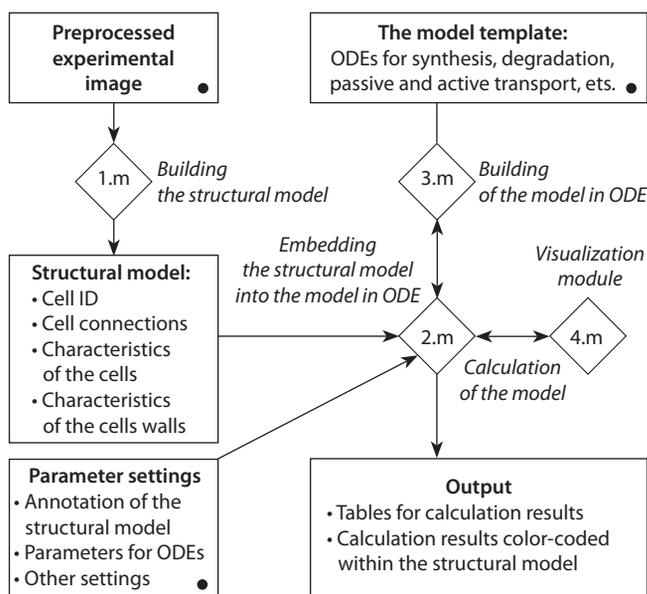


Fig. 1. PlantLayout pipeline. Interactions between different parts of PlantLayout.

Connected m-files are depicted by rhombuses. The procedures performed inside PlantLayout are written in italics. The points to be uploaded or edited by the user are marked with the black circles.

case, a manual correction might be in need. The second way might be also an option when one wants to study the influence of tiny anatomical changes.

Building a 2D structural model. PlantLayout applies *bwconncomp* function from MATLAB Image Processing Toolbox to identify all cells and cell walls as connected components within the preprocessed image (1.m in Fig. 1). The cells from the layout receive unique index numbers from 3 to $N+2$ (where N is the number of cells). Herewith index 1 identifies the external environment, and index 2 identifies the part of the organ or tissue that is not included in the simulated cell layout. Every cell wall receives a couple of index numbers (i, j) , where i is the number of the mother cell and j is the number of the neighboring cell. PlantLayout automatically determines quantitative and qualitative characteristics for all cells and cell walls (see output data).

An algorithm to define the cell wall orientation

We developed a special algorithm to determine the cell walls' orientation. For this, several characteristics were calculated for the cells and cell walls considered as connected components. The first characteristic is the centroid of the region (cell or cell wall). The second is the smallest rectangle containing the region. The third is the characteristic ellipse that has the same normalized second central moments as the region. For the ellipse, the algorithm calculates the length of its major and minor axes and the angle between the x -axis and the major axis of the ellipse. Determination of the cell walls orientation ("top", "bottom", "right" and "left") occurs according to the following algorithm:

1. If the maximum and minimum coordinates of the cell wall (i, j) lie between the centroids of the cells i and j vertically/horizontally, then the orientation of the cell wall (i, j) is "bottom"/"right" (Fig. 2, a).
2. If the cell wall (i, j) is vertical (the angle between the major axis of the characteristic ellipse and x -axis is more than 45 degrees) and the centroid of the cell j is to the right of the centroid of the cell i , then the orientation of the cell wall (i, j) is "right". If the cell wall (i, j) is horizontal (the angle between the major axis of the characteristic ellipse and x -axis less than 45 degrees) and the centroid of the cell j is to the top of the centroid of the cell i , then the orientation of the cell wall (i, j) is "top" (see Fig. 2, b).
3. An alternative definition of orientation using the smallest rectangle containing the cell wall (i, j) . If the cell i is above the rectangle, and the cell j is below the rectangle, the orientation of the cell wall (i, j) is "bottom". The "top", "right" and "left" orientations are defined in a similar way (see Fig. 2, c).
4. If the orientation of the cell wall (i, j) at points 1–3 is defined equally and unambiguously, then the orientation of the cell wall (i, j) is determined.
5. If there is an ambiguity in determining the orientation of the cell wall (i, j) , common neighbors of the cells i and j should be taken into account as described further.
6. If the cell q is the common neighbor of the cells i and j and the cell walls (i, q) and (j, q) are both vertical ("right" or "left"), then the cell wall (i, j) is considered as perpendicular to them ("top" or "bottom"). If the cell walls (i, q) and (j, q) are both horizontal ("top" or "bottom"), then the cell

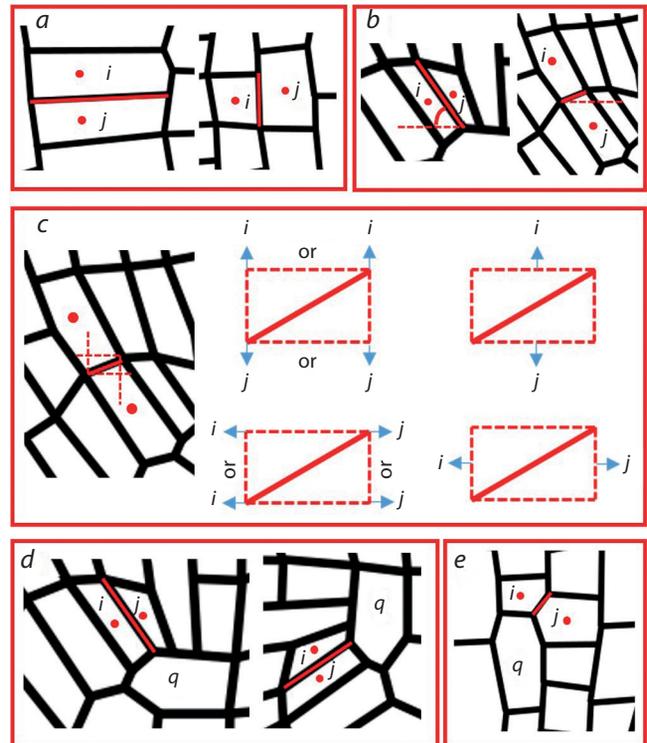


Fig. 2. The rules for determination of the cell wall orientation in PlantLayout. Representative examples of the cell wall orientation between the cells with the numbers i and j .

a, determination using the maximum and the minimum coordinates for the cell wall; b, determination using the angle between the major axis of the characteristic ellipse and x -axis; c, determination using the smallest rectangle containing the cell wall; d, determination using the common neighbor cell with the number q when the cell walls with numbers (i, q) and (j, q) have the same directions; e, determination using the common neighbor cell with number q when the cell walls with numbers (i, q) and (j, q) have different directions.

wall (i, j) is considered as perpendicular to them ("right" or "left"). "Right" or "left" ("top" or "bottom") orientation is determined by the relative position of the centroids of the cells i and j (see Fig. 2, d).

7. If the cell q is the common neighbor of the cells i and j and the cell wall (i, q) is vertical ("right" or "left") and the cell wall (q, j) is horizontal ("top" or "bottom"), it needs to compare the centroids positions of the cells i and j . If the vertical coordinates of the cell i centroid are more/less than the vertical coordinates of the cell j centroid and the orientation of the cell walls (q, j) is "bottom"/"top", then the orientation of the cell wall (i, j) is "bottom"/"top". If the horizontal coordinates of the cell i centroid are more/less than the horizontal coordinates of the cell j centroid and the orientation of the cell walls (i, q) is "left"/"right", then the orientation of the cell wall (i, j) is "left"/"right" (see Fig. 2, e).
8. If there is an ambiguity in determining the orientation of the cell wall (i, j) using common neighbors, then manual correction should be used.

Output 2D structural model

PlantLayout provides the following quantitative and qualitative characteristics of the 2D cell layout taken from the preprocessed microscopic image: (1) the size of each cell

(cross-sectional area and perimeter of the cell); (2) the size of each cell wall between any two adjacent cells (length and width); (3) the orientation of the cell walls (1, “top”; 2, “bottom”; 3, “right”; 4, “left”) for each cell. The quantitative characteristics of the cells are represented as column vectors, where the dimension of the vector corresponds to $N+2$, and the indexes of the vector correspond to unique index numbers. The characteristics of the cell walls are represented by square matrices of dimension $(N+2)$, where the index (i, j) corresponds to the cell wall with number (i, j) . If there is no cell wall between cells with indexes i and j , the value for the indexes (i, j) and (j, i) is set to zero. In the case of quantitative characteristics (the length and width of the cell wall) the values for the indexes (i, j) and (j, i) are equal. In the case of a matrix describing the orientation of the cell wall the values for the indexes (i, j) and (j, i) take the opposite values (“top”-“bottom” or “left”-“right”).

The framework for embedding the structural model into the mathematical model

At the next step, PlantLayout transfers the 2D structural model into the framework for mathematical modeling in MATLAB. The framework consists of two connected .m files for: (1) description of ODE system (3.m in Fig. 1), (2) the interrelations between the 2D structural model and the mathematical model in ODEs (2.m in Fig. 1). The 3.m file contains the frame for creating ODEs that describe the dynamics in the concentration levels for the substances of interest (variables). PlantLayout provides the examples for ODEs in general forms (the forms are different for the substances that spread through the cell layout and that do not move through the cell membrane). Only the functions that describe the appearance/disappearance of the modeling substance (e. g. synthesis, degradation, conjugation, oxidation, etc.) should be described for the substances that do not move. PlantLayout provides examples of functions in a common view to describe these processes according to Michaelis–Menten kinetics and Generalized Hill function method (Likhoshvai, Ratushny, 2007). In addition, the functions describing passive or active transportation from cell to cell should be described for the substances that are able to move through the plasma membrane. Based on Fick’s law of diffusion, the passive transport is proportional to the difference in substance concentrations between the cells. The active transport is described according to the mass action law, depending on the concentration of the carriers and the concentration of the moving substance. It is possible for the user to build the functions that differ from the default ones.

The 2.m file allows embedding the quantitative and qualitative data on the tissue structure received from the microscopic image into the mathematical model and performing its numerical analysis. This file consists of several executable blocks for different purposes (here the user can not only define a parameter set but also make the model adjustment). E. g. the user can specify the cells of different types (that possess different variables), transfer the length units to μm and mm. Some additional parameters required for the mathematical model can be calculated here. For example, in the case of diffusible substances, the flow through the cell wall of certain orientation might be specified. PlantLayout provides recommendations to describe such additional parameters and settings.

Finally, this 2.m file contains the frame for numerical calculation of the resulting mathematical model in ODEs. By default, PlantLayout uses MATLAB function `ode15s` that is a variable order solver based on the numerical differentiation formulas (NDFs) and the backward differentiation formulas (BDFs, also known as Gear’s method) (Shampine, Reichelt, 1997; Shampine et al., 1999). But the user may also apply other ODE solvers.

Visualization of the model simulation results

PlantLayout provides an option for visualization of the numerical simulation results on the base of the 2D structural model (4.m in Fig. 1). The concentration values calculated for every cell of the tissue are encoded using a color scale and visualized within the cell layout. The user can use any suitable colormap for visualization of the calculation results.

Results and discussion

PlantLayout pipeline to model tissue patterning

We developed the PlantLayout pipeline in MATLAB software to facilitate the studies on the mechanisms of tissue patterning when the user needs to consider both the tissue architecture and the dynamics of the developmental regulators. The pipeline application is especially effective when the developmental regulator is able to move from cell to cell, generating gradients, maxima, and minima that are instructive for tissue patterning.

PlantLayout consists of three steps: (1) creation of the 2D structural model of a tissue/organ, (2) embedding the mathematical model in ODE into the structural model, (3) numerical calculation and visualization of the results. As input data, the pipeline uses the preprocessed microscopic image of a 2D section of a tissue or organ (see Methods; Fig. 3). First, the pipeline determines the cells and the cell walls as connected components and gives them unique IDs. Then it automatically extracts for each cell and each cell walls their quantitative and qualitative features, such as the IDs of the neighboring cells, the cell size, the length and orientation of the cell wall (see Methods).

At the second step, the data on the anatomical structure of the tissue in the form of vectors and matrices is conveyed to the framework for the mathematical model construction. Here the user should (1) describe the ODEs for the processes he/she wants to study; (2) annotate the cells in case 2D tissues consists of different cell types; (3) define which ODEs are embedded into the cells of a specific type; (4) define the initial data for the variables; (5) define parameters set (see Methods; Fig. 1). Note that some of the model parameters might depend on the structural characteristics of the 2D cell layout, e. g. the cell area and perimeter, the length, and width of the cell wall between each two cells.

Once the computational model has been ready, one can start its numerical analysis. Importantly, the results of numerical simulations can be visualized using the 2D structural model (see Fig. 3, *h*).

PlantLayout deals with anisotropy in tissue patterning

PlantLayout is especially relevant to the study of the developmental regulators that are able to move from cell to cell, e. g.

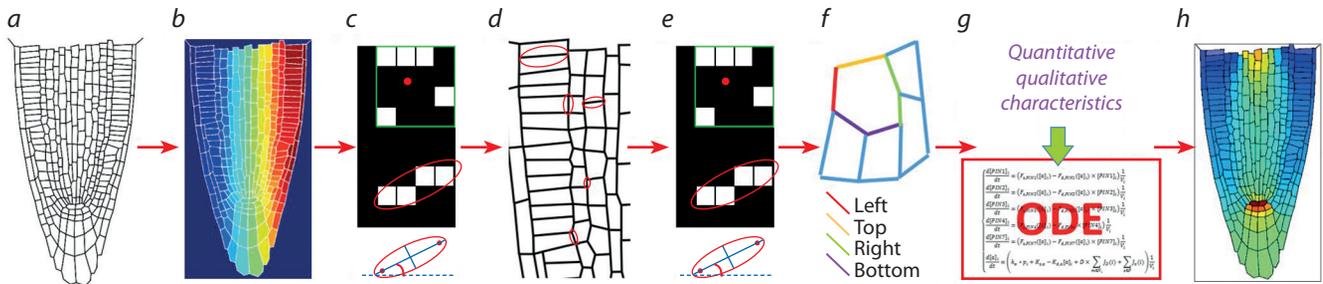


Fig. 3. Representation of the PlantLayout pipeline on the example of building the model for the study of phytohormone auxin distribution within the plant root tip.

a, pre-processed confocal image of the root tip; *b*, identifying the cells as connected components and getting unique indexes for each cell; *c*, quantification of cells features; *d*, identification of the cell walls between each two cells as connected components; *e*, estimation of the quantitative and qualitative characteristics for the cell walls; *f*, definition of the cell wall orientations; *g*, embedding the quantitative and qualitative characteristics of the 2D structural model into the mathematical model; *h*, steady state solution of the mathematical model, auxin distribution in the plant root tip.

morphogens. Some developmental regulators have an anisotropic distribution that cannot be described by simple diffusion. To deal with it, we built-in PlantLayout with an algorithm for automatic definition of the cell walls' orientation.

Unlike other software products for creation of the structural models (e.g. CellSeT (Pound et al., 2012), Balloon Plugin (Federici et al., 2012)), PlantLayout defines the orientation of the cell walls in the 2D image (“top”, “bottom”, “left”, “right”). This feature is also relevant to the tissues with polar cells, in which cell walls have unequal functions. For example, when the cell transports a regulator inside at the “top” side, outside at the “bottom” side and does not transport them at the lateral sides. This is a characteristic behaviour for e.g. vascular cells in plants and intestinal epithelial cells in animals.

PlantLayout application example

To demonstrate the PlantLayout performance, we build with its help the 2D structural model that represents the longitudinal section of the root tip of *Arabidopsis thaliana* (see Fig. 3, *a-f*). We embedded the structural model into an existing mathematical model of the phytohormone auxin in the root tip (Mironova et al., 2012; Hong et al., 2017). Auxin is a major regulator of plant root morphogenesis that distributes polarly via active transport and regulates cell dynamics depending on concentration. The initial model describes how auxin redistributes over the rectangular cell layout imitating the root tip tissue by passive and active auxin-regulated transport. Description of the mathematical model is beyond this study. In Fig. 3, *h*, you can see the steady state solution for auxin distribution that was generated with PlantLayout from uniform initial data and with the parameters set inherited from the initial model (Hong et al., 2017). The steady state solution has the specific auxin maximum inside the root tip that was also self-generated in the rectangular models (Mironova et al., 2012; Hong et al., 2017), but it gives more details about auxin concentrations in the cells of different types that did not exist in the rectangular model.

Conclusions

Here we present the PlantLayout pipeline for MATLAB software which helps studying the molecular-genetic mechanisms of tissue patterning in the 2D tissue context. PlantLayout allows easily going from the preprocessed microscopic image

to the mathematical modeling of tissue patterning through all stages at the same platform (see Figs. 1, 3), and this procedure can be repeated many times. Thus, a typical scenario of PlantLayout use is an analysis of a regulatory core output on the tissues of different architectures, e.g. to study the differences between wild type and mutant. Although PlantLayout was developed to study plant tissue patterning, it can be successfully applied for other organisms, if the cells in the tissue do not migrate, have tight connections and their shape can be approximated by a convex polygon.

References

- Band L.R., Wells D.M., Fozard J.A., Ghetiu T., French A.P., Pound M.P., Wilson M.H., Yu L., Li W., Hijazi H.I., Oh J. Systems analysis of auxin transport in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Cell*. 2014;26(3):862-875.
- Bellomo N., Carbonaro B. Toward a mathematical theory of living systems focusing on developmental biology and evolution: a review and perspectives. *Phys. Life Rev.* 2011;8(1):1-8.
- Brunel G., Borianne P., Subsol G., Jaeger M., Caraglio Y. Automatic characterization of the cell organization in light microscopic images of wood: application to the identification of the cell file. *Proc. of the 4th Int. Symp. on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications*. IEEE. 2012;58-65.
- Cerutti G., Ali O., Godin C. DRACO-STEM: an automatic tool to generate high-quality 3D meshes of shoot apical meristem tissue at cell resolution. *Front. Plant Sci.* 2017;8:353.
- de Reuille P.B., Routier-Kierzkowska A.L., Kierzkowski D., Bassel G.W., Schüpbach T., Tauriello G., Bajpai N., Strauss S., Weber A., Kiss A., Burian A. MorphoGraphX: a platform for quantifying morphogenesis in 4D. *Elife*. 2015;4:e05864.
- Eckardt N.A. A useful model of auxin transport in the root apex. *Plant Cell*. 2014;26:843.
- Economou A.D., Ohazama A., Pomtaveetus T., Sharpe P.T., Kondo S., Basson M.A., Gritli-Linde A., Cobourne M.T., Green J.B. Periodic stripe formation by a Turing mechanism operating at growth zones in the mammalian palate. *Nat. Genet.* 2012;44(3):348.
- Federici F., Dupuy L., Laplace L., Heisler M., Haseloff J. Integrated genetic and computation methods for in planta cytometry. *Nat. Methods*. 2012;9(5):483.
- Hong J.H., Savina M., Du J., Devendran A., Ramakanth K.K., Tian X., Sim W.S., Mironova V.V., Xu J. A sacrifice-for-survival mechanism protects root stem cell niche from chilling stress. *Cell*. 2017; 170(1):102-113.
- Jönsson H., Heisler M.G., Shapiro B.E., Meyerowitz E.M., Mjolsness E. An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(5):1633-1638.

- Lacalli T.C. Modeling the *Drosophila* pair-rule pattern by reaction-diffusion: gap input and pattern control in a 4-morphogen system. *J. Theor. Biol.* 1990;144(2):171-194.
- Lewis J. Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr. Biology.* 2003; 13(16):1398-1408.
- Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized Hill function method for modeling molecular processes. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007; 5(02b):521-531.
- Lobet G., Draye X., Périlleux C. An online database for plant image analysis software tools. *Plant Methods.* 2013;9(1):38.
- Merks R.M., Guravage M., Inzé D., Beemster G.T. VirtualLeaf: an open-source framework for cell-based modeling of plant tissue growth and development. *Plant Physiol.* 2011;155(2):656-666.
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Novoselova E.S., Doroshkov A.V., Kazantsev F.V., Kochetov A.V., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. Combined *in silico/in vivo* analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance. *Ann. Bot.* 2012;110(2):349-360.
- Pound M.P., French A.P., Wells D.M., Bennett M.J., Pridmore T.P. Cell Set: novel software to extract and analyze structured networks of plant cells from confocal images. *Plant Cell.* 2012;24(4):1353-1361.
- Pradal C., Dufour-Kowalski S., Boudon F., Fournier C., Godin C. OpenAlea: a visual programming and component-based software platform for plant modelling. *Funct. Plant Biol.* 2008;35(10): 751-760.
- Raspopovic J., Marcon L., Russo L., Sharpe J. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. *Science.* 2014;345(6196):566-570.
- Schmidt T., Pasternak T., Liu K., Blein T., Aubry-Hivet D., Dovzhenko A., Duerr J., Teale W., Ditengou F.A., Burkhardt H., Ronneberger O. The iRoCS Toolbox – 3D analysis of the plant root apical meristem at cellular resolution. *Plant J.* 2014;77(5):806-814.
- Shampine L.F., Reichelt M.W. The MATLAB ODE suite. *SIAM J. Sci. Comput.* 1997;18(1):1-22.
- Shampine L.F., Reichelt M.W., Kierzenka J.A. Solving index-1 DAEs in MATLAB and Simulink. *SIAM Rev.* 1999;41(3):538-552.
- Shapiro B.E., Meyerowitz E., Mjolsness E. Using cellzilla for plant growth simulations at the cellular level. *Front. Plant Sci.* 2013;4:408.
- Shimojo H., Kageyama R. Oscillatory control of Delta-like1 in somitogenesis and neurogenesis: a unified model for different oscillatory dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016;49:76-82.
- Smith R.S., Guyomarc'h S., Mandel T., Reinhardt D., Kuhlemeier C., Prusinkiewicz P. A plausible model of phyllotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(5):1301-1306.
- Tomlin C.J., Axelrod J.D. Biology by numbers: mathematical modeling in developmental biology. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(5):331.
- Turing A.M. The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1952;237:37-72.
- Zubairova U.S., Verman P.Y., Oshchepkova P.A., Elsukova A.S., Doroshkov A.V. LSM-W²: laser scanning microscopy worker for wheat leaf surface morphology. *BMC Syst. Biol.* 2019;13(1):22.

ORCID ID

M.S. Savina orcid.org/0000-0003-3804-2049
V.V. Mironova orcid.org/0000-0003-3438-0147

Acknowledgements. The work was supported by RFBR 18-34-00485 and the project 0324-2019-0040-C-01 from the Russian State Budget.

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

Received June 6, 2019. Revised September 18, 2019. Accepted September 24, 2019.

DOI 10.18699/VJ20.601

Исправление к статье «Уровень тревожности и содержание нейрометаболитов в гиппокампе и амигдале крыс после завершения хронического предаторного стресса»

О.Б. Шевелев, В.Э. Цейликман, Н.В. Хоцкин, А.С. Хоцкина, Г.В. Концевая, М.С. Лапшин, М.П. Мошкин, М.В. Комелькова, И.В. Фекличева, О.Б. Цейликман, Е.Б. Манухина, Г.Ф. Дауни, Е.Л. Завьялов

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(5):582-587

На странице 587 в разделе Благодарности вместо «Работа с животными и поведенческое тестирование выполнены в рамках бюджетного проекта № 0324-2019-0041. Томографические данные получены на средства бюджетного проекта № 0259-2019-0004. Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, подержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015)».

следует читать:

«Работа с животными и поведенческое тестирование выполнены в рамках бюджетного проекта № 0324-2019-0041. Томографические данные получены на средства бюджетного проекта № 0259-2019-0004. Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, подержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Исследование выполнено в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России (№ 17.7255.2017/8.9)».

Оригинальная статья может быть найдена по DOI 10.18699/VJ19.528

DOI 10.18699/VJ20.601

Erratum to: “Anxiety and neurometabolite levels in the hippocampus and amygdala after prolonged exposure to predator-scent stress”

O.B. Shevelev, V.E. Tseilikman, N.V. Khotskin, A.S. Khotskina, G.V. Kontsevaya, M.S. Lapshin, M.P. Moshkin, M.V. Komelkova, I.V. Feklicheva, O.B. Tseilikman, E.B. Manukhina, H.F. Downey, E.L. Zavjalov

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(5):582-587 (in Russian)

Page 587, in Acknowledgements instead of

The animals and behavioral testing are supported by the budget project (No. 0324-2019-0041). The MRI study is supported by the budget project (No. 0259-2019-0004). All studies are implemented using the equipment of Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at ICG SB RAS, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Unique ID# of the project: RFMEFI62117X0015).

should read

The animals and behavioral testing are supported by the budget project (No. 0324-2019-0041). The MRI study is supported by the budget project (No. 0259-2019-0004). All studies are implemented using the equipment of Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at ICG SB RAS, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Unique ID# of the project: RFMEFI62117X0015). The study was conducted within the basic part of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 17.7255.2017/8.9).

The original article can be found under DOI 10.18699/VJ19.528

DOI 10.18699/VJ20.603

Исправление к статье «Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии для таксономии мискантуса»

Н.М. Слынько, Н.В. Бурмакина, О.М. Поцелуев, С.Ю. Капустянчик, Г.Ю. Галицын, Т.Н. Горячковская, Л.В. Куйбида, С.В. Шеховцов, С.Е. Пельтек, В.К. Шумный

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):1076-1081

На странице 1081 в разделе Благодарности вместо
«Работа поддержана бюджетным проектом № АААА-А17-117092070032-4».

следует читать:
«Работа поддержана бюджетным проектом № 0259-2019-0011».

Оригинальная статья может быть найдена по DOI 10.18699/VJ19.583

DOI 10.18699/VJ20.603

Erratum to: “Gas chromatography-mass spectrometry in the taxonomy of Miscanthus”

N.M. Slynko, N.V. Burmakina, O.M. Potseluyev, S.Yu. Kapustyanchik, G.Yu. Galitsin, T.N. Goryachkovskaya, L.V. Kuybida, S.V. Shekhovtsov, S.E. Peltek, V.K. Shumny

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(8):1076-1081 (in Russian)

Page 1081, in Acknowledgements instead of
This work was supported by State Budgeted Project АААА-А17-117092070032-4.

should read
This work was supported by State Budgeted Project 0259-2019-0011.

The original article can be found under DOI 10.18699/VJ19.583

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, 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

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 25.02.2020. Выход в свет 30.03.2020. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 12.79.

Уч.-изд. л. 14.9. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–52 экз.). Заказ № 293. Цена свободная.

.....
Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.