

Научный рецензируемый журнал

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ20.662

## 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. Рогозин* – 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/VJ20.662

**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

- 687 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Структурно-функциональные особенности изоформ фитоинсинтазы PSY1 и PSY2 у сортов перца *Capsicum annuum* L. Е.А. Дьяченко, М.А. Филюшин, Г.И. Ефремов, Е.А. Джос, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

- 697 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Оценка генетического разнообразия с использованием SSR-маркеров в популяциях *Agriophyllum squarrosum* L. и *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey., собранных на юго-востоке Казахстана. Ю.А. Генеевская, Д.С. Карелова, С.И. Абузалиева, П. Жао, Г. Чен, Е.К. Турусбеков (на англ. языке)

## Иммунитет и продуктивность растений

- 705 **ОБЗОР**  
Потенциально опасные для отечественного картофелеводства карантинные виды и патотипы нематод: изменчивость популяций и генетика устойчивости картофеля. Н.В. Мироненко, Т.А. Гавриленко, А.В. Хютти, О.С. Афанасенко

- 722 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Структура популяции *Pyrrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и идентификация устойчивой к пиренофорозу гермоплазмы пшеницы. А.М. Кохметова, Н.М. Коваленко, М.Т. Кумарбаева

- 730 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Сравнительный анализ диких и культурных видов чины (*Lathyrus* L.) по содержанию сахаров, многоатомных спиртов, свободных жирных кислот и фитостеролов. А.Е. Соловьева, Т.В. Шеленга, А.Л. Шаварда, М.О. Бурляева

- 738 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Фенотипическое разнообразие линий мягкой пшеницы с интрогрессиями от диплоидного злака *Aegilops speltoides* по технологическим свойствам зерна и муки. Л.В. Щукина, И.Ф. Лапочкина, Т.А. Пшеничникова

## Генетика и селекция животных

- 747 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Паттерн генетического разнообразия у локальных и коммерческих пород свиней на основе анализа микросателлитов. В.Р. Харзинова, Н.А. Зиновьева

- 755 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Селекция продуктивности кур влияет на гены иммунной системы. А.М. Бородин, Я.И. Алексеев, К.Е. Герасимов, Н.В. Коновалова, Е.В. Терентьева, Д.Н. Ефимов, Ж.В. Емануйлова, Л.И. Тучемский, А.А. Комаров, В.И. Фисинин

## Физиологическая генетика

- 761 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок. М.В. Анисимова, Я. Гон, Н.С. Юдин, Ю.М. Мошкин, Л.А. Герлинская

- 770 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Субпопуляционный состав периферических иммунокомпетентных клеток и содержание цитокинов в структурах мозга у мутантных мышей линии *Disk1-Q31L*. М.М. Геворгян, С.Я. Жанаева, Е.Л. Альперина, Т.В. Липина, Г.В. Идова

## Генетика человека

- 777 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Полиморфизмы генов *TP53 (rs1042522)* и *MDM2 (rs2279744)* в раке легкого: метаанализ. О. Булгакова, А. Кусянова, Р. Берсимбаев

- 785 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Кандидатные SNP-маркеры, изменяющие сродство ТВР к промоторам Y-связанных генов *CDY2A*, *SHOX*, *ZFY*, снижают ряд показателей репродуктивного потенциала мужчин. М.П. Пономаренко, Е.Б. Шарыпова, И.А. Драчкова, Л.К. Савинкова, И.В. Чадаева, Д.А. Рассказов, П.М. Пономаренко, Л.В. Осадчук, А.В. Осадчук

- 794 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Эколого-генетическая оценка последствий влияния радиации на загрязненных территориях. А.Б. Бигалиев, К.З. Шалабаева, Б.Е. Шимшиков, С.С. Кобегенова, Л.М. Адилова, А.Н. Кожаметова, С. Шарахметов, М.Н. Бурханова

## Тест-системы и вакцинопрофилактика

- 802 **ОБЗОР**  
Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-CoV-2. А.А. Ильичев, Л.А. Орлова, С.В. Шарабрин, Л.И. Карпенко

## Plant genetics

- 687 ORIGINAL ARTICLE  
Structural and functional features of phytoene synthase isoforms PSY1 and PSY2 in pepper *Capsicum annuum* L. cultivars. E.A. Dyachenko, M.A. Filyushin, G.I. Efremov, E.A. Dzhos, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

- 697 ORIGINAL ARTICLE  
SSR-based evaluation of genetic diversity in populations of *Agriophyllum squarrosum* L. and *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey. collected in South-East Kazakhstan. Y. Genievskaya, D. Karelova, S. Abugaliev, P. Zhao, G. Chen, Y. Turuspekov

## Plant immunity and performance

- 705 REVIEW  
Quarantine nematode species and pathotypes potentially dangerous for domestic potato production: populations diversity and the genetics of potato resistance. N.V. Mironenko, T.A. Gavrilenko, A.V. Khiutti, O.S. Afanasenko

- 722 ORIGINAL ARTICLE  
*Pyrenophora tritici-repentis* population structure in the Republic of Kazakhstan and identification of wheat germplasm resistant to tan spot. A.M. Kokhmetova, N.M. Kovalenko, M.T. Kumarbaeva

- 730 ORIGINAL ARTICLE  
Comparative analysis of wild and cultivated *Lathyrus* L. species to assess their content of sugars, polyols, free fatty acids, and phytosterols. A.E. Solovyeva, T.V. Shelenga, A.L. Shavarda, M.O. Burlyaeva

- 738 ORIGINAL ARTICLE  
Phenotypic diversity of bread wheat lines with introgressions from the diploid cereal *Aegilops speltoides* for technological properties of grain and flour. L.V. Shchukina, I.F. Lapochkina, T.A. Pshenichnikova

## Animal genetics and breeding

- 747 ORIGINAL ARTICLE  
The pattern of genetic diversity of different breeds of pigs based on microsatellite analysis. V.R. Kharzinova, N.A. Zinovieva

- 755 ORIGINAL ARTICLE  
Chickens productivity selection affects immune system genes. A.M. Borodin, Ya.I. Alekseev, K.E. Gerasimov, N.V. Konovalova, E.V. Terentjeva, D.N. Efimov, Zh.V. Emanuilova, L.I. Tuchemskiy, A.A. Komarov, V.I. Fisinin

## Physiological genetics

- 761 ORIGINAL ARTICLE  
Metabolic phenotype of adult mice offspring obtained from different variants of embryo transfer. M.V. Anisimova, Ya. Gong, N.S. Yudin, Yu.M. Moshkin, L.A. Gerlinskaya

- 770 ORIGINAL ARTICLE  
The composition of peripheral immunocompetent cell subpopulations and cytokine content in the brain structures of mutant *Disc1-Q31L* mice. M.M. Gevorgyan, S.Ya. Zhanaeva, E.L. Alperina, T.V. Lipina, G.V. Idova

## Human genetics

- 777 ORIGINAL ARTICLE  
The cell cycle regulatory gene polymorphisms *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) in lung cancer: a meta-analysis. O. Bulgakova, A. Kussainova, R. Bersimbaev

- 785 ORIGINAL ARTICLE  
Candidate SNP-markers altering TBP binding affinity for promoters of the Y-linked genes *CDY2A*, *SHOX*, and *ZFY* are lowering many indexes of reproductive potential in men. M.P. Ponomarenko, E.B. Sharypova, I.A. Drachkova, L.K. Savinkova, I.V. Chadaeva, D.A. Rasskazov, P.M. Ponomarenko, L.V. Osadchuk, A.V. Osadchuk

- 794 ORIGINAL ARTICLE  
Ecological and genetic assessment of the consequences of radiation influence on contaminated areas. A.B. Bigaliev, K.Z. Shalabaeva, B.E. Shimshikov, S.S. Kobegenova, L.M. Adilova, A.N. Kozhakhmetova, S. Sharakhmetov, M.N. Burkhanova

## Test kits and preventive vaccination

- 802 REVIEW  
mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development. A.A. Ilyichev, L.A. Orlova, S.V. Sharabrin, L.I. Karpenko

## Структурно-функциональные особенности изоформ фитохинсинтазы PSY1 и PSY2 у сортов перца *Capsicum annuum* L.

Е.А. Дьяченко<sup>1</sup>, М.А. Филюшин<sup>1</sup>✉, Г.И. Ефремов<sup>1</sup>, Е.А. Джос<sup>1,2</sup>, А.В. Щенникова<sup>1</sup>, Е.З. Кочиева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, Московская область, Россия

✉ e-mail: michel7753@mail.ru

**Аннотация.** Плоды сортов перца характеризуются различной окраской, которая определяется соотношением пигментов, при этом в спелых плодах доминируют каротиноиды, тогда как в незрелых – хлорофиллы (иногда вместе с антоцианами). Ключевым регулятором биосинтеза каротиноидов является фитохинсинтаза, кодируемая геном *PSY*. Геном перца *Capsicum annuum* содержит два гена, кодирующих фитохинсинтазы, одна из которых локализуется преимущественно в пластидах листа (*PSY2*), другая – в пластидах плода (*PSY1*). В данной работе были идентифицированы полногеномные последовательности *PSY1* и *PSY2* у девяти сортов *C. annuum*, различающихся окраской спелого плода. Вариабельность последовательностей составила 2.43 % (69 SNP) и 1.21 % (36 SNP). Наиболее вариабельны белки *PSY1* сортов Мария (красный плод) и Сладкий шоколад (красно-коричневый плод). В последовательностях *PSY1* и *PSY2* определены фитохинсинтазный домен HH-IPPS и транзитный пептид. Идентифицированы функционально значимые участки в домене HH-IPPS *PSY1* и *PSY2* анализируемой выборки сортов перца. Для исследуемых образцов области, ограничивающие активные сайты (YAKTF и RAYV), аспартат-богатые субстрат-Mg<sup>2+</sup>-связывающие сайты (DELVD и DVGED) и другие функциональные сайты, консервативны. Транзитные пептиды были более вариабельны, их сходство у белков *PSY1* и *PSY2* не превышало 78.68 %. Биохимический анализ показал, что наибольшие количества хлорофиллов и каротиноидов среди исследуемой выборки содержатся в незрелых и спелых плодах сортов Сладкий шоколад и Шоколадный. Значительным содержанием хлорофиллов, но минимальным – каротиноидов отличались спелые плоды сорта Несозревающий (зеленый плод). Профиль экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* был определен в перикарпе плода на трех стадиях созревания у сортов Желтый букет, Сладкий шоколад, Кармин и Несозревающий, контрастных по окраске спелого плода – желтой, коричневой, темно-красной и зеленой соответственно. В листьях исследуемых сортов уровни экспрессии *PSY1* значительно варьировали. Для всех сортов был характерен рост транскрипции гена *PSY1* по мере созревания плода, при этом в зрелом плоде максимальный уровень транскрипции выявлен у сорта Сладкий шоколад, а самый низкий – у сорта Несозревающий. Транскрипты *PSY2* были выявлены не только в листе и незрелом плоде, но и в спелых плодах. Оценка возможной корреляции транскрипции *PSY1* и *PSY2* с суммарным содержанием каротиноидов и хлорофиллов показала, что имеется прямая зависимость между уровнем экспрессии гена *PSY1* и каротиноидной пигментацией плода в процессе созревания. Высказано предположение, что у сорта Несозревающий отсутствие типичного для плодов перца паттерна пигментации перикарпа в процессе созревания может быть связано с нарушениями образования хромoplastов. Ключевые слова: каротиногенез; *Capsicum annuum*; плоды перца; созревание плодов; окраска плода.

**Для цитирования:** Дьяченко Е.А., Филюшин М.А., Ефремов Г.И., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Структурно-функциональные особенности изоформ фитохинсинтазы *PSY1* и *PSY2* у сортов перца *Capsicum annuum* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(7):687-696. DOI 10.18699/VJ20.663

## Structural and functional features of phytoene synthase isoforms PSY1 and PSY2 in pepper *Capsicum annuum* L. cultivars

Е.А. Dyachenko<sup>1</sup>, М.А. Filyushin<sup>1</sup>✉, G.I. Efremov<sup>1</sup>, E.A. Dzhos<sup>1,2</sup>, A.V. Shchennikova<sup>1</sup>, E.Z. Kochieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Scientific Vegetable Center, VNISSOK village, Moscow region, Russia

✉ e-mail: michel7753@mail.ru

**Abstract.** The fruits of various pepper cultivars are characterized by a different colour, which is determined by the pigment ratio; carotenoids dominate in ripe fruits, while chlorophylls, in immature fruits. A key regulator of carotenoid biosynthesis is the phytoene synthase encoded by the *PSY* gene. The *Capsicum annuum* genome contains two isoforms of this enzyme, localized in leaf (*PSY2*) and fruit (*PSY1*) plastids. In this work, the complete *PSY1* and *PSY2* genes were identified in nine *C. annuum* cultivars, which differ in ripe fruit colour. *PSY1* and *PSY2* sequence variability was 2.43 % (69 SNPs) and 1.21 % (36 SNPs). The most variable were *PSY1* proteins of the cultivars 'Maria' (red-fruited) and 'Sladkij shokolad' (red-brown-fruited). All identified *PSY1* and *PSY2* homologs contained the phytoene synthase domain HH-IPPS and the transit peptide. In the *PSY1* and *PSY2* HH-IPPS domains, functionally significant sites were

determined. For all accessions studied, the active sites (YAKTF and RAYV), aspartate-rich substrate-Mg<sup>2+</sup>-binding sites (DELVD and DVGED), and other functional residues were shown to be conserved. Transit peptides were more variable, and their similarity in the PSY1 and PSY2 proteins did not exceed 78.68 %. According to the biochemical data obtained, the largest amounts of chlorophylls and carotenoids across the cultivars studied were detected in immature and ripe fruits of the cv. 'Sladkij shokolad' and 'Shokoladnyj'. Also, ripe fruits of the cv. 'Nesozrevayuschij' (green-fruited) were marked by significant chlorophyll content, but a minimum of carotenoids. The PSY1 and PSY2 expression patterns were determined in the fruit pericarp at three ripening stages in 'Zhelytyj buket', 'Sladkij shokolad', 'Karmin' and 'Nesozrevayuschij', which have different ripe fruit colours: yellow, red-brown, dark red and green, respectively. In the leaves of the cultivars studied, PSY1 expression levels varied significantly. All cultivars were characterized by increased PSY1 transcription as the fruit ripened; the maximum transcription level was found in the ripe fruit of 'Sladkij shokolad', and the lowest, in 'Nesozrevayuschij'. PSY2 transcripts were detected not only in the leaves and immature fruits, but also in ripe fruits. Assessment of a possible correlation of PSY1 and PSY2 transcription with carotenoid and chlorophyll content revealed a direct relationship between PSY1 expression level and carotenoid pigmentation during fruit ripening. It has been suggested that the absence of a typical pericarp pigmentation pattern in 'Nesozrevayuschij' may be associated with impaired chromoplast formation.

Key words: carotenogenesis; *Capsicum annuum*; pepper fruits; fruit ripening; fruit pigmentation.

**For citation:** Dyachenko E.A., Filyushin M.A., Efremov G.I., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Structural and functional features of phytoene synthase isoforms PSY1 and PSY2 in pepper *Capsicum annuum* L. cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):687-696. DOI 10.18699/VJ20.663

## Введение

Род *Capsicum* включает, по разным оценкам, 30–35 видов, пять из которых domestцированы: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* и *C. baccatum* (Moscone et al., 2007; Dias et al., 2013). Плоды перцев, как сладкие, так и острые (чили), имеют высокую диетическую ценность; они богаты антиоксидантами, в том числе витамином С, флавоноидами и каротиноидами (Sun et al., 2007; Cervantes-Paz et al., 2014).

Известно, что приматы, включая человека, не синтезируют каротиноиды *de novo*, однако остро нуждаются в них, поскольку, например, β- и α-каротин являются предшественниками витамина А. Антиоксидантная активность каротиноидов, содержащихся в каротиногенных фруктах и овощах, помогает снизить риск возникновения различных заболеваний, таких как некоторые виды рака, возрастные патологии органов зрения и сердечно-сосудистые заболевания (Howard et al., 2000; Story et al., 2010; Giuliano, 2017). Среди овощных культур перец, сочные плоды которого обогащены различными типами каротиноидов, служит одним из основных источников антиоксидантов в диете человека. В связи с этим создание новых сортов перца – важная задача современной селекции (Berry et al., 2019; Sun, Li, 2020).

Плоды разных видов перца характеризуются различным содержанием антиоксидантов, и во многих селекционных программах применяют естественные вариации для выявления особенностей «экзотического» аллельного разнообразия и доноров конкретных каротиноидных спектров. Однако в настоящее время преимущественно используют близкородственные образцы одного вида, которые часто не имеют сильных фенотипических различий, обычно наблюдаемых при использовании дикорастущих родственников (Berry et al., 2019).

Каротиноиды совместно с хлорофиллами и антоцианами определяют окраску плодов перца. Заметим при этом, что каротиноиды являются доминирующими пигментами в спелых плодах перца, а хлорофиллы (иногда вместе с антоцианами) – в незрелых, растущих плодах. Окраска плода у разных сортов *C. annuum* зависит от соотношения

пигментов, а также от стадии созревания: у незрелых плодов (стадия mature fruit, MF) она зеленая, желтая, белая или фиолетовая, у спелых (стадия ripe fruit, RF) – оранжевая, красная, темно-красная, коричневая и иногда почти черная (Levy et al., 1995; Márkus et al., 1999; Ha et al., 2007). Как правило, сладкий перец собирают на стадии технической спелости (бланжевый плод, стадия intermediate ripe, IR), а острый перец – биологической спелости (RF). Созревание плода перца сопровождается переходом тканей, содержащих хлоропласты, в ткани, содержащие хромопласты. В хромопластах хлорофиллы деградируют, однако продолжается синтез каротиноидов, которые, в отличие от хлорофиллов, способны накапливаться в специализированных глобулярных структурах (Osorio, 2019). Это приводит к снижению содержания хлорофиллов, накоплению каротиноидов и, как следствие, к смене окраски созревающего плода.

В отличие от томата, в зрелых плодах которого основными каротиноидами являются ликопин и β-каротин, в плодах перца каротиногенез идет дальше – до образования ксантофиллов, и спектр каротиноидов в спелых плодах перца представлен мажорными концентрациями красных пигментов – капсантина и капсорубина, а также различными сочетаниями минорных количеств оранжевых и желтых пигментов: β-каротина, β-криптоксантина, лютеина, зеаксантина, антраксантина и виолаксантина (Giuffrida et al., 2013; Mohd Hassan et al., 2019).

Каротиноидные пигменты представляют собой изопреноидные молекулы, полученные в результате цепочки последовательных преобразований универсального предшественника – изопентенилпирофосфата. Несколько реакций преобразуют данное соединение в геранилгеранилпирофосфат (GGPP), две молекулы которого конденсируются «голова к хвосту» под действием фитоинсинтазы, образуя фитоин – предшественник всех каротиноидов (Fraser et al., 2000).

Таким образом, фитоинсинтаза является ключевым регулятором биосинтеза каротиноидов, поставляя основной субстрат – фитоин (Fraser et al., 2000). Данный фермент кодируется геном *PSY*, экспрессия которого находится

под влиянием промежуточных и конечных продуктов пути (Welsch et al., 2003; Kachanovsky et al., 2012; Enfissi et al., 2017). У растений выявлено несколько типов фитоинсинтаз, и фитоинсинтазная активность зависит от типа фермента и его внутриклеточного расположения (Shumskaya et al., 2012). У *Arabidopsis thaliana* был выявлен только один ген *PSY* (Zhou et al., 2015), у томата *Solanum lycopersicum* – три, при этом белковые продукты этих генов имеют различную локализацию: PSY1 – в пластидах плода, PSY2 – в пластидах листа, PSY3 – в пластидах корня (Stauder et al., 2018). У перца *C. annuum* на сегодняшний день известно два гена, кодирующих фитоинсинтазы; одна из них преимущественно локализуется в пластидах листа (PSY2), другая – в пластидах плода (PSY1) (Thorup et al., 2000; Kilcrease et al., 2015). Соответственно, у томата и перца транскрипты *PSY2* в основном присутствуют в фотосинтезирующих зеленых тканях, тогда как *PSY1* – в зрелых плодах у обеих культур и в лепестках у томата (Giorio et al., 2008; Kilcrease et al., 2015; Berry et al., 2019; Филюшин и др., 2020). Тем не менее обе фитоинсинтазы могут транскрибироваться во всех органах растения (Stauder et al., 2018).

Наше исследование сфокусировано на идентификации генов фитоинсинтаз *PSY1* и *PSY2* у сортов перца овощного *C. annuum*, на оценке их межсортовой варибельности, как структурной, так и функциональной, а также возможных корреляций между экспрессией данных генов и пигментацией плода.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** В работе были использованы образцы девяти сортов перца *C. annuum*: восемь сортов сладкого перца (Несозревающий, Кармин, Шоколадный, Сладкий шоколад, Ратунда, Мария, Гогошары и Желтый букет) и один сорт острого перца (Мечта хозяйки) (табл. 1). Растения выращены в пленочной теплице в Федеральном научном центре овощеводства (ФНЦО, Московская область).

**Идентификация полногеномных последовательностей *PSY1* и *PSY2*.** Геномную ДНК каждого из анализируемых сортов перца выделяли из свежесобранных, растертых в жидком азоте листьев, согласно (Puchooa, 2004). Полученный препарат в количестве 100 нг использовали в качестве матрицы для амплификации *PSY1* и *PSY2*. Праймеры для амплификации были разработаны ранее на основе доступных в базе данных NCBI полногеномных последовательностей *C. annuum PSY1* (LOC107868281 bifunctional 15-cis-phytoene synthase, chloroplast, Gene ID: 107868281) и *PSY2* (LOC107859651 phytoene synthase 2, chloroplast, Gene ID: 107859651). Амплификацию гена *PSY1* проводили с праймерами CaPSY1F и CaPSY1R (5'-TCAGAATGTCTGTTGCC TTG-3' и 5'-TCCTGATTTTCATGTTCTTGTAGA-3'), *PSY2* – с праймерами CaPSY2F и CaPSY2R (5'-AGC ATGTCTGTGCTTTGTTG-3' и 5'-CTTCATTCATGTC TTTGTYAGTG-3'). Использовали высокоточную полимеразу LongAmp® Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США), амплификатор C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) и следующие ПЦР-условия:

исходная денатурация (94 °C в течение 10 мин); 36 циклов денатурации (94 °C, 40 с), отжига (56 °C, 40 с) и синтеза (65 °C, 4 мин); финальное достраивание фрагментов (65 °C, 7 мин). Амплификаты ожидаемой длины очищали из агарозного геля с помощью QIAEX® II Gel Extraction kit (QIAGEN, Хильден, Германия), клонировали в вектор pGEM®-T Easy (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) и секвенировали (2–4 клон для каждого образца) на ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Уолтем, Массачусетс, США).

**Сравнительный структурный анализ последовательностей *PSY1* и *PSY2*.** Выравнивание и анализ полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для сравнительного анализа использовали известные последовательности *C. annuum PSY1* (Gene ID: 107868281) и *PSY2* (Gene ID: 107859651). Консервативные домены в кодируемых белках определяли с помощью ресурсов NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Функциональную значимость замещений аминокислотных остатков (а. о.) предсказывали с использованием программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>). Под радикальными замещениями подразумеваются такие замещения, которые предположительно могут оказывать влияние на фолдинг белка или его функциональность.

Для кластерного филогенетического анализа последовательностей генов *PSY1* и *PSY2*, идентифицированных у сортов перца, использовали полногеномные последовательности *PSY*-генов *C. annuum* cv. Zunla 1 (*PSY1*, NC\_029980.1:c205334820-205328571; *PSY2*, NC\_029978.1:142877052-142881261) и *C. annuum* cv. Valencia (*PSY1*, GU085273.1). Анализ проводили с помощью метода ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 7.0.

**Определение профиля экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* в плодах перца в процессе созревания.** Суммарную РНК выделяли (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия) из перикарпа плодов на трех стадиях развития (MF, IR и RF). Полученные препараты очищали от примесей ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия), оценивали качественно и количественно (спектрофотометрически и с помощью электрофореза в 1.5 % агарозном геле) и использовали для синтеза первой цепи кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США).

Для определения профиля экспрессии *PSY1* и *PSY2* проводили количественную ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), в трех технических повторах с набором «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Праймеры для РВ-ПЦР были разработаны ранее, на основе доступных в базе данных NCBI последовательностей мРНК *C. annuum PSY1* (X68017) и *PSY2* (XM\_016704726.1): для *PSY1* – *PSY1-F* и *PSY1-R* (5'-GTGAAGAGACAGCTGAGATCG-3' и 5'-TCTCCGGAGTCATTAGCATCG-3'), для *PSY2* – *PSY2-F* и *PSY2-R* (5'-AAGGAGTCGCAGAACTGAGC-3' и 5'-GTCGTTTCGCTTCAATCTCATCTAA-3') (Филюшин и др., 2020). Для нормализации уровня транскрипции ге-

**Таблица 1.** Характеристики плодов использованных в работе сортов перца *C. annuum*

Сорт	Происхождение (код в Госсортеестре, при наличии)	Окраска плода			Сумма хлорофиллов, мкг/г сырой массы			Сумма каротиноидов, мкг/г сырой массы		
		Стадии созревания			MF	IR	RF	MF	IR	RF
		MF	IR	RF						
Несозревающий	ФНЦО	3	3	3	43.8	12.3	29.4	14.5	6.8	55.9
Желтый букет	ФНЦО (9553318)	ТЗ	ЖЗ	Ж	83.3	14.9	0	27.3	47.4	107.7
Гогошары	ФНЦО	3	ЗК	К, сегменты 3	18.5	12.6	7.3	6.8	10.2	38.3
Мечта хозяйки (острый)	ФНЦО (8355299)	ТЗ	ЗК	К	42.6	11.2	9.0	13.2	25.3	87.6
Мария	ФНЦО (9809422)	3	К, оттенок 3	К	47.3	7.49	0	18.6	108.7	407.1
Кармин	ФНЦО (8153509)	3	ЗК	ТК	62.6	14.3	0	26.1	133.0	520.2
Сладкий шоколад	ФНЦО	3	Кор	Кор	119.4	90.77	96.53	61.0	173.7	597.0
Шоколадный	ФНЦО	3	Кор	Кор	121.8	–*	130.9	48.5	–*	1009.9
Ратунда**	ФНЦО	ТЗ	ЗК	ТК	–	–	–	–	–	–

Примечание. Плоды перца анализировались на трех стадиях созревания: MF – незрелый зеленый плод финального размера, IR – бланжевая спелость плода, RF – биологическая спелость плода. Окраска плода: 3 – зеленый, ТЗ – темно-зеленый, Ж – желтый, ЖЗ – желто-зеленый, К – красный, ТК – темно-красный, Кор – коричневый, ЗК – зелено-красный.

\* В момент сбора растительного материала плодов сорта Шоколадный, соответствующих стадии IR, не было; \*\* во время сбора материала у сорта отсутствовали плоды на нужных стадиях созревания (по данным разных лет, содержание суммы каротиноидов в плодах этого сорта может превышать таковое у сорта Шоколадный до двух раз).

нов использовали экспрессию референсного гена *Actin7* и праймеры Actin7-F и Actin7-R (5'-CATGTGCTCAGTGGTGGTTC-3' и 5'-TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG-3') (Bemer et al., 2012). Условия РВ-ПЦР: 95 °С в течение 5 мин; 40 циклов (95 °С – 15 с, 62 °С – 50 с). Статистическая обработка результатов выполнена в программе GraphPad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

**Содержание суммы хлорофиллов и суммы каротиноидов в перикарпе** (вместе кожица и мякоть) плодов определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах. Содержание пигментов рассчитывали по формулам (Lichtenthaler, 1987; Solovchenko et al., 2001), в двух биологических и трех технических повторах.

## Результаты и обсуждение

### Характеристики полногеномных последовательностей генов *PSY1* и *PSY2* и кодируемых ими белков

Ранее было показано, что вариабельность характеристик последовательностей генов *PSY1* и *PSY2* может определять окраску плода перца (Сао et al., 2019; Филошин и др., 2020). Поэтому для данного исследования были отобраны девять сортов перца *C. annuum*, различающихся окраской плода по мере его созревания: Несозревающий, Желтый букет, Шоколадный, Сладкий шоколад, Кармин, Ратунда, Мария, Гогошары и Мечта хозяйки (см. табл. 1). Незрелые плоды всех анализируемых сортов имеют зеленую или темно-зеленую окраску, однако динамика изменения окраски по мере созревания у сортов различается. Плоды сорта Несозревающий остаются зелеными до биологической спелости, плоды сорта Желтый букет желто-зеленые на стадии IR и желтые на стадии RF, плоды сортов Сладкий шоколад и Шоколадный красно-коричневые на обеих стадиях, а оставшиеся четыре сорта имеют зелено-

красные плоды на стадии IR и красные/темно-красные на стадии RF (см. табл. 1).

Для каждого из девяти сортов перца были определены полногеномные последовательности генов *PSY1* и *PSY2*, начиная с ATG-кодона (табл. 2). Длина гена *PSY1* составила 2844 п. н. у всех анализируемых сортов. Для сравнения, у *C. annuum* cv. Zunla 1 последовательность *PSY1*, представленная в базе данных NCBI (NCBI Gene ID: 107868281), имеет такой же размер, тогда как у *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (Gene ID: 543988) этот показатель больше (3302 п. н.). Длина гена *PSY2* у исследуемых сортов составила 2985 п. н., за исключением *PSY2* сорта Мечта хозяйки (2994 п. н. за счет 9-нуклеотидной вставки во втором интроне) (см. табл. 2). Последовательность *PSY2* *C. annuum* cv. Zunla 1 (Gene ID: 107859651) также равна 2985 п. н., а *PSY2* *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 (Gene ID: 543964) – 3032 п. н. Вариабельность геномных последовательностей *PSY1* и *PSY2* образцов перца составила 2.43 % (69 SNP) и 1.21 % (36 SNP). При этом в экзонах локализовано 16 и 15 SNP соответственно. В сравнении с *PSY1* и *PSY2* *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706 *PSY1* и *PSY2* образцов перца имели 1072/128 и 818/100 (ген/экзоны) SNP.

Кодирующая часть генов *PSY1* и *PSY2* состояла из 6 экзонов и у всех исследуемых сортов составила 1260 и 1299 п. н. соответственно (см. табл. 2). Различия в длине кДНК *PSY1* и *PSY2* обусловлены наличием вставок в экзонах I и VI *PSY2*. Большая часть выявленных SNP была сосредоточена в экзоне III *PSY1* (7 SNP, 43.75 % всех экзональных замен) и в экзоне VI *PSY2* (6 SNP, 40.0 %). Экзон II обоих генов оказался инвариабельным и самым консервативным по отношению к *PSY*-генам *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706. Самым полиморфным в сравнении с *PSY*-генами *S. lycopersicum* оказался экзон I обоих генов.

**Таблица 2.** Характеристики последовательностей генов *PSY1* и *PSY2* у сортов *C. annuum*

Сорт	Ген	NCBI ID	Длина экзона/интрона, п. н.						Ген, п. н.	кДНК, п. н.	Белок, а. о.
			I	II	III	IV	V	VI			
Желтый букет	<i>PSY1</i>	MT507241	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507250	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Кармин	<i>PSY1</i>	MT507242	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507251	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Мария	<i>PSY1</i>	MT507243	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507252	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Сладкий шоколад	<i>PSY1</i>	MT507244	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507253	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Шоколадный	<i>PSY1</i>	MT507245	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507254	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Несозревающий	<i>PSY1</i>	MT507246	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507255	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Гогошары	<i>PSY1</i>	MT507247	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507256	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432
Мечта хозяйки (острый)	<i>PSY1</i>	MT507248	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507257	466/101	51/753	173/193	236/219	193/429	180	2994	1299	432
Ратунда	<i>PSY1</i>	MT507249	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419
	<i>PSY2</i>	MT507258	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432

Заметим, что поскольку количество анализируемых в нашей работе сортов ограничено девятью образцами, данные о полиморфизме сортов применимы только к анализируемой выборке.

Нуклеотидные последовательности *PSY1* и *PSY2* были транслированы. Предполагаемые белки *PSY1* и *PSY2* всех анализируемых сортов имели размер 419 и 432 а. о. соответственно (см. табл. 2), содержали консервативный фитоинсинтазный домен HH-IPPS (130–412 и 26–310 а. о. согласно UniProtKB и 75–405 и 92–430 а. о. согласно NCBI-CDD) и N-концевой транзитный пептид TP (1–129 и 1–25 а. о. согласно UniProtKB и 1–74 и 1–91 а. о. согласно NCBI-CDD). Сайты расщепления TP во всех возможных случаях были инварианты внутри анализируемой выборки сортов.

В сравнении с *PSY1* и *PSY2* *C. annuum* cv. Zunla 1 и *S. lycopersicum* cv. Heinz 1706, идентифицированные у сортов перца последовательности *PSY1/PSY2* содержали 9/15 и 46/43 замещения аминокислотных остатков соответственно. В случае *PSY1* из девяти замещений семь были радикальными (r) и только два нейтральными (n), при этом все r-замещения находились в консервативном домене, а два n-замещения – в транзитном пептиде (рис. 1). Замещение пС59Y было характерно для *PSY1* почти всей изучаемой выборки, кроме сорта Сладкий шоколад, а все радикальные замещения оказались сортоспецифичными. Самыми вариабельными были *PSY1* сортов Мария и Сладкий шоколад (см. рис. 1).

В последовательности *PSY2* из 15 замещений аминокислотных остатков радикальными были девять. Фито-

инсинтазы *PSY2* сортов Мечта хозяйки, Гогошары, Ратунда и Шоколадный не имели различий или же содержали пT430A. У каждого из остальных сортов насчитывалось по одному-два радикальных замещения в домене HH-IPPS (см. рис. 1).

Наличие радикальных замещений в последовательностях *PSY1* и *PSY2* анализируемых сортов может влиять на фолдинг зрелых белков фитоинсинтаз, а также на их способность взаимодействовать с белковыми партнерами и осуществлять корректные каталитические функции. Ранее было показано, что последовательности *PSY1* и *PSY2* обладают высоким сходством (Giorio et al., 2008; Cao et al., 2019). Это наблюдение подтвердилось при сравнении идентифицированных *PSY1* и *PSY2* анализируемых сортов *C. annuum*.

Если пользоваться данными UniProtKB по локализации домена, то HH-IPPS содержит 21 вариабельный сайт, специфичный для каждой из групп белков *PSY1* и *PSY2* (см. рис. 1). Также на C-конце домена *PSY1* были выявлены две делеции P422–S427del и L429del. Последовательность домена в белках *PSY1* и *PSY2* была высококонсервативна (92.86 %).

В отличие от домена, последовательность TP оказалась высоковариабельной. В сравнении с TP *PSY2*, TP *PSY1* содержала 29 замещений аминокислотных остатков (21.32 % от выровненной длины). Таким образом, идентичность TP у *PSY1* и *PSY2* исследуемой выборки сортов перца составила 78.68 %, не считая двух вставок (insF31S33 и insG50) и четырех делеций (нумерация по *PSY2*: N12del, D35del, L57-R62del и S64-D65del) в последовательности *PSY1*.

PSY1	14	59	186	210	214	288	320	321	389	PSY2	71	72	117	178	180	191	236	290	309	383	387	393	394	395	430	C	
Zunla 1	V	C	P	A	D	G	G	L	N	T	G	T	T	E	T	V	A	D	K	E	Y	N	N	T			
Maria		Y		D		R	S									D							Y				
Mechta hozyayki		Y																								A	
Gogoshary		Y																									
Karmin		Y																		E		D	N			A	
Ratunda		Y							T																	A	
Zheltyj buket		Y			V								N								R		D	Y	A		
Nesozrevayuschij	F	Y								S	R			G	S												
Sladkiy shokolad			T								P							S								A	
Shokoladnyj		Y																									
		TP	HH-IPPS domain								TP?	HH-IPPS domain?													*		
		HH-IPPS domain?														**											

Рис. 1. Аминокислотный полиморфизм последовательностей PSY1 и PSY2 исследуемой выборки сортов перца *C. annuum* в сравнении с *C. annuum* cv. Zunla 1.

Здесь и на рис. 2, 3: образцы сортов *C. annuum*: Zheltyj buket – Желтый букет, Maria – Мария, Nesozrevayuschij – Несозревающий, Ratunda – Ратунда, Shokoladnyj – Шоколадный, Mechta hozyayki – Мечта хозяйки, Karmin – Кармин, Gogoshary – Гогошары, Sladkiy shokolad – Сладкий шоколад.

\* По данным UniProtKB, \*\* по данным NCBI.

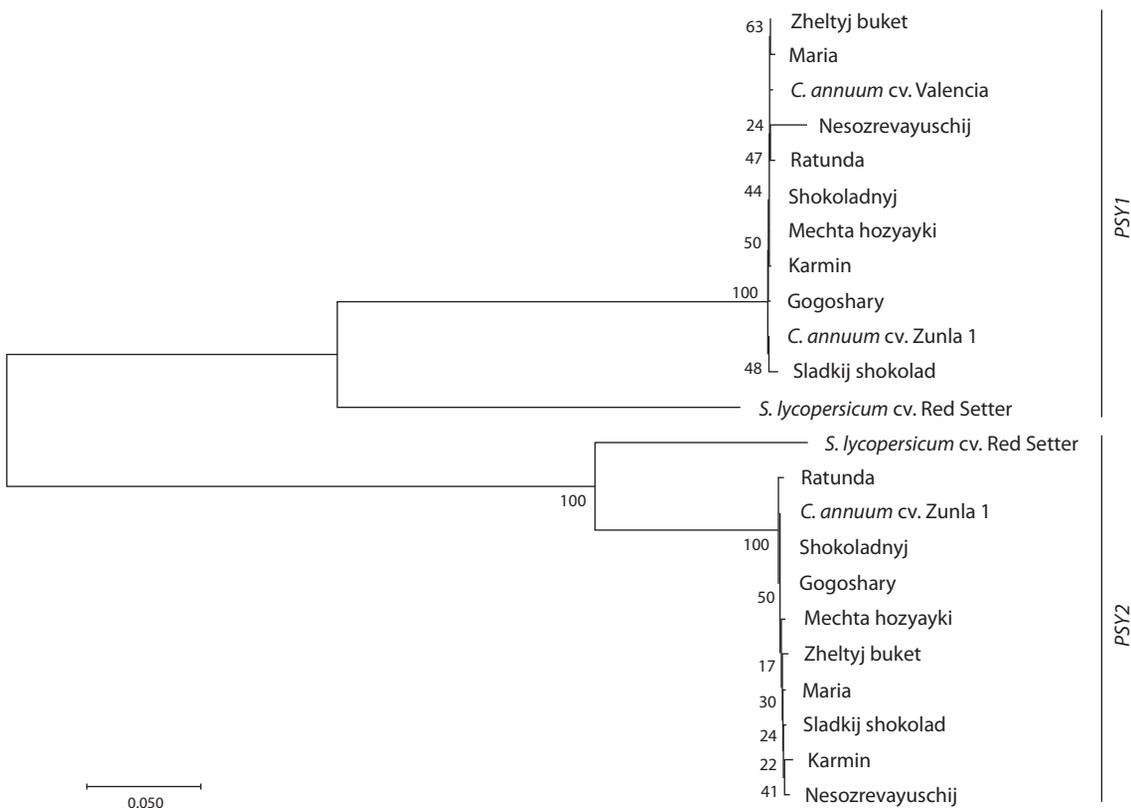


Рис. 2. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей генов PSY1 и PSY2 изучаемых образцов сортов перца *C. annuum*. Дендрограмма построена с помощью MEGA 7.0 (метод ближайших соседей NJ, модель Tamura-Nei, бутстрэп 1000). Для сравнения использованы последовательности PSY1 и PSY2 *Solanum lycopersicum* cv. Red Setter (EF534740.1, EU021055.1).

По-видимому, различия в последовательностях TP могут отвечать за специфичность доставки каждой из фитоинсинтаз в разные типы пластид, как было предположено ранее (Cao et al., 2019).

В последовательностях PSY1 и PSY2 были проведены поиск и оценка функционально значимых участков.

В результате показано, что области, ограничивающие активные сайты (Y<sub>143</sub>AKTF<sub>147</sub>/Y<sub>149</sub>AKTF<sub>153</sub> и R<sub>393</sub>AYV<sub>396</sub>/R<sub>399</sub>AYV<sub>402</sub>), аспаргат-богатые субстрат-Mg<sup>2+</sup>-связывающие сайты (D<sub>173</sub>ELVD<sub>177</sub>/D<sub>179</sub>ELVD<sub>183</sub> и D<sub>299</sub>VGED<sub>303</sub>/D<sub>305</sub>VGED<sub>309</sub>), 18 субстрат-связывающих карманов (pockets) и 15 каталитических остатков, консервативны для

исследуемых образцов. Исключение составили замещения gE180G (сорт Несозревающий, PSY2) в сайте DELVD, nD309E (сорт Кармин, PSY2) в сайте DVGED и nG288R (сорт Мария, PSY1, субстрат-связывающий карман). У всех образцов выборки сайты  $F_{147}Y_{148}/F_{153}Y_{154}$  и  $A_{210}/A_{216}$  были консервативны и для PSY1, и для PSY2, за исключением замены gA210D в последовательности PSY1 сорта Мария. Именно такой состав данных сайтов определяет сходство уровня каротиногенной активности фитоинсинтаз PSY1 и PSY2, при этом, как показано ранее, замещение в сайте  $A_{210}/A_{216}$  не является критическим, в отличие от  $F_{147}Y_{148}/F_{153}Y_{154}$  (Сао et al., 2019). Поэтому найденное нами радикальное замещение gA210D не должно существенно повлиять на активность PSY1 сорта Мария.

Для подтверждения структурного сходства идентифицированных PSY1 и PSY2 на основе их полногеномных последовательностей был проведен кластерный анализ в сравнении с известными PSY1 и PSY2 *S. lycopersicum* cv. Red Setter и *C. annuum* cv. Zunla 1 (рис. 2). На дендрограмме сорта перца ожидаемо сгруппировались в два больших кластера, объединяющих последовательности PSY1 и PSY2 соответственно (см. рис. 2). Внутри каждого кластера образцы *C. annuum* формировали единый близкородственный субкластер с несущественными внутренними значениями бутстрэпа (17–50) и единственным достоверным объединением сортов Мария и Желтый букет на основании PSY1. Вид *S. lycopersicum* занимал базовую ветвь в каждом из кластеров.

Таким образом, идентифицированные последовательности PSY1 и PSY2 девяти сортов перца, формирующих зрелый плод различной окраски, имеют высокое структурное сходство, что говорит о возможном сохранении ими консервативных ключевых функций фитоинсинтаз в синтезе каротиноидов.

#### Содержание хлорофиллов и каротиноидов в перикарпе плодов в процессе созревания

Суммарное содержание хлорофиллов и каротиноидов у анализируемых сортов перца было измерено в перикарпе плодов в процессе развития (см. табл. 1). Показано, что незрелый плод всех сортов (стадия MF) содержит сравнимые количества хлорофиллов и каротиноидов, что характеризует ткани плодов как фотосинтезирующие. В бланжевых плодах (стадия IR) содержание хлорофиллов снижалось в 1.46–5.60 раза в зависимости от сорта. В спелых плодах (стадия RF) хлорофилл обнаружен в значительном количестве у сортов Сладкий шоколад, Шоколадный, Несозревающий, а в малом количестве – у сортов Гогошары и Мечта хозяйки. В спелых плодах сортов Желтый букет, Кармин и Мария хлорофиллы отсутствовали.

Количество каротиноидов в незрелых плодах было максимальным у сортов Шоколадный и Сладкий шоколад (48.5 и 61.0 мкг/г), тогда как у остальных сортов оно варьировало от 6.8 (Гогошары) до 27.3 мкг/г (Желтый букет) (см. табл. 1). В случае спелых плодов первенство осталось за сортами с шоколадной окраской: наиболее высокое содержание каротиноидов отмечено у сорта Шоколадный (1009.90 мкг/г); у сорта Сладкий шоколад оно в 1.7 раза ниже, а у красноплодных сортов Кармин и Мария – в 1.94

и 2.48 раза соответственно (см. табл. 1). В спелых плодах остальных четырех сортов каротиноидов было на порядок меньше. Интересно, что при сходном малом содержании суммы каротиноидов спелые плоды этих сортов имели разную окраску: Желтый букет – желтую, Мечта хозяйки – красную, Несозревающий и Гогошары – зеленую и красно-зеленую. При этом Несозревающий и Гогошары характеризовались в среднем в 2 раза меньшим содержанием каротиноидов по сравнению с сортами Желтый букет и Мечта хозяйки (см. табл. 1).

Исходя из полученных биохимических данных можно предположить, что сорта, спелый плод которых имеет красную окраску, синтезируют традиционные для перцев красные пигменты – каротиноиды капсантин и капсорубин. В сортах с коричневыми плодами окраска формируется из двух составляющих – красных каротиноидов и зеленых хлорофиллов. Желтая или зеленая окраска плодов на стадии биологической спелости, по всей вероятности, определяется присутствием желтоокрашенных каротиноидов (лютеин, зеаксантин) и хлорофиллов соответственно.

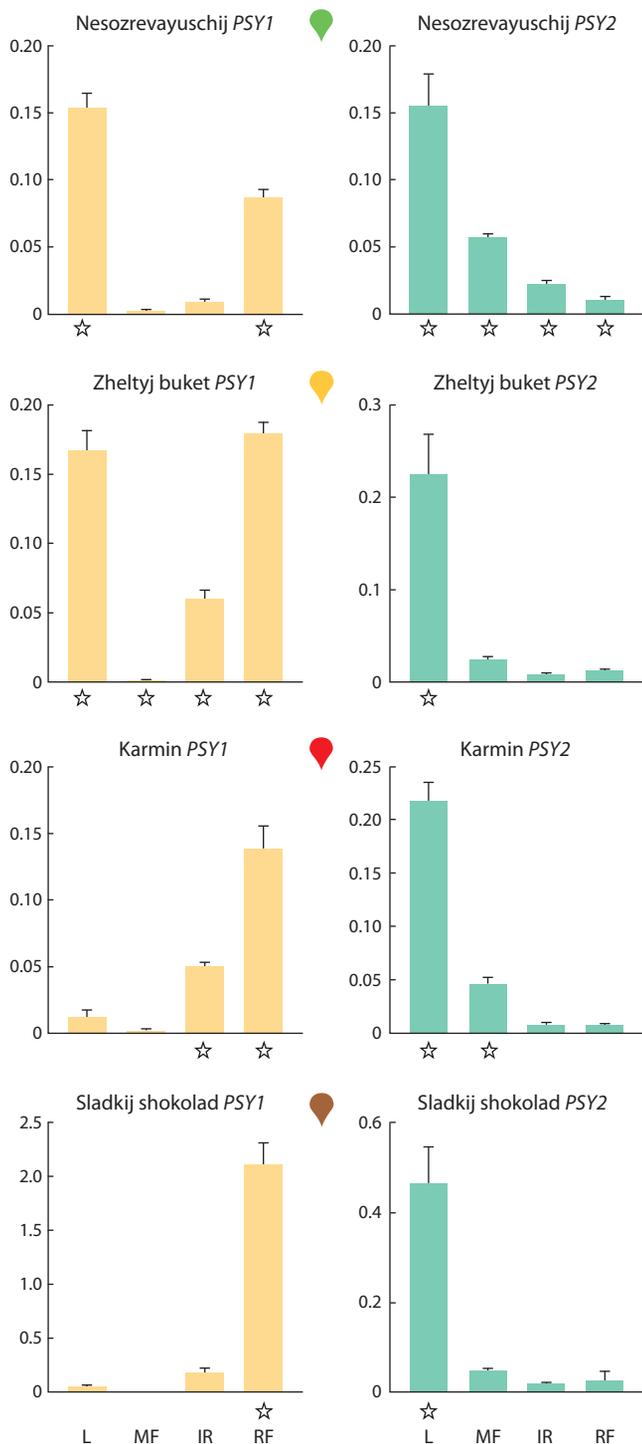
#### Профиль коэкспрессии генов PSY1 и PSY2 в перикарпе плодов в процессе созревания

Накопление каротиноидов в плодах прямо связывают с уровнем экспрессии PSY1 (Meléndez-Martínez et al., 2010), однако, несмотря на то что PSY2 в основном экспрессируется в фотосинтезирующих тканях, его транскрипты обнаружены также в тканях плода (Jang et al., 2020). Экспрессия генов PSY1 и PSY2 была охарактеризована в листьях и перикарпе (кожица и мякоть) плодов на трех стадиях созревания (MF, IR, RF) у четырех сортов перца (рис. 3). В анализ были взяты сорта Желтый букет, Сладкий шоколад, Кармин и Несозревающий, контрастные по окраске спелого плода (RF) – желтой, коричневой, темно-красной и зеленой соответственно (см. табл. 1). Сорта Кармин и Сладкий шоколад отличались высоким содержанием каротиноидов в спелых плодах (520.2 и 597.0 мкг/г), тогда как сорта Несозревающий и Желтый букет накапливали 55.9 и 107.7 мкг/г соответственно.

В листьях анализируемых сортов перца уровни экспрессии PSY1 значительно варьировали. Так, у сортов Несозревающий и Желтый букет уровни транскрипции были схожи (0.15 и 0.17), у сорта Сладкий шоколад – в 3 раза ниже (0.054), а у сорта Кармин уровень транскрипции данного гена составил 0.012 (см. рис. 3). В плодах наблюдался сходный паттерн экспрессии PSY1: увеличение уровня транскрипции в процессе созревания плода. При этом максимальный уровень экспрессии PSY1 наблюдался в спелом плоде сорта Сладкий шоколад, а минимальный – у сорта Несозревающий (см. рис. 3).

Фитоинсинтаза PSY2 считается более специфичной для фотосинтезирующих тканей (Giorgio et al., 2008). В зеленом незрелом плоде (стадия MF) все анализируемые сорта характеризовались присутствием хлорофиллов: самый высокий показатель у сорта Сладкий шоколад, самый низкий – у сорта Несозревающий. В зрелых плодах хлорофилл присутствовал только у сортов Сладкий шоколад и Несозревающий (у первого в 3 раза выше, чем у второго).

Уровень экспрессии гена PSY2 в листьях сорта Сладкий шоколад оказался в 2–3 раза выше, чем в листьях трех дру-



**Рис. 3.** Профиль экспрессии генов *PSY1* и *PSY2* в листьях (L) и плодах на трех стадиях созревания (MF – незрелый плод, IR – бланжевая спелость, RF – биологическая спелость) образцов сортов перца *C. annuum*.

Звездочками обозначены значения экспрессии генов, имеющие значимые отличия от экспрессии во всех других тканях одного образца.

гих сортов, где экспрессия была сопоставима (см. рис. 3). Анализ экспрессии *PSY2* показал присутствие его транскриптов в перикарпе плода на всех стадиях развития у всех четырех анализируемых сортов. В перикарпе незрелого плода (стадия MF) экспрессия *PSY2* была приблизительно

на одном уровне у сортов Несозревающий (0.057), Сладкий шоколад (0.050) и Кармин (0.046), тогда как у сорта Желтый букет – в 2 раза ниже (0.025) (см. рис. 3). По мере созревания плодов экспрессия *PSY2* снижалась. В зрелых плодах (стадия RF) сортов Несозревающий, Желтый букет и Кармин уровень транскрипции *PSY2* был сопоставим, а у сорта Сладкий шоколад – выше в 2.3–3.5 раза (см. рис. 3).

Можно предположить, что наличие экспрессии *PSY2* в зрелых плодах сортов перца связано с сохранением хлоропластов. Об этом свидетельствует содержание хлорофилла в перикарпе спелых плодов, например у сортов Несозревающий и Сладкий шоколад (см. табл. 1). У сортов Желтый букет и Кармин также выявлена экспрессия *PSY2* в зрелых плодах, при этом хлорофилл не обнаружен. Вероятно, *PSY2* может работать не только в хлоропластах, но и в хромопластах. Ранее на примере сорта перца MicroPer Yellow (отсутствие транскрипции гена *PSY1*) было показано, что синтез и накопление в хромопластах плода желтых пигментов связаны с экспрессией *PSY2* (Jang et al., 2020).

Регуляция синтеза и накопления каротиноидов в плодах перца является сложным процессом (Deruère et al., 1994; Kilcrease et al., 2015). В зрелых плодах каротиноиды накапливаются в хромопластах в специализированных глобулах, и если нарушено их образование, то каротиноиды могут синтезироваться, но не накапливаться (Osorio, 2019). Образование глобул находится под контролем белка Orange, который одновременно предотвращает деградацию каротиноидов и стабилизирует активность фитоинсинтазы PSY (Osorio, 2019). У сорта Несозревающий по мере созревания сохраняется зеленая окраска плода, а окраска мякоти изменяется от светло-зеленой до желто-зеленой. При этом, в отличие от трех других анализируемых сортов перца, не наблюдается значительного роста содержания каротиноидов (см. табл. 1), и уровень транскрипции *PSY1* в зрелом плоде сорта Несозревающий в 1.6 и 2.1 раза ниже, чем у сортов Кармин и Желтый букет соответственно. Можно предположить, что у сорта Несозревающий нарушен ряд процессов, характерных для созревания плода, таких как деградация хлорофилла, трансформация хлоропластов в хромопласты и/или синтез хромопластов *de novo* (Kilcrease et al., 2015; Berry et al., 2019). Однако плоды сорта Несозревающий созревают (семена полностью сформированы и жизнеспособны), хотя и не происходит заметного изменения в окраске перикарпа. Это подтверждает показанное ранее отсутствие связи каротиногенеза в плодах с процессом созревания (Fraser et al., 2007).

## Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании у девяти сортов *C. annuum* с различной окраской спелого плода были идентифицированы и охарактеризованы последовательности генов фитоинсинтаз *PSY1* и *PSY2*, определен профиль коэкспрессии этих генов в вегетативных и репродуктивных органах, а также проведена оценка возможной корреляции с суммарным содержанием каротиноидов. Получены подтверждения прямой зависимости между уровнем экспрессии гена *PSY1* и каротиноидной пигмен-

тацией плода в процессе созревания. Показано, что у сорта Несозревающий нарушен типичный для плодов перца паттерн пигментации перикарпа в процессе созревания, что может быть связано с нарушениями образования хромопластов.

## Список литературы / References

- Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов. *Физиология растений*. 2020;67(6):644-653. DOI 10.31857/S0015330320050048.
- [Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020;67(6):1054-1062. DOI 10.1134/S1021443720050040.]
- Bemer M., Karlova R., Ballester A.R., Tikunov Y.M., Bovy A.G., Wolters-Arts M., de Barros Rossetto P., Angenent G.C., de Maagd R.A. The tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *Plant Cell*. 2012;24:4437. DOI 10.1105/tpc.112.103283.
- Berry H.M., Rickett D.V., Baxter C.J., Enfissi E.M.A., Fraser P.D. Carotenoid biosynthesis and sequestration in red chilli pepper fruit and its impact on colour intensity traits. *J. Exp. Bot.* 2019;70(10):2637-2650. DOI 10.1093/jxb/erz086.
- Caο H., Luo H., Yuan H., Eissa M.A., Thannhauser T.W., Welsch R., Hao Y.-J., Cheng L., Li L. A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases. *Plant Physiol.* 2019;180(4):1988-2003. DOI 10.1104/pp.19.00384.
- Cervantes-Paz B., Yahia E.M., Ornelas-Paz J.J., Victoria-Campos C.I., Ibarra-Junqueira V., Pérez-Martínez J.D., Escalante-Minakata P. Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeño peppers at intermediate stages of ripening. *Food Chem.* 2014;146:188-196. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.09.060.
- Deruère J., Römer S., d'Harlingue A., Backhaus R.A., Kuntz M., Camara B. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell*. 1994;6:119-133. DOI 10.2307/3869680.
- Dias G.B., Gomes V.M., Moraes T.M., Zottich U.P., Rabelo G.R., Carvalho A.O., Moulin M., Gonçalves L.S., Rodrigues R., Da Cunha M. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genet. Mol. Res.* 2013;12:6488-6501. DOI 10.4238/2013.february.28.29.
- Enfissi E.M., Nogueira M., Bramley P.M., Fraser P.D. The regulation of carotenoid formation in tomato fruit. *Plant J.* 2017;89:774-788. DOI 10.1111/tpj.13428.
- Fraser P.D., Enfissi E.M., Halket J.M., Truesdale M.R., Yu D., Gerish C., Bramley P.M. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell*. 2007;19(10):3194-3211. DOI 10.1105/tpc.106.049817.
- Fraser P.D., Schuch W., Bramley P.M. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts – partial purification and biochemical properties. *Planta*. 2000;211:361-369. DOI 10.1007/s004250000293.
- Giorio G., Stigliani A.L., D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J.* 2008;275(3):527-535. DOI 10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x.
- Giuffrida D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C., Dugo G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* 2013;140(4):794-802. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.09.060.
- Giuliano G. Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017;44:169-180. DOI 10.1016/j.copbio.2017.02.001.
- Ha S.H., Kim J.B., Park J.S., Lee S.-W., Cho K.-J. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin–capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Bot.* 2007;58:3135-3144. DOI 10.1093/jxb/erm132.
- Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H., Villalon B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1713-1720. DOI 10.1021/jf990916t.
- Jang S.J., Jeong H.B., Jung A., Kang M.-Y., Kim S., Ha S.-H., Kwon J.-K., Kang B.-C. *Phytoene Synthase 2* can compensate for the absence of *Psy1* in *Capsicum* fruit. *J. Exp. Bot.* 2020;71(12):3417-3427. pii: eraa155. DOI 10.1093/jxb/eraa155.
- Kachanovsky D.E., Filler S., Isaacson T., Hirschberg J. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of *phytoene synthase 1* expression by cis-carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:19021-19026. DOI 10.1073/pnas.1214808109.
- Kilcrease J., Rodriguez-Uribe L., Richins R.D., Arcos J.M.G., Victorino J., O'Connell M.A. Correlations of carotenoid content and transcript abundances for fibrillin and carotenogenic enzymes in *Capsicum annuum* fruit pericarp. *Plant Sci.* 2015;232:57-66. DOI 10.1016/j.plantsci.2014.12.014.
- Levy A., Hare S., Palevitch D., Akiri B., Menagem E., Kanner J. Carotenoid pigments and  $\beta$ -carotene in paprika fruits (*Capsicum* spp.) with different genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 1995;43:362-366. DOI 10.1021/jf00050a019.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 1987;148:350-382. DOI 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- Márkus F., Daood H.G., Kapitány J., Biacs P.A. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47:100-107. DOI 10.1021/jf980485z.
- Meléndez-Martínez A.J., Fraser P.D., Bramley P.M. Accumulation of health promoting phytochemicals in wild relatives of tomato and their contribution to *in vitro* antioxidant activity. *Phytochemistry*. 2010;71(10):1104-1114. DOI 10.1016/j.phytochem.2010.03.021.
- Mohd Hassan N., Yusof N.A., Yahaya A.F., Mohd Rozali N.N., Othman R. Carotenoids of *Capsicum* fruits: pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(10):469. DOI 10.3390/antiox8100469.
- Moscone E.A., Scaldaferrò M.A., Grabielle M., Cecchini N.M., Sánchez García Y., Jarret R., Daviña J.R., Ducasse D.A., Barboza G.E., Ehrendorfer F. The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Hort.* 2007;745:137-170. DOI 10.17660/ActaHortic.2007.745.5.
- Orosio C.E. The role of orange gene in carotenoid accumulation: manipulating chromoplasts toward a colored future. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1235. DOI 10.3389/fpls.2019.01235.
- Puchooa D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Afr. J. Biotech.* 2004;3:253-255. DOI 10.5897/ajb2004.000-2046.
- Shumskaya M., Bradbury L.M.T., Monaco R.R., Wurtzel E.T. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *Plant Cell*. 2012;24:3725-3741. DOI 10.1105/tpc.112.104174.
- Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N., Reshetnikova I.V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples. *Rus. J. Plant Phys.* 2001;48(5):693-700.
- Stauder R., Welsch R., Camagna M., Kohlen W., Balcke G.U., Tisier A., Walter M.H. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *PHYTOENE*

- SYNTHASE* gene family. *Front. Plant Sci.* 2018;9:255. DOI 10.3389/fpls.2018.00255.
- Story E.N., Kopec R.E., Schwartz S.J., Harris G.K. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2010;1:189-210. DOI 10.1146/annurev.food.102308.124120.
- Sun T., Li L. Toward the 'golden' era: the status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants. *Plant Sci.* 2020; 290:110331. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110331.
- Sun T., Xu Z., Wu C.T., Janes M., Prinyawiwatkul W., No H.K. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *J. Food Sci.* 2007;72(2):98-102. DOI 10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x.
- Thorup T.A., Tanyolac B., Livingstone K.D., Popovsky S., Paran I., Jahn M. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:11192-11197. DOI 10.1073/pnas.97.21.11192.
- Welsch R., Medina J., Giuliano G., Beyer P., von Lintig J. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 2003;216:523-534. DOI 10.1007/s00425-002-0885-3.
- Zhou X., Welsch R., Yang Y., Álvarez D., Riediger M., Yuan H., Fish T., Liu J., Thannhauser T.W., Li L. *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(11):3558-3563. DOI 10.1073/pnas.1420831112.

---

#### ORCID ID

E.A. Dyachenko orcid.org/0000-0002-0570-9751  
M.A. Filyushin orcid.org/0000-0003-3668-7601  
G.I. Efremov orcid.org/0000-0002-2943-5118  
A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727  
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-16-00016) и частично Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (измерение содержания хлорофилла в плодах).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.05.2020. После доработки 16.07.2020. Принята к публикации 16.07.2020.

# SSR-based evaluation of genetic diversity in populations of *Agriophyllum squarrosum* L. and *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey. collected in South-East Kazakhstan

Y. Genievskaya<sup>1</sup>, D. Karelova<sup>1</sup>, S. Abugalieva<sup>1,2</sup>, P. Zhao<sup>3</sup>, G. Chen<sup>3</sup>, Y. Turuspekov<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Laboratory of molecular genetics, Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> Department of biodiversity and bioresources, al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>3</sup> Key laboratory of stress physiology and ecology in cold and arid regions, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Gansu, China

 e-mail: yerlant@yahoo.com

**Abstract.** The development of informative polymorphic DNA markers for poorly studied genera is an important step in population analyses of living organisms, including those that play very important ecological roles in harsh environments, such as desert and semi-desert area. Examples of those poorly studied desert species are *Agriophyllum squarrosum* L. and *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey. However, a recent RNA-sequencing project in *A. squarrosum* has proposed a large set of hypothetical SSR (simple sequence repeat) markers. In this work, 11 novel polymorphic SSRs were found due to the screening of 24 randomly selected SSRs for three populations of *A. squarrosum* and one population of *A. minus*. The analysis of 11 SSRs revealed 16 polymorphic loci in two *Agriophyllum* species, 8 polymorphic loci within three populations of *A. squarrosum*, and 6 polymorphic loci in the population of *A. minus*. Statistical analyses showed high interspecific, but relatively low intraspecific genetic diversity. The phylogenetic clusterization and population structure analysis have demonstrated a clear segregation of *A. minus* from *A. squarrosum*, as well as the separation of population 1 from populations 2 and 3 of *A. squarrosum*. Thus, we identified the set of novel and informative SSR markers suitable for the study of genetic diversity in *Agriophyllum*.

Key words: sand rice; *Agriophyllum squarrosum*; *Agriophyllum minus*; SSR markers; genetic diversity; population structure.

**For citation:** Genievskaya Y., Karelova D., Abugalieva S., Zhao P., Chen G., Turuspekov Y. SSR-based evaluation of genetic diversity in populations of *Agriophyllum squarrosum* L. and *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey. collected in South-East Kazakhstan. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7): 697-704. DOI 10.18699/VJ20.664

## Оценка генетического разнообразия с использованием SSR-маркеров в популяциях *Agriophyllum squarrosum* L. и *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey., собранных на юго-востоке Казахстана

Ю.А. Гениевская<sup>1</sup>, Д.С. Карелова<sup>1</sup>, С.И. Аbugалиева<sup>1,2</sup>, П. Жао<sup>3</sup>, Г. Чен<sup>3</sup>, Е.К. Туруспеков<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Кафедра биоразнообразия и биоресурсов, Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

<sup>3</sup> Ключевая лаборатория по физиологии стресса и экологии в холодных и засушливых регионах,

Северо-Западный институт экологической среды и ресурсов, Гансу, Китай

 e-mail: yerlant@yahoo.com

**Аннотация.** Разработка информативных полиморфных ДНК-маркеров для малоизученных родов – необходимое и важное условие для эффективного популяционного анализа живых организмов, в том числе играющих важную экологическую роль в суровых климатических условиях, в частности в пустынях и полупустынях. Примерами подобных малоизученных пустынных видов являются *Agriophyllum squarrosum* L. и *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey. В недавнем проекте по РНК-секвенированию *A. squarrosum* было найдено большое количество гипотетических SSR (простые повторяющиеся последовательности) маркеров. В настоящей работе в результате скрининга 24 случайно отобранных SSR-маркеров для трех популяций *A. squarrosum* и одной популяции *A. minus* обнаружены 11 новых полиморфных SSR-маркеров. Изучение этих 11 SSR-маркеров показало наличие 16 полиморфных локусов для двух видов *Agriophyllum*, 8 полиморфных локусов среди трех популяций *A. squarrosum* и 6 полиморфных локусов для популяции *A. minus*. Статистический анализ выявил высокое межвидовое, но относительно низкое внутривидовое генетическое разнообразие. Филогенетический анализ и анализ структуры популяций позволили обнаружить явное разделение на уровне видов, а

также дивергенцию популяции 1 *A. squarrosum* относительно популяций 2 и 3 данного вида. Таким образом, нами идентифицирован набор новых и информативных SSR-маркеров, подходящих для изучения генетического разнообразия *Agriophyllum*.

Ключевые слова: кумарчик песчаный; кумарчик малый; *Agriophyllum squarrosum*; *Agriophyllum minus*; SSR-маркеры; генетическое разнообразие; структура популяции.

## Introduction

Xerophytes and psammophytes (plants with adaptations to survive in water-deficiency environment) become the main plants in the desert region. Despite the harsh environmental conditions, many of these plants have adapted and became a part of complex and diverse desert ecosystems. Due to the wide distribution of desert territories, the study of its wild flora is very important for the ecological prediction and conservation of biodiversity. The Central Asia region, including Kazakhstan, is having numerous large and small sand deserts, such as Gobi, Taklamakan, Karakum, Kyzylkum and Moynkym. Deserts and semi-deserts occupy more than half of Kazakhstan territory and keep growing (Issanova et al., 2015). The major representatives of wild desert flora here are herbaceous plants, subshrubs, shrubs and subtrees. The list of dominating species includes genera *Artemisia*, *Salsola*, *Ferula*, *Arthrophytum*, *Calligonum*, *Ammodendron*, *Haloxylon*, and *Agriophyllum* (Rachkovskaya et al., 2003). Many of them are endemic for the Central Asian and Kazakhstan deserts.

*Agriophyllum squarrosum* L. and *Agriophyllum minus* Fisch. & Mey. are important desert species in Kazakhstan. They belong to the tribe Corispermaceae within the subfamily Chenopodioideae of the family Chenopodiaceae (Kühn, 1993). The genus *Agriophyllum* includes five species, and four of them, including *A. squarrosum*, grow in Kazakhstan (Ageeva et al., 1960). *A. squarrosum* is also widely spread in all Central Asia territory, Caucasus, and China. Local people in the sandy desert regions of China consume the seed of the species during periods of food shortage, and refer to the plant as 'shami' in Chinese, which translates as 'sand rice' (Chen et al., 2014). Sand rice is an example of psammophyte perfectly adapted for harsh desert environmental conditions. Morphologically it is a shrub-like plant with a height ranging from 20 to 100 cm. The stem of sand rice at the young plant stage is firm, branched, green, and covered with short hairs. Leaves are small, sessile, green, and usually linear. Small flowers are organized in a spike-like inflorescence. *A. squarrosum* blossoms in the late summer and early fall, after that ovoid shape seeds are formed. Seeds of sand rice are very light and covered by a thin husk. After ripening, the husk is cracked into two parts, and seeds are easily dispersed by the wind. The root system is represented by a long taproot penetrating deep into the soil to access stored moisture, and almost equally long lateral roots branching near the soil surface and helping to fix plant in loose sand. Although, there is a lack of information related to the structure of the sand rice's genome, the transcriptomic analysis of *A. squarrosum* ( $2n = 18$ ) had showed presence of 67741 unigenes and approximately 43 % of them were annotated (Zhao et al., 2014).

Throughout history, sand rice was used for diverse purposes. Aboveground organs (stem and leaves) are eaten by both wild animals and livestock of farmers in arid and semi-arid regions,

especially in Western Kazakhstan on camel pasture. Historically, nutritious seeds of sand rice were an alternative to cereals not surviving in hot deserts. In China and Mongolia, the local villagers consume sand rice seed in a variety of dishes. There are many reports about the rich nutrition value of *A. squarrosum* seeds close to its widely-used as food quinoa seeds (Chen et al., 2014). However, sand rice is not a domesticated plant species with several agriculturally unfavorable traits, such as fragile spikes and light seeds. Still, the works on possible domestication of sand rice as a novel crop are reported (Chen et al., 2014). In addition to nutrition purposes, sand rice had found its application in medicine. Back in the days, it was used as antipyretic and analgesic medicine (Gong et al., 2012; Chen et al., 2014). It was reported that the extract of *A. squarrosum* decreases blood glucose levels in type 2 diabetic mice and has the potential for further medical researches (Saqier et al., 2019). Sand rice is useful in combat against shifting sands (Wen-Ming et al., 2004). Climate change and human activities led to the growth of sand desert areas and the migration of sand dunes to agricultural territories. The structure of the sand rice root system and its ability to form seed banks in active sand dunes allow the fixation of the sand surrounding the plant. Thus, *A. squarrosum* has a tremendous potential together with other psammophytes to be used in a large-scale sand fixation (Liu et al., 2007; Ma, Liu, 2008). This species is an interesting model for different studies of morphology and physiology of desert plants. For example, earlier *A. squarrosum* was already used for the study of growth under drought conditions (Mo et al., 1997; Huang et al., 2008) and for the study of fertilizer effect on psammophytes under different rainfall conditions (Yuan et al., 2019).

Endemic species with great economic potential like sand rice are an interesting subject for genetic and molecular researches. One of the most common methods utilized for the studies on biodiversity conservation, population and phylogenetic studies of wild plant species is the usage of molecular DNA markers (Nybom, 2004). Examples of successful application of the most common DNA markers in plants include random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (Nybom, Bartish, 2000), amplified fragment-length polymorphisms (AFLP) (Zhang C. et al., 2018), and other nuclear and chloroplast DNA markers (Abugalieva et al., 2017; Almerikova et al., 2018; Turuspekov et al., 2018). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nrITS) region and five chloroplast DNA (cpDNA) fragments have been used earlier for the study of population dynamics of *A. squarrosum* in China (Qian et al., 2016). The *maturase K* (*matK*) gene of the chloroplast genome and nrITS were used for comparison of *A. squarrosum* and *A. minus* populations in two regions of Kazakhstan (Genievskaya et al., 2017). The literature survey suggests that there is a limited information on the study of *Agriophyllum* species by using SSR markers. However, a recent RNA-sequencing

**Table 1.** Geographical locations of sampling sites

Sampling site	Species, population	Number of plants	Coordinates	Altitude, m
South-East Kazakhstan, Zhambyl region, Moyynkum desert	<i>A. squarrosum</i> , pop1	10	44°34'55.1"N 76°58'30.3"E	411
South-East Kazakhstan, Zhambyl region, Moyynkum desert (near Birlik village)	<i>A. squarrosum</i> , pop2	25	44°40'56.9"N 76°41'49.7"E	407
	<i>A. squarrosum</i> , pop3	19	44°41'36.2"N 76°44'53.5"E	407
	<i>A. minus</i> , pop1	20	44°42'08.3"N 76°44'19.3"E	403



**Fig. 1.** *A. squarrosum* (on the left) and *A. minus* (on the right) in Moyynkum desert.

project of *A. squarrosum* populations in China has suggested several thousands of potential SSR markers for this species (Zhang J. et al., 2018).

In this study, we selected 24 SSR markers from this *Agriophyllum* genome resequencing project and used them for the assessment of genetic diversity within and among populations of *A. squarrosum*, and between *A. squarrosum* and *A. minus*.

## Materials and methods

**Plant material.** In total, leaf samples of four wild *Agriophyllum* populations were collected in South-East Kazakhstan and used for the analysis (Table 1). The list included three populations of *A. squarrosum* and one population of *A. minus* sampled in Moyynkum desert of Almaty region in South-East Kazakhstan (Fig. 1). Population 1 of *A. squarrosum* was collected in 2016, while the populations 2 and 3 of *A. squarrosum* and population 1 of *A. minus* were collected in 2019. The distances between populations were at least four kilometers, and plants within the population were sampled in at least 50 meters apart.

**DNA extraction, amplification and SSR marker assessment.** Five young leaves from each sample were dried in silica gel. The total genomic DNA was extracted from dry leaf

tissues using CTAB method (Doyle, 1991). The quality and concentration of extracted DNA were assessed via spectrophotometric test, and 1 % agarose gel electrophoresis.

Twenty-four pairs of SSR markers and their primers (Supplementary Table)<sup>1</sup> were selected from 6150 SSRs in the sequence of *A. squarrosum* genome reported by Zhang J. and co-authors (2018). SSR motives and expected sized of alleles were obtained from the same source.

Annealing temperature ( $T_a$ ) for primer pairs and concentration of reagents in a PCR reaction mix were determined empirically. All successful PCR reactions were performed in total 16  $\mu$ l volumes, including 4 mM of each dNTP, 2 mM of  $MgCl_2$ , 6.4 mM of primer mix (forward+reverse), 1.6 U of Taq polymerase and 50 ng of DNA. The amplification was performed in Veriti Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an initial denaturation step at 94 °C for 3 minutes, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 seconds, optimized  $T_a$  °C (see Suppl. Table) for 45 seconds and 72 °C for 1.5 minutes. The final extension step was at 72 °C for 10 minutes. The PCR products were separated on 6 % polyacrylamide gel (PAG). The SSR profile image was

<sup>1</sup> Supplementary Table is available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx10.pdf>

captured using the GelDoc gel documentation unit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Allele sizes were estimated visually based on the size of ladder bands and the control sample on each gel.

**Statistical analysis.** Nei's genetic diversity indices were calculated via POPGENE software ver. 1.32 (Yeh et al., 1997); the polymorphism information content (PIC) (Botstein et al., 1980) was calculated as follows:  $PIC = \sum(1 - p_i^2)$ , where  $p_i$  is the frequency of the  $i$ -th band or percentage of individuals in which the fragment is present. Principal coordinates analysis (PCoA) and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) hierarchical clustering were performed based on genetic distances among populations and species. PCoA plot was made via GenAlEx (Genetic Analysis in Excel) ver. 6.5 software (Peakall, Smouse, 2012), UPGMA analysis was performed in R statistical software environment (R Core Team, 2018). Bayesian clustering was based on the use of the STRUCTURE software ver. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). The value of  $K$  was set from 1 to 5 with five iterations for each value of  $K$ . Both, length of burn-in period, and the number of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) repeat after burn-in was set at 100000. Web-tool STRUCTURE HARVESTER (Earl, von Holdt, 2011) based on Evanno's method (Evanno et al., 2005) was used to determine the best fit value of  $K$ . The molecular variance (AMOVA) test was calculated using GenAlEx software.

## Results

### Performance of SSR markers in *Agriophyllum* species

Initially, 24 SSR markers were chosen for the analysis (see Suppl. Table), however, successful amplification was performed for 18 markers only. Five of 18 SSRs were multilocus markers, while other 13 SSRs were single-locus. In total, 18 markers allowed identification of 23 loci (Table 2), of which 16 were polymorphic and suitable for the analysis (Table 3).

The screening of sixteen SSR loci has allowed the identification of 43 alleles in the analysis of three populations of *A. squarrosum* and one population of *A. minus*. The molecular sizes of alleles in loci were ranged from 143 to 342 bp. The number of alleles in the study of all four populations varied from 2 to 4.

In total, eight polymorphic loci were observed in *A. squarrosum*, six polymorphic loci were found in *A. minus*, and 16 loci had demonstrated polymorphism between two species (see Table 3). In total, 20 alleles were identified exclusively in *A. squarrosum*, 16 alleles were exclusive for *A. minus*, and 7 alleles were found in both species. The average number of alleles per locus in polymorphic loci was  $2.69 \pm 0.70$  for both species,  $2.25 \pm 0.16$  for *A. squarrosum*, and  $2.17 \pm 0.17$  for *A. minus*, respectively.

Nei's index and PIC value were calculated separately for polymorphic SSR loci of *A. squarrosum*, *A. minus*, and jointly for two *Agriophyllum* species (see Table 3). The genetic distance-based PCoA plot suggested a clear separation of *A. minus* from populations of *A. squarrosum*, as well as distinguishing of the population 1 from populations 2 and 3 in *A. squarrosum* (Fig. 2, a). The UPGMA tree had also demonstrated two clusters corresponding to *A. squarrosum* and *A. minus*. The portion of samples in population 1 of *A. squar-*

**Table 2.** The characteristics of SSR loci successfully amplified in *A. squarrosum* and *A. minus*

No.	Locus	Annealing temperature ( $T_a$ ), °C	Number of alleles	Range of alleles sizes, bp
1	AGS-02	46	1*	237
2	AGS-03	60	2	266–273
3	AGS-05	42	1*	280
4	AGS-07	46	1*	182
5	AGS-09.1	46	4	178–210
6	AGS-09.2	46	3	264–273
7	AGS-10	46	1*	280
8	AGS-11	54	1*	200
9	AGS-13	46	1*	275
10	AGS-16.1	39	3	159–186
11	AGS-16.2	39	3	284–305
12	AGS-17.1	33	2	228–238
13	AGS-17.2	33	2	287, null allele
14	AGS-18	39	3	176–245
15	AGS-20.1	33	3	298–323
16	AGS-20.2	33	2	359, null allele
17	AGS-23	54	2	170–182
18	AGS-24	46	1*	108
19	AGS-26	54	3	183–199
20	AGS-27.1	46	2	182, null allele
21	AGS-27.2	46	4	229–342
22	AGS-29	42	2	298–328
23	AGS-30	51	3	143–167

\* Monomorphic loci excluded from further analysis.

*rosum* was clustered together with populations 2 and 3, while the remaining part formed a separate subcluster (see Fig. 2, b). Bayesian distance-based analysis of the structure among two *Agriophyllum* species was congruent with the UPGMA clusterization and also indicated that  $K = 3$  is an optimal number of groups in the study (see Fig. 2, c).

AMOVA results for the set of data containing all *Agriophyllum* samples revealed that the majority (88 %) of the genetic diversity in *Agriophyllum* exists between two species rather than within them (Table 4).

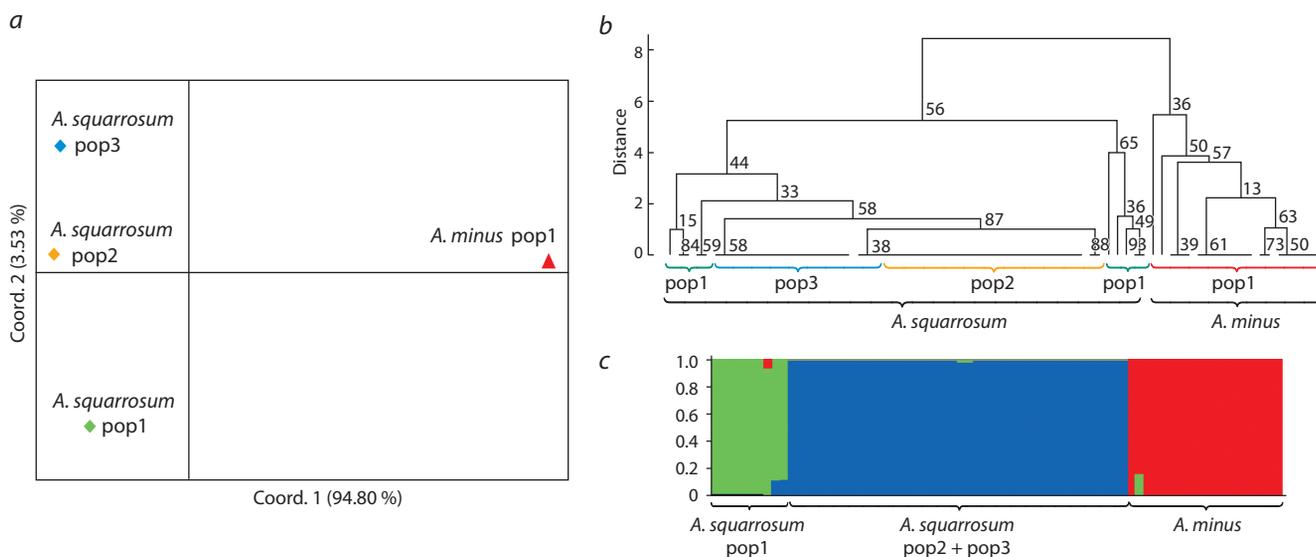
### Genetic diversity in *A. squarrosum* populations

Part of this study was focused on the assessment of the genetic diversity within and between populations of *A. squarrosum*. In total, 26 alleles were identified in eight SSR loci. The largest number of unique alleles was found in population 1 (8 alleles), while population 2 had only one unique allele (Table 5). The largest values of Nei's index ( $0.27 \pm 0.16$ ) and PIC value ( $0.25 \pm 0.09$ ) were observed in population 1.

**Table 3.** Assessment of genetic diversity in populations of *Agriophyllum* species based on SSR marker analysis

No.	Locus	<i>A. squarrosum</i>				<i>A. minus</i>				<i>A. squarrosum</i> + <i>A. minus</i>			
		na	ne	Nei	PIC	na	ne	Nei	PIC	na	ne	Nei	PIC
1	AGS-03	2	1.85	0.46	0.35	2	1.11	0.10	0.09	2	1.99	0.50	0.38
2	AGS-09.1	2	1.04	0.04	0.04	3	2.06	0.52	0.46	4	1.81	0.45	0.41
3	AGS-09.2	2	1.04	0.04	0.04	2	1.84	0.46	0.35	3	1.80	0.45	0.40
4	AGS-16.1	Monomorphic*				2	1.11	0.10	0.09	3	1.71	0.42	0.34
5	AGS-16.2	3	1.22	0.18	0.17	2	1.11	0.10	0.09	3	1.19	0.16	0.15
6	AGS-17.1	Monomorphic*				Monomorphic*				2	1.63	0.39	0.31
7	AGS-17.2	Monomorphic*				Monomorphic*				2	1.63	0.39	0.31
8	AGS-18	2	1.43	0.30	0.26	Monomorphic*				3	2.22	0.55	0.49
9	AGS-20.1	Monomorphic*				2	1.21	0.18	0.16	3	1.69	0.41	0.34
10	AGS-20.2	Monomorphic*				Monomorphic*				2	1.65	0.39	0.32
11	AGS-23	Monomorphic*				Monomorphic*				2	1.66	0.40	0.32
12	AGS-26	2	1.04	0.04	0.04	Monomorphic*				3	1.69	0.41	0.34
13	AGS-27.1	Monomorphic*				Monomorphic*				2	1.65	0.39	0.32
14	AGS-27.2	3	1.46	0.32	0.29	Monomorphic*				4	2.29	0.56	0.50
15	AGS-29	Monomorphic*				Monomorphic*				2	1.65	0.39	0.32
16	AGS-30	2	1.34	0.25	0.22	Monomorphic*				3	2.13	0.53	0.46
	Mean	2.25	1.30	0.20	0.18	2.17	1.41	0.24	0.21	2.69	1.77	0.42	0.36
	SEM	0.16	0.10	0.06	0.04	0.17	0.17	0.08	0.07	0.18	0.07	0.02	0.02
	Number of plants	54				20				74			
	Number of populations	3				1				4			

Note. na – number of alleles per locus; ne – number of effective alleles; Nei – Nei’s genetic diversity index; PIC – polymorphism information content; SEM – standard error of mean. \* Monomorphic loci were not considered for the calculation of mean and SEM values.



**Fig. 2.** Population structure among studied *Agriophyllum* species.

a, PCoA of three *A. squarrosum* and one *A. minus* populations; b, UPGMA dendrogram showing clusters among 74 samples of both species; c, Bayesian clustering of 74 *Agriophyllum* samples at  $K = 3$ .

**Table 4.** AMOVA in two species of *Agriophyllum*

Source	df	SS	MS	Est. Var. (%)	<i>p</i>
Between species	1	435.289	435.289	14.840 (88)	0.001
Within species	72	151.941	2.111	2.110 (12)	0.047
Total	73	587.230		16.951 (100)	

Note. df – degree of freedom; SS – sum of squares; MS – mean squares; Est. Var. – estimated variance; *p* – significance level.

**Table 5.** Average values of diversity statistics for eight polymorphic SSR loci across three *A. squarrosum* populations

<i>A. squarrosum</i>	nea	ne	na	Nei	PIC
Population 1	8	1.43 ± 0.32	1.88 ± 0.35	0.27 ± 0.16	0.25 ± 0.09
Population 2	1	1.02 ± 0.06	1.13 ± 0.35	0.02 ± 0.05	0.02 ± 0.05
Population 3	0	1.03 ± 0.09	1.13 ± 0.35	0.03 ± 0.07	0.02 ± 0.06

Note. nea – number of alleles exclusive for population; na – number of alleles per locus; ne – number of effective alleles; Nei – Nei's genetic diversity index; PIC – polymorphism information content.

**Table 6.** AMOVA among and within three populations of *A. squarrosum*

Source	df	SS	MS	Est. Var. (%)	<i>p</i>
Among populations	2	29.185	14.592	0.771 (34)	0.002
Within populations	51	77.556	1.521	1.521 (66)	0.003
Total	53	106.741		2.292 (100)	

Note. df – degree of freedom; SS – sum of squares; MS – mean squares; Est. Var. – estimated variance; *p* – significance level.

The AMOVA for *A. squarrosum* had shown a higher molecular variance within populations than the variance among populations (Table 6).

## Discussion

The availability of informative DNA markers is advantageous for the study of rare species, their population structure, and for the development of a proper conservation strategy to prevent their extinction (Adams, Turuspekov, 1998; Kramer, Havens, 2009). SSR markers are one of those types of DNA markers that reliably utilized in population structure analysis due to their hyper-variability, co-dominance, and high reproducibility (Aitken et al., 2005). Successful applications of SSR markers for the identification, classification, and taxonomy of Chenopodiaceae species have been reported previously (Borger et al., 2008; Prinz et al., 2009; Sampson, Byrne, 2012; Nachtigall et al., 2016). However, for the genus *Agriophyllum*, there were no previous studies with the use of SSRs. The situation was changed recently due to the RNA-sequencing project of *A. squarrosum* accessions, and a large number of hypothetical SSR markers were suggested for population studies (Zhang J. et al., 2018). Hence, in this work 24 SSRs were randomly selected for the assessment of three populations of *A. squarrosum* and one population of *A. minus* collected in South-East Kazakhstan. The assessment of selected SSR markers resulted in the identification of 11 novel SSR markers that allowed the identification of 16 polymorphic loci in two *Agriophyllum* species (see Table 3). The large percentage of molecular variance (see Table 4) and a large

genetic distance (see Fig. 2) observed between *A. squarrosum* and *A. minus* indicated good discriminative power of studied SSR markers and confirmed a significant genetic difference reported between these species earlier (Genievskaia et al., 2018). Fifteen SSR loci used for both species were in intermediate diversity group with PIC values ranged between 0.32 and 0.50, and Nei's diversity index ranged between 0.39 and 0.56 (see Table 3).

When species were analyzed separately, 8 out of 16 loci were polymorphic for *A. squarrosum*, and 6 loci were polymorphic for *A. minus* (see Table 3). The average diversity in *A. minus* was slightly higher than in *A. squarrosum* and lower than the average interspecies diversity (see Table 3). Thus, *A. squarrosum* and *A. minus* have maintained a low level of genetic diversity. It has been demonstrated that annuals like *Agriophyllum* or short-lived perennials usually demonstrate low levels of genetic diversity compared with long-lived and outcrossing species (Austerlitz et al., 2000). However, the limited amount of samples in studied species (particularly in *A. minus*), their close geographical locations, and a relatively small number of polymorphic SSR markers used for the analysis could influence obtained results.

The study of the genetic diversity within *A. squarrosum* suggested that 66 % of the total variation was within and 34 % between populations (see Table 6), indicating that the difference of population 1 from populations 2 and 3 was rather substantial. The presence of relatively high diversity within populations may be explained by the geographical proximity of *A. squarrosum* populations used in this study (see Table 1),

which may cause a high rate of gene flow in a limited area (Conner, Hartl, 2004). Populations 2 and 3 of *A. squarrosum* had demonstrated an extremely low level of genetic diversity in comparison with population 1 (see Table 5), but the fact that samples from each population clustered together using multiple analyses (PCoA, UPGMA, Bayesian clustering) (see Fig. 2) indicates that there is a high level of heterogeneity in the species. The grouping of 5 samples from population 1 on the UPGMA tree and on the STRUCTURE bar plot into separate subcluster in the entire species cluster may indicate the presence of some barriers between groups of samples within population 1 interfering gene flow. Therefore, even if no physical obstructions were found during the sample collection, probably, two groups in population 1 may be considered as subpopulations (Waples, Gaggiotti, 2006). This assumption is also supported by the relatively higher genetic diversity in population 1 comparing with the other two *A. squarrosum* populations (see Table 5).

## Conclusions

In this study, sequences of 24 pairs of oligonucleotides for SSR markers were randomly selected from *A. squarrosum* genome resequencing project, and used for the study of genetic diversity in the genus *Agriophyllum*. Hence, it is the first report exploring the performance of novel SSR markers in the genetic analysis of this genus. The study revealed 16 polymorphic loci in eleven SSR markers using two *Agriophyllum* species, 8 polymorphic loci within three populations of *A. squarrosum*, and 6 polymorphic loci within the population of *A. minus*. Statistical analyses showed high interspecific, but relatively low genetic diversity in populations 2 and 3 of *A. squarrosum*. The phylogenetic clusterization and analysis and population structure analysis demonstrated clear segregation of *A. minus* from *A. squarrosum*, as well as the separation of population 1 of *A. squarrosum* from populations 2 and 3. As a result, we identified the set of novel and informative SSR markers suitable for the study of genetic diversity in *Agriophyllum* species. These results provide an important contribution to the population study and approaches for the development of conservation mechanisms for *Agriophyllum* species.

## References

- Abugaliev S., Volkova L., Genievskaya Y., Ivaschenko A., Kotukhov Y., Sakauova G., Turuspekoy Y. Taxonomic assessment of *Allium* species from Kazakhstan based on ITS and *matK* markers. *BMC Plant Biol.* 2017;17(S2):258. DOI 10.1186/s12870-017-1194-0.
- Adams R.P., Turuspekoy Y. Taxonomic reassessment of some Central Asian and Himalayan scale-leaved taxa of *Juniperus* (*Cupressaceae*) supported by random amplification of polymorphic DNA. *Taxon.* 1998;47(1):75-83. DOI 10.2307/1224021.
- Ageeva N.T., Baitenov M.B., Goloskokov V.P., Kornilova V.S., Pavlov N.V., Poljakov P.P. *Agriophyllum*. In: Pavlov N.V. (Ed.) Flora of Kazakhstan. Vol. III. Alma-Ata: Academy of Sciences of KazSSR, 1960;241-243. (in Russian)
- Aitken K.S., Jackson P.A., McIntyre C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110:789-801. DOI 10.1007/s00122-004-1813-7.
- Almerikova S., Abugaliev S., Mukhitdinov N. Taxonomic assessment of the *Oxytropis* species from South-East of Kazakhstan. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(2):285-290. DOI 10.18699/VJ18.362.
- Austerlitz F., Mariette S., Machon N., Gouyon P.H., Godelle B. Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species. *Genetics.* 2000;154(3):1309-1321.
- Borger C.P.D., Yan G., Scott J.K., Walsh M.J., Powles S.B. *Salsola tragus* or *S. australis* (Chenopodiaceae) in Australia – untangling taxonomic confusion through molecular and cytological analyses. *Aust. J. Bot.* 2008;56(7):600-608. DOI 10.1071/bt08043.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32:314-331.
- Chen G., Zhao J., Zhao X., Zhao P., Duan R., Nevo E., Ma X. A psammophyte *Agriophyllum squarrosum* (L.) Moq.: a potential food crop. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2014;61(3):669-676. DOI 10.1007/s10722-014-0083-8.
- Conner J.K., Hartl D.L. A Primer of Ecological Genetics. Oxford Univ. Press, 2004.
- Doyle J. DNA protocols for plants. In: Molecular Techniques in Taxonomy. Berlin; Heidelberg: Springer, 1991;283-293.
- Earl D.A., von Holdt B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2011;3:429-431. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Genievskaya Y., Abugaliev S., Zhubanysheva A., Turuspekoy Y. Morphological description and DNA barcoding study of sand rice (*Agriophyllum squarrosum*, Chenopodiaceae) collected in Kazakhstan. *BMC Plant Biol.* 2017;17(S1):177. DOI 10.1186/s12870-017-1132-1.
- Gong B., Zhan K.X., Zhou Y.H., Zhang L., Hui Y.Q., Li Y.S. Separation and identification of chemical constituents from *Agriophyllum squarrosum* (L.) Moq. *Mod. Chinese Med.* 2012;14(10):7-11.
- Huang Y.X., Zhao X.Y., Zhang H.X., Luo Y.Y., Mao W. Responses of *Agriophyllum squarrosum* phenotypic plasticity to the changes of soil nutrient and moisture contents and population density. *J. Appl. Ecol.* 2008;19(12):2593-2598.
- Issanova G., Abuduwaili J., Kaldybayev A., Semenov O., Dedova T. Dust storms in Kazakhstan: frequency and division. *J. Geol. Soc. India.* 2015;85(3):348-358. DOI 10.1007/s12594-015-0224-5.
- Kramer A.T., Havens K. Plant conservation genetics in a changing world. *Trends Plant Sci.* 2009;14(11):599-607. DOI 10.1016/j.tplants.2009.08.005.
- Kühn U. Chenopodiaceae. In: Kubitzki K., Rohwer J.G., Bittrich V. (Eds.). The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants: Dicotyledons, Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1993;253-280.
- Liu Z., Yan Q., Liu B., Ma J., Luo Y. Persistent soil seed bank in *Agriophyllum squarrosum* (Chenopodiaceae) in a deep sand profile: variation along a transect of an active sand dune. *J. Arid Environ.* 2007;71(2):236-242. DOI 10.1016/j.jaridenv.2007.03.003.
- Ma J., Liu Z. Spatiotemporal pattern of seed bank in the annual psammophyte *Agriophyllum squarrosum* Moq. (Chenopodiaceae) on the active sand dunes of northeastern Inner Mongolia, China. *Plant Soil.* 2008;311(1-2):97-107. DOI 10.1007/s11104-008-9661-x.
- Mo W., Natori T., Jiang S., Nishimura N., Omasa K. Responses of photosynthesis and water use to drought in two desert annuals, *Agriophyllum squarrosum* and *Bassia dasyphylla*. *J. Arid Land Studies.* 1997;7:185-195.
- Nachtigall M., Bülow L., Schubert J., Frese L. Development of SSR markers for the genus *Patellifolia* (Chenopodiaceae). *Appl. Plant Sci.* 2016;4(8):1600040. DOI 10.3732/apps.1600040.
- Nybohm H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 2004;13(5):1143-1155. DOI 10.1111/j.1365-294x.2004.02141.x.
- Nybohm H., Bartish I.V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers

- in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 2000;3(2):93-114. DOI 10.1078/1433-8319-00006.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.* 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Prinz K., Hensen I., Schie S., Debener T., Weising K. Microsatellite markers for the tetraploid halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dumort. (Chenopodiaceae) and cross-species amplification in related taxa. *Mol. Ecol. Resour.* 2009;9(4):1247-1249. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02620.x.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959.
- Qian C., Yin H., Shi Y., Zhao J., Yin C., Luo W., Dong Z., Chen G., Yan X., Wang X.-R., Ma X.-F. Population dynamics of *Agriophyllum squarrosum*, a pioneer annual plant endemic to mobile sand dunes, in response to global climate change. *Sci. Rep.* 2016;6(1):26613. DOI 10.1038/srep26613.
- Rachkovskaya E.I., Safronova I.N., Volkova E.A. Botanical geography of Kazakhstan and Middle Asia (desert region). St. Petersburg, 2003; 192-222. (in Russian).
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. URL <https://www.R-project.org/>
- Sampson J.F., Byrne M. Genetic diversity and multiple origins of polyploid *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). *Biol. J. Linn. Soc.* 2012;105(1):218-230. DOI 10.1111/j.1095-8312.2011.01787.x.
- Saqier Bao S., Han S., Ao W. Effects of *Agriophyllum squarrosum* extracts on glucose metabolism in KKAY mice and the associated underlying mechanisms. *J. Ethnopharmacol.* 2019;241:112009. DOI 10.1016/j.jep.2019.112009.
- Turuspekov Y., Genievskaya Y., Baibulatova A., Zatybekov A., Kothuhov Y., Ishmuratova M., Imanbayeva A., Abugalieva S. Phylogenetic taxonomy of *Artemisia* L. species from Kazakhstan based on *MatK* analyses. *Proc. Latv. Acad. Sci. B Nat. Exact Appl. Sci.* 2018; 72(1):29-37.
- Waples R.S., Gaggiotti O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 2006;15(6):1419-1439. DOI 10.1111/j.1365-294x.2006.02890.x.
- Wen-Ming B., Xue-Mei B., Ling-Hao L. Effects of *Agriophyllum squarrosum* seed banks on its colonization in a moving sand dune in Hunshandake Sand Land of China. *J. Arid. Environ.* 2004;59(1): 151-157. DOI 10.1016/j.jaridenv.2004.01.006.
- Yeh F., Yang R., Boyle T., Ye Z., Mao J. POPGEN Ver. 1.32. The user-friendly software for population genetic analysis. Alberta, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Center; Univ. of Alberta, 1997.
- Yuan M., Xiao H., Wang R., Duan Y., Cao Q. Effects of changes in precipitation pattern and of seaweed fertilizer addition on plant traits and biological soil crusts. *J. Appl. Phycol.* 2019;31(6):3791-3802. DOI 10.1007/s10811-019-01838-1.
- Zhang C., Sun M., Zhang X., Chen S., Nie G., Peng Y., Huang L., Ma X. AFLP-based genetic diversity of wild orchardgrass germplasm collections from Central Asia and Western China, and the relation to environmental factors. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195273. DOI 10.1371/journal.pone.0195273.
- Zhang J., Zhao P., Zhao J., Chen G. Synteny-based mapping of causal point mutations relevant to sand rice (*Agriophyllum squarrosum*) *trichomeless1* mutant by RNA-sequencing. *J. Plant Physiol.* 2018; 231:86-95. DOI 10.1016/j.jplph.2018.09.003.
- Zhao P., Capella-Gutiérrez S., Shi Y., Zhao X., Chen G., Gabaldón T., Ma X.-F. Transcriptomic analysis of a psammophyte food crop, sand rice (*Agriophyllum squarrosum*) and identification of candidate genes essential for sand dune adaptation. *BMC Genomics.* 2014;15: 872. DOI 10.1186/1471-2164-15-872.

#### ORCID ID

Y. Genievskaya [orcid.org/0000-0001-5987-2952](https://orcid.org/0000-0001-5987-2952)  
D. Karelova [orcid.org/0000-0002-2767-4350](https://orcid.org/0000-0002-2767-4350)  
S. Abugalieva [orcid.org/0000-0002-9748-507X](https://orcid.org/0000-0002-9748-507X)  
P. Zhao [orcid.org/0000-0003-4955-0989](https://orcid.org/0000-0003-4955-0989)  
G. Chen [orcid.org/0000-0002-3687-4012](https://orcid.org/0000-0002-3687-4012)  
Y. Turuspekov [orcid.org/0000-0001-8590-1745](https://orcid.org/0000-0001-8590-1745)

**Acknowledgements.** The research was supported by the project "Key techniques for sand dune stabilization and vegetation recovery in the typical regions of the countries along the Silk Road Economic Belt" (REF: 2016YFE0203400) granted by the Ministry of Science and Technology of China. The study was also supported by the project AP05131621 "Informational system for molecular genetic and botanical documentation of wild flora in Kazakhstan" granted by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

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

Received July 29, 2020. Revised September 1, 2020. Accepted September 10, 2020.

# Потенциально опасные для отечественного картофелеводства карантинные виды и патотипы нематод: изменчивость популяций и генетика устойчивости картофеля

Н.В. Мироненко<sup>1, 2</sup>, Т.А. Гавриленко<sup>2, 3</sup>, А.В. Хютти<sup>1, 2</sup>, О.С. Афанасенко<sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

 e-mail: olga.safan@gmail.com

**Аннотация.** Обзор посвящен проблеме потенциально опасных для отечественного картофелеводства карантинных видов и патотипов нематод. Картофель поражают более 30 видов паразитических нематод, однако в статье основное внимание уделено самым вредоносным, приносящим большой ущерб картофелеводству представителям родов *Globodera*, *Ditylenchus*, *Nacobbus* и *Meloidogyne*. Проанализированы фитопатологические и молекулярные методы идентификации видов и патотипов и основные достижения в изучении изменчивости популяций паразитических нематод картофеля. Показано, что, благодаря особенностям жизненного цикла нематод и лабильности их геномов, генетическая изменчивость этих организмов очень велика, что создает угрозу образования новых патогенных генотипов паразита. Сведения о внутри- и межпопуляционной изменчивости нематод важны для изучения путей интродукции и распространения отдельных видов, а также поиска корреляций молекулярных маркеров с определенным патотипом. Филогенетические исследования, основанные на современных данных по генетической изменчивости популяций, позволили выявить комплексы видов у *Globodera pallida* (Stone) Behrens и *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne & Allen (sensu lato), включающие криптические виды. К основным составляющим успешной защиты, предотвращающей массовое распространение паразитических нематод, относятся карантинные мероприятия, агротехнические приемы, биологические способы защиты и возделывание устойчивых сортов. Особое внимание в обзоре уделено вопросам селекции сортов картофеля с длительной устойчивостью к различным видам нематод, поскольку возделывание таких сортов – экологически наиболее безопасный и экономически выгодный способ предотвращения эпифитотий. В настоящее время достигнуты значительные успехи в генетической защите сортов картофеля, особенно в отношении цистообразующих нематод. Приведены сведения об источниках устойчивости картофеля к паразитическим нематодам, выделенных в коллекциях диких и культурных видов. Проанализированы данные об идентифицированных *R*-генах и QTL устойчивости, которые были интрогрессированы в селекционный материал с помощью различных методов и подходов. Представлены результаты изучения структурной и функциональной организации генов устойчивости к цистообразующим нематодам картофеля. Рассмотрены результаты исследований по использованию молекулярных маркеров определенных генов в маркер-опосредованной селекции для создания новых устойчивых сортов, в том числе с групповой устойчивостью.

Ключевые слова: картофель; паразитические нематоды; *Globodera*; *Ditylenchus*; *Nacobbus*; *Meloidogyne*; патотипы; изменчивость популяций; устойчивость сортов; гены устойчивости; QTL.

**Для цитирования:** Мироненко Н.В., Гавриленко Т.А., Хютти А.В., Афанасенко О.С. Потенциально опасные для отечественного картофелеводства карантинные виды и патотипы нематод: изменчивость популяций и генетика устойчивости картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):705-721. DOI 10.18699/VJ20.665

## Quarantine nematode species and pathotypes potentially dangerous for domestic potato production: populations diversity and the genetics of potato resistance

N.V. Mironenko<sup>1, 2</sup>, T.A. Gavrilenko<sup>2, 3</sup>, A.V. Khiutti<sup>1, 2</sup>, O.S. Afanasenko<sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

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

 e-mail: olga.safan@gmail.com

**Abstract.** The review considers quarantine species and nematode pathotypes potentially dangerous for domestic potato production. Potatoes are affected by more than 30 types of parasitic nematodes, but the review focuses on the most harmful representatives of genera that cause great damage to potato production: *Globodera*, *Ditylenchus*, *Nacob-*

*bus* and *Meloidogyne*. Phytopathological and molecular methods of identification of species and pathotypes and the main achievements in studying the population variability of parasitic potato nematodes were analyzed. It was shown that due to the peculiarities of the life cycle of nematodes and lability of their genomes, the genetic variability of these organisms is very high, which creates a threat of forming new pathogenic genotypes of the parasites. The information about the intra- and interpopulation variability of nematodes is important for studying the ways of introduction and distribution of separate species, as well as for searching for the correlations of molecular markers with the pathotype. Phylogenetic studies based on modern data on genetic variability of populations have allowed to reveal species complexes in *Globodera pallida* (Stone) Behrens and *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne & Allen (sensu lato), including cryptic species. The main components of successful protection preventing a wide distribution of parasitic nematodes are quarantine measures, agricultural techniques, biological methods of protection and cultivation of resistant cultivars. Special attention in the review is paid to the breeding of potato cultivars with durable resistance to various nematode pathotypes, because the cultivation of such varieties is the most ecologically safe and economically advantageous way to prevent epiphytotic. Currently, significant progress has been made in the genetic protection of potato cultivars, especially against cyst-forming nematodes. The review provides data on sources of potato resistance to parasitic nematodes identified in collections of wild and cultivated species. Data on identified R-gens and QTL of resistance that have been introduced into breeding varieties using different methods and approaches are analyzed. The literature data on the study of structural and functional organization of genes for resistance to potato cyst nematodes are given. The results of molecular research on revealing the polymorphisms of loci involved in the control of resistance to cyst and gall nematodes, the development of molecular markers of certain genes and their use in marker-assisted selection for developing of new resistant cultivars, including those with group resistance, are considered.

**Key words:** potato; parasitic nematodes; *Globodera*; *Ditylenchus*; *Nacobbus*; *Meloidogyne*; pathotypes; population variability; resistance cultivars; resistance genes; QTL.

**For citation:** Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Khiutti A.V., Afanasenko O.S. Quarantine nematode species and pathotypes potentially dangerous for domestic potato production: populations diversity and the genetics of potato resistance. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):705-721. DOI 10.18699/VJ20.665 (in Russian)

## Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из основных сельскохозяйственных культур и возделывается на более чем 19 млн га сельскохозяйственных угодий по всему миру с ежегодным производством более 390 млн тонн картофеля (FAOSTAT, 2019). По валовому сбору картофеля Российская Федерация занимает третье место в мире после Китая и Индии, и его среднегодовое производство в стране составляет примерно 29 млн тонн в год. Основной фактор, снижающий рентабельность возделывания картофеля, – болезни, способом контроля которых продолжают оставаться химические средства защиты. Возделывание сортов картофеля с длительной устойчивостью к болезням – экологически наиболее безопасный и экономически выгодный способ предотвращения эпифитотий.

Паразитические нематоды повсеместно приносят большой ущерб производству картофеля, ежегодные глобальные потери урожая от них составляют 10–15 % и оцениваются в 78 млрд долларов (Fábia et al., 2018). Картофель поражают 34 вида паразитических нематод, 6 из которых, по крайней мере, могут вызывать значительные потери урожая. Среди них распространенными во всех зонах возделывания картофеля и наиболее вредоносными являются цистообразующие картофельные нематоды (ЦКН) – золотистая картофельная нематода (ЗКН) *Globodera rostochiensis* (Woll.) и бледная картофельная нематода (БКН) *Globodera pallida* (Stone). Эти виды считаются объектами внешнего и внутреннего карантина и широко распространены на всех континентах: в Европе, Северной и Южной Америке, Азии, Африке, Океании (EPPO, 2020a, b), ЗКН распространена также и в Австралии (Blackett et al., 2019).

Кроме ЦКН, существенные потери урожая картофеля повсеместно могут вызывать карантинные, широкоспе-

циализированные виды нематод, на настоящий день отсутствующие на территории Российской Федерации. В соответствии с единым перечнем карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕАЭС) от 30 ноября 2016 г. № 158 с изменениями и дополнениями от 8 августа 2019 г. в перечень карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории ЕАЭС, входят: ложная галловая нематода *Nacobbus aberrans* (Thorne) (EPPO, 2019), колумбийская корневая галловая нематода *Meloidogyne chitwoodi* Golden et al., корневая галловая нематода *M. enterolobii* Golden et al. и ложная колумбийская галловая нематода *M. fallax* Karssen ([https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01413200/cncd\\_06032017\\_158](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01413200/cncd_06032017_158)). Стеблевая нематода картофеля *Ditylenchus destructor* (Thorne) относится к карантинным видам в Европейском союзе (список A2), но из-за широкого распространения в нашей стране входит в список A3 – регулируемых некарантинных вредных организмов на территории Российской Федерации (EPPO, 2019b; EPPO, 2020d; OEP/EPPO, 2017a).

Вопросы классификации видов паразитических картофельных нематод еще не приведены к единой системе. Согласно классификации, принятой EPPO (EPPO, 2000), виды нематод родов *Globodera*, *Ditylenchus*, *Nacobbus* и *Meloidogyne*, рассмотренных в этом обзоре, относятся к одному классу Chromadorea, и порядку Rhabditida, но к четырем различным семействам: Heteroderidae (виды: *Globodera rostochiensis*, *G. pallida* – цистообразующие нематоды), Anguinidae (*Ditylenchus destructor* – стеблевая нематода картофеля), Pratylenchidae (*Nacobbus aberrans* – ложная галловая нематода) и Meloidogynidae (*Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* – галловые нематоды). Кроме перечисленных видов рода *Meloidogyne*, рассматриваются также другие виды этого рода, сведения об устойчивости к которым видов рода *Solanum* имеются в литературе:

*M. javanica* (Treub, 1885), *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. arenaria* Chitwood (1949), *M. incognita* Kofoed & White, 1919.

В литературе обсуждается возможность существования криптических видов у ЦКН (Thevenoux et al., 2019) и видовых комплексов, как, например, у *G. pallida* (Subbotin et al., 2011) и *N. aberrans* (Cabrerá-Hidalgo et al., 2019). На филогенетическом древе, построенном на основании сходства нуклеотидных последовательностей малой субъединицы рДНК, филум *Nematoda* разделен на 12 клад, из которых 4 включают нематоды, паразитирующие на растениях. Наиболее вредоносные виды нематод, приводящие к значительным экономическим потерям в картофелеводстве, – представители четырех родов: *Meloidogyne* spp., *Globodera* spp., *Ditylenchus* spp. и *Nacobbus* spp., отнесены к кладе *Tylenchomorpha* (Holterman et al., 2006). Развитие исследований по таксономии паразитических нематод необходимо, прежде всего, для понимания эволюционных процессов в популяциях патогенов, связанных с решением проблемы генетической защиты. Например, в работе R. Thevenoux с коллегами (2019) показано, что генетические расстояния между географическими популяциями *G. pallida* на территории Перу могут свидетельствовать о дивергенции популяций с возможным образованием нового вида.

Составляющие успешной защиты, предотвращающей массовое распространение паразитических нематод, – это карантинные мероприятия и возделывание устойчивых сортов. Из существующих биологических способов защиты картофеля от паразитических нематод можно отметить использование растений-нехозяев, которые стимулируют выход личинок из яиц, но не являются субстратом для их размножения. Таким видом-ловушкой считается, например, *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) (Timmermans et al., 2006). В США (штат Айдахо) использование в качестве ловушки *S. sisymbriifolium* в трех очагах *G. pallida* позволило снизить жизнеспособность яиц на 95–100 % (Dandurand et al., 2019).

Сорта картофеля с устойчивостью к расширенному спектру патогенов более конкурентоспособны на рынке и обеспечивают получение экологически чистой продукции и сохранение окружающей среды. Последние два фактора имеют не только экономическое, но и существенное социальное значение.

Результатом длительной селекции картофеля на устойчивость как в нашей стране, так и за рубежом стала серия сортов, генетически защищенных от наиболее распространенных патотипов цистообразующих картофельных нематод. Например, в списке из 216 сортов картофеля, устойчивых к цистообразующим нематодам, одобренных для использования в ЕС, 213 защищены геном *H1*, детерминирующим устойчивость к наиболее распространенному, в том числе и на территории РФ, патотипу Ro1 ([https://lbt.dk/fileadmin/user\\_upload/NaturErhverv/Sortsliste\\_til\\_internetet\\_marts\\_2019.pdf](https://lbt.dk/fileadmin/user_upload/NaturErhverv/Sortsliste_til_internetet_marts_2019.pdf)). В России в Государственном реестре селекционных достижений зарегистрировано 455 сортов картофеля, 254 из них устойчивы к ЗКН, т.е. 55,8 % (Государственный реестр селекционных достижений, 2019). При этом необходимо учитывать опыт селекционных программ Великобритании, где во второй половине 20-го века преимущественно возделывались сорта

картофеля с геном *H1* устойчивости к ЗКН, что привело к замещению популяций *G. rostochiensis* на *G. pallida* (Evans, 1993).

Основная проблема селекции растений на устойчивость к болезням – высокая адаптивная изменчивость патогенов, приводящая к обязательной потере устойчивости при длительном возделывании сортов, защищенных одними и теми же генами, на больших площадях. В отношении ЦКН, и, в частности ЗКН, широкое использование устойчивых сортов, защищенных геном устойчивости *H1*, эффективным против распространенного патотипа Ro1, создает условия для адаптивной эволюции паразита и опасность появления новых патотипов. Не исключен и занос других патотипов ЦКН, а также вида *G. pallida* с семенным картофелем из Западной Европы. В настоящее время в РФ вид *G. rostochiensis* представлен исключительно одним патотипом, Ro1, а бледная нематода *G. pallida* до сих пор не обнаружена. Такая же ситуация существует в Австралии, где распространен только один вид *G. rostochiensis* и патотип Ro1, а *G. pallida* не обнаружен, что было доказано секвенированием ITS участков рибосомных генов (Faggian et al., 2012).

В наше время активно развиваются молекулярно-генетические методы видовой диагностики паразитических нематод, появились новые данные по механизмам изменчивости популяций цистообразующих и галловых нематод, что позволяет определить происхождение местных популяций патогена и прогнозировать их возможные адаптационные изменения к возделываемым сортам картофеля. Имеются успехи в разработке молекулярных маркеров генов устойчивости и создании сортов картофеля, генетически защищенных против разных патотипов и видов цистообразующих картофельных нематод. Все эти сведения необходимы для разработки стратегии эффективной генетической защиты против ЦКН в Российской Федерации.

В этом обзоре представлены последние достижения в изучении изменчивости популяций паразитических картофельных нематод, молекулярной диагностики, генетики устойчивости картофеля к нематодам, а также результаты селекции на устойчивость к потенциально опасным для России видам и патотипам цистообразующих и галловых нематод. В статье не затрагивались вопросы биологии фитопаразитических нематод, хозяино-паразитных отношений, особенностей патогенеза растений, биохимических факторов устойчивости растений и мер контроля вредоносности нематод, поскольку эти темы подробно анализировались в ряде иностранных обзоров (Sato et al., 2019; Abd-Elgawad, Askary, 2020; Holbein et al., 2020), а также в монографии по фитопаразитическим нематодам ([https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o\\_1781721#99](https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_1781721#99); Зиновьева и др., 2012).

### Цистообразующие нематоды

Центр происхождения ЦКН – регион Центральных Анд в Южной Америке (Evans et al., 1975; Plantard et al., 2008). Считается, что ЦКН попали в Европу из Южной Америки в середине 19-го века с селекционным материалом картофеля, а оттуда распространились по всему миру. Таким образом, Европа является вторичным центром

происхождения ЦКН (Evans, Rowe, 1998; Hockland et al., 2012; Boucher et al., 2013). На территории Российской Федерации широкое распространение получила ЗКН, которая встречается очагами в 7 федеральных округах 61 субъекта РФ на территории общей площадью около 1.8 млн га (Справочник..., 2017). По данным Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO), в настоящее время ЗКН распространена во всех странах Европы, в том числе и на территории сопредельных стран, таких как Беларусь, Латвия, Эстония, Литва, Украина, Грузия, Армения; на Азиатском континенте в Таджикистане, Японии и Индии (EPPO, 2020a, b). В РФ до настоящего времени БКН не обнаружена (Limantseva et al., 2014; Хютти и др., 2017). В то же время вид *G. pallida* широко встречается в Европе. По данным EPPO, *G. pallida* зарегистрирована во всех странах Европы, кроме Беларуси, Латвии, Литвы, Польши и Словакии ([https://gd.eppo.int/taxon/HETDPA/distribution/RU\\_ru](https://gd.eppo.int/taxon/HETDPA/distribution/RU_ru)). В Украине первое обнаружение *G. pallida* было отмечено в Ужгороде в 2005 г. (Pulyenko et al., 2005), но после карантинных мероприятий уже в 2014 г. в существующем очаге патоген не был выявлен, EPPO официально зафиксировала отсутствие этого вида для страны. В сопредельных с РФ Европейских государствах *G. pallida* была выявлена в 2018 и в 2019 гг. в Эстонии (NPPO of Estonia (2018-02, 2018-11, 2019-06)), а также в Норвегии и Финляндии (Holgado, Magnusson, 2012). На Азиатском континенте очаги БКН зафиксированы в Индии и Японии. В связи с большими объемами импорта как продовольственного, так и семенного картофеля в Россию в последние десятилетия существует потенциальная возможность заноса БКН на территорию страны.

Известны еще два вида ЦКН из рода *Globodera*, паразитирующие на картофеле. *G. leptonepia* (Cobb & Taylor) была обнаружена только однажды в партии картофеля из Южной Америки, но интенсивные поиски в районе Андского Нагорья, известного как центр происхождения ЦКН, не были успешными, таким образом, *G. leptonepia* – редкий и неизученный вид (Thevenoux et al., 2019). В 2008 г. в США в штатах Айдахо и Орегон обнаружены единичные цисты, которые по морфологической и молекулярной диагностике не соответствовали ни *G. rostochiensis*, ни *G. pallida* (Dandurand et al., 2019). Новый вид был определен как *Globodera ellingtonae* n.sp. (Handoo et al., 2012) и было показано, что картофель и томаты – его растения-хозяева (Skantar et al., 2011). Отсутствие сведений о распространении этого вида в других регионах мира, по-видимому, свидетельствует о наличии локальной эндемичной популяции на Северо-Американском континенте.

Цистообразующие картофельные нематоды – облигатные специализированные седентарные паразиты, для которых характерно наличие в жизненном цикле цист, содержащих яйца и инвазионные личинки. Потери урожая могут достигать более 80–90 % (OEPP/EPPO, 2017b). Основной диагностический признак *G. pallida* – окраска цист: в конце созревания они не приобретают золотистый цвет, как у *G. rostochiensis*, а остаются бледными. Цисты обоих видов могут выживать в почве без растений-хозяев до 10 лет (Sijmons, 1993; Williamson, Hussey, 1996), однако имеются данные о сохранении их жизнеспособности до

30 лет (Winslow, Willis, 1972). Максимальные потери урожая, ассоциированные с поражением ЦКН, определены в 80 % (Brodie, Mai, 1989), но при высокой инфекционной нагрузке ЦКН в почве урожай картофеля может быть полностью уничтожен (Whitehead, Turner, 1998). Четкие симптомы глободероза часто не заметны в период вегетации картофеля (Lilley et al., 2007). Вследствие этого потери урожая могут быть приписаны вторичным болезням, возникшим на уже зараженных нематодой ослабленных растениях картофеля.

Видовая диагностика с применением морфометрических и молекулярных методов широко применяется в практике карантина растений для идентификации видов ЦКН в обнаруженном очаге в посадках картофеля. Морфометрические методы диагностики достаточно подробно описаны в коллективной монографии (Зиновьева и др., 2012), а также в обзорах и методических указаниях (Шестеперов, 2002; Ryss, 2002; Bairwa et al., 2017; Christoforou et al., 2017; OEPP/EPPO, 2017b).

### Молекулярные методы идентификации видов ЦКН

Молекулярные методы идентификации видов нематод меняются параллельно с развитием базовых методов молекулярной генетики и зависят от конкретных задач исследователя. В последние годы молекулярную диагностику различных видов нематод проводят методами обычной ПЦР, ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР) и обратной ПЦР (ОТ-ПЦР). Во всех случаях обычно используют праймеры, разработанные к последовательностям участков кластера генов рибосомных РНК. Методы идентификации *G. rostochiensis* и *G. pallida*, основанные на рестриктивном анализе продуктов амплификации фрагментов ITS1 или ITS1+5.8S+ITS2 (Thiéry, Mugniery, 1996; Fleming et al., 1998), сменились более удобными методами ПЦР с видоспецифичными праймерами (Bulman, Marshall, 1997; Zouhar et al., 2000; Vejl et al., 2002).

В наших работах для молекулярной идентификации видов *G. rostochiensis* и *G. pallida* (Мироненко и др., 2013, 2015; Limantseva et al., 2014) применен метод мультиплексной ПЦР с двумя наборами видоспецифичных праймеров (Bulman, Marshall, 1997). Эти же праймеры используют другие авторы, например, для количественной ПЦР (Nakhla et al., 2010).

Для оценки эффективности методов деконтаминации растительного материала от ЦКН определяют жизнеспособность цист, применяя ОТ-ПЦР как индикатор экспрессии генов «домашнего хозяйства», например гена *gpd1*, кодирующего глицерол-3-фосфат-дегидрогеназу – одного из основных ферментов гликолиза (Kaemmerer, 2012). В этой работе виды нематод были определены предварительно по методу S.R. Bulman и J.W. Marshall (1997) с помощью стандартной ПЦР, так как ОТ-ПЦР не может быть использована для идентификации видов нематод, пока не будут обнаружены видоспецифичные гены, необходимые для выживания организма, аналогичные генам «домашнего хозяйства». Вероятно, полногеномное секвенирование обоих видов нематод (Cotton et al., 2014; Eves-van den Akker et al., 2016) сделает доступной информацию для выявления таких генов.

### Патотипы *G. rostochiensis* и *G. pallida*

Оба вида ЦКН могут быть классифицированы на патотипы на основании их реакций вирулентности/авирулентности на дифференцирующих тест-клонах картофеля с различными генами устойчивости (табл. 1) (Canto Saenz, De Scurrah, 1977; Kort et al., 1977). Для *G. rostochiensis* были определены пять патотипов, Ro1–Ro5; для *G. pallida* – три, Pa1–Pa3 (Kort et al., 1977).

В 1990 г. дифференциация популяций ЦКН была пересмотрена на основании нечетких различий между патотипами, определяемыми на данном наборе, что связано с различной жизнеспособностью инокулюма и наличием количественной частичной устойчивости, уровень которой трудно интерпретировать (Nijboer, Parlevliet, 1990). По мнению авторов, основанном на анализе литературы и собственных экспериментальных данных, возможно идентифицировать только три патотипа: Ro1 (бывшие Ro1 и Ro4), Ro3 (бывшие Ro2 и Ro3) и Ro5 (бывший Ro5). Клоны-дифференциаторы 60.21.19 и 65.346.19 различают только виды нематод, но не их патотипы. В отношении *G. pallida* Н. Nijboer и J.E. Parlevliet (1990) считают возможным характеризовать популяцию только как более или менее вирулентную, не выделяя патотипы. В то же время в Нидерландах в 1975 г. было отмечено обильное размножение БКН на сортах, устойчивых к патотипу Pa2. По реакции клон-дифференциатора (VTN) 62-33-3 изolat был отнесен к патотипу Pa3 (Dellaert, Vinke, 1987). Авторами показан различный уровень размножения патотипа Pa3 на разных генотипах картофеля.

По мнению Европейской и Средиземноморской организации по защите растений, термин «патотип» в отношении ЦКН считается слишком общим, и многие популяции, основываясь на Международной схеме по дифференциации (Kort et al., 1977), не могут быть адекватно идентифицированы и отнесены к тому или иному патотипу (ОЕПР/ЕРРО, 2017b). В настоящее время предлагается проводить изучение вирулентности местных популяций *G. rostochiensis* и *G. pallida* на наборах сортов, выращиваемых в той или иной стране, со следующими эталонными популяциями ЦКН: Ro1 Ecosse (INRA, Франция), Ro5 Harmerz (BBA, Германия), Pa1 Scottish (SASA, Великобритания) и Pa3 Chavornay (INRA, Франция). В связи с тем, что в селекции картофеля используются различные генетические источники устойчивости, вирулентность эталонных популяций ЦКН должна регулярно перепроверяться по отношению к этим наборам сортов. Точно так же, если в результате мониторинга будет обнаружено, что характеристики вирулентности популяций ЦКН нематод в Европе изменились, то эталонные популяции ЦКН следует пересмотреть (ОЕПР/ЕРРО, 2006, 2017b).

Во всем мире широко распространен патотип ЗКН Ro1, и, соответственно, большинство устойчивых к ЗКН сортов защищены эффективным против этого патотипа геном *H1*. Преодоление этого гена другими патотипами ЗКН зарегистрировано в Польше, где впервые в 2013 г. был выявлен патотип Ro5 (Przetakiewicz, 2013). В США в течение более 50 лет с момента первого обнаружения ЗКН ген *H1* оставался эффективным против распространенного патотипа Ro1. В 1995–1996 гг. на Лонг Айленде и в северной части штата Нью-Йорк на сортах, защищенных геном *H1*, было

**Таблица 1.** Дифференциаторы картофеля для определения патотипов ЦКН (Canto Saenz, De Scurrah, 1977; Kort et al., 1977)

Дифференцирующие тест-клоны картофеля	Патотипы
<i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> hybr. CPC 1673	Ro1,4
<i>S. kurtzianum</i> hybr. KTT/60.21.19	Ro1,2
<i>S. vernei</i> hybr. 58.1642/4	Ro1,2,3
<i>S. vernei</i> hybr. 62.33.3	Ro1,2,3,4; Pa1,2
<i>S. vernei</i> hybr. 65.346/19	Ro1,2,3,4,5
<i>S. multidissectum</i> hybr. P55/7	Pa1
<i>S. vernei</i> hybr. 69.1377/94	Ro1,2,3,4,5; Pa1,2,3

отмечено появление размножающейся популяции ЗКН, которая была определена как патотип Ro2 (Brodie, 1995; 1996). Интересно, что на обширных территориях, например в Российской Федерации и Австралии (Виктория), встречается только один вид, *G. rostochiensis*, и один патотип этого вида, Ro1 (Limantseva et al., 2014; Blacket et al., 2019).

Появление патотипа Pa2/3 *G. pallida* в США в штате Айдахо произошло в результате одной интродукции в 2006 г. Последующие интенсивные исследования показали распространение этого вида на полях общей площадью 369 га, в основном путем механического переноса инокулюма с сельскохозяйственной техникой. В связи с этим немедленно было введено эмбарго на импорт картофеля из этого штата традиционным партнерам в Канаду, Южную Корею и Мексику. Япония прекратила импорт картофеля из США (Dandurand et al., 2019). Таким образом, серьезный экономический ущерб от появления *G. pallida* на небольших площадях одного региона был связан главным образом с необходимыми карантинными ограничениями.

### Генетическая изменчивость популяций ЗКН и БКН

Цистообразующие картофельные нематоды группируются в патотипы согласно их способности размножаться на дифференциаторах (Canto Saenz, De Scurrah, 1977; Kort et al., 1977). Идентификация патотипа фитопатологическим методом занимает много времени, поэтому предпринимаются попытки найти молекулярные маркеры, способные идентифицировать патотипы. Однако до сих пор эти попытки были безуспешны.

В работах, посвященных изучению генетической изменчивости ЦКН, употребляется термин «популяция», которую рассматривают как вариант патотипа. Интересно, что разные популяции одного патотипа можно различить с использованием комбинации молекулярных маркеров, например гена-эффектора *rbp-1*, некодирующих участков ядерной (ITS регион) и митохондриальной (scmtDNA IV) ДНК (Hoolahan et al., 2012).

В этом плане представлял интерес результаты изучения нуклеотидного полиморфизма гена-эффектора *pel-2*, который у нематод рода *Globodera* кодирует эффекторную молекулу пектат-лиазу, участвующую в деградации кле-

точной стенки растения-хозяина. Однако наблюдаемый полиморфизм не был связан с определенным патотипом *G. rostochiensis* или *G. pallida*, хотя были выявлены видо-специфичные сайты (Geric Stare et al., 2011).

В качестве генетического маркера патотипов *G. pallida* рассматривают также ген-эффектор *Gp-Rbp-1* (Carpentier et al., 2012), который кодирует секретируемый белок, индуцирующий специфический, или эффектор-активированный иммунитет (effector-triggered immunity), опосредованный геном устойчивости *Gpa2 Solanum tuberosum*. Создана база данных из 158 полиморфных последовательностей гена *Gp-Rbp-1*, найдено 8 сайтов, которые находятся под контролем положительного естественного отбора. Из них только один сайт, P/S 187, подходит для объяснения узнавания *Gp-Rbp-1* геном *Gpa2* (Carpentier et al., 2012).

Данные, полученные при анализе внутри- и межпопуляционной изменчивости ЦКН, важны для оценки путей интродукции и распространения, а также поиска корреляций с патотипом. Для этого используют различные молекулярные маркеры – RAPD (Blok et al., 2006; Мироненко и др., 2015), AFLP (Folkertsma et al., 2001), SSR (Plantard et al., 2008; Boucher et al., 2013), SNP (Davis et al., 2005). Например, с помощью микросателлитных маркеров была оценена изменчивость популяций патотипа Ro1 *G. rostochiensis* в Австралии (штат Виктория). Показано большое сходство между австралийскими популяциями по частотам аллелей микросателлитных локусов и в то же время отличие их от других популяций, собранных по всему миру. Этот факт свидетельствует об одноразовом заносе ЗКН в Австралию, что дает возможность легко контролировать появление новых видов и патотипов нематод (Blacket et al., 2019).

В 2011 г. был разработан новый высокопроизводительный метод генотипирования GBS (genotyping-by-sequencing) (Elshire et al., 2011). Позднее был внедрен метод Pool-Seq, основанный на секвенировании ДНК сложных образцов, пулов, вместо индивидуумов (Futschik, Schlotterer, 2010). Среди ЦКН распространена полиандрия, т.е. множественное оплодотворение самки разными самцами (Turner, Rowe, 2006), поэтому одна циста может содержать несколько сотен генетически различных яиц. Именно пулы цист (по 15 цист) нематод были объектом исследования с помощью комбинации подходов Pool-Seq и GBS, что позволило изучить отношения между 23 популяциями *G. rostochiensis* из девяти стран, представляющими пять патотипов (Mimee et al., 2015). На филогенетическом древе, построенном для 23 популяций на основании частот аллелей для 604 SNP-локусов, популяции сгруппировались по генетическому сходству и патотипному составу в два кластера: Ro1, Ro2 и Ro3, Ro4, Ro5. Отмечено большое генетическое сходство двух популяций ЗКН из США, относящихся к разным патотипам (Ro1 и Ro2). Авторы считают, что из-за длительного использования устойчивых сортов картофеля с геном *H1* развитие вирулентной популяции (Ro2) может быть результатом недавней мутации, а не интродукции нового патотипа ЗКН (Mimee et al., 2015).

Возможно, в ближайшее время будет разработан новый подход к молекулярной диагностике патотипов Ro1 и Ro2, основанный на использовании результатов полно-

геномного секвенирования множественных линий Ro1 и Ro2, полученных из одной цисты, и выявлении однонуклеотидных полиморфизмов (Dandurand et al., 2019).

Данные литературы по генотипированию популяций нематод с помощью молекулярных маркеров показывают, что один патотип может объединять популяции нематод, различающиеся не только по географическому происхождению, но и генетическим параметрам изменчивости. Например, с использованием комбинации методов Pool-Seq и GBS были получены сведения о генетическом разнообразии популяций, на основании которых рассчитаны индексы фиксации (Fst) при попарном сравнении популяций *G. rostochiensis*. Так, патотип Ro1 был представлен в работе 14 популяциями из девяти стран: минимальное значение, Fst = 0.04, получено при сравнении популяций из Германии и Бельгии, а максимальное, Fst = 0.43, – для популяций из США и Канады. Можно предполагать, что на фоне такой высокой генетической изменчивости высока вероятность адаптивной эволюции, приводящей к образованию новых патотипов (Mimee et al., 2015).

Адаптация паразита к генотипам хозяина, защищенным эффективными генами устойчивости, может быть связана со сниженной фитностью на восприимчивых сортах. «Цена» новой вирулентности состоит в том, что клоны с такой вирулентностью становятся менее агрессивны на сортах с отсутствием комплементарного гена устойчивости, т.е. на восприимчивых сортах. Вследствие этого снижается конкурентоспособность таких особей в природных популяциях паразитов. Такие факты приведены в обзоре (Laine, Barres, 2013) для грибов, оомицетов, вирусов и нематод, в частности *Meloidogyne incognita* (Castagnone-Sereno et al., 2007). На примере *G. pallida* была показана адаптация паразита после 8–10 пассажей на сорте картофеля Iledher с QTL устойчивости *GpaV<sub>vir</sub>*, интрогрессированным от *Solanum vernei* и картированным на хромосоме V (Fournet et al., 2013). Авторы пришли к неожиданному выводу об увеличении фитности линий с новой вирулентностью на восприимчивом сорте Desiree, которая выражалась в формировании увеличенных по размеру цист, содержащих большее количество личинок, и в сокращении времени образования личинок из яиц. Поскольку эти данные были получены в лабораторных условиях, то, безусловно, требуется подтверждение такого сценария адаптации *G. pallida* в условиях природных популяций.

Для понимания эволюционной истории *G. pallida* проведены обширные сборы популяций ЦКН на картофельных полях Перу (Picard et al., 2004). Сорок две перуанские популяции *G. pallida* были проанализированы с использованием восьми микросателлитных маркеров. Популяции разделились на южные и северные и образовали пять кластеров. Большое генетическое разнообразие выявлено на юге Перу. В связи с этим была выдвинута идея о том, что процессы горообразования в Андах вызвали множество адаптивных изменений у нематод и стимулировали процесс видообразования у представителей рода *Globodera* (Grenier et al., 2010). Эти исследования были продолжены на более широком материале перуанских популяций *G. pallida*. Были генотипированы 117 популяций с использованием данных секвенирования гена *cathepsin L*, уча-

ствующего в процессе питания нематоды и включающего 12 интронов, и нового набора из 13 микросателлитных локусов (Thevenoux et al., 2019). В результате было выявлено гораздо большее генетическое разнообразие популяций, которые были структурированы в шесть групп: 1a, 1b, 2, 3, 4 и “pallida Chilean type”. Оказалось, что генетические расстояния между популяциями *G. pallida* объясняются не только географическим фактором, но и климатическими условиями, а также типом почвы. Показано, что длина продукта амплификации гена *cathepsin L* служит диагностическим видоспецифичным маркером для видов *G. rostochiensis*, *G. pallida* и *G. ellingtonae*. Изоляты групп 1, 2 и 3 имеют один и тот же аллель гена *cathepsin L*, что свидетельствует об их генетической близости и позволяет считать их популяциями одного вида. Популяции группы 4 и группы *pallida Chilean type* могут считаться криптическими видами внутри видового комплекса *G. pallida*. О генетической отдаленности группы 4 от остальных говорит факт обнаружения у изолятов этой группы уникальной аллели гена *cathepsin L*. О дивергенции группы *pallida Chilean type* свидетельствуют высокие значения *Fst* при сравнении с *G. pallida*, которые были выше 0.5, что сравнимо для *Fst* между перуанскими *G. rostochiensis* и *G. pallida* (=0.58) и *G. pallida* и *G. mexicana* (=0.48) (Thevenoux et al., 2019).

### Генетика устойчивости картофеля к цистообразующим нематодам и перспективы селекции

***G. rostochiensis* (ЗКН).** Источниками устойчивости картофеля к различным патотипам ЗКН и БКН служат многие южноамериканские и мексиканские виды картофеля (Castelli et al., 2003; Nunziata et al., 2010; Dalamu et al., 2012). У ряда устойчивых образцов культурных и близкородственных диких видов картофеля было идентифицировано около 25 генетических факторов, детерминирующих устойчивость к ЦКН: *R*-гены, обеспечивающие реакцию сверхчувствительности (*HI*, *Gpa2*) или конститутивно экспрессирующиеся во всех тканях растения (*Grol-4*), и локусы количественных признаков (QTL), вовлеченные в контроль длительной олиго- и полигенной устойчивости либо в контроль частичной устойчивости к одному или нескольким патотипам одного из видов нематод (табл. 2). Идентифицированы также два QTL, вовлеченные в контроль частичной групповой устойчивости к разным видам ЦКН, оба картированы на хромосоме V в одном и том же кластере: *Grp1*\_QTL, определяющий устойчивость картофеля к патотипу Ro5 ЗКН и к патотипам Pa2/3 БКН (Finkers-Tomczak et al., 2009, 2011), и *Ro2\_A* QTL устойчивости к патотипу Ro2 ЗКН и к патотипам Pa2/3 БКН (Park et al., 2019).

Гены, контролирующие устойчивость к наиболее распространенным патотипам ЦКН, были клонированы и секвенированы: ген *Gpa2* устойчивости к патотипам Pa2 и Pa3 БКН (Roupre van der Voort et al., 1997; Van der Vossen et al., 2000), *Grol-4*, определяющий специфическую устойчивость растений к патотипу Ro1 ЗКН, входящий в сложный кластер генов семейства *Grol* (Paal et al., 2004), и ген *HI* устойчивости к патотипам Ro1/Ro4 ЗКН (Finkers-Tomczak et al., 2011). Выявлена сложная структура

этих локусов, содержащих как полноразмерные, так и дефектные копии гомологов *R*-генов, – *RGH* (resistance gene homologues). Продукты этих генов относятся к разным классам рецепторных белков, взаимодействующих с эффекторами патогена. Так, ген *Gpa2* кодирует белок семейства LZ-NBS-LRR (Van der Vossen et al., 2000), *HI* – белок семейства CC-NB-LRR (Finkers-Tomczak et al., 2011), а *Grol-4* – структурно отличный белок, относящийся к семейству TIR-NB-LRR с дополнительным TIR-доменом, гомологичным Toll-подобному рецептору, активирующему IL-1 (Paal et al., 2004).

Для детекции у растений функциональных аллелей *R*-генов устойчивости к ЦКН, а также локусов количественных признаков, контролирующих частичную устойчивость к глободерозам, разработаны многочисленные ДНК-маркеры, которые широко применяются в маркеропосредованной селекции (MAS) (Dalamu et al., 2012; Хютти и др., 2017), а также мультиплексные системы (Asano et al., 2012), позволяющие существенно повысить эффективность селекционно-генетических программ по созданию устойчивых к ЦКН сортов картофеля.

Как упоминалось выше, наиболее часто нематодоустойчивые сорта защищены доминантным аллелем гена *HI*, сохраняющим уже более 50 лет свою эффективность против наиболее распространенного патотипа ЗКН Ro1 (Ellenby, 1954; Gebhardt et al., 1993). Сорта с генами *Grol-4*, или *GroV1*, или с QTL-локусами серии *Grol* также проявляют устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* (см. табл. 2). В то же время в сортименте сортов и селекционных клонов разных стран частота встречаемости образцов с этими генами различна. Так, по данным польских коллег, 77 % из 61 протестированных зарубежных сортов обладали маркерами гена *HI* и 28 % – маркером гена *Grol-4*, причем результаты молекулярного скрининга коррелировали с данными фитопатологических тестов (Milczarek et al., 2011). Из 812 сортов и селекционных клонов японского селекцентра NARO (Хоккайдо) у 33 % образцов были выявлены маркеры гена *HI*, в то же время ни один из протестированных образцов не обладал маркером гена *Grol-4* (Asano et al., 2012). Аналогично в выборке из 58 селекционных клонов индийской селекции около 60 % генотипов имели маркеры гена *HI*, а генотипов с маркером гена *Grol-4* не обнаружено (Sudha et al., 2016, 2019). При этом около 20 % из 217 протестированных образцов коллекции UACH Университета Южного Чили оказались MAS-позитивными в скрининге с маркером гена *Grol-4* (López et al., 2015). Согласно суммарным результатам молекулярного скрининга 225 российских сортов картофеля и сортов ближнего зарубежья (114 из которых входят в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ), от 2 до 5 маркеров гена *HI* были выявлены у 28 % изученных сортов, а маркеры гена *Grol-4* – лишь у 2 % (Антонова и др., 2016; Клименко и др., 2017; Гавриленко и др., 2018). Очевидно, что в селекционных программах разных стран использованы разные доноры *R*-генов устойчивости к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*. В цитированных выше работах описано различное число маркеров, но в большинстве случаев в наборы входили и наиболее информативные из них: *Gro1-4-1* гена *Grol-4*, а также маркеры TG689 и 57R гена *HI*.

**Таблица 2.** Гены и QTL, детерминирующие устойчивость к различным патотипам цистообразующих и галловых нематод, идентифицированные у культурных и диких видов картофеля

Вид паразитических нематод	Патотип	Дикие и культурные виды – источники устойчивости к нематодозам	Гены и QTL (хромосомная локализация)	Лит. источник
<b>Цистообразующие картофельные нематоды</b>				
Золотистая картофельная нематода <i>Globodera rostochiensis</i>	Ro1	<i>S. spagazzinii</i>	<b>Gro1-4</b> (VII)	Paal et al., 2004; Gebhardt et al., 2006
	Ro1	<i>S. spagazzinii</i>	QTL <i>Gro</i> <sub>1,2</sub> (X) QTL <i>Gro</i> <sub>1,3</sub> (XI) QTL <i>Gro</i> <sub>1,4</sub> (III)	Kreike et al., 1993, 1996
		<i>S. vernei</i>	<i>GroV1</i> (V)	Jacobs et al., 1996
	Ro2	<i>S. canasense</i> , <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	–	Nunziata et al., 2010
	Ro2	Селекционные клоны, в родословных которых участвовали <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> и/или <i>S. vernei</i>	<i>Ro2_A</i> QTL (V) <i>Ro2_B</i> QTL (V)	Park et al., 2019
	Ro5	Межвидовые гибриды <i>S. tuberosum</i> с <i>S. vernei</i> , <i>S. oplocense</i> , ssp. <i>andigena</i>	<i>Grp1_QTL</i> (V)	Roupe van der Voort et al., 1998; Finkers-Tomczak et al., 2009
	Ro1, 5	<i>S. spagazzinii</i>	<i>Gro1</i> (VII)	Barone et al., 1990; Paal et al., 2004
	Ro1, Ro4	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	<b>H1</b> (V)	Ellenby, 1952; Ross, 1979; Gebhardt et al., 1993; Bakker et al., 2004; Finkers-Tomczak et al., 2011
Бледная картофельная нематода <i>Globodera pallida</i>	Pa1	<i>S. multidissectum</i>	<b>H2</b> (V)	Dunnett, 1960; Strachan et al., 2019
	Pa3	<i>S. tarijense</i>	<i>Gpa3_QTL</i> (XI)	Wolters et al., 1998
	Pa3	<i>S. tarijense</i>	<i>GpaIV<sub>tar</sub><sup>I</sup>_QTL</i> (XI)	Tan et al., 2009
	Pa2/Pa3	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	<b>H3</b> (IV)	Howard et al., 1970; Bradshaw et al., 1998
		<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	<b>Gpa2</b> (XII)	Roupe Van der Voort et al., 1997; Van der Vossen et al., 2000
		<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	<i>GpaV<sub>adg</sub><sup>S</sup></i> (IV)	Moloney et al., 2010
		<i>S. sparsipilum</i>	<i>GpaV<sub>spl</sub><sup>S</sup>_QTL</i> (V)	Caromel et al., 2005
		<i>S. sparsipilum</i>	<i>GpaXI<sub>spl</sub><sup>S</sup>_QTL</i>	Caromel et al., 2005
		<i>S. spagazzinii</i>	<i>Gpa_QTL</i>	Kreike et al., 1994
		<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	<i>Gpa</i> (IV)	Bradshaw et al., 1998
		<i>S. sparsipilum</i>	<i>Gpa4_QTL</i> (V)	Wolters et al., 1998
		Межвидовые гибриды <i>S. tuberosum</i> с <i>S. vernei</i> , <i>S. oplocense</i> , ssp. <i>andigena</i>	<i>Gpa5_QTL</i> (V), <i>Gpa6_QTL</i> (IX)	Roupe van der Voort et al., 2000; Bryan et al., 2002
		<i>S. spagazzinii</i>	<i>GpaM1_QTL</i> (V) <i>GpaM2_QTL</i> (VI) <i>GpaM3_QTL</i> (XII)	Caromel et al., 2003
		<i>S. vernei</i>	<i>GpaV<sub>ym</sub>_QTL</i> (V)	Sattarzadeh et al., 2006
		Селекционные клоны, в родословных которых участвовали <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> и/или <i>S. vernei</i>	<i>Ro2_A</i> QTL (V)	Park et al., 2019
	Межвидовые гибриды <i>S. tuberosum</i> с <i>S. vernei</i> , <i>S. oplocense</i> , ssp. <i>andigena</i>	<i>Grp1_QTL</i> (V)	Roupe van der Voort et al., 1998; Finkers-Tomczak et al., 2009	

**Окончание табл. 2**

Вид паразитических нематод	Патотип	Дикие и культурные виды – источники устойчивости к нематодам	Гены и QTL (хромосомная локализация)	Лит. источник
<b>Галловые нематоды</b>				
Колумбийская галловая корневая нематода <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	Расы 1, 2	<i>S. bulbocastanum</i>	<i>R<sub>Mc1(blb)</sub></i> (XI) [ <i>RMc1</i> ]	Brown et al., 1996
		<i>S. fendleri</i>	<i>R<sub>Mc1(fen)</sub></i> (XI)	Draaistra, 2006
		<i>S. hougasii</i>	<i>R<sub>Mc1(hou)</sub></i> (XI)	Brown et al., 1999, 2003
Галловая северная нематода <i>Meloidogyne hapla</i>		<i>S. tarijense</i>	<i>R<sub>Mh-tar</sub></i> _QTL (VII)	Draaistra, 2006
		<i>S. chacoense</i>	<i>R<sub>Mh-chcA</sub></i> _QTL, <i>R<sub>Mh-chcB</sub></i> _QTL	
<i>Meloidogyne fallax</i>		<i>S. chacoense</i>	<i>R<sub>Mf-chc</sub></i>	
		<i>S. fendleri</i>	<i>R<sub>Mc1(fen)</sub></i> (XI)	
<i>M. arenaria</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>		Гибриды <i>S. tuberosum</i> с <i>S. sparsipilum</i>	<i>Mh</i>	Berthou et al., 2003

Примечание. Жирным шрифтом обозначены гены, которые были клонированы и секвенированы.

**G. pallida (БКН).** Источники устойчивости картофеля к патотипам Pa2/P3 БКН достаточно широко использованы в селекции. Так, маркеры гена *Gpa2* выявлены у 17.5 % образцов выборки из 812 сортов и селекционных клонов японского селекцентра NARO, (Asano et al., 2012); маркеры гена *Gpa2* и/или *Gpa5*\_QTL детектированы у устойчивых к БКН зарубежных сортов и отсутствовали у восприимчивых (Milczarek et al., 2011). Из 66 клонов индийской селекции примерно у половины были детектированы маркеры локусов *GPaV<sub>vrn</sub>*\_QTL и *Gpa5*\_QTL устойчивости к Pa2/3 БКН, причем почти все MAS-позитивные генотипы были фенотипически устойчивы к БКН (Sudha et al., 2019). Целенаправленный поиск источников устойчивости к *G. pallida* в нашей стране до последнего времени фактически не проводился, поскольку этот патоген в России не обнаружен. С использованием аллель-специфичного маркера гена *Gpa2* среди 193 отечественных сортов выявлено 24 (12.4 %) MAS-позитивных – потенциальных источников устойчивости к БКН (Гавриленко и др., 2018; Клименко и др., 2019). Особый интерес для последующих селекционных работ, направленных на пирамидирование генов устойчивости к разным вредным организмам, представляют сорта, сочетающие маркеры генов *Gpa2* и *H1* устойчивости к обоим видам цистообразующих нематод – *G. pallida* и *G. rostochiensis*.

Сорта и селекционные клоны картофеля, устойчивые к *G. rostochiensis*, несущие доминантный аллель гена *H1* устойчивости к патотипам Ro1/4, поражаются другими патотипами ЗКН (Brodie, 1995, 1996; Przetakiewicz, 2013), известно также, что растения с маркерами локуса *Gpa5* поражаются ЗКН (Sudha et al., 2019). В связи с этим в последнее десятилетие усилия исследователей разных стран направлены на поиск источников групповой устойчивости к глободерозам. С этой целью проведены фитопатологические тесты, по результатам которых среди образцов диких (*S. kurtzianum*, *S. sparsipilum*, *S. vernei*) и культурных видов (*S. stenotomum*) были отобраны источники устойчивости ко всем известным патотипам *G. rostochiensis*

(Ro1–Ro5) и *G. pallida* (Pa1–Pa3) (Dalamu et al., 2012). Такие источники групповой устойчивости были также выделены в различных комбинациях межсортовых скрещиваний (Przetakiewicz et al., 2017). В селекционных программах США удалось отобрать пять селекционных клонов, одновременно устойчивых к трем видам цистообразующих картофельных нематод: *G. rostochiensis* (Ro1 и Ro4), *G. pallida* и *G. ellingtonae* (Whitworth et al., 2018). Интересно отметить, что большая часть генотипов, устойчивых и к *G. rostochiensis* (Ro1 и Ro4), и к *G. ellingtonae*, обладали маркерами локуса *H1*, что позволило авторам предположить наличие у этих клонов нового локуса, тесно сцепленного с *H1*, детерминирующего устойчивость картофеля к *G. ellingtonae* (Whitworth et al., 2018).

В европейской базе данных по сортам картофеля (The European Cultivated Potato Database, ECPD) приведены списки большого количества сортов с устойчивостью к различным патотипам цистообразующих картофельных нематод.

**Галловые нематоды**

Известно более 90 видов галловых нематод из рода *Meloidogyne* – широко специализированных патогенов, поражающих более 2000 видов растений, в том числе картофель (Hunt et al., 2009; Moens et al., 2009). Наибольший ущерб картофелеводству галловые нематоды наносят в районах тропического и субтропического климата (Lima et al., 2018). Благоприятными для развития большинства видов рода *Meloidogyne* являются условия повышенной температуры, наличие ирригации и легкая песчаная почва (Jones et al., 2017). В таких условиях потери от поражения галловыми нематодами, например такими, как *M. javanica* и *M. incognita*, могут составлять 100 %. В регионах с умеренным климатом, таких как Европа и Северная Америка, распространенный и вредоносный на картофеле вид – колумбийская галловая корневая нематода – *M. chitwoodi*. Этот вид может поражать картофель при температуре ниже 6 °C (Jones et al., 2017).

Галловые нематоды – эндопаразиты. Инфекционными являются личинки второй стадии развития, которые, вылупившись из яиц, передвигаются в почве и находят корни растения, а далее с использованием стилета и набора энзимов, проникают в клетки корня и начинают питаться. В результате гипертрофии и гиперплазии соседних клеток образуются гигантские клетки, в которых происходят еще три линьки. Половозрелая самка откладывает в среднем 400–500 яиц между клетками кортикальной паренхимы или на поверхности корней. Первая линька личинок происходит внутри яйца, после чего появляется инфекционная личинка второго возраста. Взрослые самцы не паразитируют на растении, они выходят в почву и погибают (Lima et al., 2018). Пораженные растения картофеля – низкорослые, хлоротичные, с бурыми пятнами на листьях и гнилью клубней.

Для галловых нематод характерны различные типы размножения: от классического амфимиксиса до митотического партеногенеза. Для партеногенетических видов *Meloidogyne*, к которым относятся *M. chitwoodi*, *M. javanica* и *M. incognita*, не подходит концепция биологического вида. Идентификация видов построена на определении морфологических признаков и поддержана биохимическими данными, основанными на изоферментном анализе (Dalmasso, Berge, 1978). Для применения этих методов требуются зрелые самки. Последние 30 лет разрабатывали методы молекулярной диагностики галловых нематод на основе ДНК полиморфизмов рибосомной и митохондриальной ДНК и анонимных локусов, таких как RFLP, RAPD и AFLP (Human, Powers, 1991; Powers, 2004). Источниками ДНК в этом случае могут быть яйца, личинки или взрослые особи. В настоящее время методы диагностики галловых нематод, как и других, основаны на ПЦР с видоспецифичными праймерами, например для *M. incognita* и *M. javanica* (Donkers-Venne et al., 2000; Dong et al., 2001), *M. chitwoodi* и *M. fallax* (Wishart et al., 2002).

### Генетика устойчивости картофеля к галловым нематодам и перспективы селекции

На сегодняшний день устойчивые к галловым нематодам селекционные сорта картофеля еще не выведены, однако источники устойчивости к разным видам рода *Meloidogyne* были выделены среди диких видов, на их основе создаются перспективные селекционные клоны и исследуется генетика устойчивости картофеля к этим видам паразитических нематод. Так, в результате фитопатологического скрининга на устойчивость к галловым нематодам более 5000 индивидуальных растений 64 диких видов картофеля показано, что устойчивые к *M. chitwoodi* и *M. fallax* образцы встречаются в основном среди центрально- и североамериканских видов (Janssen et al., 1996), у которых был установлен моногенный контроль устойчивости (Brown et al., 1989, 1991). Многие диплоидные виды этих регионов принадлежат к третичному генпулу и из-за барьеров презиготической несовместимости не могут скрещиваться с *S. tuberosum*. Интрогрессия гена  $R_{Mc1(blb)}$ , обеспечивающего резистентность диплоидного мексиканского вида *S. bulbocastanum* к расам 1 и 2 колумбийской галловой корневого нематоды *M. chitwoodi*, была осуществлена с помощью межвидовой соматической

гибридизации с *S. tuberosum*. В результате косегрегационного анализа популяций, полученных в возвратных скрещиваниях этих соматических гибридов, проведенного с использованием хромосомспецифичных RFLP-маркеров, ген  $R_{Mc1(blb)}$  был картирован на хромосоме XI (Brown et al., 1996).

Ортологичные гены устойчивости к *M. chitwoodi* –  $R_{Mc1(fen)}$  и  $R_{Mc1(hou)}$  – идентифицированы у аллополиплоидных мексиканских видов *Solanum hougasii* и *S. fendleri* (Brown et al., 1999, 2003, 2009; Draaistra, 2006) (см. табл. 2). В серии работ С.Р. Brown с коллегами (1996, 1999, 2003, 2009, 2014; Zhang et al., 2007) получены интрогрессивные формы картофеля поколений BC<sub>5</sub>–BC<sub>6</sub> с генами  $R_{Mc1(blb)}$ ,  $R_{Mc1(fen)}$  и  $R_{Mc1(hou)}$  диких мексиканских видов, а также разработаны сцепленные с ними STS- и CAPS-маркеры для проведения маркер-опосредованной селекции. Устойчивость интрогрессивных форм обусловлена генерацией активных форм кислорода и активацией защитных механизмов, в которых центральную роль играет салициловая кислота. Она запускает реакции сверхчувствительности и каскада физиологических и биохимических реакций, предотвращающих развитие *M. chitwoodi* в корнях растений (Bali et al., 2019). Важно отметить, что клоны с идентифицированным геном  $R_{Mc1(fen)}$  устойчивости к *M. chitwoodi* одновременно обладали и устойчивостью к *M. fallax* (Draaistra, 2006).

Среди южноамериканских диких видов картофеля образцов, устойчивых к *M. chitwoodi* и к *M. fallax*, не обнаружено, за исключением единичных образцов у трех видов: *S. berthaultii*, *S. chacoense*, *S. gourlayi*. По результатам AFLP-анализа гибридной популяции *S. tuberosum* × *S. chacoense*, был идентифицирован QTL *RMf-chc* устойчивости к *M. fallax* (Draaistra, 2006).

Многочисленные источники устойчивости к северной галловой нематоде *M. hapla* были отобраны среди как северо-, так и южноамериканских видов (Janssen et al., 1996). Постзиготическая несовместимость, проявляющаяся в большинстве комбинаций межвидовых скрещиваний диких видов Южной Америки с *S. tuberosum*, относительно легко преодолевалась использованием дигаметоидов сортов картофеля или экспериментальных полиплоидов диких диплоидных видов для достижения значений «эффективной плоидности» (EBN), а также подбором совместимых комбинаций скрещиваний (Гавриленко, Ермишин, 2017).

Таким образом, устойчивые к *M. hapla* образцы диких видов Южной Америки относительно легко вовлекались в гибридизацию с *S. tuberosum*; расщепляющиеся гибридные популяции использовали для картирования локусов, обуславливающих частичную устойчивость к *M. hapla* (Draaistra, 2006). В этой работе на хромосоме VII был картирован  $R_{Mh-tar}$ -QTL дикого аргентинского вида *S. tarijense*, два других QTL,  $R_{Mh-chc}^A$  и  $R_{Mh-chc}^B$ , так и не удалось картировать из-за нарушений коллинеарности хромосом *S. chacoense* и *S. tuberosum*, однако были отобраны AFLP-маркеры, ассоциированные с локусами устойчивости к северной галловой нематоде (Draaistra, 2006) (см. табл. 2).

Важным практическим результатом работ по картированию *R*-генов и QTL устойчивости картофеля к галло-

вым нематодам считается разработка сцепленных с ними ДНК-маркеров (Roupe van der Voort et al., 1999; Draaistra, 2006), которые применяются в маркер-опосредованной селекции. Следует отметить, что первые результаты исследований по пирамидированию  $R_{Mh-cha}$ -QTL и  $R_{Mh-tar}$ -QTL оказались нерезультативными, поскольку среди клонов, отобранных в MAS, не выявлено устойчивых к *M. hapla* (Tan et al., 2009). Исследования, направленные на поиск эффективных комбинаций QTL-локусов и *R*-генов для создания высокоустойчивых к галловым нематодам генотипов, продолжаются.

В работе F. Berthou с коллегами (2003) изучен характер наследования устойчивости к различным видам галловых нематод гибридов ди- и тетраплоидных культурных видов картофеля с близкородственным южноамериканским видом *S. sparsipilum*. Результаты анализа девяти гибридных комбинаций (из  $F_1$ ,  $F_2$  и возвратных скрещиваний) позволили установить моногенную устойчивость к трем видам галловых нематод, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, обусловленную доминантным аллелем гена *Mh* (см. табл. 2). Вместе с тем отобранные устойчивые генотипы поражались *M. mayaguensis*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*. Важно отметить, что устойчивость гибридов, определяемая геном *Mh*, существенно снижается при повышении температуры от 24 до 29 °C (Berthou et al., 2003), что необходимо учитывать при проведении фитопатологических тестов в регионах с тропическим и субтропическим климатом, где широко распространены галловые нематоды.

## Виды паразитических нематод картофеля, генетика устойчивости к которым не изучена

**Стеблевая нематода картофеля *Ditylenchus destructor* (Nematoda, Tylenchida)** – широко распространенные виды в регионах с умеренным климатом в Европе, в том числе в России, Северной Америке, Азии, Океании и Южной Африке (Mai et al., 1990; Шестеперов и др., 2006, 2010; Sigareva et al., 2012; ОЕПП/ЕРРО, 2017а).

Вредоносность стеблевой нематоды картофеля *D. destructor* состоит в повреждении клубней, которые покрываются растрескивающимися темными пятнами, при этом симптомы поражения надземной части растения отсутствуют. Весь жизненный цикл нематод длится около шести дней и проходит в клубнях картофеля, в которые они проникают через кожуру около глазков, питаясь крахмальными зернами (Mai et al., 1990).

Стеблевая нематода *D. dipsaci* поражает стебли, столоны и клубни картофеля. На клубнях образуются серовато-бурые пятна, растение отстает в росте. Пораженные стебли изгибаются и становятся вздутыми. Источник инфекции – пораженные клубни (Lima et al., 2018). Многочисленные исследования генетической изменчивости популяций *D. dipsaci* показали, что этот вид фактически является комплексом видов (Subbotin et al., 2005). Для идентификации видов *Ditylenchus* были разработаны видоспецифичные универсальные праймеры к последовательностям генов и спейсерным участкам генов рибосомального кластера, дававшие в ПЦР специфический продукт амплификации: *D. destructor* – 1200 п. о., *D. dipsaci* и *D. myceliophagus* – 900 п. о. (Vrain et al., 1992). Для идентификации

нормальной и гигантской рас *D. dipsaci* использовали ПЦР с применением SCAR-праймеров (Esquibet et al., 2003); праймеры на 5.8S рДНК были разработаны для молекулярной диагностики *D. destructor* (Marek et al., 2005). Протоколы по молекулярной диагностике подробно описаны ЕРРО – European and Mediterranean Plant Protection Organization (ОЕПП/ЕРРО, 2017а). Видоспецифичные праймеры на ITS-участки были использованы для идентификации *D. destructor* в Московской области (Mahmoudi et al., 2019). В литературе были сообщения об устойчивых и толерантных к *D. destructor* и *D. dipsaci* сортах картофеля (Mwaura et al., 2015). Генетика устойчивости картофеля к клубневой и стеблевой нематодам не изучена.

**Ложная галловая нематода *Nacobbus aberrans*** – эндемичный вид для Южно-Американского континента, тем не менее из-за широкого диапазона хозяев, включающего 84 вида растений, и экономического значения для таких культур, как картофель, томат и сахарная свекла, она отнесена к карантинным объектам. Для картофеля потери урожая составили в среднем 65 % в Андском регионе Латинской Америки. Таксономические проблемы рода *Nacobbus* рассмотрены в обзоре (Manzanilla-López, 2010). Современные молекулярные данные позволили присвоить *N. aberrans* статус видового комплекса. Для обнаружения *Nacobbus* spp. в почве и клубнях картофеля используют методы RFLP и секвенирование ITS-rDNA-областей (Reid et al., 2003), ПЦР с видоспецифичными праймерами (Atkins et al., 2005). В литературе сообщалось об источниках устойчивости к *Nacobbus aberrans*, отобранных среди образцов диких южноамериканских видов: *S. microdontum*, *S. acaule*, *S. okadae* (Franco, Main, 2006), генетика устойчивости картофеля к ложной галловой нематоде не изучена.

## Закключение

В настоящее время защита картофеля от паразитических нематод сводится к двум основным составляющим: 1) карантинным мероприятиям, которые не всегда эффективны из-за иногда неконтролируемого перевоза посадочного материала и сельскохозяйственной техники между частными хозяйствами, и 2) использованию устойчивых к нематодам сортов, в том числе с групповой устойчивостью к разным видам нематод. Вследствие этого поиск для селекции новых генов устойчивости, в том числе эффективных против потенциально опасных патотипов и видов паразитических нематод, создадут «подушку безопасности» в случае их заноса на территорию РФ или появления в результате адаптационных процессов. Информация о картированных *R*-генах и QTL устойчивости к нематодам и ассоциированных с ними ДНК-маркерах существенно повышает эффективность селекционно-генетических программ по созданию новых сортов, устойчивых к разным патотипам и видам паразитических нематод.

Перспективным представляется развитие новых молекулярных технологий. Последние 20 лет с момента обнаружения РНК интерференции (RNAi) (Fire et al., 1998), эту технологию пытаются использовать для защиты растений от различных видов нематод (Lilley et al., 2007; Bairwa et al., 2017). Показано, что экспрессия в растении-хозяине двуцепочечной РНК, нацеленной на гены домашнего хозяйства или паразитизма у галловой нематоды, приводит к

устойчивости против этой нематоды (Gheysen, Vanholme, 2007). Дальнейшее развитие молекулярных технологий, а также исследований биологии паразитических нематод картофеля, изменчивости популяций, эволюции, структурной и функциональной геномики как паразитов, так и их хозяев позволит совершенствовать способы контроля заболеваний картофеля, вызываемых паразитическими нематодами.

## Список литературы / References

- Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ19.534.
- [Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and its neighboring countries based on the polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance R-genes. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017; 7(5):489-500. DOI 10.1134/S2079059717050021.]
- Гавриленко Т.А., Ермишин А.П. Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):16-29. DOI 10.18699/VJ17.220.
- [Gavrilenko T.A., Yermishin A.P. Interspecific hybridization of potato: Theoretical and applied aspects. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1): 16-29. DOI 10.18699/VJ17.220. (in Russian)]
- Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеева Н.М., Мамадобокирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля Северо-Западной зоны Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329.
- [Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (офф. изд.). М.: Росинформагротех, 2019.
- [State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagroteh Publ., 2019. (in Russian)]
- Зиновьева С.В., Чижов В.Н., Приданников М.В., Субботин С.А., Рысс А.Ю., Хусайнов Р.В. Фитопаразитические нематоды России. Товарищество научных изданий КМК, 2012.
- [Zinovieva S.V., Chizhov V.N., Pridannikov M.V., Subbotin S.A., Ryss A.Yu., Khusainov R.V. Phyt parasitic Nematodes in Russia. KMK Scientific Publishing Association Publ., 2012. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамадобокирова Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоды (патотип Ro1). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75.
- [Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-associated selection of russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). *Trudi po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selekcii* = *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Гавриленко Т.А., Костина Л.И., Мамадобокирова Ф.Т., Антонова О.Ю. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к вирусу X картофеля в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(1):42-48. DOI 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48.
- [Klimenko N.S., Gavrilenko T.A., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Antonova O.Yu. Search for resistance sources to *Globodera pallida* and potato virus X in the collection of potato varieties using molecular markers. *Biotechnologiya i Selekcija Rasteniy* = *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(1):42-48. DOI 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48. (in Russian)]
- Мироненко Н.В., Афанасенко О.С., Рогозина Е.В. Изменчивость генного пула популяции *Globodera rostochiensis* Woll. в результате отбора на слабоустойчивых гибридных клонах картофеля. *Вестник защиты растений*. 2015;2(84):24-28.
- [Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Rogozina E.V. Variability of gene pool of *Globodera rostochiensis* population as a result of selection on weakly resistant potato hybrid clones. *Vestnik Zashchity Rasteniy* = *Plant Protection News*. 2015;2(84):24-28. (in Russian)]
- Мироненко Н.В., Афанасенко О.С., Рогозина Е.В., Лиманцева Л.А., Хютти А.В., Антонова О.Ю., Шувалов О.Ю., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. Механизмы взаимодействия золотистой картофельной нематоды *Globodera rostochiensis* со слабоустойчивыми межвидовыми гибридами картофеля. *Вестник защиты растений*. 2013;4:37-42.
- [Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Rogozina E.V., Limantseva L.A., Khutti A.V., Antonova O.Yu., Shuvalov O.Yu., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. Mechanisms of interaction of *Globodera rostochiensis* with the partially resistant interspecific potato hybrids. *Vestnik Zashchity Rasteniy* = *Plant Protection News*. 2013;4:37-42. (in Russian)]
- Справочник по карантинному фитосанитарному состоянию территорий государств-участников СНГ на 01.01.2017 г. М.: Россельхознадзор; ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», 2017.
- [All-Russia Center for Plant Quarantine. Book of reference on the plant quarantine states of CIS countries as of January 1, 2017. Moscow: Rosselkhoz nadzor, 2017. (in Russian)]
- Шестеперов А.А. Картирование эпифитотических очагов глободероза картофеля. *Защита и карантин растений*. 2002;7: 38-40.
- [Shestepеров A.A. Mapping of epiphytotic foci of potato globe disease. *Zashchita i Karantin Rasteniy* = *Plant Protection and Quarantine*. 2002;7:38-40. (in Russian)]
- Шестеперов А.А., Бутенко К.О. Дитиленхоз картофеля: распространение, эпифитотология, диагностика. *Защита картофеля*. 2010;1:26-37.
- [Shestepеров A.A., Butenko K.O. Potato rot: distribution, epiphytology, diagnosis. *Zashchita Kartofelya* = *Potato Protection*. 2010;1: 26-37. (in Russian)]
- Шестеперов А.А., Черкашин В.И., Бутенко К.О. Дитиленхоз картофеля и меры борьбы с ним. М.: Росинформагротех, 2006.
- [Shestepеров A.A., Cherkashin V.I., Butenko K.O. Potato Rot and Control Measures. Moscow: Rosinformagroteh Publ., 2006. (in Russian)]
- Хютти А.В., Антонова О.Ю., Мироненко Н.В., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость картофеля к карантинным болезням. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1): 51-61. DOI 10.18699/VJ17.223.
- [Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. *Vavilov-*

- skii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223. (in Russian)]  
Abd-Elgawad M.M.M., Askary T.H. Factors affecting success of biological agents used in controlling the plant-parasitic nematodes. *Egypt J. Biol. Pest Control*. 2020;30:17. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00215-2>.
- Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breed. Sci.* 2012;62(2):142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.
- Atkins S.D., Manzanilla-López R.H., Franco J., Peteira B., Kerry B.R. A molecular diagnostic method for detecting *Nacobbus* in soil and in potato tubers. *Nematology*. 2005;7:193-202. DOI 10.1163/1568541054879539.
- Bairwa A., Venkatasalam E.P., Sudha R., Umamaheswari R., Singh B.P. Techniques for characterization and eradication of potato cyst nematode: a review. *J. Parasit. Dis.* 2017;41:607-620. DOI 10.1007/s12639-016-0873-3.
- Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Govere A. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.
- Bali S., Vining K., Gleason C., Majtahedi H., Brown C.R., Sathuvali V. Transcriptome profiling of resistance response to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from wild species *Solanum bulbocastanum* into cultivated potato. *BMC Genomics*. 2019;20:907. DOI 10.1186/s12864-019-6257-1.
- Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 1990;224:177-182.
- Berthou F., Kouassi A., Bossis M., Dantec J.-P., Eddaoudi M., Ferji Z., Pellé R., Taghzouti M., Ellisseche D., Mugniery D. Enhancing the resistance of the potato to Southern Root-knot Nematodes by using *Solanum sparsipilum* germplasm. *Euphytica*. 2003;132:57-65.
- Blacket M.J., Agarwal A.A., Wainer J., Triska M.D., Renton M., Edwards J. Molecular assessment of the introduction and spread of potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in Victoria, Australia. *Phytopathology*. 2019;109:659-669. DOI 10.1094/PHYTO-06-18-0206-R.
- Blok V.C., Pylypenko L., Phillips M.S. Molecular variation in the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, in relation to virulence. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2006;71(3PtA):637-638.
- Boucher A.C., Mimee B., Montarry J., Bardou-Valette S., Bélair G., Moffett P., Grenier E. Genetic diversity of the golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and determination of the origin of populations in Quebec, Canada. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013;69:75-82. DOI 10.1016/j.ympev.2013.05.020.
- Bradshaw J.E., Hackett C.A., Meyer R.C., Milbourne D., McNicol J.W., Phillips M.S., Waugh R. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:202-210.
- Brodie B.B. The occurrence of a second pathotype of potato cyst nematodes in New York. *J. Nematol.* 1995;27:493-494.
- Brodie B.B. The identification and distribution of a second pathotype of potato cyst nematodes in the United States. *Nematropica*. 1996;26:246.
- Brodie B.B., Mai W.F. Control of the Golden Nematode in the United States. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1989;27(1):443-461. DOI 10.1146/annurev.py.27.090189.002303.
- Brown C.R., Mojtahedi H., Santo G.S. Comparison of the reproductive efficiency of *Meloidogyne chitwoodi* on *Solanum bulbocastanum* in soil and *in vitro* tests. *Plant Dis.* 1989;73:957-959. DOI 10.1094/PD-73-0957.
- Brown C.R., Mojtahedi H., Santo G.S. Resistance to Columbia root-knot nematode in *Solanum* spp. and in hybrids of *S. hougasii* with cultivated tetraploid potato. *Am. Potato J.* 1991;68:445-452.
- Brown C.R., Mojtahedi H., Santo G.S. Genetic analysis of resistance to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from *Solanum hougasii* in cultivated potato. *J. Nematol.* 1999;31:264-271.
- Brown C.R., Mojtahedi H., Santo G.S. Characteristics of resistance to Columbia root-knot nematode introgressed from several Mexican and North American wild potato species. *Acta Hort.* 2003;619:117-125.
- Brown C.R., Mojtahedi H., Zhang L.-H., Riga E. Independent resistant reactions expressed in root and tuber of potato breeding lines with introgressed resistance to *Meloidogyne chitwoodi*. *Phytopathology*. 2009;99:1085-1089.
- Brown C.R., Yang C.-P., Mojtahedi H., Santo G.S., Masuelli R. RFLP analysis of resistance to Columbia root-knot nematode derived from *Solanum bulbocastanum* in a BC2 population. *Theor. Appl. Genet.* 1996;92:572-576.
- Brown C.R., Zhang L., Mojtahedi H. Tracking the R Mc1 gene for resistance to race 1 of Columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in three Mexican wild potato species with different ploidies. *Am. J. Potato Res.* 2014;91:180-185. DOI 10.1007/s12230-013-9336-x.
- Bryan G.J., Bradshaw J.E., De Jong W., Phillips M., Castelli L., Waugh R. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105:68-77.
- Bulman S.R., Marshall J.W. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *N. Z. J. Crop. Hort. Sci.* 1997;25:123-129.
- Cabrera-Hidalgo A.J., Marban-Mendoza N., Valadez-Moctezuma E. Phylogenetic relationships among Mexican populations of *Nacobbus aberrans* (Nematoda, Pratylenchidae) reveal the existence of cryptic (complex) species. *Nematropica*. 2019;49:1-11.
- Canto-Saenz M., de Scurrah M.M. Races of the potato cyst nematode in the andean region and a new system of classification. *Nematologica*. 1977;23:340-349.
- Caromel B., Mugniery D., Kerlan M.C., Andrzejewski S., Palloix A., Ellisseche D., Bourgeois F.R., Lefebvre V. Resistance quantitative trait loci originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction. *MPMI*. 2005;18(11):1186-1194.
- Caromel B., Mugniery D., Lefebvre V., Andrzejewski S., Ellisseche D., Kerlan M.C., Rousselle P., Bourgeois F.R. Mapping QTLs for resistance against *Globodera pallida* (Stone) Pa2/3 in a diploid potato progeny originating from *Solanum spegazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 2003;106:1517-1523.
- Carpentier J., Esquibet M., Fouville D., Manzanares-Dauleux M.J., Kerlan M.C., Grenier E. The evolution of the Gp-Rbp-1 gene in *Globodera pallida* includes multiple selective replacements. *Mol. Plant Pathol.* 2012;13(6):546-555. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00769.x.
- Castagnone-Sereno P., Bongiovanni M., Wajnberg E. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evol. Ecol.* 2007;21:259-270.
- Castelli L., Ramsay G., Bryan G., Neilson S.J., Phillips M.S. New sources of resistance to the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* in the Commonwealth Potato Collection. *Euphytica*. 2003;129:377-386. DOI 10.1023/A:1022264111096.
- Christoforou M., Orford M., Tsaltas D. Molecular diagnostic tools for nematodes chapter from the book nematology – concepts, diagnosis and control. Published by INTECH. 2017;37-50. Available at: <http://www.intechopen.com/books/nematology-conceptsdiagnosis-and-control>
- Cotton J.A., Lilley C.J., Jones L.M., Kikuchi T. The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. *Genome Biol.*

- 2014;15:1-17. Available at: <https://www.genomebiology.com/2014/15/3/R43>.
- Dalamu V.B., Umamaheshwari R., Sharma R., Kaushik S., Joseph T., Singh B., Gebhardt C. Potato cyst nematode (PCN) resistance: genes, genotypes and markers. *SABRAO J. Breed. Genet.* 2012;44(2): 202-228.
- Dalmasso A., Berge J.B. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *J. Nematol.* 1978;10(4):323-332.
- Dandurand L.M., Zasada I.A., Wang X., Mimeo B., De Jong W., Novy R., Whitworth J., Kuhl J.C. Current status of potato cyst nematodes in North America. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2019;25(57): 117-133. DOI 10.1146/annurev-phyto-082718-100254.
- Davis M.W., Hammarlund M., Harrach T., Hullett P., Olsen S., Jorgensen E.M. Rapid single nucleotide polymorphism mapping in *C. elegans*. *BMC Genomics.* 2005;6:118.
- Dellaert L.M.W., Vinke J.H. Testing potatoes for resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa-3; resistance spectra of plant genotypes and virulence spectra of Pa-3 isolates. *Revue Nématol.* 1987;10(4): 445-453.
- Dong K., Dean R.A., Fortnum B.A., Lewis S.A. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica.* 2001;31(2):271-280.
- Donkers-Venne D.T.H.M., Fargette M., Zijlstra C. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology.* 2000;2(8):847-853. DOI 10.1163/156854100750112798.
- Draaisstra J. Genetic analysis of root-knot nematode resistance in potato: PhD thesis. Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, The Netherlands. 2006;96. Available at: <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3880.pdf>.
- Dunnet J.M. Inheritance of resistance to potato root eelworm in a breeding line stemming from *Solanum multidissectum* Hawkes. In: Annual Report of the Scottish Plant Breeding Station, Edinburgh, 1960;39-46.
- Ellenby C. Resistance to the potato root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nature.* 1952;170:1016.
- Ellenby C. Tuber forming species and varieties of the genus *Solanum* tested for resistance to the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Euphytica.* 1954;3:195-202.
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One.* 2011;6(5): e19379. DOI 10.1371/journal.pone.0019379.
- EPPO. *Ditylenchus destructor*. Distribution map. Last updated: 2020-05-15. 2020d. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/DITYDE/distribution>.
- EPPO. *Ditylenchus dipsaci*. Distribution map. Last updated: 2019-10-17. 2019b. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/DITYDI/distribution>.
- EPPO. *Globodera pallida*. Distribution map. Last updated: 2020-03-02. 2020b. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/HETDPA/distribution>.
- EPPO. *Globodera rostochiensis*. Distribution map. Last updated: 2020-06-29. 2020a. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/HETDRO/distribution>.
- EPPO. *Nacobbus aberrans*. Distribution map. Last updated: 2019-01-29. 2019a. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/NACOPA/distribution>.
- Esquibet M., Grenier E., Plantard O., Andaloussi F.A., Caubel G. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome.* 2003;46(6):1077-1083. DOI 10.1139/g03-072.
- Evans K. Reviews: New approaches for potato cyst nematode management. *Nematophica.* 1993;23(2):221-231.
- Evans K., Franco J., De Scurrah M.M. Distribution of species of potato cyst-nematodes in South America. *Nematologica.* 1975;21:365-369.
- Evans K., Rowe J. Distribution and economic importance. In: Sharma S.B. (Ed.). *The Cyst Nematodes*. The Netherlands: Springer, 1998;1-30.
- Eves-van den Akker S., Laetsch D.R., Thorpe P., Lilley C.J., Danchin E.G.J., Da Rocha M., Rancurel C., Holroyd N.E., Cotton J.A., Szitenberg A., Grenier E., Montarry J., Mimeo B., Duceppe M.-O., Boyes I., Marvin J.M.C., Jones L.M., Yusup H.B., Lafond-Lapalme J., Esquibet M., Sabeh M., Rott M., Overmars H., Finkers-Tomczak A., Smant G., Koutsovoulos G., Blok V., Mantelin S., Cock P.J.A., Phillips W., Henriessat B., Urwin P.E., Blaxter M., Jones J.T. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. *Genome Biol.* 2016;17:124. DOI 10.1186/s13059-016-0985-1.
- Fábria S.O. Lima, Mattos V.S., Silva E.S., Carvalho M.A.S., Teixeira R.A., Silva J.C., Correa V.R. Nematodes Affecting Potato and Sustainable Practices for their Management, Potato – from Incas to All Over the World, Mustafa Yildiz, IntechOpen (February 16th 2018). DOI 10.5772/intechopen.73056. Available at: <https://www.intechopen.com/books/potato-from-incas-to-all-over-the-world/nematodes-affecting-potato-and-sustainable-practices-for-their-management>.
- Faggian R., Powell A., Slater A.T. Screening for resistance to potato cyst nematode in Australian potato cultivars and alternative solanaceous hosts. *Australas. Plant Pathol.* 2012;41:453-461. DOI 10.1007/s13313-011-0098-y.
- FAOSTAT. Database. 2019. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Finkers-Tomczak A., Bakker E., Boer J., Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Goverse A. Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus H1 reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.) *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:595-608. DOI 10.1007/s00122-010-1472-9.
- Finkers-Tomczak A., Danan S., van Dijk T., Beyene A., Bouwman L., Overmars H., van Eck H., Goverse A., Bakker J., Bakker E. A high-resolution map of the *Grp1* locus on chromosome V of potato harbouring broad-spectrum resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119: 165-173. DOI 10.1007/s00122-009-1026-1
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-811. DOI 10.1038/35888.
- Fleming C.C., Turner S.J., Powers T.O., Szalansky A.L. Diagnostics of cyst nematodes: Use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. *Asp. Appl. Biol.* 1998;52: 375-382.
- Folkertsma R.T., Van Koert P., Rouppe Van der Voort J.N.A.M. The effects of founding events and agricultural practices on the genetic structure of three metapopulations of *Globodera pallida*. *Phytopathology.* 2001;91:753-758. doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.8.753.
- Fournet S., Kerlan M.C., Renault L., Dantec J.P., Rouaux C., Montarry J. Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant. Pathol.* 2013;62:184-193. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02617.x.
- Franco J., Main G. Screening for resistance to *Nacobbus aberrans* and *Globodera* spp. in wild potato species resistant to other pathogens. *Nematol. Medit.* 2006;34(2):165-169.
- Futschik A., Schlotterer C. The next generation of molecular markers from massively parallel sequencing of pooled DNA samples. *Genetics.* 2010;186:207-218. doi.org/10.1534/genetics.110.114397.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006; 112:1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.
- Gebhardt C., Mugniery D., Ritter E., Salamin F., Bonnel E. Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1993;85(5):541-544.
- Geric Stare B., Fouville D., Širca S., Gallot A., Urek G., Grenier E. Molecular variability and evolution of the pectate lyase (pel-2)

- parasitism gene in cyst nematodes parasitizing different solanaceous plants. *J. Mol. Evol.* 2011;72(2):169-181. DOI 10.1007/s00239-010-9413-4.
- Gheysen G., Vanholme B. RNAi from plants to nematodes. *Trends Biotechnol.* 2007;25(3):89-92. DOI 10.1016/j.tibtech.2007.01.007.
- Grenier E., Fournet S., Petit E., Anthoine G. A cyst nematode 'species factory' called the Andes. *Nematology*. 2010;12(2):163-169. doi.org/10.1163/138855409X12573393054942.
- Handoo Z.A., Carta L.K., Skantar A.M., Chitwood D.J. Description of *Globodera ellingtonae* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Oregon. *J. Nematol.* 2012;44:40-57.
- Hockland S., Niere B., Grenier E., Blok V., Phillips M., Den Nijs L., Anthoine G., Pickup G., Viaene N. An evaluation of the implications of virulence in non-European populations of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* for potato cultivation in Europe. *Nematology*. 2012;14(1):1-13.
- Holbein J., Grundler F.M.W., Siddique S. Plant basal resistance to nematodes: an update. *J. Exp. Bot.* 2020;67(7):2049-2061. https://doi.org/10.1093/jxb/erw005.
- Holgado R., Magnusson C. Half a century of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) management in Norway. Proceedings of the International Symposium on current trends in plant protection (Belgrade, RS, 2012-09-25/28). 2012;583-592.
- Holterman M., van der Wurff A., van den Elsen S., van Megen H., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23:1792-1800. DOI 10.1093/molbev/msl044.
- Hoolahan A.H., Blok V.C., Gibson T., Dowton M. A Comparison of three molecular markers for the identification of populations of *Globodera pallida*. *J. Nematol.* 2012;44(1):7-17.
- Howard H.W., Cole C.S., Fuller J.M. Further sources of resistance to *Heterodera rostochiensis* Woll in Andigena potatoes. *Euphytica*. 1970;19:210-216.
- Hunt D., Handoo Z. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry R.N., Moens M., Starr J.L. (Eds). *Root Knot Nematodes*. 1st ed. London: CAB International, 2009;55-88.
- Hyman B.C., Powers T.O. Integration of molecular data with systematics of plant parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1991;29:89-107.
- Jacobs J.M.E., van Eck H.J., Horsman K., Arens P.F.P., Verkerk-Bakker B., Jacobsen E., Pereira A., Stiekema W.J. Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. *Mol. Breed.* 1996;2:51-60.
- Janssen G.J.W., van Norel A., Verkerk-Bakker B. Resistance to *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* in wild tuber-bearing *Solanum* spp. *Euphytica*. 1996;92:287-294. DOI 10.1007/BF00037110.
- Jones R.K., Storey S.G., Knoetze R., Fourie H. Nematode Pests of Potato and Other Vegetables – Nematology in South Africa. A View from the 21st Century. Vol. 1. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017;231-260.
- Kaemmerer D. Detection of viable potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) by reverse transcription PCR. *J. Plant Dis. Prot.* 2012;119(3):100-106.
- Kort J., Ross H., Rumpfenhorst H.J., Stone A.R. An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica*. 1977;23:333-339.
- Kreike C.M., de Koning J.R.A., Vinke J.H., van Ooijen J.W., Stiekema W.J. Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. *Theor. Appl. Genet.* 1993;87:464-470.
- Kreike C.M., de Koning J.R.A., Vinke J.H., van Ooijen J.W., Stiekema W.J. Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 1994;88:764-769.
- Kreike C.M., Kok-Westeneng A.A., Vinke J.H. Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development in *Solanum* species. *Theor. Appl. Genet.* 1996;92:463-470.
- Laine A.L., Barres B. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathol.* 2013;62:96-105. doi.org/10.1111/ppa.12129.
- Lilley C.J., Bakhiet M., Charlton W.L., Urwin P.E. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. *Mol. Plant Pathol.* 2007;8(5):701-711. DOI 10.1111/j.1364-3703.2007.00422.x.
- Lima F.S.O., Mattos V.S., Silva E.S., Carvalho M.A.S., Teixeira R.A., Silva J.C., Correa V.R. Nematodes affecting potato and sustainable practices for their management. 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73056>
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Aфанасенко O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breed.* 2014;133:660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- López M., Riegel R., Lizana C., Behn A. Identification of virus and nematode resistance genes in the Chilota Potato Genebank of the Universidad Austral de Chile. *Chilean J. Agric. Res. (Chilean JAR)*. 2015;75(3):320-327. doi.org/10.4067/S0718-58392015000400008.
- Mahmoudi N., Naserzadeh Y., Pakina E., Limantseva L., Nejad D.K. Molecular identification of *Ditylenchus destructor* nematode with PCR Species-Specific primers in the Moscow region. *RUDN J. Agron. Anim. Industries*. 2019;14(4):430-436. DOI 10.22363/2312-797X-2019-14-4-430-436.
- Mai W.F., Brodie B.B., Harisson M.B. Nematodes. In: Hooker W. (Ed.). *Compendium of Potato Diseases*. 1st ed. Saint Paul, USA: The American Phytopathological Society, 1990;93-101.
- Manzanilla-López R. Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy? *Nematology*. 2010;12(3):321-334. DOI 10.1163/138855409x12584547412734.
- Marek M., Zouhar M., Rysanek P., Havranek P. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia*. 2005;42(2):49-56.
- Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J. Potato Res.* 2011;88:245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.
- Mimee B., Duceppe M.O., Véronneau P.Y., Lafond-Lapalme J., Jean M. A new method for studying population genetics of cyst nematodes based on Pool-Seq and genomewide allele frequency analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 2015;15:1356-1365. DOI 10.1111/1755-0998.12412.
- Moens M., Perry R.N., Starr J.L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry R.N., Moens M., Starr J.L. (Eds.). *Root Knot Nematodes*. Wallingford, UK: CAB International, 2009;1-18.
- Moloney C., Griffin D., Jones P.W., Bryan G.J., McLean K., Bradshaw J.E., Milbourne D. Development of diagnostic markers for use in breeding potatoes resistant to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3 using germplasm derived from *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena* CPC 2802. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120:679-689.
- Mwaura P., Niere B., Vidal S. Resistance and tolerance of potato varieties to potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) and stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *Ann. Appl. Biol.* 2015;166(2):257-270. DOI 10.1111/aab.12180.
- Nakhla K.M., Owens K.J., Wei W.L.G., Skantar A.M., Levy L. Multiplex real-time PCR assay for the identification of the potato cyst and tobacco cyst nematodes. *Pest Manag. Sci.* 2010;8:959-965. DOI 10.1094/PDIS-94-8-0959.
- Nijboer H., Parlevliet J.E. Pathotype-specificity in potato cyst nematodes, a reconsideration. *Euphytica*. 1990;49:39-47.

- Nunziata A., Ruggieri V., Greco N., Frusciantone L., Barone A. Genetic diversity within wild potato species (*Solanum* spp.) revealed by AFLP and SCAR markers. *AJPS*. 2010;1(2):95-103. DOI 10.4236/ajps.2010.12012.
- OEPP/EPPO. PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2017b;47(2):174-197.
- OEPP/EPPO. PM 7/41 (3) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2016;46(2):171-189. DOI 10.1111/epp.12292.
- OEPP/EPPO. PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2017a;47(3):401-419. DOI 10.1111/epp.12433.
- OEPP/EPPO. Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2006;36:419-420.
- Paal J., Henselewski H., Muth J., Meksem K., Menendez C.M., Salamini F., Ballvora A., Gebhardt C. Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype *Ro1* of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J*. 2004;38:285-297. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02047.x.
- Park J., Hackett C.A., Dandurand L., Wang X., Dejong W.S. QTL for resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro2 and *G. pallida* pathotype Pa2/3 in autotetraploid potato. *Am. J. Potato Res.* 2019; 96:552-563. DOI 10.1007/s12230-019-09745-4.
- Picard D., Plantard O., Scurrah M., Mugniery D. Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Mol. Ecol.* 2004;13(10):2899-2908. DOI 10.1111/j.1365-294X.2004.02275.x.
- Plantard O., Picard D., Valette S., Scurrah M., Grenier E., Mugniery D. Origin and genetic diversity of Western European populations of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 2008;17:2208-2218. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03718.x.
- Powers T.O. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2004;42:367-383. DOI 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140348.
- Przetakiewicz A. The first report of *Globodera rostochiensis* pathotypes Ro5 occurrence in Poland. *Plant Dis.* 2013;97(8):1125. DOI 10.1094/PDIS-12-12-1156-PDN.
- Przetakiewicz A., Milczarek D., Zimnoch-Guzowska E., Flis B. Improvement level of nematode resistance in potato facing changes in population of *Globodera* spp. *J. Anim. Plant Sci.* 2017;27(6):1958-1962.
- Pylypenko L.A., Uehara T., Phillips M.S., Sigareva D.D., Blok V.C. Identification of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in the Ukraine by PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 2005;111(1):39-46. DOI 10.1007/s10658-004-2732-9.
- Reid A., Manzanilla-López R.H., Hunt D.J. *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae); a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. *Nematology*. 2003;5:441-551.
- Ross H. Wild species and primitive cultivars as ancestors of potato varieties. In: Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops, Wageningen. Pudoc., 1979;237-244.
- Roupe van der Voort J.N., Janssen G.J., Overmars H. Development of a PCR-based selection assay for root-knot nematode resistance (*Rmc1*) by a comparative analysis of the *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* genome. *Euphytica*. 1999;106:187-195. DOI 10.1023/A:1003587807399.
- Roupe van der Voort J., Lindeman W., Folkertsma R., Hutten R., Overmars H., van der Vossen E., Jacobsen E., Bakker J. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1998;96:654-661.
- Roupe van der Voort J., van der Vossen E., Bakker E. Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:1122-1130. DOI 10.1007/s001220051588.
- Roupe van der Voort J., Wolters P., Folkertsma R., Hutten R., van Zandvoort P., Vinke H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., Bakker J. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95:874-880.
- Ryss A.Yu. Express technique to prepare collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica*. 2002;11(2):257-260.
- Sato K., Kadota Y., Shirasu K. Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1165. DOI 10.3389/fpls.2019.01165.
- Sattarzadeh A., Achenbach U., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hoferbert H.R., Rothsteyn T., Gebhardt C. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol. Breed.* 2006;18:301-312.
- Sigareva D., Zhylyna T., Galagan T. Detection of *Ditylenchus destructor* in potato during the growing season and storage. In: Proceedings of the International Symposium on Current Trends in Plant Protection (Belgrade, RS, 2012-09-25/28). 2012;575-578.
- Sijmons P.C. Plant-nematode interactions. *Plant Mol. Biol.* 1993;23: 917-931.
- Skantar A.M., Handoo Z.A., Zasada I.A., Ingham R.E., Carta L.K. Morphological and molecular characterization of *Globodera* populations from Oregon and Idaho. *Phytopathology*. 2011;101:480-491. DOI 10.1094/PHYTO-01-10-0010.
- Strachan S.M., Armstrong M.R., Kaur A., Wright K.M., Lim T.Y., Baker K., Jones J., Bryan G., Blok V., Hein I. Mapping the *H2* resistance effective against *Globodera pallida* pathotype Pa1 in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 2019;132:1283-1294. DOI 10.1007/s00122-019-03278-4.
- Subbotin S.A., Madani M., Krall E., Sturhan D., Moens M. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the Internal Transcribed Spacer-rDNA. *Phytopathology*. 2005;95(11):1308-1315. DOI 10.1094/PHYTO-95-1308. PMID: 18943362.
- Subbotin S.A., Prado Vera I.C.D., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. Identification, phylogeny and phylogeography of circum-fenestrated cyst nematodes (Nematoda: *Heteroderidae*) as inferred from analysis of ITS-rDNA. *Nematology*. 2011;13:805-824.
- Sudha R., Mhatre P.H., Lekshmanan D.K., Venkatasalam E.P., Bairwa A., Bhardwaj V., Sharma D., Sharma R. Phenotypic and molecular characterization of potato germplasm for potato cyst nematode resistance. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 2019;79(2):394-403. DOI 10.31742/IJGPB.79.2.2.
- Sudha R., Venkatasalam E.P., Bairwa A., Bhardwaj V. Identification of potato cyst nematode resistant genotypes using molecular markers. *Sci. Hort.* 2016;198:21-26.
- Tan M.Y.A., Park T.H., Alles R., Ronald C.B.H., Visser R.G.F., van Eck H.J. *GpaXII* originating from *Solanum tarijense* is a major resistance locus to *G. pallida* and is localized on chromosome 11 of potato. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:1477-1487.
- Thevenoux R., Folcher L., Esquibet M., Fouville D., Montarry J., Grenier E. The hidden diversity of the potato cyst nematode *Globodera pallida* in the south of Peru. *Evol. Appl.* 2019;13(4):727-737. DOI 10.1111/eva.12896.
- Thiery M., Mugniery D. Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fundam. Appl. Nematol.* 1996;19:471-479.
- Timmermans B.G.H., Vos J., Stomph T.J., Van Nieuwburg J., Van der Putten P.E.L. Growth duration and root length density of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) as determinants of hatching of *Globodera pallida* (Stone). *Ann. Appl. Biol.* 2006;148:213-222.
- Turner S.J., Rowe J.A. Cyst nematodes. In: Plant Nematology. CAB International, Wallingford, 2006;91-122.

- Van Der Vossen E.A.G., Rouppe Van Der Voort J.N.A.M., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D.C., Bakker J., Stiekema W.J., Klein-Lankhorst R.M. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J.* 2000;23:567-576. DOI 10.1046/j.1365-3113x.2000.00814.x.
- Vejl P., Skupinová S., Sedlák P., Domkářová J. Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. *ROSTLINNÁ VÝROBA*. 2002;48(11):486-489.
- Vrain T.C., Wakarchuk D.A., Levesque A.C., Hamilton R.I. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundam. Appl. Nematol.* 1992;15:563-573.
- Whitehead A.G., Turner S.J. Management and regulatory control strategies for potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*). In: Marks R., Brodie B. (Eds.). *Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control*. Cambridge, UK: University Press, 1998;135-152.
- Whitworth J.L., Novy R.G., Zasada I.A., Wang X., Dandurand L.M., Kuhl J.C. Resistance of potato breeding clones and cultivars to three species of potato cyst nematode. *Plant Dis.* 2018;102(11):2120-2128. DOI 10.1094/PDIS-12-17-1978-RE.
- Williamson V.W., Hussey R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell.* 1996;8:1735-1745.
- Winslow R.D., Willis R.J. Nematode diseases of potatoes. II. Potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis*. In: Webster J. (Ed). *Economic Nematology*. N.Y.: Acad. Press, 1972;18-34.
- Wishart J., Phillips M.S., Blok V.C. Ribosomal Intergenic Spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*. 2002;92(8):884-892. DOI 10.1094/PHYTO.2002.92.8.884.
- Wolters P., Vinke H., Bontjer I., Rouppe van der Voort J., Colon L., Hoogendoorn C. Presence of major genes for resistance to *Globodera pallida* in wild tuber-bearing *Solanum* species and their location on the potato genome. In: 5th Int. Symp. Mol. Biol. Pot., August 2–6, Bogensee, Germany, 1998.
- Zhang L.-H., Mojtahedi H., Kuang H., Baker B., Brown C.R. Marker-Assisted Selection of Columbia Root-Knot Nematode Resistance Introgressed from *Solanum bulbocastanum*. *Crop Sci.* 2007;47:2021-2026. DOI 10.2135/cropsci2007.01.0003.
- Zouhar M., Ryšánek P., Kočová M. Determination and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protect. Sci.* 2000;36:81-84. DOI 10.17221/9628-PPS.

---

#### ORCID ID

N.V. Mironenko orcid.org/0000-0003-3383-2973  
T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569  
A.V. Khiutti orcid.org/0000-0003-1479-7746  
O.S. Afanasenko orcid.org/0000-0001-7368-0797

**Благодарности.** Работа поддержана грантом РФФИ № 16-16-04073.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.07.2020. После доработки 14.10.2020. Принята к публикации 15.10.2020.

## Структура популяции *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и идентификация устойчивой к пиренофорозу гермоплазмы пшеницы

А.М. Кохметова<sup>1,3</sup>✉, Н.М. Коваленко<sup>2</sup>, М.Т. Кумарбаева<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

✉ e-mail: gen\_kalma@mail.ru

**Аннотация.** Возбудитель пиренофороза *Pyrenophora tritici-repentis* – одна из наиболее вредоносных болезней листовых пятнистостей пшеницы. В последние годы отмечаются нарастающее распространение и вредоносность пиренофороза в Казахстане. Расовый состав *P. tritici-repentis* претерпевает изменения из-за климатических и средовых флуктуаций, а также из-за все более усиливающейся тенденции возделывания одних и тех же сортов пшеницы на больших территориях. В настоящее время имеется лишь ограниченная информация о расовой структуре популяции *P. tritici-repentis* в Казахстане. Целью исследований были изучение популяций *P. tritici-repentis* по расовому составу на юго-востоке Республики Казахстан, а также идентификация устойчивых к пиренофорозу образцов пшеницы. Коллекция из 30 образцов мягкой пшеницы, включающая перспективные линии и сорта из Казахстана и из международных центров CIMMYT и ICARDA, была подвергнута оценке устойчивости к возбудителю пиренофороза в теплице и охарактеризована с использованием молекулярного маркера *Xfcp623*, диагностического для гена *Tsn1*. Моноконидиальные изоляты *P. tritici-repentis*, выделенные из популяции патогена юго-восточного региона, были отнесены к определенным расам на основе проявления симптомов некроза/хлороза с использованием стандартных образцов-дифференциаторов (Glenlea, 6B662, 6B365). Идентифицировано пять рас *P. tritici-repentis*, включающих расы 1, 2, 3, 7 и 8. Показано, что доминируют расы 1 и 8 *P. tritici-repentis*. В результате анализа частоты встречаемости рас возбудителя желтой пятнистости *P. tritici-repentis* установлено, что доминирующей оказалась раса 1 (50 %), продуцирующая Ptr ToxA и Ptr ToxB, и раса 8 (35 %), продуцирующая Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC. С практической точки зрения наибольший интерес представляют 16 образцов пшеницы, которые демонстрировали устойчивость к расе 1 и подтвердили нечувствительность к токсину Ptr ToxA при молекулярном скрининге. К ним относятся восемь казахстанских линий: 4\_PSI, 10204\_2\_KSI, 10204\_3\_KSI, 10205\_2\_KSI, 10205\_3\_KSI, 605\_SP2, 632\_SP2, Dana и семь зарубежных линий: KR11-20, KR11-03, KR11-9014, 11KR-13, KR11-9025, KR12-07, GN-68/2003. Результаты этого исследования представляют интерес для программы селекции пшеницы на устойчивость к пиренофорозу. Ключевые слова: пшеница; пиренофороз; расы; молекулярные маркеры; *Tsn1*; ToxA.

**Для цитирования:** Кохметова А.М., Коваленко Н.М., Кумарбаева М.Т. Структура популяции *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и идентификация устойчивой к пиренофорозу гермоплазмы пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(7):722-729. DOI 10.18699/VJ20.666

## *Pyrenophora tritici-repentis* population structure in the Republic of Kazakhstan and identification of wheat germplasm resistant to tan spot

А.М. Kokhmetova<sup>1,3</sup>✉, N.M. Kovalenko<sup>2</sup>, M.T. Kumarbaeva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan

✉ e-mail: gen\_kalma@mail.ru

**Abstract.** *Pyrenophora tritici-repentis* is a causative agent of tan spot in wheat. In recent years, there has been an increasing spread and harmfulness of wheat tan spot. The aim of the research was to study the racial composition of the *P. tritici-repentis* population in the Republic of Kazakhstan. A collection of 30 common wheat accessions, including promising lines and cultivars from Kazakhstan and CIMMYT-ICARDA, was assessed for resistance to *P. tritici-repentis* in a greenhouse and characterized using the *Xfcp623* molecular marker, diagnostic for the *Tsn1* gene. Monospore isolates of *P. tritici-repentis* isolated from the southeastern region were assigned to certain races based on the manifestation of symptoms of necrosis/chlorosis on standard differentials (Glenlea, 6B662, 6B365). Five races of *P. tritici-repentis* have been identified, including races 1, 2, 3, 7 and 8. It has been shown that races 1 and 8 of

*P. tritici-repentis* are dominant. As a result of the analysis of the frequency of occurrence of the *P. tritici-repentis* races, it was found that race 1 (50 %) producing Ptr ToxA and Ptr ToxB and race 8 (35 %) producing Ptr ToxA, Ptr ToxB and Ptr ToxC turned out to be dominant. From a practical point of view, of greatest interest are 16 wheat samples, which demonstrated resistance to race 1 and confirmed insensitivity to Ptr ToxA in a molecular screening. These include eight Kazakhstani (4\_PSI, 10204\_2\_KSI, 10204\_3\_KSI, 10205\_2\_KSI, 10205\_3\_KSI, 605\_SP2, 632\_SP2, Dana) and seven foreign lines (KR11-20, KR11-03, KR11-9014, 11KR-13, KR11-9025, KR12-07, GN-68/2003). The results of this study are of interest in wheat breeding programs for tan spot resistance.

Key words: wheat; tan spot; races; molecular markers; *Tsn1*; ToxA.

**For citation:** Kokhmetova A.M., Kovalenko N.M., Kumarbaeva M.T. *Pyrenophora tritici-repentis* population structure in the Republic of Kazakhstan and identification of wheat germplasm resistant to tan spot. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):722-729. DOI 10.18699/VJ20.666

## Введение

Одна из основных причин недобора урожая пшеницы в Казахстане – болезни с воздушно-капельной инфекцией. Доминирующее положение в составе патогенного комплекса пшеницы на юге и юго-востоке Казахстана занимают ржавчинные грибы (желтая, стеблевая и бурая ржавчины) (Kokhmetova et al., 2011, 2016, 2018; Rsaliyev A.S., Rsaliyev Sh.S., 2018), а также болезни листовых пятнистостей (пиренофороз и септориоз) (Kokhmetova et al., 2017, 2019; Кохметова и др., 2018).

Возбудитель пиренофороза пшеницы – гриб *Pyrenophora tritici-repentis*, который относится к классу Ascomycetes, подклассу плодосумчатых, порядку Dothidiales, семейству Pleosporaceae. Кроме пшеницы, *P. tritici-repentis* поражает более 60 видов кормовых и дикорастущих злаковых трав (Койшибаев, 2010; Мироненко, Коваленко, 2018). Заболевание проявляется на листьях и листовых влагалищах злаков в виде мелких одиночных или многочисленных пятен овальной или округлой формы, желтой или светло-коричневой окраски, вокруг пятна формируется хлоротичная зона. Источником первичной инфекции служат сумкоспоры гриба, вторичной инфекции – конидии, которые переносятся ветром (Поспехов, 1989).

Вредоносность болезней заключается в уменьшении ассимиляционной поверхности, возрастании транспирации, снижении накопления органического вещества, поражении всех надземных органов растений, потере качества зерна из-за формирования невыполненного зерна. В условиях благоприятных для развития заболевания, отмечены потери более 50 % (Shabeer, Vockus, 1988) *P. tritici-repentis* (PTR) (Died.), возбудитель пиренофороза, индуцирует два различных симптома на восприимчивых сортах – некроз и хлороз. Генетически оба симптома находятся под независимым контролем хозяина. В настоящее время в мире идентифицированы восемь рас PTR, основанных на способности индуцировать симптомы некроза и хлороза на наборе сортов-дифференциаторов пшеницы. Комплексные стратегии борьбы с болезнями, такие как возделывание устойчивых сортов, в сочетании с желаемыми севооборотами и практикой управления – наиболее эффективные, экологически чистые и экономичные средства для борьбы с пиренофорозом пшеницы (Singh et al., 2010).

Гриб *P. tritici-repentis* распространен во всех основных регионах, возделывающих пшеницу. Возбудитель пиренофороза зарегистрирован в Австралии, Канаде, Соединенных Штатах Америки, Южной Америке, Румынии, Молдавии, Англии, Казахстане, Украине, Бела-

руси, Средней Азии (Михайлова и др., 2012). Первые сведения о распространении *P. tritici-repentis* в Средней Азии представлены Б.А. Хасановым в начале 1980-х гг. (Postnikova, Khasanov, 1997). Мониторинг пшеничных полей в Центральной Азии и Казахстане в 2003 г. показал, что в наибольшей степени пиренофороз распространен на озимой пшенице, при этом интенсивность поражения могла достигать от 50 до 100 % (Койшибаев, 2002; Lamari et al., 2005).

Реакция совместимости между расой *P. tritici-repentis* и соответствующим дифференциатором реализуется через посредника – хозяин-специфичный токсин (Host Selective Toxins, HST). К настоящему времени охарактеризованы четыре HST: один токсин, индуцирующий некроз, Ptr ToxA, два токсина, индуцирующих хлороз, Ptr ToxB и Ptr ToxC, и один токсин, вызывающий и некроз, и хлороз, Ptr ToxD (Balance et al., 1989; Orolaza et al., 1995; Ali et al., 2010).

Исследования структуры популяции *P. tritici-repentis* в Казахстане ведутся с начала 2000-х гг. и продолжаются в настоящее время (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006; Kokhmetova et al., 2016, 2017). Наибольшее разнообразие расового состава в популяции патогенов отмечено в Азербайджане, где были идентифицированы расы 1, 2, 3, 5, 7 и 8, и в Сирии, где наблюдались расы 1, 3, 5, 7 и 8 (Lamari et al., 2005). Раса 1 наиболее распространена в Центральной Азии и Казахстане (87 %), а расы 2, 3 и 4 отмечаются реже (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). Ранее нами проводилось сравнительное изучение сходства и различия популяций *P. tritici-repentis* по вирулентности и расовому составу в Республике Казахстан и Северо-Кавказском регионе России, где показано, что в последние годы раса 8 часто встречалась в Казахстане (Кохметова и др., 2016; Kokhmetova et al., 2017).

Наследование устойчивости к пиренофорозу носит как количественный, так и качественный характер, а гены устойчивости к токсинам и локусы количественных признаков (QTL) являются расоспецифическими и контролируют процесс, снижающий чувствительность к токсинам (Михайлова и др., 2012). Были идентифицированы шесть главных генов устойчивости к пиренофорозу *Tsr1–Tsr6*, локализованных на хромосомах 2BS, 3AS, 3BL, 3DS и 5BL (McIntosh et al., 2013). В обзоре P.K. Singh с коллегами (2016) указывается, что многочисленные генетические исследования с анализом QTL продемонстрировали, что устойчивость к пиренофорозу наследуется как полигенный признак, при этом главные расоспецифичные гены, от *Tsr1* до *Tsr6*, часто объясняют эффекты этих локусов

(Singh S. et al., 2008; Singh P.K. et al., 2016). Дополнительные QTL были идентифицированы и локализованы на хромосомах 1AL, 2AS, 3AS (Singh S. et al., 2008), 4AL, 5AL, 1BS, 2BL, 3BS, 3BL, 5BL, 2DS, 2DL и 7DS (Singh P. et al., 2016).

Для повышения эффективности селекции на устойчивость к пиренофорозу необходимо выявлять перспективные линии пшеницы, характеризующиеся разнообразием по генам устойчивости к болезни, а затем размещать их на территории распространения болезни. Поскольку под влиянием абиотических и биотических факторов в природе происходят постоянные изменения расового состава возбудителей болезней, необходим регулярный анализ структуры популяций патогена. Это позволяет оценить динамику изменчивости расового состава в популяции и определить изоляты с новым спектром вирулентности.

Целью наших исследований было изучение расового состава популяции *P. tritici-repentis* из юго-восточного региона Республики Казахстан, а также поиск источников устойчивости к пиренофорозу в коллекции образцов пшеницы.

## Материалы и методы

Для определения ареала распространения и вредоносности *Pyrenophora tritici-repentis* пораженные образцы листьев пшеницы рандомизированно собирали в юго-восточных регионах возделывания озимой мягкой пшеницы в 2018 г. в Алматинской области Республики Казахстан. Анализ фитосанитарного состояния посевов пшеницы проводили в период колошения и молочно-восковой спелости зерна (июнь).

Объектом исследования была коллекция из 30 образцов мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, включающая перспективные линии и сорта казахстанской и зарубежной селекции, в том числе 17 казахстанских и 13 образцов из CIMMYT-ICARDA (см. табл. 2). Изучение коллекции пшеницы направлено на поиск источников устойчивости к PTR на основе оценки ювенильной устойчивости к доминирующим расам гриба, изучения полевой (возрастной) устойчивости и молекулярного скрининга к токсинам *P. tritici-repentis*. Сорт Salamouni (Lebanon) использован в качестве невосприимчивого контроля для расы 1 пиренофороза и токсина Ptr ToxA, Glenlea (Canada) – в качестве восприимчивого контроля для расы 1 и токсина Ptr ToxA.

Оценку полевой устойчивости к пиренофорозу проводили в условиях Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР), (Алматы, 43°13'09" N, 76°36'17" E, Алматинская область) в 2019–2020 гг. Растения выращивали на делянках размером 1 м<sup>2</sup> по рандомизированному дизайну с двумя повторностями. Поражение растений оценивали в условиях искусственного инфекционного фона на флаговых листьях в фазы GS 65-69 по шкале J.C. Zadoks с коллегами (1974). Инфекционный фон создавался с помощью зараженной пиренофорозом соломы (1 кг/м<sup>2</sup>). Уровень устойчивости оценивали по шкале 1–100% (Saari, Prescott, 1975). В качестве контроля использованы стандартные сорта-дифференциаторы болезни: Glenlea (чувствительный контроль) и Salamouni (устойчивый контроль).

Дифференциация рас осуществлена в соответствии с классификацией, предложенной L. Lamari и С.С. Bernier (1998), с использованием канадского набора дифференциаторов болезни (сорт пшеницы Glenlea и линии 6B662 и 6B365). Токсин Ptr ToxA индуцирует образование некрозов на сорте пшеницы Glenlea, а токсины Ptr ToxB и Ptr ToxC – образование хлорозов на линиях 6B365 и 6B662.

Моноконидиальные изоляты гриба выделяли из инфекционного материала пшеницы, собранного на производственных и селекционных полях юго-восточного региона Республики Казахстан по методу Л.А. Михайловой с коллегами (2012). Для изучения расового состава казахстанской популяции *P. tritici-repentis* использовали 20 моноконидиальных изолятов. Изучение структуры популяции по расовому составу и вирулентности проводили с помощью метода отрезков листьев, помещенных в 0.004 % раствор бензимидазола (Михайлова и др., 2012). Оценку проростковой устойчивости выполняли также с использованием бензимидазольного метода. Степень развития заболевания оценивали на 7–8-е сутки, при этом сорта с проявлением некротической реакции 1–2 балла относили к устойчивым (R), а с типом реакции некроза 3–5 баллов – к восприимчивым (S) образцам (Lamari, Bernier, 1989). На линиях 6B365 и 6B662 оценивали наличие или отсутствие хлороза.

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществлено из 5-дневных проростков пшеницы с помощью СТАВ-метода (Riede, Anderson, 1996). Для идентификации носителей генов устойчивости применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, фланкирующими диагностические маркеры генов, и образцами ДНК коллекции из 30 образцов пшеницы мягкой (*T. aestivum* L.). Сорта-носители гена *Tsn1*, чувствительного к токсину Ptr ToxA, выявляли на основе ПЦР с использованием SSR-маркера *Xfcp623* (Zhang et al., 2009; Faris et al., 2010). Маркер имеет два аллеля: 380 п.н. (ассоциированный с чувствительностью, доминантным аллелем гена *Tsn1*) и нуль-аллель (ассоциированный с нечувствительностью, рецессивным аллелем гена *tsn1*) (Zhang et al., 2009). Состав реакционной смеси и условия ПЦР соответствовали протоколу (Roder et al., 1998). Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 % агарозном геле в ТВЕ-буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA, pH 8) (Chen et al., 1998). Визуализацию гелей выполняли в гель-документирующей системе Mega Bio-Print 1100/26M, Vilber Lourmat.

## Результаты

Для изучения расового состава казахстанской популяции *P. tritici-repentis* проанализировано 20 моноконидиальных изолятов. С использованием дифференциальных линий и сортов из Канады 20 изолятов гриба были охарактеризованы как относящиеся к определенным расам *P. tritici-repentis*, представленным в табл. 1. В соответствии с общепринятой классификацией рас (Lamari et al., 1998), изоляты были отнесены к расе 1 как индуцирующие токсины Ptr ToxA и Ptr ToxC, к расе 2 (Ptr ToxA), расе 3 (Ptr ToxC), расе 4 (не индуцирующей токсины), расе 5 (Ptr ToxB), расе 6 (Ptr ToxB и Ptr ToxC), расе 7 (Ptr ToxA и Ptr ToxB) и расе 8 (Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC).

**Таблица 1.** Определение рас изолятов *P. tritici-repentis* из юго-востока Казахстана на канадском наборе сортов-дифференциаторов

Номер изолята (номер каталога)	Реакция сортов-дифференциаторов на инокуляцию <i>P. tritici-repentis</i>			Номер расы
	Glenlea	6B662	6B365	
1-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
2-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	CI (ToxC)	8
3-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
4-Ю-KZ	ToxA	ToxB	ToxC	8
5-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
6-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
7-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
8-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	R	7
9-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	CI (ToxC)	8
10-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	CI (ToxC)	8
11-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
12-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	CI (ToxC)	8
13-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	CI (ToxC)	8
14-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
15-Ю-KZ	R	R	CI (ToxC)	3
16-Ю-KZ	N (ToxA)	CI (ToxB)	CI (ToxC)	8
17-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
18-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
19-Ю-KZ	N (ToxA)	R	CI (ToxC)	1
20-Ю-KZ	N (ToxA)	R	R	2

Примечание. Проявление симптомов: N – некроза, CI – хлороза; R – отсутствие реакции на заражение *P. tritici-repentis*.

В результате анализа частоты встречаемости рас возбудителя желтой пятнистости *P. tritici-repentis* установлено, что в изолятах из юго-востока Казахстана доминирующей оказалась раса 1 (50 %), продуцирующая Ptr ToxA и Ptr ToxB, и раса 8 (35 %), продуцирующая Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC. Расы 4, 5 и 6 не встречались в изученных выборках популяции *P. tritici-repentis*. Таким образом, в юго-восточном регионе Казахстана идентифицировано пять рас *P. tritici-repentis*: 1, 2, 3, 7 и 8.

В лабораторных условиях были проведены инокуляция и оценка 30 перспективных линий и сортов озимой мягкой пшеницы (табл. 2). Поскольку большая часть собранного на юго-востоке Казахстана инфекционного материала *P. tritici-repentis* была отнесена к изолятам расы 1, продуцирующей токсин ToxA (см. табл. 1), то для скрининга материала пшеницы нами использован изолят расы 1. С этой целью проведен анализ образцов пшеницы к изоляту казахстанской популяции гриба из южного региона (1-Ю-KZ), продуцирующему токсин Ptr ToxA (см. табл. 2).

Реакции генотипов пшеницы на изолят Ptr 1-Ю-KZ, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что наи-

большей устойчивостью характеризуются пять перспективных линий, что составляет 16.6 %. В эту группу входят три казахстанских (GF\_13\_CP, GF\_16\_CP, 10204\_3\_KSI) и две зарубежные линии пшеницы из ICARDA-SIMMYT (KR11-9025 и GN-158/2004). Шестнадцать образцов (53.3 %) показали умеренно-устойчивую реакцию (moderate-resistant, MR). Умеренно-восприимчивый тип реакции (moderate-susceptible, MS) выявлен у трех образцов. Восприимчивый тип реакции (susceptible, S) отмечен у шести образцов, что составляет 20 % от общего числа изученного материала.

Результаты оценки полевой устойчивости к пиренофорозу показали, что развитие болезни наблюдалось в основном на нижнем и среднем ярусах растений, максимальное поражение составило 40 %. Устойчивый тип реакции (10–15 %) к болезни демонстрировали 14 линий, что составило 46.6 % от общего числа изученного материала. Высокой полевой устойчивостью к болезни характеризовались четыре линии пшеницы: GF24\_CP, 10204\_2\_KSI, KR11-20 и 11KR-13.

Поиск генотипов-носителей аллелей генов чувствительности, *Tsn1*, и нечувствительности, *tsn1*, к токсину Ptr ToxA *P. tritici-repentis* у перспективных линий пшеницы осуществлен в результате молекулярного анализа коллекции образцов пшеницы и сравнения этих результатов со скринингом, основанным на реакции к изоляту 1-Ю-KZ, продуцирующему токсин Ptr ToxA.

Генотипирование образцов пшеницы с использованием молекулярного маркера было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсину Ptr ToxA. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п. н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину Ptr ToxA у 13 образцов (43.3 %) (см. табл. 2, рисунок). Нуль-аллель маркера *Xfcp623* оказался сцепленным с нечувствительностью к токсину в 17 образцах пшеницы. Большинство образцов (76.4 %) не чувствительны к изоляту расы 1 (1-Ю-KZ), продуцирующему токсин Ptr ToxA (см. табл. 2). Степень сцепления маркера *Xfcp623* с нечувствительностью к расе 1 составила 76.4 %. Пример электрофореграммы с результатами ПЦР, отражающей наличие/отсутствие в исследуемых образцах локуса *Tsn1*, чувствительного к Ptr ToxA, представлен на рисунке.

Частота встречаемости аллеля маркера *Xfcp623*, сцепленного с геном *tsn1*, контролирующего нечувствительность к токсину Ptr ToxA, составила 56.6 % (17 образцов). Встречаемость аллелей маркера, сцепленного с доминантным аллелем гена *Tsn1*, сцепленного с чувствительностью к Ptr ToxA токсину, составила 43.3 % (13 образцов).

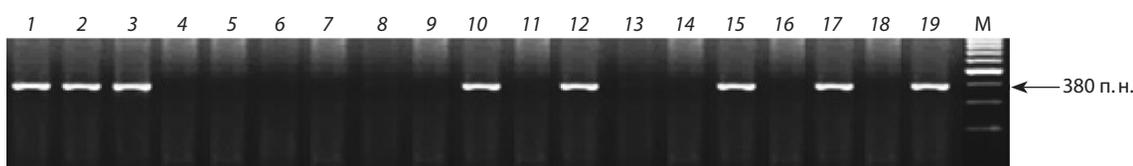
SSR-маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент ДНК размером 380 п. н., ассоциированный с доминантным аллелем *Tsn1*, чувствительным к ToxA, у 13 образцов и у контроля Glenlea. Другой аллель, обнаруженный с помощью маркера *Xfcp623* у остальных образцов пшеницы (17), представлял собой нуль-аллель, характерный для не чувствительных к ToxA генотипов и указывающий на рецессивное состояние аллеля *tsn1*.

С практической точки зрения наибольший интерес представляют 16 образцов пшеницы, которые демонстрировали устойчивость к расе 1 и подтвердили невосприим-

**Таблица 2.** Скрининг перспективных линий озимой мягкой пшеницы из Казахстана и ICARDA-CIMMYT на проростковую и полевую устойчивость к *P. tritici-repentis*

Название	Происхождение	Устойчивость к изоляту Ptr 1-Ю-KZ, балл*	Полевая устойчивость к Ptr, %**	<i>Xfcp623</i> , <i>Tsn1</i>	
GF_13_CP	Казахстан	1/0	25	S 380	
GF_16_CP		1/1	25	S 380	
GF_19_CP		3/3	30	S 380	
GF24_CP		3/3	5	R null	
4_PSI		2/2	10	R null	
10204_2_KSI		2/1	5	R null	
10204_3_KSI		1/1	10	R null	
10205_2_KSI		1/2	10	R null	
10205_3_KSI		3/2	10	R null	
602_SP2		2/2	25	S 380	
605_SP2		2/2	10	R null	
618_SP2		2/3	30	S 380	
632_SP2		2/1	10	R null	
634_SP2		3/2	10	R null	
635_SP2		2/2	30	S 380	
Dana		2/2	10	R null	
Dinara		2/1	25	S 380	
KR11-20		ICARDA-CIMMYT	2/1	5	R null
KR11-03			1/2	10	R null
KR11-9014			2/3	10	R null
KR11-26	2/2		25	S 380	
KR11-29	3/3		10	R null	
11KR-13	2/2		5	R null	
KR11-40	1/2		40	S 380	
KR11-9025	1/0		15	R null	
KR12-07	1/2		30	R null	
KR12-9011	2/1		25	S 380	
GN-68/2003	2/3		10	R null	
GN-143/2006	2/1		10	S 380	
GN-158/2004	1/0		30	S 380	
Saloumoni – устойчивый контроль для расы 1 и токсина Ptr ToxA	Ливан		1/0	5	R null
Glenlea – восприимчивый контроль для расы 1 и токсина Ptr ToxA	Канада		3/3	30	S 380

\* Изолят 1-Ю-KZ, продуцирующий Ptr ToxA; над чертой – балл развития некроза; под чертой – балл развития хлороза; \*\* представлены средние значения процента поражения болезнью за два года (2019–2020); *Xfcp623* – SSR-маркер локуса *Tsn1*, чувствительного к Ptr ToxA, амплифицирует фрагмент ДНК 380 п. н.



Продукты амплификации ДНК образцов пшеницы с использованием диагностического маркера *Xfcp623*, сцепленного с геном *Tsn1*, определяющим чувствительность к Ptr ToxA.

1 – GF\_13\_CP; 2 – GF\_16\_CP; 3 – GF\_19\_CP; 4 – GF24\_CP; 5 – 4\_PSI; 6 – 10204\_2\_KSI; 7 – 10204\_3\_KSI; 8 – 10205\_2\_KSI; 9 – 10205\_3\_KSI; 10 – 602\_SP2; 11 – 605\_SP2; 12 – 618\_SP2; 13 – 632\_SP2; 14 – 634\_SP2; 15 – 635\_SP2; 16 – Dana; 17 – Dinara; 18 – Saloumoni – устойчивый контроль к Ptr Tox A; 19 – Glenlea – чувствительный контроль к PTR Tox A. M – маркер молекулярного веса (Gene-Ruler™, 100 bp DNA Ladder (Fermentas)). 2 % агарозный гель.

чивость к токсину Ptr ToxA при молекулярном скрининге. К ним относятся восемь казахстанских линий (4\_PSI, 10204\_2\_KSI, 10204\_3\_KSI, 10205\_2\_KSI, 10205\_3\_KSI, 605\_SP2, 632\_SP2, Dana) и семь зарубежных линий (KR11-20, KR11-03, KR11-9014, 11KR-13, KR11-9025, KR12-07, GN-68/2003).

## Обсуждение

Представленные нами исследования позволили определить расовый состав изолятов *P. tritici-repentis*, установленных в 2018 г. на территории юго-востока Казахстана. Изучение расового состава казахстанской юго-восточной популяции *P. tritici-repentis* подтвердило ранее полученные результаты (Кохметова и др., 2016) и выявило доминирование рас 1 и 8 на этой территории. Анализ частоты встречаемости рас гриба показал, что в выборках изолятов из Казахстана в 2018 г. определено доминирование рас 1 и 8. В Северном Казахстане в начале 2000-х гг. были распространены раса 1 (Zhanarbekova et al., 2005) и расы 2, 3 и 4 (Maraite et al., 2006). Указанные различия расового состава в Казахстане могут быть обусловлены изменениями климатических условий в разные годы. Представленные различия в составе патогена указывают на необходимость ежегодного анализа структуры популяций патогена, для того чтобы понимать динамику ее изменчивости и ареалов распространения *P. tritici-repentis*.

Изучение структуры популяции пиренофороза в трех различных климатических зонах России позволило определить расовый состав популяций *P. tritici-repentis*. Установлено, что доминирующими были расы 1 и 2. Раса 8 встречалась во всех регионах. В популяции из Дагестана отсутствовали расы 5, 6, 7, тогда как в популяции из Западной Сибири отсутствовала раса 4 (Кремнева и др., 2007; Mikhailova et al., 2010, 2014).

Сравнительный анализ казахстанских и российских образцов популяций патогена, проведенный в 2016 г., показал, что наиболее вирулентными являются изоляты из Казахстана, а более фенотипически разнообразными – из Северо-Кавказского региона России (Кохметова и др., 2016). Авторы выявили разнообразие по вирулентности изолятов: в России идентифицированы четыре расы *P. tritici-repentis*, 1, 2, 4 и 8, а в Казахстане – пять рас, 1, 3, 4, 6 и 8. Изучение структуры популяции *P. tritici-repentis* Е.И. Гульгяевой с коллегами (2018) в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане показало, что по признаку токсинообразования отмечена высокая степень сходства структуры популяций гриба из этих регионов, что указывает на единую эпидемиологическую зону.

Исследованиям, направленным на оценку устойчивости гермоплазмы пшеницы к пиренофорозу, уделяется большое внимание (Chu et al., 2008; Singh et al., 2016; Kokhmetova et al., 2017, 2019; Кохметова и др., 2018). Настоящая работа обусловлена необходимостью создания генетически разнородных источников устойчивости, которые могут быть использованы в селекции устойчивых к *P. tritici-repentis* сортов пшеницы. Эту задачу удалось решить путем применения ДНК-технологий и использования изолятов расы 1, продуцирующих наиболее распространенный в Казахстане токсин Ptr ToxA.

Ранее были разработаны молекулярные маркеры для диагностики нечувствительности к Ptr ToxA и Sn ToxA (*Xfcp393* и *Xfcp394*) (Zhang et al., 2009). После того как ген *Tsn1* был клонирован и секвенирован, был разработан доминантный SSR-маркер *Xfcp623* на внутреннюю область гена (Faris et al., 2010). Маркер *Xfcp623*, предложенный в качестве диагностического для гена *Tsn1*, считается более надежным по сравнению с ранее разработанными. Надежность диагностического маркера *Xfcp623* для выявления генотипов пшеницы с устойчивостью к патогену и нечувствительностью к Ptr ToxA показана в ряде исследований (Karelov et al., 2015; Мироненко и др., 2017). Принимая во внимание более высокую эффективность маркера *Xfcp623*, в нашем исследовании мы генотипировали гермоплазму пшеницы с использованием этого маркера.

В результате наших исследований коллекция из 30 образцов мягкой пшеницы охарактеризована с использованием молекулярного маркера *Xfcp623*, диагностического для гена *Tsn1*, связанного с чувствительностью к Ptr ToxA. С практической точки зрения наибольший интерес представляют 16 образцов пшеницы, которые демонстрировали устойчивость к расе 1 и подтвердили невосприимчивость к токсину Ptr ToxA при молекулярном скрининге. К ним относятся восемь казахстанских и семь зарубежных линий пшеницы. Чувствительность к Ptr ToxA не всегда коррелировала с восприимчивостью к расе 1 и зависела от генетического фона хозяина.

Результаты генотипирования и скрининга образцов пшеницы по устойчивости к наиболее распространенным в Казахстане изолятам *P. tritici-repentis* представляют интерес в целях повышения эффективности селекции на основе элиминации из селекционного материала носителей доминантных аллелей гена *Tsn1*, чувствительных к агрессивным токсину Ptr ToxA. Носители идентифицированного *tsn1* гена устойчивости к Ptr ToxA могут быть использованы в селекционных программах по пирамидированию генов устойчивости к болезням пшеницы.

## Список литературы / References

- Гульгяева Е.И., Коваленко Н.М., Шаманин В.П., Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Шайдаюк Е.Л., Моргунов А.И. Структура популяций листовых патогенов яровой пшеницы в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане в 2017 г. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372.
- [Gulyaeva E.I., Kovalenko N.M., Shamanin V.P., Tyunin V.A., Shreyder E.R., Shaydayuk E.L., Morgunov A.I. Population structure of leaf pathogens of common spring wheat in the West Asian regions of Russia and Northern Kazakhstan in 2017. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372. (in Russian)]
- Койшибаев М.К. Болезни зерновых культур. Алматы: Бастау, 2002. [Koishybaev M.K. Diseases of Crops. Almaty: Bastau Publ., 2002. (in Russian)]
- Койшибаев М.К. Особенности развития желтой ржавчины на озимой пшенице в южном и юго-восточном Казахстане. В: Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур: Тез. докл. междунар. науч. конф. Алматы: Асыл кітап, 2010;145-147.
- [Koishybaev M.K. Features of the development of yellow rust on winter wheat in southern and southeastern Kazakhstan. In: Abstracts from the international scientific conference "Achievements and

- Prospects of the Agriculture, Breeding, and Biology of Agricultural Crops". Almaty: Asyl Kitap Publ., 2010;145-147. (in Russian)]
- Кохметова А., Али С., Сапахова З., Атишова М.Н. Идентификация генотиповносителей устойчивости к токсинам пиренофороза Ptr ToxA и Ptr ToxB *Pyrenophora tritici-repentis* в коллекции мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440.
- [Kokhmetova A.M., Ali Sh., Sapakhova Z., Atishova M.N. Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440. (in Russian)]
- Кохметова А.М., Кремнева О.Ю., Кейшилов Ж.С., Султанова Н.Ж. Расовый состав и вирулентность изолятов *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и Северо-Кавказском регионе России. *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* 2016;3:57-66.
- [Kokhmetova A.M., Kremneva O.Yu., Keyshilov Zh.S., Sultanova N.Zh. Race range and virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates in the Republic of Kazakhstan and the North Caucasus region of Russia. *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* 2016;3:57-66. (in Russian)]
- Кремнева О.Ю., Волкова Г.В. Структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе по морфолого-культуральным признакам и вирулентности. *Микология и фитопатология*. 2007;41(4):356-361.
- [Kremneva O.Yu., Volkova G.V. The structure of *Pyrenophora tritici-repentis* population in the North Caucasus by morphological and cultural characteristics and virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2007;41(4):356-361. (in Russian)]
- Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Афанасенко О.С., Михайлова Л.А. Селективное влияние сортов пшеницы с геном *Tsn1* на формирование популяции возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis*. *Вестн. защиты растений*. 2017;3(93):23-27.
- [Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Afanasenko O.S., Mikhailova L.A. Selective influence of wheat cultivars with *Tsn1* gene on the formation of tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* population. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2017;3(93):23-27. (in Russian)]
- Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Особенности взаимодействия генов *Tsn1* и *ToxA* в патосистеме *Triticum aestivum* – *Pyrenophora tritici-repentis*. *Вестн. защиты растений*. 2018;2(96):12-16.
- [Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Interaction of the *Tsn1* and *ToxA* genes in the *Triticum aestivum* – *Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2018;2(96):12-16. (in Russian)]
- Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб., 2012.
- [Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Tan Spot of Wheat. Guidelines for the study of populations of the tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* and resistance of varieties. St. Petersburg, 2012. (in Russian)]
- Поспехов Г.В. Особенности роста и плодоношения гриба *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. в культуре. *Микология и фитопатология*. 1989;23(2):117-121.
- [Pospekhov G.V. Growth and fruiting characteristics of the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. in culture. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1989;23(2):117-121. (in Russian)]
- Ali S., Gurung S., Adhikar T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. *Plant Dis.* 2010;94:229-235. DOI 10.1094/PDIS-94-2-0229.
- Ballance G.M., Lamari L., Bernier C.C. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1989;35:203-213. DOI 10.1016/0885-5765(89)90051-9.
- Chen X., Line R., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:345-355.
- Chu C.G., Friesen T.L., Xu S.S., Faris J.D. Identification of novel tan spot resistance loci beyond the known host-selective toxin insensitivity genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117:873-881.
- Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:13544-13549. DOI 10.1073/pnas.1004090107.
- Karelov A.V., Kozub N.O., Sozinov I.O., Sozinov O.O., Blume Ya.B. Allelic state of the molecular genetic markers for genes associated with sensitivity to *Pyrenophora tritici-repentis* toxins A and B and *Stangospora nodorum* toxin A among Ukrainian common wheat cultivars. *Visn. Ukr. Tov. Genetikov i Selektionerov.* 2015;13(1): 11-17.
- Kokhmetova A.M., Atishova M.N., Kumarbayaeva M.T., Leonova I.N. Phytopathological screening and molecular marker analysis of wheat germplasm from Kazakhstan and CIMMYT for resistance to tan spot. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):879-886. DOI 10.18699/VJ19.562.
- Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. *J. Plant Pathol.* 2017;99(1):161-167. DOI 10.4454/jpp.v99i1.3812.
- Kokhmetova A., Madenova A., Purnhauser L., Kampitova G., Urazaliyev R., Yessimbekova M. Identification of leaf rust resistance genes in wheat cultivars produced in Kazakhstan. *Cereal Res. Commun.* 2016;44(2):240-250. DOI 10.1556/0806.43.2015.056.
- Kokhmetova A.M., Morgounov A., Rsaliyev Sh., Yessenbekova G., Tyupina L. Wheat germplasm screening for stem rust resistance using conventional and molecular techniques. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2011;47:146-154. DOI 10.17221/3270-CJGPB.
- Kokhmetova A., Sharma R., Rsaliyev S., Galymbek K., Baymagambetova K., Ziyaev Z., Morgounov A. Evaluation of Central Asian wheat germplasm for stripe rust resistance. *Plant Genet. Resour.* 2018;16(2):178-184. DOI 10.1017/S1479262117000132.
- Lamari L., Bernier C.C. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* based on lesion type. *Can. J. Plant Pathol.* 1989;11:49-56.
- Lamari L., Bernier C.C. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*. 1991;81:1092-1095.
- Lamari L., Gilbert J., Tekauz A. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 1998;20(4):396-400.
- Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Amedov M., Saidov M., Djunosova M., Koichibayev M. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. *Can. J. Plant Pathol.* 2005;27: 383-388. DOI 10.1080/07060661.2012.695750.
- Maraite H., Mercado-Vergnes D., Renard M.-E., Zhanarbekova A., Duveiller E. Relevance of pathogen diversity in management of leaf spot and leaf blight diseases on wheat in Central Asia. *Agromeridian.* 2006;2:105-114.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appel R. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013. Suppl. 2014–2017. Available at: [www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes](http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes)
- Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in the North Caucasus and North-West Russia: the racial composition and dynamics of virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2014; 48(6):393-400. (in Russian)

- Mikhailova L.A., Ternyuk I.G., Mironenko N.V. Characteristic of *Pyrenophora tritici-repentis* populations by their virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2010;44(3):263-272. (in Russian)
- Orolaza N.P., Lamari L., Ballance G.M. Evidence of a hostspecific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*. 1995;85:1282-1287.
- Postnikova E.N., Khasanov B.A. Tan spot in Central Asia. In: Helminthosporium Blights of Wheat: Tan Spot. Mexico: CIMMYT-UCL, 1997;107-114.
- Riede C.R., Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci*. 1996;36(4):905-909.
- Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998;149:2007-2023.
- Rsaliev A.S., Rsaliev Sh.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):967-977. DOI 10.18699/VJ18.439. (in Russian)
- Saari E.E., Prescott L.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. *Plant Dis. Rep.* 1975;59:377-380.
- Shabeer A., Bockus W.W. Tan spot effects on yield and yield components relative to growth stage in winter wheat. *Plant Dis*. 1988;72:599-602.
- Singh P.K., Crossa J., Duveiller E., Singh R.P., Djurle A. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in CIMMYTs historical bread wheat set. *Euphytica*. 2016;207(3):515-525. DOI 10.1007/s10681-015-1528-7.
- Singh P.K., Singh R.P., Duveiller E., Mergoum M., Adhikari T.B., Elias E.M. Genetics of wheat-*Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Euphytica*. 2010;171:1-13.
- Singh S., Bockus W.W., Sharma I., Bowden R.L. A novel source of resistance in wheat to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1. *Plant Dis*. 2008;92:91-95.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak M.M. A decimal code for the growth stages of wheat. *Weed Res*. 1974;14:415-421.
- Zhanarbekova A.B., Koishibayev M., Maraite H., Duveiller E., Mercado D.M., Sliamova N.D. The distribution of tan spot on wheat and race structure of *Drechslera tritici-repentis* in Kazakhstan and neighboring CIS countries. In: Proc. Int. Sci. Conf. "Modern Problems of Plant Protection and Quarantine". Almaty, 2005;371-376.
- Zhang Z., Friesen T.L., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. *Mol. Breed*. 2009;23(1):35-49. DOI 10.1007/s11032-008-9211-5.

---

#### ORCID ID

A.M. Kokhmetova orcid.org/0000-0002-0186-7832  
N.M. Kovalenko orcid.org/0000-0001-9577-8816  
M.T. Kumarbaeva orcid.org/0000-0002-5588-6772

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта грантового финансирования № AP05132540.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.10.2020. После доработки 23.10.2020. Принята к публикации 23.10.2020.

## Сравнительный анализ диких и культурных видов чины (*Lathyrus* L.) по содержанию сахаров, многоатомных спиртов, свободных жирных кислот и фитостеролов

А.Е. Соловьева<sup>1</sup>, Т.В. Шеленга<sup>1</sup>, А.Л. Шаварда<sup>1, 2, 3</sup>, М.О. Бурляева<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: m.burlyaeva@vir.nw.ru

**Аннотация.** В условиях изменения климата увеличивается потребность в устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам сельскохозяйственных культурах. Виды чины характеризуются высокой питательной ценностью зеленой массы. Чина посевная – одна из наиболее устойчивых к засухе, заболачиванию, холоду, засолению, болезням и вредителям бобовых культур, выращивается при минимальных затратах. Создание сортов *Lathyrus* L. с улучшенным составом питательных веществ позволит получать качественные корма в районах с крайне неустойчивыми погодными условиями. В связи с этим нами исследованы закономерности изменчивости показателей углеводного комплекса (сахаров, их лактонных и метильных форм), многоатомных спиртов (в том числе фенолсодержащих), фитостеролов, свободных жирных кислот и ацилглицеролов в зеленой массе 32 образцов *Lathyrus sativus* L., *L. tuberosus* L., *L. sylvestris* L., *L. vernus* (L.) Bernh., *L. latifolius* L., *L. linifolius* (Reichard) Bassler. из коллекции ВИР, репродуцированных в Ленинградской области в контрастных условиях 2012 и 2013 гг. Содержание идентифицированных соединений варьировало в зависимости от генотипа, вида и метеорологических условий. Высокие температуры и большое количество осадков 2013 г. способствовали накоплению моносахаридов, более холодные и сухие условия 2012 г. – накоплению олигосахаридов, большинства многоатомных спиртов и свободных жирных кислот. Вид, возделываемый в культуре (*L. sativus*), отличался высоким содержанием сахаров, дикие виды – свободных жирных кислот (*L. latifolius*), ононитола, мио-инозитола и глицерол-3-фосфата (*L. linifolius*), МАГ и метилпентофуранозида (*L. vernus*). По результатам изучения большинство исследованных образцов перспективно для селекции новых высокопитательных и устойчивых к стрессам кормовых сортов *Lathyrus*.

Ключевые слова: *Lathyrus* L.; дикие виды; сорта; зеленая масса; газовая хроматография; генетические ресурсы; полиморфизм признаков.

**Для цитирования:** Соловьева А.Е., Шеленга Т.В., Шаварда А.Л., Бурляева М.О. Сравнительный анализ диких и культурных видов чины (*Lathyrus* L.) по содержанию сахаров, многоатомных спиртов, свободных жирных кислот и фитостеролов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):730-737. DOI 10.18699/VJ20.667

## Comparative analysis of wild and cultivated *Lathyrus* L. species to assess their content of sugars, polyols, free fatty acids, and phytosterols

А.Е. Solovyeva<sup>1</sup>, Т.В. Shelenga<sup>1</sup>, А.Л. Shavarda<sup>1, 2, 3</sup>, М.О. Burlyaeva<sup>1</sup> ✉

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

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: m.burlyaeva@vir.nw.ru

**Abstract.** Under the condition of climate change, the need for crops resistant to abiotic and biotic stresses is increasing. *Lathyrus* spp. are characterized by a high nutritional value of their green biomass. The grass pea is one of the most resistant to drought, waterlogging, cold, salinity, diseases and pests among cultivated legumes, and it is grown at minimal cost. The creation of new *Lathyrus* L. sorts with an improved nutrient composition of nutrients will allow to obtain high-quality feed in areas with extremely unstable weather conditions. In this connection, we studied the patterns of variability in the parameters of the carbohydrate complex (sugars, their lactone and methyl forms), polyols (including phenol-containing alcohols), phytosterols, free fatty acids (FFA) and acylglycerols in the green mass of 32 samples of *Lathyrus sativus* L., *L. tuberosus* L., *L. sylvestris* L., *L. vernus* (L.) Bernh., *L. latifolius* L., *L. linifolius* (Reichard) Bassler. from the VIR collection, reproduced in the Leningrad region in contrasting conditions 2012, 2013. The content of identified compounds varied depending on the genotype, species, and weather conditions. High temperatures and high level of precipitation in 2013 contributed to the accumulation of monosaccharides, in more colder and drier conditions in 2012 – oligosaccharides, most of polyols and FFA. The cultivated species (*L. sativus*) was distinguished by its high sugar content, and the wild species as follows: *L. latifolius* by

FFA; *L. linifolius* by ononitol, myo-inositol, and glycerol 3-phosphate; *L. vernus* by MAG and methylpentofuranoside. The species cultivated in culture (*L. sativus*) was distinguished by a high sugar content, wild species: *L. latifolius* – by FFA, *L. linifolius* – ononitol, myo-inositol and glycerol-3-phosphate, *L. vernus* – MAG and methylpentofuranoside. According to our results, the studied samples are promising for the selection of *Lathyrus* varieties with high nutrition quality and stress-resistant. Key words: *Lathyrus* L.; wild species; varieties; green mass; gas chromatography; polymorphism of characters.

**For citation:** Solovyeva A.E., Shelenga T.V., Shavarda A.L., Burlyayeva M.O. Comparative analysis of wild and cultivated *Lathyrus* L. species to assess their content of sugars, polyols, free fatty acids, and phytosterols. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):730-737. DOI 10.18699/VJ20.667

## Введение

В условиях изменения климата увеличивается число регионов с крайне нестабильными погодными условиями, что усиливает потребность в устойчивых к стрессам сельскохозяйственных культурах, выращиваемых для питания и на корм. Многие виды рода *Lathyrus* L. используются как пищевые, кормовые и лекарственные растения. Большинство дикорастущих видов чины применяется в качестве пастбищных и кормовых культур. Наиболее известна чина посевная (*Lathyrus sativus* L.), имеющая тысячелетнюю историю возделывания и культивируемая на всех континентах. Эта бобовая культура считается одной из наиболее устойчивых к засухе, затоплению и холоду (Campbell, 1997). Выращивается на различных типах почв, в том числе засоленных, и дает урожай в условиях, когда другие культуры погибают, поэтому считается «пищей для выживания» (Sarkar et al., 2019). Вид устойчив к болезням (мучнистой росе, ржавчине и др.) и вредителям (Sarkar et al., 2019), урожайность семян чины посевной достигает 2.9 т/га, зеленой массы – 5.2 т/га.

Семена и зеленая масса чины посевной отличаются высокой питательной ценностью. В зерне в зависимости от условий произрастания содержится от 18 до 34 % белка (Rizvi et al., 2016; Бурляева и др., 2018; Донской и др., 2019), в зеленой массе – от 10 до 27 % (Бурляева и др., 2015). Семена *L. sativus* и *L. cicera* L. характеризуются высокой концентрацией незаменимых аминокислот (63–64 %) и полиненасыщенных жирных кислот (66.9 и 58.6 % соответственно), преимущественно линолевой (Grela et al., 2012). Сено из чины по питательности не уступает люцерне (Poland et al., 2003). Содержание органических кислот в зеленой массе чины колеблется от 140.0 до 2140.0 мг/100 г, свободных аминокислот – от 11.8 до 610.0, соединений вторичного метаболизма – от 4.4 до 224.6 мг/100 г (Соловьева и др., 2019).

В России по сравнению с другими странами виды чины занимают незначительное место в растениеводстве. Селекционная работа ведется ограниченным числом учреждений, что отрицательно сказывается на использовании чины в сельскохозяйственном производстве.

Наши предыдущие исследования зеленой массы диких и культурных видов чины выявили широкий спектр соединений, входящих в ее состав (органические кислоты, свободные аминокислоты, вещества вторичного метаболизма). Были выделены образцы, перспективные для создания высокопитательных, устойчивых и лекарственных сортов *Lathyrus* (Соловьева и др., 2019).

В данной работе мы продолжили изучение метаболомных профилей зеленой массы чины по содержанию сахаров, свободных жирных кислот (св ЖК), многоатомных спиртов и ацилглицеролов. Задачей исследования

стала оценка меж- и внутривидового полиморфизма биохимических признаков у видов рода *Lathyrus* и влияния погодных условий на их изменчивость. Для ее решения был использован распространенный в настоящее время профайлинговый анализ (Steinhauser, Kopka, 2007), относящийся к группе так называемых метаболомных методик, которые, помимо получения данных о содержании отдельных метаболитов в объекте, позволяют оценивать состояние исследуемого объекта (Worley, Powers, 2012; Hong et al., 2016). Таким образом, нашей целью было изучение различий в состоянии метаболитных сетей образцов видов *Lathyrus* в контексте их таксономической характеристики и погодных условий.

## Материалы и методы

В опыт были включены 32 образца шести видов чины из коллекции ВИР: чина посевная (*L. sativus*), лесная (*L. sylvestris* L.), весенняя (*L. vernus* (L.) Bernh.), льнолистная (*L. linifolius* (Reichard) Bassler), широколистная (*L. latifolius* L.) и клубненосная (*L. tuberosus* L.), выращенные на полях Пушкинских опытных лабораторий Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) в 2012 и 2013 гг. по методикам, принятым в ВИР (Вишнякова и др., 2010). Метеорологические условия во время вегетации растений были контрастными. В 2012 г. сумма активных температур равнялась 1885.0 °С, количество осадков – 340.7 мм, в 2013 г. наблюдалось повышение суммы активных температур до 2474.3 °С и осадков до 646.4 мм.

Растения были собраны в стадии начала налива бобов. Анализировалась свежая зеленая масса пяти растений каждого образца (листья, соцветия, бобы в фазе молочной спелости, стебли). ГХ-МС профайлинг реализован по протоколу анализа триметилсилильных производных, разработанному в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова (БИН) РАН в процессе выполнения планового задания по теме АААА-А18-118032390136-5 «Оценка изменений корреляционной структуры метаболитных сетей в процессе роста и развития грибов и растений с позиций системной биологии», и адаптированному к использованию на Agilent 6850-MSD 5975 в РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка Санкт-Петербургского университета (СПбГУ) (Puzanskiy et al., 2018).

Растительный материал исследовали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС). Экстрагировали этанолом, затем выпаривали досуха на установке CentriVap Concentrator фирмы Labconco (США). Сухой остаток растворяли в пиридине, содержащем 1000 ppm трикозана, используемого в качестве внутреннего стандарта, затем вводили 20 мкл BSTFA ([N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамид]) (Supelco, США). Для

обеспечения достаточной полноты протекания реакции силилирования, вials выдерживали в течение 15 мин при температуре 100 °С в специальном термоблоке. Образцы исследовали на хромато-масс-спектрометре фирмы Agilent 6850 с масс-селективным детектором Agilent 5975 D (США). Хроматографическое разделение выполняли на капиллярной колонке Agilent HP-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм в режиме линейного программирования температуры от 70 до 325 °С со скоростью 6°/мин (50 мин), газ-носитель – гелий. Анализ проводился в режиме постоянства скорости газового потока через колонку (1 мл/мин). Температура испарителя 300 °С, деление потока при вводе проб 1:20. Сканирование масс-спектров от 50 до 1050 а. е. м. со скоростью 2 скана/с. Хроматограммы образцов регистрировали по полному ионному току.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ UniChrom, AMDIS и библиотек масс-спектров NIST 2010, а также in-house библиотек Научного парка СПбГУ и БИН РАН.

Расчет количества ТМС (триметилсилил) производных идентифицированных соединений проводили методом внутренней стандартизации по трикозану с помощью программы UniChrom. При примененном нами полуколичественном анализе (semiquantitation) коэффициенты чувствительности детектора к отдельным соединениям не учитываются (Worley, Powers, 2012). Данные анализа представлены в условных единицах (усл. ед.) (Ситкин и др., 2013).

Статистическую обработку данных проводили в программах Statistica7 и Excel 7.0 for Windows с помощью факторного анализа по методу главных компонент и однофакторного дисперсионного анализа. Достоверность воздействия условий среды на проявление биохимических признаков оценивали при помощи критерия Фишера (LSD-test), долю (силу) влияния фактора –  $\eta^2$  (коэффициент внутриклассовой корреляции по Фишеру) вычисляли по формуле (Ивантер, Коросов, 2003):

$$\eta^2 = \frac{SS_{\text{фактора}}}{SS_{\text{общая}}} \times 100 \%,$$

где  $\eta^2$  – доля влияния фактора, %;  $SS_{\text{фактора}}$  – факторная сумма квадратов отклонений;  $SS_{\text{общая}}$  – общая сумма квадратов отклонений.

## Результаты

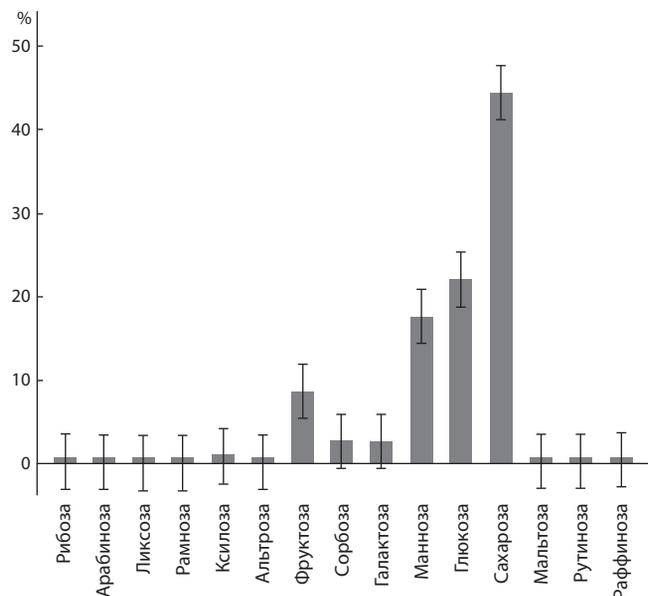
В результате изучения ГХ-МС профайлинга зеленой массы видов *Lathyrus* L. выявлено около 300 компонентов. Органические кислоты, свободные аминокислоты и фенолсодержащие соединения рассмотрены нами ранее (Соловьева и др., 2019). В настоящей статье приведены данные сравнительного анализа содержания в зеленой массе чины более 60 веществ: сахаров, многоатомных спиртов, фитостеролов, св ЖК. Содержание идентифицированных соединений представлено в усл. ед. (см. таблицу, Прил. 1)<sup>1</sup>.

**Углеводный состав** зеленой массы чины состоял из моно- и олигосахаров. Моносахара были представлены

Сравнительный анализ содержания сахаров, многоатомных спиртов и св ЖК в зеленой массе некоторых видов *Lathyrus* L. (в усл. ед.)

Вид	Сахара	Многоатомные спирты	св ЖК
<i>L. sativus</i> L.	1808 ± 124* 423–4470**	487 ± 66 77–3184	162 ± 25 10–732
<i>L. sylvestris</i> L.	825 ± 101 592–1162	340 ± 73 244–630	130 ± 42 40–288
<i>L. vernus</i> (L.) Bernh.	304 ± 204 40–569	1041 ± 22 1019–1062	50 ± 7 43–56
<i>L. linifolius</i> (Reichard) Bassler	327 ± 5 322–331	2343 ± 247 1895–2791	114 ± 3 110–117
<i>L. latifolius</i> L.	488 ± 10 478–4990	360 ± 31 329–391	345 ± 81 264–427
<i>L. tuberosus</i> L.	144 ± 25 119–169	66 ± 17 49–82	86 ± 34 52–120

\* Среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического; \*\* вариабельность (минимум–максимум).



**Рис. 1.** Компонентный состав моносахаров и олигосахаров в процентах от общего содержания сахаров в зеленой массе видов *Lathyrus* spp. (средние значения, усл. ед.; стандартная погрешность).

пентозами (рибозой, арабинозой, ликсозой, ксилозой) и гексозами (фруктозой, глюкозой, сорбозой, галактозой, маннозой, рамнозой, альтрозой). Олигосахара включали дисахариды (сахарозу, мальтозу, рутинозу) и трисахарид (раффинозу). Основными сахарами в группе гексоз были фруктоза, глюкоза и манноза, в группе пентоз – ксилоза, в группе дисахаридов – сахароза (рис. 1). Кроме того, идентифицированы метаболически активные формы сахаров – лактонные (глюкоза-1,4-лактон), фосфатные (фруктоза-6-фосфат, глюкоза-1-фосфат) и метильные (метилпентафуранозид, метилглюкофуранозид).

<sup>1</sup> Приложения 1–3 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx11.pdf>

Относительное содержание сахаров варьировало по годам (рис. 2) и в зависимости от генотипа. Большая часть сахаров относилась к моносахарам (67 % от суммы сахаров), которые были представлены главным образом гексозами (66 % от суммы моносахаров). Пентозы составляли чуть более 1 %, олигосахара – 32.6 %, в том числе дисахариды – 32.3 %, трисахариды – 0.3 %. Из дисахаридов преобладала сахароза (31.9 %).

Среднее значение сахаров в 2012 г. составило 1442 усл. ед. (диапазон от 40 до 4470 усл. ед.). Основная часть сахаров относилась к дисахаридам – 903 усл. ед. (от 0 до 3983). Средняя сумма моносахаров равнялась 538 усл. ед. (от 40 до 2085). Они были представлены преимущественно гексозами – 530 усл. ед. (от 29 до 2082). Количество пентоз составило 8 усл. ед. (от 0 до 24). Из трисахаридов выявлена раффиноза – средний показатель 1 усл. ед. (от 0 до 14). Сумма олигосахаров в среднем достигала 904 усл. ед. (от 0 до 3984).

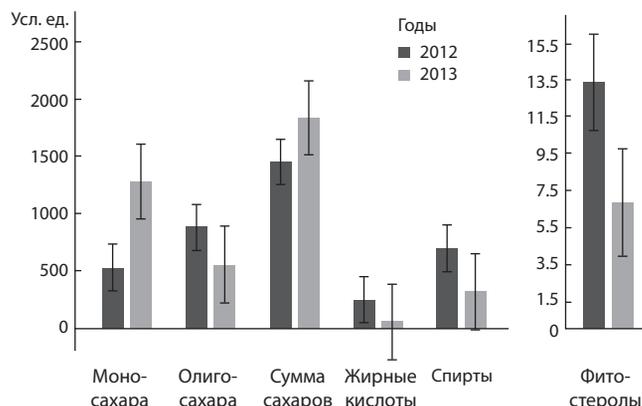
Самое высокое содержание сахаров в 2012 г. определено у образцов *L. sativus* (до 4470 усл. ед.) и *L. sylvestris* (до 1162). Остальные виды чины накапливали менее 600 усл. ед. сахаров. Самые низкие значения наблюдались у образцов *L. tuberosus* (144 усл. ед.).

В 2013 г. суммарное содержание сахаров, в том числе моносахаров (гексоз и пентоз), в среднем увеличилось до 1830 и 1278 усл. ед. соответственно, а сахарозы снизилось до 551 усл. ед. По сравнению с 2012 г. изменились границы варьирования суммы сахаров (от 144 до 2511 усл. ед.), моносахаров (от 63 до 1842, в том числе гексоз – от 63 до 1751) и олигосахаров (от 273 до 1060 усл. ед.). Основную часть сахаров в 2013 г. составляли моносахара (гексозы). Средние значения суммы олигосахаров в 2013 г. уменьшились до 532 усл. ед., раффинозы – увеличились до 11 усл. ед. Диапазон изменчивости пентоз и раффинозы (0.3–64 и 0–40 усл. ед. соответственно) в 2013 г. стал шире по сравнению с предыдущим годом.

Высоким содержанием сахаров (более 2831 усл. ед.) за весь период исследования отличались образцы *L. sativus*.

**Многоатомные спирты и фитостеролы.** Большая часть идентифицированных многоатомных спиртов относилась к шестиатомным полиолам (сорбитол, дульцитол, маннитол, инозитол), их сумма в среднем составила 476 усл. ед. (см. Прил. 1). Они были представлены в основном инозитолом, его изомерами и производными (миоинозитолом, хиро-инозитолом, метил-инозитолом, ононитолом, галактинолом), их сумма составила 413 усл. ед. Кроме вышперечисленных, идентифицированы глицерол, эритритол, триетол, ксилитол, арабинитол, фитол. Также выявлены фитостеролы (кампестерол, стигмастерол,  $\beta$ -ситостерол, изофукостерол, тараксастерол) и фенолсодержащие спирты (кониферол,  $\alpha$ -токоферол, кемпферол, пирогаллол), их сумма равнялась 9 и 3 усл. ед. соответственно. В группе фитостеролов преобладал  $\beta$ -ситостерол (8 усл. ед.). Помимо того, идентифицированы фосфатные формы глицерола, инозитола и продукты обмена глицерофосфолипидов (глицерол-3-фосфат, миоинозитол-2-фосфат). Фенолсодержащие спирты были рассмотрены нами ранее (Соловьева и др., 2019).

Содержание полиолов значительно менялось по годам исследования (см. рис. 2). В 2012 г. их среднее значение



**Рис. 2.** Средние значения моносахаров, олигосахаров, суммы сахаров, свободных жирных кислот, многоатомных спиртов и фитостеролов в зеленой массе чины в 2012–2013 гг. (средние значения, усл. ед.; стандартная погрешность).

равнялось 744 усл. ед., границы варьирования – от 171 до 3184. В 2013 г. количество полиолов снизилось до 317 усл. ед., а диапазон стал уже (от 77 до 442). У *L. sativus* в 2012 г. данный показатель (637 усл. ед.) был меньше среднего (рассчитанного для всех образцов), в 2013 г. он сократился до 322 усл. ед. Аналогичная картина наблюдалась у образцов *L. sylvestris*: в 2012 г. – 437, в 2013 г. – 275 усл. ед.

Самое высокое содержание полиолов определено у *L. sativus* (3152 усл. ед.), более низкое – у образцов *L. linifolius* (2307), *L. vernus* (1050), *L. sylvestris* (619), *L. latifolius* (348), наименьшее – у *L. tuberosus* (66).

Максимальное содержание эритритола и фитостеролов наблюдалось у образцов *L. sativus* (1 и 22), суммы полиолов – у *L. sativus* и *L. linifolius* (3115 и 2307 усл. ед. соответственно).

**Свободные жирные кислоты и ацилглицеролы.** Идентифицировано 19 св ЖК, среди них насыщенные (каприновая, ундециловая, лауриновая, пальмитиновая, стеариновая, арахиновая, бегеновая, лигноцериновая, церотиновая, монтановая, мелиссовая кислоты), ненасыщенные (олеиновая, линолевая, линоленовая кислоты), гидроксикислоты (гидроксиктодекановая, гидрокситетракозановая, гидроксигекакозановая, гидроксиктакозановая, гидрокситриактановая) и моноацилглицеролы (МАГ-1 С16:0, МАГ-1 С18:0) (см. Прил. 1).

В 2012 г. общее содержание св ЖК в зеленой массе чины составило 248 усл. ед. (пределы варьирования от 37 до 732), МАГ – 1 усл. ед. (от 0 до 21). В 2013 г. значения св ЖК и МАГ снизились до 52 и 0.5 усл. ед., а диапазон сузился (10–138 для св ЖК и 0–2 для МАГ) (см. рис. 2).

Гидроксигекакозановая, пальмитиновая, линоленовая и стеариновая кислоты характеризовались самыми высокими показателями, их доля в общем содержании св ЖК и гидроксикислот равнялась 32, 22, 14 и 13 % соответственно. Доля линолевой кислоты в среднем составила 7 %, каприновой – 5 %, олеиновой – 3 %, гидроксиктакозановой – 2 %, ундециловой – 1 %. Доля минорных св ЖК – менее 1 %.

Наибольшее среднее содержание св ЖК установлено для образцов *L. latifolius* (до 345 усл. ед.). У других видов

чины эти показатели были ниже: *L. sativus* – 162 усл. ед., *L. sylvestris* – 131, *L. linifolius* – 114, *L. tuberosus* – 86 усл. ед. Для *L. vernus* определены самые низкие значения св ЖК – 50 усл. ед., однако этот вид выделился по содержанию МАГ-1 С16:0 (до 11 усл. ед.) и МАГ-1 С18:0 (до 10). У остальных видов показатели МАГ были значительно ниже.

### Обсуждение

В нашем эксперименте наблюдалась значительная меж- и внутривидовая изменчивость образцов *Lathyrus* как по количественному, так и по качественному составу идентифицированных веществ (см. Прил. 1).

Анализ полученных результатов показал сильное варьирование показателей в зависимости от погодных условий (см. рис. 2). Высокие температуры и большое количество осадков (2013 г.) способствовали накоплению сахаров за счет увеличения доли моносахаров, а более холодные и сухие условия 2012 г. – накоплению многоатомных спиртов, св ЖК и олигосахаров.

Для определения достоверности влияния погодных условий на изученные признаки был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Изменчивость показателей суммы сахаров и св ЖК, рибозы, арабинозы, ксилозы, альтрозы, рамнозы, маннозы, глюкозы, галактозы, сахарозы, мальтозы, рутинозы, раффинозы, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, лигноцеринового, гидроксигексаказановой, гидрокситриактановой кислот, стигмастерола, триетолола, глицерола, ксилитола, эритритолола, ононитолола, сорбитолола, маннитолола, фитолола,  $\beta$ -ситостерола, кампестерола, фосфата, глюкоза-1-фосфата, метилфосфата, треоно-1,4-лактона и глюконовой кислоты-1,4-лактона достоверно зависела от условий выращивания (рис. 3, Прил. 2). На остальные соединения погодные условия не оказывали достоверного влияния. Наиболее сильно условия произрастания воздействовали на накопление в зеленой массе маннозы (доля влияния  $\eta^2 = 62.9\%$ ), рамнозы (62.3), глюкозы (56.7), раффинозы (41.1), альтрозы (40.9%). Изменчивость показателей суммы св ЖК определялась метеоусловиями на 34.1%, особо зависимыми оказались линоленовая (51.1) и пальмитиновая (46.9%) кислоты. Из фитостеролов самые высокие значения  $\eta^2$  были установлены у кампестерола (80.2%) и стигмастерола (71.6), из многоатомных спиртов – у триетолола (53.6) и маннитолола (37.9%). Заметно воздействовала погода на содержание производных фосфорной кислоты (60.0%), глюкозо-1-фосфата (36.7) и треоно-1,4-лактона (31.5%). Таким образом, погодные условия оказывали существенное влияние на накопление в зеленой массе чины значительной части идентифицированных соединений.

Для определения взаимосвязей между биохимическими признаками, выявления закономерностей их варьирования в зависимости от погодных условий, генотипа и таксономической (видовой) принадлежности был проведен факторный анализ по методу главных компонент. В результате выявлено 10 факторов, определяющих 65.8% общей дисперсии признаков. В первом факторе (F1 = 20.7% от общей дисперсии) с отрицательной взаимосвязью согласованно изменяются две большие группы биохимических

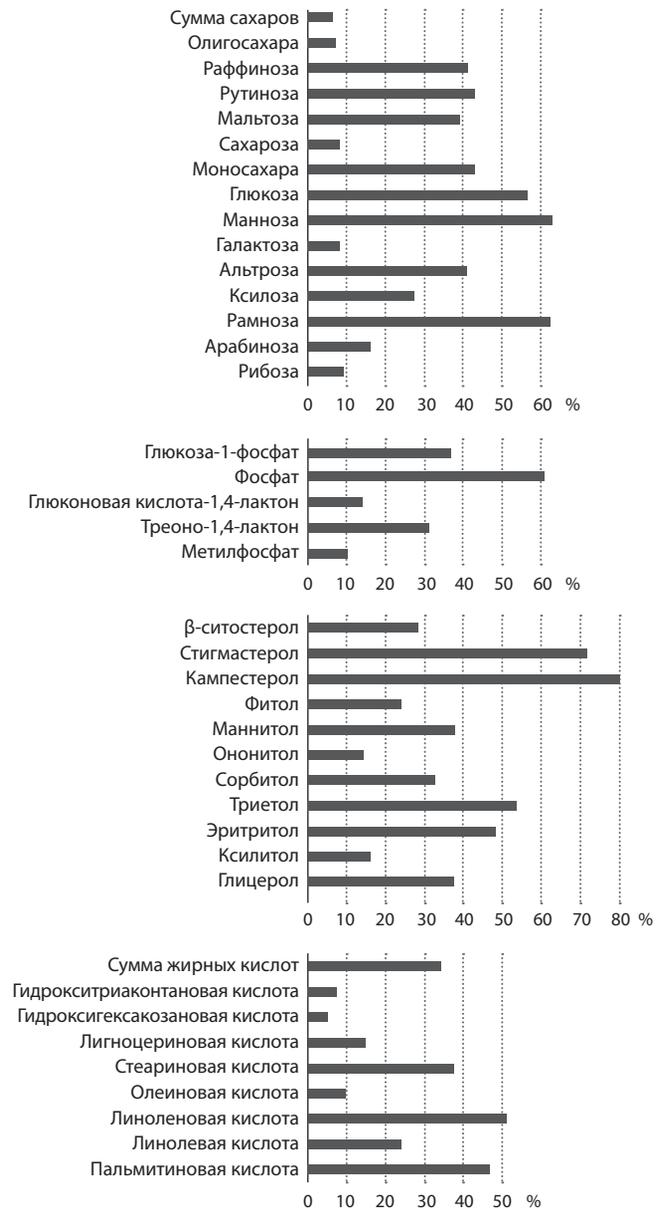


Рис. 3. Доля влияния ( $\eta^2$ ) погодных условий на изменчивость биохимических признаков.

признаков. В первую группу вошли рамноза, ксилоза, альтроза, глюкоза, мальтоза, рутиноза, раффиноза, эритритол, триетол, маннитол, кампестерол, стигмастерол, фосфат, глюкоза-1-фосфат, во вторую – пальмитиновая, линоленовая, линоленовая, стеариновая кислоты, глицерол, сорбитол,  $\beta$ -ситостерол, треоно-1,4-лактон. Этот фактор показывает, что в зеленой массе чины при высоком содержании соединений из первой группы наблюдается низкое содержание веществ из второй, и наоборот. Ведущими признаками F1, определяющими варьирование остальных, являются кампестерол, стигмастерол, линоленовая и пальмитиновая кислоты. Второй фактор (F2 7.5%) выявляет связь между сорбозой и фруктозой. Третий (F3 6.8%) определяет взаимосвязь метил-инозитола, глицеральдегида, альфа-метилглюкофуранозиды, метилглюкозида. В четвертом (F4 6.3%) скоррелированы

каприновая, олеиновая и гидрокситетракозановая кислоты. Пятый (F5 5.4 %) включает арахидоновую, бегеновую, гидроксигексакозановую и гидроксиктакозановую кислоты. В состав шестого фактора (F6 4.8 %) входят меллиссовая и гидроксиктакозановая кислоты, седьмого (F7 4.1 %) – ононитол, восьмого (F8 3.6 %) – глицерол-3-фосфат, девятого (F9 3.5 %) – лупеол и гуанозин, десятого (F10 3.3 %) – мио-инозитол-2-фосфат и уридин.

Изучая распределение образцов в системе двух первых факторов, можно заметить, что растения сгруппировались по годам исследования (рис. 4). В правой части графика сконцентрировались сорта с высокими показателями сахаров (рамнозы, ксилозы, альтрозы, глюкозы, мальтозы, рутинозы, раффинозы, глюкозы-1-фосфата), фосфата, эритритола, триктола, маннитола, кампестерола, стигмастерола и низкими – св ЖК (пальмитиновой, линолевой, линоленовой, стеариновой), глицерола, сорбитола,  $\beta$ -ситостерола, треоно-1,4-лактона. В левой части расположились образцы с противоположными значениями перечисленных выше соединений, в верхней – с минимальными показателями сорбозы и фруктозы, в нижней – с максимальными величинами этих же сахаров. Таким образом, образцы репродукции 2013 г. сосредоточились в зоне высокого содержания большинства сахаров, а образцы 2012 г. – в области св ЖК. Неблагоприятные условия 2012 г. способствовали накоплению глицерола, сорбитола,  $\beta$ -ситостерола, а оптимальные для роста и развития условия 2013 г. – эритритола, триктола, маннитола, кампестерола, стигмастерола. У дикорастущих видов *L. vernus*, *L. linifolius* и *L. tuberosus* показатели большинства сахаров, многоатомных спиртов и св ЖК находились в области средних значений, а фруктозы и сорбозы – в области низких значений. Образцы *L. sylvestris* отличались от других дикорастущих форм более высоким содержанием фруктозы и сорбозы. *L. latifolius* по многим признакам был близок к *L. sylvestris*. Возделываемый в культуре *L. sativus* отличался высоким полиморфизмом всех изученных признаков. Большинство сортов *L. sativus* расположились в области средних и высоких значений фруктозы и сорбозы, по остальным биохимическим признакам видоспецифичных группировок не наблюдалось: образцы распределились по графику в соответствии с индивидуальными особенностями генотипов и их нормой реакции на погодные условия.

Факторы F3–F10 выявили неоднородность образцов по каждой из главных компонент (Прил. 3). Максимальные показатели нагрузок по большинству факторов отмечались у образцов *L. sativus* (к-34, к-900), *L. linifolius* (N-597422), *L. vernus* (N-591179, N-593953).

По данным U. Chavan (1998), зеленая масса чины характеризуется высоким содержанием сахаров. В растении сахара играют роль осмопротекторов, стабилизаторов мембран и белков, в том числе при воздействии низких температур. Поэтому образцы с высоким содержанием сахаров, особенно олигосахаров и раффинозы, более устойчивы к абиотическим факторам среды. Олигосахара накапливаются растением в ответ на холодовой стресс (Krasenski, Jonak, 2012; Moreno et al., 2018). В нашем опыте в год с более низкими температурами наблюдался рост содержания олигосахаров, что подтверждает вы-

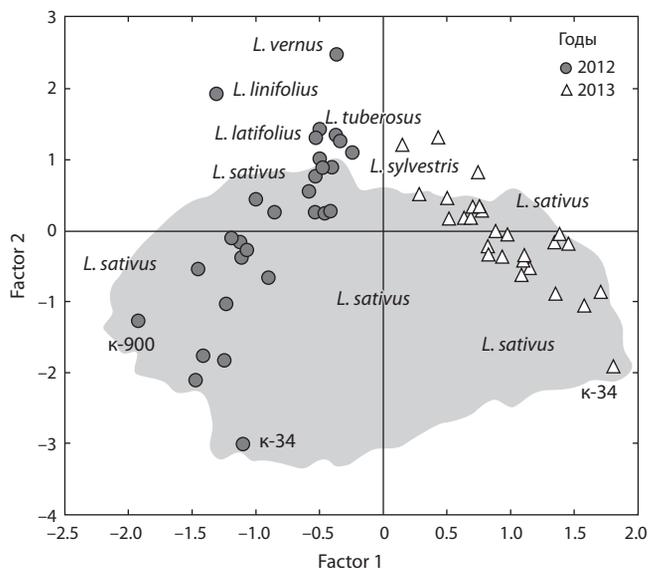


Рис. 4. Распределение образцов в факторном пространстве первых двух факторов (Factor 1, Factor 2).

песказанное. Самые высокие значения раффинозы были определены у *L. sativus*, образцы этого вида могут быть рекомендованы для селекции адаптивных к стрессу и холодоустойчивых сортов чины.

В ряде исследований отмечается, что содержание в пище и кормах раффинозы более 0.4 % на сухое вещество может вызвать диспепсические расстройства (Muzquiz et al., 2012). В нашем эксперименте доля раффинозы не превышала обозначенной величины, поэтому зеленую массу всех изученных видов чины можно использовать на корм животным.

Маннитол, арабинитол, сорбитол, галактинол, дульцитол, эритритол и другие полиолы улучшают адаптационные возможности растения к солевому, водному и температурному стрессам. Образцы с их высоким содержанием могут быть выделены как потенциально устойчивые к неблагоприятным факторам среды (Tibbett et al., 2002; Majumder, Biswas, 2006; Dong et al., 2013; Baudier et al., 2014; Zhou et al., 2014; Patel, Williamson, 2016; Moreno et al., 2018). По нашим данным содержание глицерола и сорбитола в зеленой массе чины было выше в холодных и сухих условиях 2012 г. (23 и 56 усл. ед. соответственно), что подтверждает результаты вышеперечисленных авторов. Самые высокие показатели глицерола и сорбитола установлены для *L. sativus*.

Инозитол, его изомеры и производные, в том числе фосфатные (метил-инозитол, хиро-инозитол, мио-инозитол, ононитол, мио-инозитол-2-фосфат), участвуют в биосинтезе клеточных мембран, регуляции роста растений, входят в состав фосфатного «депо» клетки, относятся к антистрессовым факторам защиты растений (осмолитам) (Dong et al., 2013). В нашем исследовании средние показатели ононинола были выше при развитии растений в холодных сухих условиях, чем в оптимальных (505 и 245 усл. ед. соответственно). Подобная картина наблюдалась и по содержанию в зеленой массе *L. sativus* маннитола, ксилитола, эритритола – в неблагоприятных

условиях их количество возрастало. Максимальное содержание метил-инозитола, хиро-инозитола и мио-инозитол-2-фосфата было выявлено у *L. sativus* (200, 40 и 0.5 усл. ед. соответственно), мио-инозитола и ононитола – у *L. linifolius* (212 и 2088 усл. ед. соответственно). В целом у всех видов чины отмечены высокие показатели многоатомных спиртов, что объясняет их устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам.

Фитостеролы играют большую роль в росте и развитии растений, так как являются предшественниками фитогормонов (Beebe, Turgeon, 1992; Deng et al., 2016; Valitova et al., 2016). Согласно литературным сведениям, основной фитостерол в растениях –  $\beta$ -ситостерол, что совпадает с нашими результатами: 86.5 % от суммы идентифицированных нами стеролов приходилось на  $\beta$ -ситостерол. Суммарное содержание фитостеролов в зеленой массе чины составило 39 усл. ед.

На поверхности семян *L. sativus* среди св ЖК преобладают пальмитолеиновая и пальмитиновая кислоты, далее по представленности идут: стеариновая, миристиновая, олеиновая, арахидовая, каприновая, бегеновая, линолевая и линоленовая кислоты (Adhikary et al., 2016). В нашем исследовании основная часть идентифицированных св ЖК также приходилась на пальмитиновую, линолеву, линоленовую, олеиновую и стеариновую кислоты. Наличие этих св ЖК в зеленой массе характеризует чину как высокопитательную кормовую культуру.

Таким образом, в зеленой массе чины нами идентифицировано около 300 соединений (Соловьева и др., 2019), более 60 из них описаны в настоящей статье. Показатели большинства проанализированных биохимических веществ отличались широким диапазоном варьирования. Они значительно изменялись в зависимости от генотипа, видовой принадлежности образцов и года исследования. Изученные образцы характеризовались высоким внутри- и межвидовым полиморфизмом как по количественному, так и по качественному составу идентифицированных веществ.

Дикорастущие виды *L. vernus*, *L. linifolius* и *L. tuberosus* имели средние показатели большинства сахаров, многоатомных спиртов, св ЖК и низкие – фруктозы и сорбозы. *L. sylvestris* и *L. latifolius* по содержанию сахаров занимали промежуточное положение между перечисленными дикими видами и возделываемым в культуре *L. sativus*. Вид *L. sativus* выделялся максимальным количеством сахаров в зеленой массе, *L. linifolius* – ононитола, мио-инозитола и глицерол-3-фосфата, *L. vernus* – МАГ и метилпентофуранозиды.

Сравнительный анализ позволил выделить образцы для дальнейшего углубленного изучения сахаров, многоатомных спиртов, св ЖК, фитостеролов и др. Это особенно ценно для будущих исследований в связи с тем, что данные вещества служат показателями качества зеленой массы и устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Выделенные образцы могут быть использованы для получения как высокопитательных, так и устойчивых сортов *Lathyrus*. Учитывая современные достижения геномики, можно рассматривать такие образцы как источники качества и устойчивости не только для чины, но и для других культур.

## Заключение

Выявлен значительный полиморфизм биохимических признаков у диких и культурных представителей рода *Lathyrus*. Полученные результаты доказывают высокий потенциал изученных видов для современного сельскохозяйственного производства и новых направлений селекции.

Привлечение *L. sativus*, *L. sylvestris*, *L. vernus*, *L. linifolius*, *L. latifolius*, *L. tuberosus* в кормопроизводство расширит ассортимент используемых кормовых культур. Благодаря устойчивости к абиотическим стрессам и выявленной питательной ценности, виды чины могут играть важную роль в поддержании продовольственной безопасности в районах с непредсказуемыми погодными условиями.

## Список литературы / References

- Бурляева М.О., Соловьева А.Е., Силенко С.И. Исследование генетического разнообразия чины посевной по адаптивности биохимических показателей зеленой массы. *Достижения науки и техники АПК*. 2015;7:52-55.
- [Burlyayeva M.O., Solovyeva A.E., Silenko S.I. The study of grass pea genetic diversity in terms of adaptability of green mass biochemical indices. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;7:52-55. (in Russian)]
- Бурляева М.О., Соловьева А.Е., Никишкина М.А., Сергеев Е.А., Тихонова Н.И. Чина посевная (*Lathyrus sativus* L.): исходный материал для селекции на продуктивность и качественный состав семян и зеленой массы. В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 856. СПб., 2018.
- [Burlyayeva M.O., Solovyeva A.E., Nikishkina M.A., Sergeev E.A., Tikhonova N.I. Grass pea (*Lathyrus sativus* L.): the initial material for breeding for productivity and quality composition of seeds and green mass. In: Catalog of the World VIR Collection. Iss. 856. St. Petersburg, 2015. (in Russian)]
- Вишнякова М.А., Буравцева Т.А., Булынец С.В., Бурляева М.О., Семенова Е.В., Сеферова И.В., Александрова Т.Г., Яньков И.И., Егорова Г.П., Герасимова Т.В. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение. СПб., 2010.
- [Vishnyakova M.A., Buravtseva T.A., Bulyntsev S.V., Burlyayeva M.O., Semenova E.V., Seferova I.V., Aleksandrova T.G., Yan'kov I.I., Egorova G.P., Gerasimova T.V. The Collection of the World's Genetic Resources of Grain Legumes in VIR: Replenishment, Preservation and Study. St. Petersburg, 2010. (in Russian)]
- Донской М.М., Донская М.В., Бобков С.В., Селихова Т.Н., Наумкин В.П. Биохимический состав семян чины посевной. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2019;1(29):70-78. DOI 10.24411/2309-348X-2019-11075.
- [Donskoj M.M., Donskaya M.V., Bobkov S.V., Selihova T.N., Naumkin V.P. Biochemical composition of seeds of indian pea. *Zernobobovoye i Krupnyane Kultury = Legumes and Groat Crops*. 2019; 1(29):70-78. DOI 10.24411/2309-348X-2019-11075. (in Russian)]
- Ивантер Е.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск, 2003.
- [Ivanter E.V., Korosov A.V. Introduction to Quantitative Biology. Petrozavodsk, 2003. (in Russian)]
- Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Вахитов Т.Я., Орешко Л.С., Жигалова Т.Н. Метаболом сыворотки крови по данным газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) у пациентов с язвенным колитом и больных целиакией. *Эксперим. и клин. гастроэнтерология*. 2013;12:44-57.
- [Sitkin S.I., Tkachenko Ye.I., Vakhitov T.Ya., Oreshko L.S., Zhigalova T.N. Serum metabolome by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in ulcerative colitis and celiac disease. *Ekspri-*

- mental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2013;12:44-57. (in Russian)]
- Соловьева А.Е., Шеленга Т.В., Шаварда А.Л., Бурляева М.О. Сравнительный анализ диких и культурных видов чины (*Lathyrus* L.) по содержанию веществ первичного и вторичного метаболизма. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(6):667-674. DOI 10.18699/VJ19.539.
- [Solovyeva A.E., Shelenga T.V., Shavarda A.L., Burlyayeva M.O. Comparative analysis of wild and cultivated *Lathyrus* L. spp. according to their primary and secondary metabolite contents. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):667-674. DOI 10.18699/VJ19.539.]
- Adhikary P., Mukherjee A., Barik A. Free fatty acids from *Lathyrus sativus* seed coats acting as short-range attractants to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored. Prod. Res.* 2016;67:56-62. DOI 10.1016/j.jspr.2016.01.005.
- Baudier K.M., Kaschock-Marenda S.D., Patel N., Diangelus K.L., O'Donnell S., Marenda D.R. Erythritol, a non-nutritive sugar alcohol sweetener and the main component of Truvia®, is a palatable ingested insecticide. *PLoS One*. 2014;9(6):e98949. DOI 10.1371/journal.pone.0098949.
- Beebe D.U., Turgeon R. Localization of galactinol, raffinose, and stachyose synthesis in *Cucurbita pepo* leaves. *Planta*. 1992;188(3):354. DOI 10.1007/BF00192802.
- Campbell C.G. Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Vol. 18. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1997. <https://www.biodiversityinter.nal.org/e-library/publications/detail/grass-pea-lathyrus-sativus-l/>
- Chavan U.D. Chemical and biochemical components of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). Canada Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, 1998. <http://research.library.mun.ca/id/eprint/1196>
- Deng S., Wei T., Tan K., Hu M., Li F., Zhai Y., Ye S., Xiao Y., Hou L., Pei Y., Luo M. Phytosterol content and the campesterol: sitosterol ratio influence cotton fiber development: role of phytosterols in cell elongation. *Sci. China Life Sci.* 2016;59:183-193. DOI 10.1007/s11427-015-4992-3.
- Dong J., Yan W., Bock C., Nokhrina K., Keller W., Georges F. Perturbing the metabolic dynamics of myo-inositol in developing *Brassica napus* seeds through *in vivo* methylation impacts its utilization as phytate precursor and affects downstream metabolic pathways. *BMC Plant Biol.* 2013;13:84. DOI 10.1186/1471-2229-13-84.
- Grella E.R., Rybiński W., Matras J., Sobolewska S. Variability of phenotypic and morphological characteristics of some *Lathyrus sativus* L. and *Lathyrus cicera* L. accessions and nutritional traits of their seeds. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012;59:1687-1703. DOI 10.1007/s10722-011-9791-5.
- Hong J., Yang L., Zhang D., Shi J. Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(6):767. DOI 10.3390/ijms17060767.
- Krasenski J., Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 2012;63(4):1593-1608. DOI 10.1093/jxb/err460.
- Majumder A.L., Biswas B.B. Biology of Inositols and Phosphoinositides. Springer, 2006. DOI 10.1007/0-387-27600-9.
- Moreno A.S., Perotti V.E., Margarit E., Bello F., Vázquez D.E., Podestá F.E., Tripodi K.E.J. Metabolic profiling and quality assessment during the postharvest of two tangor varieties subjected to heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 2018;142:10-18. DOI 10.1016/j.postharvbio.2018.03.014.
- Muzquiz M., Varela A., Burbano C., Cuadrado C., Guillamon E., Pedrosa M.M. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochem. Rev.* 2012;11:227-244.
- Patel T.K., Williamson J.D. Mannitol in plants, fungi, and plant-fungal interactions. *Trends Plant Sci.* 2016;21(6):486-497. DOI 10.1016/j.tplants.2016.01.006.
- Poland C., Faller T., Tisor L. Effect of chickling vetch (*Lathyrus sativus* L.) or alfalfa (*Medicago sativa*) hay in gestating ewe diets. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*. 2003;3:38-40.
- Puzanskiy R., Romanyuk D., Shishova M. Coordinated alterations in gene expression and metabolomic profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during batch autotrophic culturing. *Bio. Comm.* 2018;63(1):87-99. DOI 10.21638/spbu03.2018.110.
- Rizvi A.H., Sarker A., Dogra A. Enhancing grass pea (*Lathyrus sativus* L.) production in problematic soils of South Asia for nutritional security. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 2016;76:583-592. DOI 10.5958/0975-6906.2016.00074.2.
- Sarkar A., Emmrich P.M.F., Sarker A., Zong X., Martin C., Wang T.L. Grass pea: remodeling an ancient insurance crop for climate resilience. In: Kole C. (Ed.). *Genomic Designing of Climate-Smart Pulse Crops*. Springer, Cham, 2019;425-469. DOI 10.1007/978-3-319-96932-9\_9.
- Steinhauser D., Kopka J. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: primary metabolism. In: Baginsky S., Fernie A.R. (Eds.). *Plant Systems Biology*. Basel: Birkhäuser Basel, 2007. DOI 10.1007/978-3-7643-7439-6\_8.
- Tibbett M., Sanders F.E., Cairney J.W. Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabinol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.). *Mycorrhiza*. 2002;12(5):249-255. DOI 10.1007/s00572-002-0183-8.
- Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81(8):819-834. DOI 10.1134/S0006297916080046.
- Worley B., Powers R. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr. Metabolomics*. 2012;1(1):92-107. DOI 10.2174/2213235X11301010092.
- Zhou J., Yang Y., Yu J., Wang L., Yu X., Ohtani M., Kusano M., Saito K., Demura T., Zhuge Q. Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic stresses. *J. Plant Res.* 2014;127(2):347-358. DOI 10.1007/s10265-013-0597-8.

#### ORCID ID

A.E. Solovyeva [orcid.org/0000-0002-6201-4294](https://orcid.org/0000-0002-6201-4294)  
T.V. Shelenga [orcid.org/0000-0003-3992-5353](https://orcid.org/0000-0003-3992-5353)  
A.L. Shavarda [orcid.org/0000-0003-1778-2814](https://orcid.org/0000-0003-1778-2814)  
M.O. Burlyayeva [orcid.org/0000-0002-3708-2594](https://orcid.org/0000-0002-3708-2594)

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВПР, номер государственной регистрации 0662-2019-0002.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.05.2020. После доработки 04.08.2020. Принята к публикации 17.08.2020.

## Фенотипическое разнообразие линий мягкой пшеницы с интрогрессиями от диплоидного злака *Aegilops speltoides* по технологическим свойствам зерна и муки

Л.В. Щукина<sup>1</sup> ✉, И.Ф. Лапочкина<sup>2</sup>, Т.А. Пшеничникова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», р.п. Новоивановское, Одинцовский район, Московская область, Россия

✉ e-mail: quality@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Создание сортов, адаптированных к изменяющимся условиям окружающей среды, устойчивых к различным патогенам и соответствующих различному целевому назначению зерна, невозможно без использования генетического разнообразия пшеницы. Одним из путей его расширения является введение в генотипы существующих сортов новых вариантов генов из генетического пула родственных видов и диких сородичей. В настоящем исследовании использованы 10 линий из коллекции «Арсенал», созданных на основе ярового сорта Родина и вида *Aegilops speltoides* в Научно-исследовательском институте сельского хозяйства центральных районов Нечерноземной зоны (ныне Федеральный исследовательский центр «Немчиновка») в 1994 г. Линии были ранее охарактеризованы цитологическими и цитогенетическими методами, а также с помощью молекулярных маркеров на наличие замещений и перестроек хромосом. Технологические анализы были выполнены на зерне, полученном в Западной Сибири и Московской области. Цель исследования – установить возможности расширения фенотипического разнообразия пшеницы по технологическим свойствам зерна и муки в результате такой гибридизации. Сорт Родина формирует стекловидное зерно с высоким содержанием клейковины в условиях Сибири, но имеет невысокие физические свойства муки и теста. Обнаружено, что пять производных от него линий имеют достоверно более высокое содержание белка и клейковины в зерне. Наибольшие значения в обоих условиях выращивания установлены у линий 73/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup> и 84/00<sup>i</sup>. Две линии, 69/00<sup>i</sup> и 76/00<sup>i</sup>, показали высокую силу муки и упругость теста, характеризующие линии как сильные и ценные по качеству. Зерно этих линий может быть использовано для выпечки хлеба. Линия 82/00<sup>i</sup> унаследовала от *Ae. speltoides* мягкозерный эндосперм, что говорит об интрогрессии в геном сорта Родина гена *Ha-Sp*, гомеоаллельного гену *Ha* мягкой пшеницы. Мука этой линии пригодна для изготовления кондитерских изделий без применения технологических добавок. Линии в основном сохраняли свои особенности в различных условиях выращивания. Они могут быть привлечены в качестве доноров новых аллелей генов, определяющих технологические свойства зерна и устойчивость к биотическим стрессам.

Ключевые слова: мягкая пшеница; *Ae. speltoides*; интрогрессированные линии; хромосомные перестройки; стекловидность зерна; содержание белка и клейковины в зерне; физические свойства теста; мягкозерность и твердозерность эндосперма.

**Для цитирования:** Щукина Л.В., Лапочкина И.Ф., Пшеничникова Т.А. Фенотипическое разнообразие линий мягкой пшеницы с интрогрессиями от диплоидного злака *Aegilops speltoides* по технологическим свойствам зерна и муки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):738-746. DOI 10.18699/VJ20.668

## Phenotypic diversity of bread wheat lines with introgressions from the diploid cereal *Aegilops speltoides* for technological properties of grain and flour

L.V. Shchukina<sup>1</sup> ✉, I.F. Lapochkina<sup>2</sup>, T.A. Pshenichnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Center "Nemchinovka", Novoivanovskoe, Odintsovsky district, Moscow region, Russia

✉ e-mail: quality@bionet.nsc.ru

**Abstract.** The creation of varieties adapted to changing environmental conditions, resistant to various pathogens, and satisfying various grain purposes is impossible without using the genetic diversity of wheat. One of the ways to expand the genetic diversity of wheat is to introduce new variants of genes from the genetic pool of congeners and wild relatives into the genotypes of existing varieties. In this study, we used 10 lines from the Arsenal collection created on the genetic basis of the spring variety 'Rodina' and the diploid species *Aegilops speltoides* in the Federal Research Center "Nemchinovka" in 1994. The lines were previously characterized for the presence of translocations and chromosomal rearrangements cytologically and using molecular markers. Technological analyses were performed on grain obtained in Western Siberia and Moscow region. The aim of this study was to establish the possibilities of expanding the phenotypic diversity for technological properties of grain and flour as a result of such hybridization of bread wheat and the diploid cereal *Aegilops speltoides*.

des. The variety 'Rodina' forms a vitreous grain with a high gluten content in Siberia, but has low physical properties of flour and dough. Five derived lines were found to have significantly higher protein and gluten content in grain. The highest values under both growing conditions were found in lines 73/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup>, and 84/00<sup>i</sup>. Two lines (69/00<sup>i</sup> and 76/00<sup>i</sup>) showed a high flour strength and dough elasticity, characterizing the lines as strong and valuable in quality. These lines can be used for baking bread. Line 82/00<sup>i</sup> inherited from *Ae. speltoides* a soft-grain endosperm, which indicates the introgression of the *Ha-Sp* gene, homoeoallelic to the *Ha* gene of bread wheat, into 'Rodina'. Flour of this line is suitable for the manufacture of confectionery without the use of technological additives. The lines generally retained their characteristics in different growing conditions. They can be attracted as donors of new alleles of genes that determine the technological properties of grain and resistance to biotic stresses.

Key words: bread wheat; *Ae. speltoides*; introgression lines; chromosomal rearrangements; grain vitreousness; protein and gluten content in grain; physical properties of dough; soft grain and endosperm grain hardness.

**For citation:** Shchukina L.V., Lapochkina I.F., Pshenichnikova T.A. Phenotypic diversity of bread wheat lines with introgressions from the diploid cereal *Aegilops speltoides* for technological properties of grain and flour. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):738-746. DOI 10.18699/VJ20.668

## Введение

Изменение климата на Земле влечет за собой изменение условий выращивания сельскохозяйственных культур. Селекционеры, сталкиваясь с новыми природными вызовами, должны обладать большим арсеналом генетического разнообразия для создания сортов с необходимыми свойствами. Мягкая пшеница в России – одна из основных злаковых культур, ее зерно употребляется в пищу, на фураж и в технических целях; также оно является важной статьей экспорта. В 2020 г. площадь посевов яровой мягкой пшеницы в РФ составила 12.2 млн га при общей площади посевов яровых культур 52 млн га (Ганенко, Белая, 2020).

Селекция, длительное время ориентированная на создание высокоурожайных сортов пшеницы, привела к потере ряда ценных и редких аллелей, обеспечивающих создание высококачественных и высококлейковинных сортов. Изменение спектра патогенов и их расового состава также периодически выводит многие сорта из использования в производстве. В результате генофонд пшеницы становится ограниченным в практическом применении.

В настоящее время перед селекцией стоит задача создания сортов, адаптированных к изменяющимся условиям окружающей среды, устойчивых к различным патогенам и удовлетворяющих различному целевому назначению зерна (выпечка дрожжевого хлеба, изготовление пиццы, печенья, блинов, лапши и др.) (Реѝа, 2002). Это требует расширения генетического разнообразия пшеницы по многим признакам. Классический путь решения этой задачи – использование в гибридизации стародавних сортов и образцов из генетических коллекций пшеницы (Митрофанова, 2012; Vikram et al., 2016). Альтернативным путем служит гибридизация мягкой пшеницы с близкородственными видами и дикорастущими сородичами, несущими варианты генов, отсутствующие в генотипе существующих сортов. Этот путь используется в основном для поиска генов устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам (Цицин, 1958; Вавилов, 1986; Leonova, Budashkina, 2017; Воронов и др., 2019). Интрогрессия чужеродного генетического материала влияет и на отдельные признаки качества зерна (Крупнова, 2013; Shchukina et al., 2017; Alvarez, Guzmán, 2018).

К основным компонентам зерновки, определяющим технологические свойства зерна, относятся клейковина и крахмал, содержание и свойства которых определяют

практическое использование зерна. Поиск генов, которые могут разнообразить эти параметры у пшеницы при межвидовой и межродовой гибридизации, – актуальное направление исследований. Понимание связи имеющихся у генотипа хромосомных перестроек и интрогрессий с формированием конечного целевого продукта зерна расширяет поле деятельности для селекционеров. Целью настоящего исследования было установить возможности расширения фенотипического разнообразия по технологическим свойствам зерна и муки у мягкой пшеницы за счет хромосомных перестроек, возникших в результате гибридизации с диплоидным злаком *Aegilops speltoides*.

## Материалы и методы

**Генетический материал.** В работу были взяты 10 линий яровой мягкой пшеницы сорта Родина из коллекции «Арсенал»: 69/00<sup>i</sup>, 73/00<sup>i</sup>, 76/00<sup>i</sup>, 77/00<sup>i</sup>, 81/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup>, 84/00<sup>i</sup>, 99/00<sup>i</sup>, 102/00<sup>i</sup> и 103/00<sup>i</sup>, созданных путем отбора индивидуальных растений с бивалентным характером мейоза из потомства F<sub>2</sub>M<sub>2</sub>–F<sub>4</sub>M<sub>4</sub> асимметричных половых гибридов F<sub>1</sub>M<sub>1</sub> (2n = 49). Они получены от скрещивания сорта Родина (2n = 42) с видом *Aegilops speltoides*, образцом к-389 из коллекции ВИР (Санкт-Петербург), пыльцу которого облучали гамма-лучами в дозе 10 кр (Лапочкина, 1999). Линии ранее были охарактеризованы на наличие замещений и перестроек хромосом цитологическими и цитогенетическими методами, а также с помощью молекулярных маркеров.

Установление механизма интрогрессии чужеродного материала в геном пшеницы (наличие замещений, транслокаций) проводили путем изучения характера спаривания хромосом в мейозе у специально полученных гибридов F<sub>1</sub> (тестируемая линия × исходный сорт Родина). У линий идентифицированы гены устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе с использованием микросателлитных и STS-маркеров и тест-патотипов гриба (табл. 1) (Lapochkina et al., 2003; Лапочкина и др., 2005; Гайнуллин и др., 2007). Исходный сорт Родина оказался гетерогенным по хромосомной транслокации T1BS/1RS, унаследованной от сорта Кавказ, участвовавшего в происхождении сорта (World Seeds × Кавказ) (Дорофеев и др., 1987). С помощью анализа запасных белков глиадина из сорта была выделена линия, в генотипе которой эта перестройка отсутствует (далее – сорт Родина). Этот генотип был использован в качестве контроля во всех экспериментах.

**Таблица 1.** Генетические особенности линий яровой мягкой пшеницы с интрогрессиями от вида *Aegilops speltoides*

Сорт и линии	Цитогенетический статус	Поражение в Московской области, %		Примечание
		мучнистой росой	бурой ржавчиной	
Родина – контроль	T 1B/1R (от сорта Кавказ)	80	80	Сорт восприимчив к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине. Устойчив к желтой ржавчине
69/00 <sup>i</sup>	Дисомное замещение	0–10	30/2–60/4	–
73/00 <sup>i</sup>	Дисомное замещение 5B/5S	0	0	Линия с групповой устойчивостью к грибным болезням. Устойчива к бурой ржавчине и на стадии проростков. Доминантный характер наследования устойчивости
76/00 <sup>i</sup>	Дисомное замещение 7D/7S, T 1BS/1SS и T 4BL/4SL	5–15	20/2–30–40/3	Идентифицированы гены <i>Pm2</i> , <i>Lr10</i> , <i>Lr21</i> (STS); по результатам заражения тест-патотипами предполагаются гены устойчивости взрослого растения
77/00 <sup>i</sup>	Дисомное и телоцентрическое замещение	15–25	40–60	–
81/00 <sup>i</sup>	Дисомное и телоцентрическое замещение	0–5	0	Идентифицированы гены <i>Pm2</i> , <i>Pm3c</i> , <i>Lr21</i> , <i>Lr46</i>
82/00 <sup>i</sup>	Дисомное замещение	0–5	0	Идентифицированы гены <i>Lr10+</i> и <i>Lr26</i> , <i>Pm3c</i> , <i>Pm4b</i>
84/00 <sup>i</sup>	Малая транслокация	10	20/2–40/2–60/3	–
99/00 <sup>i</sup>	Дисомное замещение и транслокация	5–10	0	Идентифицированы гены <i>Lr1</i> , <i>Lr10</i> , <i>Lr21</i> , <i>Lr37</i> , <i>Lr46</i> , <i>Pm2</i> , <i>Pm4b</i>
102/00 <sup>i</sup>	Рекомбинация	40	0–1/0–1	Идентифицированы гены <i>Lr10</i> , <i>Lr21</i> , <i>Lr35</i> , <i>Lr34</i> (STS); тест-патотипы гриба: <i>Lr12</i> , <i>Lr27</i> , <i>Lr31</i>
103/00 <sup>i</sup>	Дисомное замещение и транслокация	10–15	40–60	–

**Условия выращивания.** Линии и материнский сорт Родина выращивали при яровом посеве на экспериментальном поле Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Академгородок, Новосибирская область) в 2003–2005, 2007 и 2013 гг. На экспериментальном поле Федерального исследовательского центра «Немчиновка» (Московская область) выращивание проводили с 2000 по 2011 гг.

Применяли рядковую схему посева: по ярусам шириной 1 м, по 5 рядков на образец, по 50 зерен в рядке. Почвы в Новосибирске серые лесные, в Немчиновке – дерново-подзолистые. Удобрения вносили в почву перед посевом в соответствии с принятой для таких почв агрономической практикой. Уборку производили вручную в снопы с последующим дозариванием в течение месяца, что необходимо для полного формирования клейковинного комплекса в зерне.

По данным агроклиматического районирования России (<https://geographyofrussia.com/agroklimaticheskoe-rajonirovanie/>), Московская область и Новосибирск находятся в одной зоне достаточного увлажнения вегетационного периода при засухах в отдельные годы. Метеоданные станции Огурцово, наиболее приближенной по географическому положению к месту проведения экспериментов

в Новосибирске, приведены в Приложении 1<sup>1</sup> и 2. Число повторностей опытных посевов линий по годам в Новосибирске указано в Приложении 3.

**Технологический анализ** зерна включал определение массы 1000 зерен, общей стекловидности, диаметра частиц муки после помола, содержание белка и клейковины в зерне. Изучали также физические свойства муки и теста, водопоглощательную способность и смесительную характеристику муки, полученную из зерна, выращенного в Новосибирске.

Массу 1000 зерен определяли экспресс-методом путем взвешивания 100 зерновок. Общую стекловидность зерна определяли визуально после разрезания 100 зерновок пополам. Под показателем общей стекловидности понимают сумму полностью стекловидных и половины количества частично стекловидных зерен (ГОСТ 10987-76). Средний диаметр частиц муки определяли с помощью прибора ПСХ-4 по ранее описанной методике (Шибаяев и др., 1974; Егоров, 2000). Содержание сырой клейковины в зерне в Новосибирске было определено путем отмывания вручную в воде из 1 г шрота (ГОСТ Р 54478-2011). Количество сырой клейковины выражали в процентах от веса шрота.

<sup>1</sup> Приложения 1–3 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx12.pdf>

Содержание белка и клейковины в зерне определяли в ФИЦ «Немчиновка» на инфракрасном анализаторе SpectraStar 2400.

Размол образцов производили на лабораторной валковой мельнице МЛВ-1 с 70 % выходом муки для дальнейшего исследования на приборах – альвеографе и фаринографе.

Физические свойства теста определяли на альвеографе Шопена, оснащенный пятидесятиграммовой месилкой (ГОСТ Р 51415-99, с модификацией для научно-исследовательских работ). Проводили определение силы муки (W, единиц альвеографа, е.а.), упругости теста (P, мм), растяжимости теста (L, мм). Сбалансированность теста рассчитывали как отношение упругости к растяжимости (P/L). Водопоглотительную способность (ВПС, %) и смесительные характеристики муки определяли на фаринографе Брабендера с пятидесятиграммовой месилкой (ГОСТ ISO-5530-1-2013, с модификацией для научно-исследовательских работ). Водопоглотительная способность – количество воды (выраженное в процентах), необходимое для образования теста консистенцией 500 е. ф. Смесительные характеристики включали пять характеристик: время образования теста (ВОТ, мин), устойчивость теста (УТ, мин), разжижение теста (РТ, единицы фаринографа, е. ф.), валориметрическую оценку – комплексную оценку по результатам исследования муки на фаринографе (ВО, единицы валориметра, е.вал.). Электрофорез по глиадиновым белкам эндосперма у линий проводили по методике, описанной ранее (Pshenichnikova, Maustrenko, 1995).

**Статистический анализ.** Данные по каждому признаку у каждого генотипа усредняли за все годы исследований (см. Приложение 3) и вычисляли среднее отклонение. Для определения достоверности отличий от контроля по каждому признаку использовали *t*-критерий Стьюдента. Все расчеты выполняли в программе Microsoft Office Excel 2013.

## Результаты

Результаты исследований сгруппированы в табл. 2 (мукомольные параметры и содержание сырой клейковины в зерне), табл. 3 (физические свойства теста) и табл. 4 (смесительные характеристики муки). Масса 1000 зерен сорта Родина составила 29.2 г в Новосибирске и 39.1 г в Московской области (см. табл. 2). Зерно в Новосибирске было стекловидным (80.1 %) и среднетвердозерным (20.4 мкм). Содержание сырой клейковины в зерне достигло 36.0 % в Новосибирске, тогда как в Московской области это значение было почти на 10 % ниже. Сила муки составила 145 е.а., упругость – 56 мм и растяжимость теста – 108 мм. Сбалансированность теста была низкой (P/L = 0.55) (см. табл. 3). Водопоглотительная способность муки у сорта была 66.6 %. Образование теста шло немногим более 3 мин, и 2 мин тесто сохраняло стабильность. Разжижение теста и валориметрическая оценка составили 58 е. ф. и 59 е. вал. соответственно (см. табл. 4). По качеству зерна сорт Родина можно отнести к сортам со слабой клейковиной (Методика государственного сортоиспытания..., 1988).

Из данных табл. 2 следует, что ни одна линия по массе 1000 зерен не превзошла контроль в обеих географических зонах. Признак в Новосибирске достоверно снизили линии 73/00<sup>i</sup>, 77/00<sup>i</sup>, 84/00<sup>i</sup>, 99/00<sup>i</sup> и 103/00<sup>i</sup>. Самое мелкое зерно было у первых двух линий, которые достоверно, на 8.9 и 11.6 г, отличались от контроля. Из этих пяти линий три, 73/00<sup>i</sup>, 77/00<sup>i</sup>, 99/00<sup>i</sup>, также значительно снижали показатели и в Московской области (см. табл. 2). Корреляция по признаку между двумя зонами была высокодостоверной ( $r = 0.75$ ;  $p < 0.001$ ).

Стекловидность зерна и диаметр частиц муки были изучены только в условиях Новосибирска. Линии в основном не отличались достоверно от сорта Родина (см. табл. 2). Линии 102/00<sup>i</sup> и 103/00<sup>i</sup> достоверно превзошли контроль на 8 и 11 % соответственно. Наибольшее достоверное

**Таблица 2.** Средние многолетние показатели мукомольных параметров и содержания сырой клейковины в зерне интрогрессированных линий и сорта Родина

Сорт и линии	Масса 1000 зерен, г		Средняя стекловидность зерна, %	Средний диаметр частиц муки, мкм	Содержание сырой клейковины в зерне, %	
	Новосибирск	Немчиновка			Новосибирск	Немчиновка
Родина	29.2±4.5	39.9±0.6	80.1±3.1	20.4±3.5	36.0±3.5	25.8±3.8
69/00 <sup>i</sup>	25.7±3.6	34.5±7.8	83.7±6.7	15.7±2.4**	37.3±4.0	31.4±0.8
73/00 <sup>i</sup>	20.3±3.4***	32.5±2.1	81.2±9.163	19.6±3.0	46.1±6.9***	35.8±3.3
76/00 <sup>i</sup>	27.6±2.4	43.6±0.7**	83.5±7.0	20.3±2.9	39.7±2.8*	28.3±6.6
77/00 <sup>i</sup>	17.6±1.6***	30.8±0.4**	88.8±5.5	21.3±2.2	38.9±7.3	27.0±3.7
81/00 <sup>i</sup>	24.1±5.4	41.5±0.7	79.8±8.4	18.3±2.0	37.4±2.0	26.6±0.6
82/00 <sup>i</sup>	26.1±6.9	39.0±1.4	63.3±5.8***	10.0±0.5***	47.4±2.5***	32.7±1.9
84/00 <sup>i</sup>	23.1±4.9*	36.7±6.4	77.7±14.2	16.0±3.0*	41.0±4.6*	21.0±0.6
99/00 <sup>i</sup>	22.6±4.8*	35.4±3.2	80.6±4.7	15.9±2.7*	43.6±7.1*	31.5±0.8
102/00 <sup>i</sup>	24.6±5.9	43.5±3.5	88.5±5.0*	26.6±6.5	33.0±7.4	26.1±2.6
103/00 <sup>i</sup>	24.6±2.2*	41.5±0.3	91.2±1.0***	19.3±3.2	37.1±7.8	28.2±0

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

**Таблица 3.** Средние показатели физических свойств теста интрогрессированных линий и сорта Родина за пять лет полевых испытаний (Новосибирск)

Сорт и линии	Сила муки (W), е. а.	Упругость теста (P), мм	Растяжимость теста (L), мм	Отношение P/L
Родина – контроль	143±53	56±14	108±26	0.55±0.19
69/00 <sup>i</sup>	339±79 <sup>**</sup>	114±20 <sup>***</sup>	95±14	1.25±0.33 <sup>**</sup>
73/00 <sup>i</sup>	121±21	71±1	65±18 <sup>*</sup>	1.18±0.43
76/00 <sup>i</sup>	272±52 <sup>**</sup>	85±18 <sup>**</sup>	116±27	0.79±0.32
77/0 <sup>i</sup>	178±21	78±2 <sup>**</sup>	85±15	0.93±0.13
81/00 <sup>i</sup>	128±28	65±12	80±14	0.84±0.21
82/00 <sup>i</sup>	159±46	79±6 <sup>**</sup>	72±28	1.29±0.63
84/00 <sup>i</sup>	166±19	80±5 <sup>**</sup>	69±8 <sup>**</sup>	1.16±0.11 <sup>**</sup>
99/00 <sup>i</sup>	188±50	75±8	100±5	0.76±0.05
102/00 <sup>i</sup>	129±15	65±9	80±14	0.84±0.28
103/00 <sup>i</sup>	139±7	51±2	114±12	0.45±0.07

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .**Таблица 4.** Смесительные свойства теста интрогрессированных линий и сорта Родина (Новосибирск, 2013 г.)

Сорт и линии	Водопоглощительная способность муки, %	Время образования теста, мин	Стабильность теста, мин	Разжижение теста, е. ф.	Валориметрическая оценка, е. вал.
Родина	66.6	3'15"	2'00"	58	59
69/00 <sup>i</sup>	68.6	5'00"	4'00"	70	73
73/00 <sup>i</sup>	72.6	3'30"	2'30"	90	58
76/00 <sup>i</sup>	71.5	4'10"	2'20"	48	66
77/00 <sup>i</sup>	68.0	3'30"	1'00"	75	56
81/00 <sup>i</sup>	68.1	3'15"	3'15"	85	63
82/00 <sup>i</sup>	77.5	3'30"	1'00"	145	48
84/00 <sup>i</sup>	70.6	5'00"	2'00"	75	66
102/00 <sup>i</sup>	64.0	3'30"	2'30"	80	59

снижение стекловидности зерна наблюдалось у линии 82/00<sup>i</sup> – 63.3 %, что сопровождалось двукратным снижением диаметра частиц муки до 10.0 мкм по сравнению с исходным сортом. Другие три линии, 69/00<sup>i</sup>, 84/00<sup>i</sup> и 99/00<sup>i</sup>, также достоверно снизили средний диаметр частиц муки примерно на 4 мкм по сравнению с сортом Родина (см. табл. 2).

У линий 73/00<sup>i</sup>, 76/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup>, 84/00<sup>i</sup> и 99/00<sup>i</sup> отмечено увеличение содержания клейковины по сравнению с сортом Родина. Самый высокий показатель обнаружен у трех линий – 73/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup> и 99/00<sup>i</sup> (см. табл. 2). Эти же линии превосходили родительский сорт в Немчиновке. Среднее содержание клейковины за все годы исследований в Новосибирске было на 10 % выше, чем в Московской области.

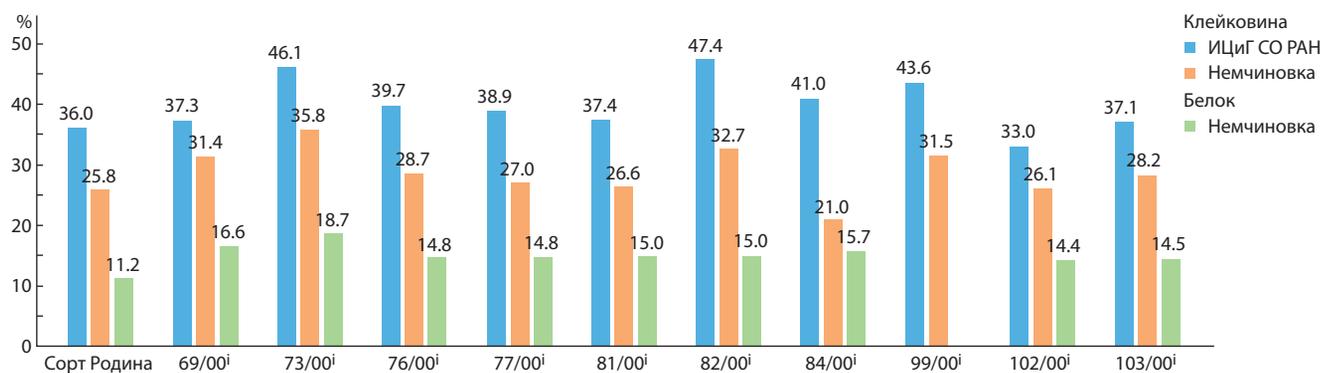
Сила муки линий 69/00<sup>i</sup> и 76/00<sup>i</sup> достоверно превзошла на 196 и 129 е. а. соответственно этот показатель у контроля (см. табл. 3). Упругость теста интрогрессированных линий в основном увеличивалась. У линий 76/00<sup>i</sup>, 77/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup> и 84/00<sup>i</sup> этот признак достоверно превышал показатель контроля на 78–80 мм. Упругость теста линии 69/00<sup>i</sup> выросла почти в два раза. По растяжимости теста в сторону уменьшения выделились две линии, 73/00<sup>i</sup> и 84/00<sup>i</sup>. Отношение P/L теста линий 69/00<sup>i</sup>, 73/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup> и

84/00<sup>i</sup> превысило 1.0, т. е. оно стало более сбалансированным. В линиях 69/00<sup>i</sup> и 84/00<sup>i</sup> эти изменения достоверны.

Смесительные характеристики муки линий были определены только в один год и в одной повторности, поэтому статистических выводов о достоверности отличия линий от контроля сделать невозможно. Тем не менее некоторые линии выделяются по ряду параметров (см. табл. 4). Водопоглощительная способность увеличивалась в линиях 73/00<sup>i</sup>, 76/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup> и 84/00<sup>i</sup>. Максимальное значение, 77.5 %, было у линии 82/00<sup>i</sup>, что превзошло контроль более чем на 10 %. Время образования теста увеличилось у линий 69/00<sup>i</sup> и 84/00<sup>i</sup> по сравнению с контролем. Только у линии 69/00<sup>i</sup> стабильность теста увеличилась в 2 раза. Разжижение теста в линиях в основном увеличивалось. Худший показатель разжижения наблюдали у линии 82/00<sup>i</sup> – 145 е. ф. Валориметрическая оценка этой линии была самая низкая, всего 48 е. вал. Самую высокую валориметрическую оценку имела линия 69/00<sup>i</sup>, которая превзошла контроль на 14 ед. и составила 73 е. вал.

### Обсуждение

В настоящее время широко ведутся работы по переносу генов от диких сородичей в геном мягкой пшеницы с



**Рис. 1.** Содержание сырой клейковины и белка в зерне интрогрессированных линий и сорта Родина, выращенных в Немчиновке, и содержание сырой клейковины в зерне этих линий, выращенных в Новосибирске.

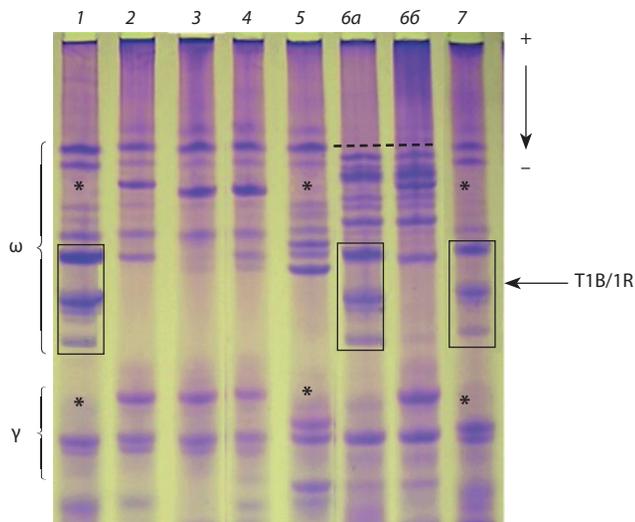
целью создания полезного для селекции генетического разнообразия. Отдельные исследования осуществлены и в отношении технологических свойств зерна. В частности, интрогрессии от дикого сородича *Aegilops markgrafii* увеличивали содержание клейковины в зерне и улучшали другие технологические показатели (Shchukina et al., 2017). В работе О.В. Крупновой (2010) оценено влияние транслокаций – носителей генов *Lr* от диких сородичей *Agropiron elongatum*, *Triticum dicocum*, *Agropiron intermedium*, *T. dicoccoides* – на содержание белка в муке, показатель ИДК-1, седиментацию, число падения и натуру зерна.

В нашей работе проведены исследования влияния генетического материала от *Ae. speltoides*, интрогрессированного в геном мягкой пшеницы сорта Родина, на технологические признаки зерна и муки. Перенос чужеродного генетического материала был подтвержден генетическими, цитогенетическими и молекулярными методами (Salina et al., 2001; Adonina et al., 2004; Гайнуллин и др., 2007; Адонина и др., 2012). Как показали многолетние исследования, линии несут гены устойчивости к грибным заболеваниям, часть из которых идентифицирована (см. табл. 1). У линий изучены мукомольные свойства, содержание клейковины в зерне и физические свойства теста. Обнаружена изменчивость по сравнению с исходным сортом Родина по всем изученным технологическим признакам. Отдельные линии показали высокое содержание клейковины и белка в зерне, варибельность по мукомольным показателям, изменчивость реологических и смесительных свойств теста. Десять интрогрессированных линий изучены в разные годы возделывания и в различных географических зонах России. При этом важно отметить, что некоторые из выявленных новых свойств устойчиво сохранялись в различных условиях выращивания.

Содержание клейковины в зерне – важнейший показатель при определении класса зерна пшеницы в соответствии с российскими и международными торговыми стандартами. Сравнительные показатели признака в зерне, выращенном в Немчиновке и в Сибири, представлены на рис. 1. Здесь же приведено содержание белка в этом зерне. Средние значения у линий и родительского сорта при выращивании в Новосибирске были выше, чем в Немчиновке. Различие по содержанию клейковины у сорта Родина составило около 13 %, а у линий – в среднем 10 %. Из полученных данных следует, что соотношение

сырой клейковины и белка составляло примерно 2 : 1. Такое соотношение характерно для зерна мягкой пшеницы, выращенного в нормальных условиях возделывания, и согласуется с данными, полученными другими исследователями (Козьмина, 1969; Kulkarni et al., 1987). Линия 73/00<sup>i</sup> в указанных условиях выращивания превосходила все остальные линии по содержанию клейковины и показала самое высокое содержание белка в зерне (см. рис. 1). Линии 76/00<sup>i</sup>, 82/00<sup>i</sup> и 99/00<sup>i</sup> в Московской области, так же как и в Новосибирске, показали высокие значения обоих признаков. Это говорит о том, что линии в результате интрогрессии унаследовали гены, значительно расширяющие разнообразие пшеницы по содержанию белка и клейковины в зерне. Однако были обнаружены и различия в проявлении этих признаков. У линии 69/00<sup>i</sup> содержание белка и клейковины в Нечерноземной зоне выращивания составило 16.6 и 31.4 % соответственно, что превышало контроль. В Новосибирске эта линия не отличалась достоверно от сорта Родина. Значительные расхождения по зонам выращивания обнаружены для линии 84/00<sup>i</sup>. Если в условиях Новосибирска она относилась к группе наиболее высококлейковинных линий, то в Нечерноземной зоне она не отличалась от родительского сорта по содержанию клейковины и белка (см. табл. 2, рис. 1).

В работе И.Г. Адониной с коллегами (2012) с помощью флуоресцентной гибридизации с зондами *Spelt1* и *rSc119.2* в сочетании с микросателлитными маркерами показано, что линия 73/00<sup>i</sup> несет транслокации в короткое плечо хромосомы 1В и длинные плечи хромосом 5В и 6В. В дальнейшем эти транслокации были перенесены в отдельные линии на основе сорта Родина (Адонина и др., 2012), несмотря на то, что исходная линия 73/00<sup>i</sup> обладает групповой устойчивостью к спектру грибных болезней (см. табл. 1). Однако максимальной устойчивостью к листовой ржавчине обладала только линия с транслокацией в хромосому 5В (Адонина и др., 2012). Ранее в этой хромосоме находили локусы, ответственные за высокое содержание белка и клейковины в зерне (Gonzalez-Hernandez et al., 2004; Pshenichnikova et al., 2012). Линия 73/00<sup>i</sup> отличалась снижением массы 1000 зерен и высоким ВПС, последнее, вероятно, связано с высоким содержанием клейковины и белка в зерне. Однако сила муки у нее была снижена, а разжижение теста увеличилось по сравнению с контролем, что нежелательно при использовании в пи-



**Рис. 2.** Электрофореграмма компонентов глиадина у интрогрессированных линий.

Стрелкой указаны секалины ржи, привнесенные транслокацией 1BS/1RS. Звездочками обозначены отсутствующие в результате транслокации компоненты  $\gamma$ - и  $\omega$ -глиадина. Штриховой линией обозначена перестройка в локусе *Glu-D1*. 1 – 84/00<sup>i</sup>; 2 – 82/00<sup>i</sup>; 3 – 76/00<sup>i</sup>; 4 – сорт Родина; 5 – 73/00<sup>i</sup>; 6a, 6b – 69/00<sup>i</sup>; 7 – 81/00<sup>i</sup>.

щевых целях. В то же время такие генотипы пшеницы могут быть ценным источником растительного белка в производстве кормов для животноводства и рыбоводства.

Еще одна линия, 82/00<sup>i</sup>, для которой характерно стабильно высокое содержание белка и клейковины (см. табл. 2, рис. 1), одновременно продемонстрировала значительное снижение стекловидности зерна и среднего диаметра частиц муки по сравнению с сортом Родина. Линия показала очень высокую водопоглощительную способность муки, которая формировала тесто с высоким разжижением. Согласно литературным данным, за твердозерность и стекловидность мягкой пшеницы отвечает локус *Ha*, находящийся в субтеломерном районе короткого плеча хромосомы 5D (McIntosh et al., 2013). В локусе расположены тесно сцепленные доминантные гены *Pina-D1* и *Pinb-D1*, кодирующие белки пуриноидины, ответственные за изменчивость структуры эндосперма.

Ранее было установлено, что озимая линия 84/00<sup>w</sup> из коллекции «Арсенал» с мягкозерным эндоспермом несет интрогрессию от *Ae. speltoides* в виде хромосомного замещения 5S/5A. Оно содержит локус *Ha-Sp*, гомеоаллельный локусу *Ha* (Pshenichnikova et al., 2010). В дальнейшем на основе линии 84/00<sup>w</sup> были созданы яровые супермягкозерные линии, в генотипе которых объединены гомеоаллельные локусы *Ha-Sp* линии 84/98<sup>w</sup> и *Ha* мягкозерного сорта Chinese Spring (Симонов и др., 2017). Эти линии характеризуются супермягкозерным мучнистым эндоспермом зерновки, со стекловидностью менее 50 % и диаметром частиц муки 10–12 мкм. Поскольку линия 82/00<sup>i</sup> – яровая, можно предполагать, что интрогрессия затронула участок только короткого плеча какой-то одной из хромосом пятой гомеологической группы. Согласно цитогенетическим данным (см. табл. 1), линия несет дисомное замещение. С использованием линии 82/00<sup>i</sup> можно

создавать новые яровые супермягкозерные линии. Мука таких линий пригодна для изготовления кондитерских изделий без применения технологических добавок (Реѡа, 2002).

Эта же интрогрессия в предполагаемом районе могла привести к увеличению количества сырой клейковины в зерне. В гибридной популяции Weimai × Yannong ранее был выявлен район хромосомы 5A, маркированный молекулярными маркерами *Xcfa2163.2-Xcwm216*, в котором солокализовались главные локусы: *QGpc.WY-5A.1*, ответственный за 53 % фенотипического проявления накопления белка в зерне, и *QWgc.WY-5A.2*, ответственный за 36 % фенотипического проявления признака «количество сырой клейковины» (Li et al., 2012). Необходимо также отметить, что линия 82/00<sup>i</sup>, в отличие от линии 73/00<sup>i</sup>, имела сопоставимую с исходным сортом массу 1000 зерен (см. табл. 2), что говорит о возможности отбора на высокое содержание клейковины и белка без потери урожайности. Линия характеризовалась высокой устойчивостью к грибным болезням. В ней идентифицированы гены устойчивости *Lr10*, *Lr26*, *Pm3c*, *Pm4e* (см. табл. 1). Высокая устойчивость, возможно, также обеспечивается интрогрессией.

Исходный сорт Родина имел низкие реологические и смесительные свойства. В родословной сорта присутствует сорт Кавказ – носитель транслокации из ржи 1BS/1RS. Сорт был гетерогенен по этому признаку. Известно, что транслокация значительно ухудшает физические свойства теста (Martin, Stewart, 1990), так как может влиять на состав высокомолекулярных глютелинов и глиадинов – запасных белков клейковины, определяющих баланс между упругостью и растяжимостью теста. С помощью анализа компонентного состава глиадина (рис. 2) мы отобрали линию сорта Родина, которая не содержит транслокации. Тем не менее физические свойства линии остались низкими (см. табл. 2, 3). Согласно электрофоретическим данным, транслокацию 1BS/1RS унаследовали линии 81/00<sup>i</sup>, 84/00<sup>i</sup> и 69/00<sup>i</sup> (см. рис. 2). Последняя линия была гетерогенна по этому признаку. В основном линии также характеризовались низкой силой муки, подобно сорту Родина. Однако одна линия, 69/00<sup>i</sup>, показала среднее значение силы муки, позволяющее отнести ее к группе сильных по качеству и использовать как улучшитель для хлебопекарных целей. У линии 69/00<sup>i</sup> отсутствуют наиболее медленно подвижные компоненты  $\omega$ -фракции (см. рис. 2), которые контролируются локусом *Glu-D1* хромосомы 1DS (Pshenichnikova, Maystrenko, 1995). Локус тесно сцеплен с локусом *Glu-D1*, кодирующим высокомолекулярные субъединицы глютелинов, которые в значительной степени определяют силу муки и упругость теста. Вероятно, этот район хромосомы претерпел рекомбинацию в результате отдаленного скрещивания. Интересно, что присутствие транслокации 1BS/1RS не ухудшает физических свойств теста этой линии.

В линиях 76/00<sup>i</sup> и 81/00<sup>i</sup> цитологическими методами были обнаружены дисомные замещения. Молекулярными методами у линий идентифицировали полное замещение хромосомы 7D на хромосому 7S от *Ae. speltoides* (Adonina et al., 2004). Линия 81/00<sup>i</sup> несет дополнительно транслокацию 1BS/1RS, а линия 76/00<sup>i</sup> – транслокацию в короткое

плечо хромосомы 3A. Линия 76/00<sup>i</sup> лучше линии 81/00<sup>i</sup> по ряду технологических признаков. Она может быть отнесена к группе ценных по качеству и использоваться как улучшитель. Содержание клейковины у линии 76/00<sup>i</sup> достоверно увеличено, и она лучшего качества. Сила муки достигла 272 е. а., а тесто стало более упругим (см. табл. 3). Улучшились смешительные показатели муки и ВПС (см. табл. 4). Можно предположить, что замещение хромосомы 7D на 7S при отсутствии белков-секалинов ржи в составе клейковины положительно влияет на качественные показатели муки. Кроме этого, показано, что линия 76/00<sup>i</sup> несет транслокацию 1BS/1SS (см. табл. 1). Ранее уже было отмечено, что интрогрессия в короткое плечо хромосом 1-й гомеологической группы от видов рода *Aegilops* улучшает хлебопекарные свойства (Alvarez, Guzmán, 2018).

### Заключение

Десять яровых линий из коллекции «Арсенал», отобранных первоначально по признаку «устойчивость к мучнистой росе или бурой ржавчине», впервые изучены по широкому кругу технологических показателей: мукомольным, содержанию клейковины в зерне и комплексу физических свойств муки и теста. Исследование показало, что интрогрессии от вида *Ae. speltoides* значительно расширяют генетическое разнообразие мягкой пшеницы по этим свойствам и, как следствие, – возможности конечного использования зерна и муки. В настоящей работе выявлены линии, сочетающие новую изменчивость по различным технологическим признакам с устойчивостью к различным грибным заболеваниям. Эти линии в основном сохраняли свои особенности в различных условиях в разные годы выращивания. Они могут быть привлечены в качестве доноров комплекса агрономически ценных признаков в селекционные работы.

### Список литературы / References

Адонина И.Г., Петраш Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание и изучение устойчивых к листовой ржавчине линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltoides* Tausch. *Генетика*. 2012;48(4):488-494.  
[Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Salina E.A., Khristov Yu.A. Construction and study of leaf rust-resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. genetic material. *Russ. J. Genet.* 2012;48(4):404-409.]  
Вавилов Н.И. Иммуниет растений к инфекционным заболеваниям. М., 1986.  
[Vavilov N.I. Plant Immunity to Infectious Diseases. Moscow, 1986. (in Russian)]  
Воронов С.И., Лапочкина И.Ф., Марченкова Л.А., Павлова О.В., Чавдар' Р.Ф., Орлова Т.Г. Пребридинговые исследования пшеницы мягкой по повышению устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам в Нечерноземной зоне РФ. *Бюл. Гос. Никитского ботанического сада*. 2019;132:102-108. DOI 10.25684/NBG.boot.132.2019.13.  
[Voronov S.I., Lapochkina I.F., Marchenkova L.A., Pavlova O.V., Chavdar' R.F., Orlova T.G. Prebreeding research of a common wheat to improve its resistance to biotic and abiotic stress in the non-chernozem belt of the Russian Federation. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin the State Nikitskiy Botanical Gardens*. 2019;132:102-108. DOI 10.25684/NBG.boot.132.2019.13. (in Russian)]  
Гайнуллин Н.П., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д. Использование фитопатологи-

ческого и молекулярно-генетических методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом коллекции «Арсенал». *Генетика*. 2007;43(8):1058-1064.

[Gajnullin N.R., Lapochkina I.F., Zhemchuzhina A.I., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Kovalenko E.D. Phytopathological and molecular genetic identification of leaf rust resistance genes in common wheat accessions with alien genetic material. *Russ. J. Genet.* 2007; 43(8):875-881.]

Ганенко И., Белая А. Что посеём. Общая посевная площадь в 2020 году составит около 80,3 млн гектаров. *Агроинвестор*. 2020. № 3. Доступно на сайте: <https://www.agroinvestor.ru/analytics/article/33319-cto-poseem-obshchaya-posevnaya-ploshchad-v-2020-godu-sostavit-okolo-80-3-mln-gektarov/>. Доступ: 29.07.20.

[Ganenko I., Belaya A. As we sow. The total sown area in 2020 will be about 80.3 million hectares. *Agroinvestor*. 2020. No. 3. Available at: <https://www.agroinvestor.ru/analytics/article/33319-cto-poseem-obshchaya-posevnaya-ploshchad-v-2020-godu-sostavit-okolo-80-3-mln-gektarov/>. Last access: 29.07.20. (in Russian)]

ГОСТ 10987-76. Зерно. Методы определения стекловидности (с изменениями № 1, 2). Дата введения: 1977-06-01. Переиздание с Изменениями № 1, 2, утвержденными в декабре 1988 г., декабре 1991 г. (ИУС 4-89, 4-92).

[State Standard 10987-76. Grain. Methods for Determination of Vitreousness. 1977. Reedition with Amendments 1 and 2, approved in December 1988 and December 1991 (reference indexes of standards 4-89 and 4-92) (in Russian)].

ГОСТ Р 54478-2011. Зерно. Методы определения количества и качества клейковины в пшенице. Дата введения: 2013-01-01.

[State Standard R 54478-2011. Grain. Methods for Determination of Gluten Quantity and Quality in Wheat. Effective date January 1, 2013. (in Russian)]

ГОСТ Р 51415-99 (ИСО 5530-4-91) Мука пшеничная. Физические характеристики теста. Определение реологических свойств с применением альвеографа. Дата введения: 2001-03-01.

[State Standard R 51415-99 (ISO 5530-4-91). Wheat Flour. Physical Characteristics of Doughs. Determination of rheological properties using an alveograph. 2001. (in Russian)]

ГОСТ ISO 5530-1-2013. Мука пшеничная. Физические характеристики теста. Часть 1. Определение водопоглощения и реологических свойств с применением фаринографа (Переиздание). Дата введения: 2014-01-01.

[State Standard ISO 5530-1-2013. Wheat Flour. Physical Characteristics of Doughs. Part 1: Determination of Water Absorption and Rheological Properties Using a Farinograf. 2014. (in Russian)]

Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчанинова О.Д., Шитова И.П., Мережко Ф.Ф., Филатенко Ф.Ф. Пшеницы мира. Л., 1987.

[Dorofeev V.F., Udachin R.A., Semenova L.V., Novikova M.V., Gradchaninova O.D., Shitova I.P., Merezko F.F., Filatenko F.F. Wheat of the World. Leningrad, 1987. (in Russian)]

Егоров Г.А. Управление технологическими свойствами зерна. Воронеж, 2000.

[Egorov G.A. Control of Technological Properties of Grain. Voronezh, 2000. (in Russian)]

Козьмина Н.П. Зерно. М., 1969.

[Kozmina N.P. Grain. Moscow, 1969. (in Russian)]

Крупнова О.В. Качество зерна яровой мягкой пшеницы с транслокациями от сородичей: Дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2010.

[Krupnova O.V. Grain quality of spring bread wheat with translocations from congeners: Dr. Sci. (Biol.) Dissertation. Saratov, 2010. (in Russian)]

Крупнова О.И. О сопоставлении качества зерна яровой и озимой пшеницы в связи с делением на рыночные классы. С.-х. биология. 2013;1:15-25. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2013.1.15rus>.

[Krupnova O.I. A comparison of grain quality in spring and winter wheats associated with market classes (review). *Selskokhozyayst-*

- vennaya *Biologiya = Agricultural Biology*. 2013;1:15-25. <https://doi.org/10.15389/agrobio.2013.1.15rus>. (in Russian)]
- Лапочкина И.Ф. Реконструкция генома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при отдаленной гибридизации (с использованием *Aegilops* L. и других видов): Дис. ... д-ра биол. наук. Немчиновка, 1999.
- [Lapochkina I.F. Reconstruction of the common wheat (*Triticum aestivum* L.) genome in remote hybridization (using *Aegilops* L. and other species): Dr. Sci. (Biol.) Dissertation. Nemchinovka, 1999. (in Russian)]
- Лапочкина И.Ф., Ячевская Г.Л., Иорданская И.В., Кызласов В.Г., Руденко М.И., Макарова И.Ю., Серова А.С., Гайнуллин Н.Р., Коваленко Е.Д., Жемчужина А.И., Коломиец Т.М., Соломатин Д.А., Кисилева М.И. Линии яровой мягкой пшеницы с идентифицированным генотипом устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе из коллекции Арсенал. В: Доклады Второго Всероссийского Съезда по защите растений. СПб., 5–10 декабря 2005. СПб., 2005;493-495.
- [Lapochkina I.F., Yachevskaya G.L., Iordanskaya I.V., Kyzlasov V.G., Rudenko M.I., Makarova I.Yu., Serova A.S., Gajnullin N.R., Kovalenko E.D., Zhemchuzhina A.I., Kolomiets T.M., Solomatin D.A., Kisileva M.I. Lines of spring bread wheat with identified genotypes of resistance to leaf rust and powdery mildew from the Arsenal collection. In: Proceedings of the Second All-Russia Congress on Plant Protection. Saint-Petersburg, December 5–10, 2005. St. Petersburg, 2005;493-495. (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1988.
- [Methods of State Variety Testing of Agricultural Crops. Moscow, 1988. (in Russian)]
- Митрофанова О.П. Генетические ресурсы пшеницы в России: состояние и предселекционное изучение. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):10-20.
- [Mitrofanova O.P. Wheat genetic resources in Russia: current status and pre-breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):10-20. (in Russian)]
- Симонов А.В., Чистякова А.К., Морозова Е.В., Щукина Л.В., Бёрнер А., Пшеничникова Т.А. Создание нового для мягкой пшеницы генотипа – носителя двух локусов мягкозерности эндосперма. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(3):341-346. DOI 10.18699/VJ17.251.
- [Simonov A.V., Chistyakova A.K., Morozova E.V., Shchukina L.V., Börner A., Pshenichnikova T.A. The development of a new bread wheat genotype carrying two loci for endosperm softness. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(3):341-346. DOI 10.18699/VJ17.251. (in Russian)]
- Цицин Н.В. Отдаленная гибридизация в семействе злаковых. М., 1958.
- [Tsitsin N.V. Remote Hybridization in the Family Poaceae. Moscow, 1958. (in Russian)]
- Шибайев П.Н., Гусев И.С., Самсонов М.М. Стекловидность и структурно-механические свойства зерна пшеницы. *Селекция и семеноводство*. 1974;3:22-26.
- [Shibayev P.N., Gusev I.S., Samsonov M.M. Vitreousness and structural-mechanical properties of wheat grain. *Seleksiya i Semenovodstvo = Breeding and Seed Industry*. 1974;3:22-26. (in Russian)]
- Adonina I.G., Salina E.A., Efremova T.T., Pshenichnikova T.T. The study of introgressive lines of *Triticum aestivum* × *Aegilops speltoides* by *in situ* and SSR analyses. *Plant Breed*. 2004;123:220-224. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00932.x>.
- Alvarez J.B., Guzmán C. Interspecific and intergeneric hybridization as a source of variation for wheat grain quality improvement. *Theor. Appl. Genet*. 2018;131:225-251. DOI 10.1007/s00122-017-3042-x.
- Gonzalez-Hernandez J.L., Elias E.M., Kianian S.F. Mapping genes for grain protein concentration and grain yield on chromosome 5B of *Triticum turgidum* (L.) var. *dicoccoides*. *Euphytica*. 2004;139:217-225.
- Lapochkina I.F., Iordanskaya I.V., Yatchevskaya G.L., Zhemchuzhina A.I., Kovalenko E.D., Solomatin D.A., Kolomiets T.M. Identification of alien genetic material and genes of resistance to leaf rust in wheat (*Triticum aestivum* L.) stocks. In: Proc. Tenth Int. Wheat Genetics Symp. 2003;3:1190-1192.
- Leonova I.N., Budashkina E.B. The study of agronomical traits determining productivity of *Triticum aestivum*/*Triticum timopheevii* introgression lines with resistance to fungal diseases. *Russ. J. Genet. Appl. Res*. 2017;7:299-307. <https://doi.org/10.1134/S2079059717030091>.
- Li Y., Song Y., Zhou R., Branlard G., Jia J. QTL detection of seven quality traits in wheat using two related recombinant inbred line populations. *Euphytica*. 2012;183(2):207-226. DOI 10.1007/s10681-011-0448-4.
- Martin D.J., Stewart B.G. Dough stickiness in rye-derived wheat cultivars. *Euphytica*. 1990;51:77-86. <https://doi.org/10.1007/BF00022895>.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Roger J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proc. 12th Int. Wheat Genet. Symp. Yokohama, Japan, 2013. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2013/GeneCatalogueIntroduction.pdf>.
- Peña R.J. Wheat for bread and other foods. In: Curtis B.C., Rajaram S., Macpherson H.G. (Eds.). *Bread Wheat – Improvement and Production*. Rome: FAO, 2002.
- Pshenichnikova T.A., Maystrenko O.I. Inheritance of genes coding for gliadin proteins and glume colour introgressed into *Triticum aestivum* from a synthetic wheat. *Plant Breed*. 1995;114(6):501-504. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00844.x>.
- Pshenichnikova T.A., Shchukina L.V., Simonov A.V., Chistyakova A.K., Morozova E.V. The use of monosomic lines of bread wheat for verification of quantitative trait loci (QTL). In: Proc. 15th Int. EWAC Conf. Novi Sad, Serbia, 7–11 November 2011. EWAC Newslett. 2012;180-181.
- Pshenichnikova T.A., Simonov A.V., Ermakova M.F., Chistyakova A.K., Shchukina L.V., Morozova E.V. The effects on grain endosperm structure of an introgression from *Aegilops speltoides* Tausch. into chromosome 5A of bread wheat. *Euphytica*. 2010;175(3):315-322. DOI 10.1007/s10681-010-0168-1.
- Salina E.A., Adonina I.G., Efremova T.T., Lapochkina I.F., Pshenichnikova T.A. The genome-specific subtelomeric repeats for study of introgressive lines *T. aestivum* × *Ae. speltoides*. In: Proc. 11th EWAC Conf. Novosibirsk, 24–28 July 2000. EWAC Newslett. 2001; 161-164.
- Shchukina L.V., Pshenichnikova T.A., Chistyakova A.K., Khlestkina E.K., Börner A. Properties of grain, flour and dough in bread wheat lines with *Aegilops markgrafii* introgressions. *Cereal Res. Commun*. 2017;45(2):296-306. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.012>.
- Vikram P., Franco J., Burgueño-Ferreira J., Li H., Sehgal D., Saint Pierre C., Ortiz C., Sneller C., Tattaris M., Guzman C., Paola Sansaloni C., Ellis M., Fuentes-Davila G., Reynolds M., Sonder K., Singh P., Payne T., Wenzl P., Sharma A., Bains N.S., Singh G.P., Crossa J., Singh S. Unlocking the genetic diversity of Creole wheats. *Sci. Rep*. 2016;6:1-13. <https://doi.org/10.1038/srep23092>.

#### ORCID ID

I.F. Lapochkina [orcid.org/0000-0002-2328-2798](https://orcid.org/0000-0002-2328-2798)  
T.A. Pshenichnikova [orcid.org/0000-0001-5639-916X](https://orcid.org/0000-0001-5639-916X)

**Благодарности.** Технологический анализ зерна выполнен при поддержке проекта РНФ № 16-16-00011-П. Выращивание в поле проведено в условиях ЦКП «Селекционно-генетическая лаборатория» при поддержке бюджетного проекта № 0324-2019-0039-С-01.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2020. После доработки 16.09.2020. Принята к публикации 09.10.2020.

## Паттерн генетического разнообразия у локальных и коммерческих пород свиней на основе анализа микросателлитов

В.Р. Харзинова , Н.А. Зиновьева

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Дубровицы, Московская область, Россия  
 e-mail: veronika0784@mail.ru

**Аннотация.** Одной из основных задач генетики и селекции животных является оценка генетического разнообразия и исследование генетических взаимоотношений между различными породами и популяциями с помощью методов молекулярно-генетического анализа. Нами проведен анализ полиморфизма микросателлитов и получена информация о состоянии генетического разнообразия и структуры популяций локальных пород свиней, разводимых на территории России (кемеровская, беркширская, ливенская, мангалица, цивильская), Республики Беларусь (крупная белая, черно-пестрая), Украины (степная белая), а также коммерческих пород импортного происхождения отечественной репродукции (крупная белая, ландрас, дюрок). Материалом для исследований служили пробы ткани 1194 образцов свиней из биоресурсной коллекции «Банк генетического материала животных и птиц» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Полиморфизм 10 STR-локусов (S0155, S0355, S0386, SW24, SO005, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857) определяли по ранее разработанной методике с помощью генетического анализатора ABI3130xl (Applied Biosystems, США). Для оценки аллелофонда каждой породы рассчитывали среднее число аллелей ( $N_A$ ) и эффективное число аллелей ( $N_E$ ) на locus, аллельное разнообразие ( $A_R$ ), вычисленное с применением процедуры рарификации, наблюдаемую ( $H_O$ ) и ожидаемую ( $H_E$ ) гетерозиготность, индекс фиксации ( $F_{IS}$ ). Степень генетической дифференциации пород оценивали на основании попарных значений  $F_{ST}$  и  $D$ . Анализ параметров аллельного и генетического разнообразия локальных пород показал максимальный уровень полиморфности у свиней украинской степной породы ( $N_A = 6.500$ ,  $N_E = 3.709$ ,  $A_R = 6.020$ ), а минимальный – у свиней породы дюрок (4.875, 2.119 и 3.821 соответственно). Наиболее высокий уровень генетического разнообразия выявлен у свиней крупной белой породы Республики Беларусь ( $H_O = 0.707$ ,  $H_E = 0.702$ ). Минимальный уровень генетического разнообразия установлен у свиней импортных пород ландрас ( $H_O = 0.459$ ,  $H_E = 0.400$ ) и дюрок ( $H_O = 0.480$ ,  $H_E = 0.469$ ), что, возможно, указывает на высокое давление отбора в этих породах. По результатам филогенетического анализа выявлена генетическая обособленность пород свиней корня крупной белой породы, в создании которых принимали участие беркширские свиньи, и отдаленность пород ландрас и мангалица. Кластерный анализ показал генетическую консолидированность свиней пород черно-пестрая, беркширская и мангалица. Отличной от других пород генетической структурой характеризовались также импортные породы свиней с кластеризацией в зависимости от происхождения. Информация, полученная в ходе исследований, может служить руководством для стратегий управления и разведения изученных пород свиней с целью лучшего их использования и сохранения.  
Ключевые слова: породы свиней; микросателлиты; генетическое разнообразие.

**Для цитирования:** Харзинова В.Р., Зиновьева Н.А. Паттерн генетического разнообразия у локальных и коммерческих пород свиней на основе анализа микросателлитов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(7):747-754. DOI 10.18699/VJ20.669

## The pattern of genetic diversity of different breeds of pigs based on microsatellite analysis

V.R. Kharzinova , N.A. Zinovieva

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, Moscow region, Russia  
 e-mail: veronika0784@mail.ru

**Abstract.** One of the main tasks of genetics and animal breeding is the assessment of genetic diversity and the study of genetic relationships between different breeds and populations using molecular genetic analysis methods. We analysed the polymorphism of microsatellites and the information on the state of genetic diversity and the population structure of local breeds in Russia: the Kemerovo, the Berkshire, the Liven, the Mangalitsa, and the Civilian; in the Republic of Belarus: the Large White and the Black-and-White; and in Ukraine: the White Steppe, as well as commercial breeds of imported origin of domestic reproduction: the Large White, the Landrace, and the Duroc. The materials used for this study were the tissue and DNA samples extracted from 1,194 pigs and DNA of the UNU “Genetic material bank of domestic and wild animal species and birds” of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry.

Polymorphisms of 10 microsatellites (S0155, S0355, S0386, SW24, SO005, SW72, SW951, S0101, SW240, and SW857) were determined according to the previously developed technique using DNA analyser ABI3130xl. To estimate the allele pool of each population, the average number of alleles ( $N_A$ ), the effective number of alleles ( $N_E$ ) based on the locus, the rarified allelic richness ( $A_R$ ), the observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosity, and the fixation index ( $F_{IS}$ ) were calculated. The degree of genetic differentiation of the breeds was assessed based on the pairwise values of  $F_{ST}$  and  $D$ . The analysis of the allelic and genetic diversity parameters of the local breeds showed that the maximum and minimum levels of polymorphism were observed in pigs of the Ukrainian White Steppe breed ( $N_A = 6.500$ ,  $N_E = 3.709$ , and  $A_R = 6.020$ ) and in pigs of the Duroc breed ( $N_A = 4.875$ ,  $N_E = 2.119$ , and  $A_R = 3.821$ ), respectively. The highest level of genetic diversity was found in the Large White breed of the Republic of Belarus ( $H_O = 0.707$  and  $N_E = 0.702$ ). The minimum level of genetic diversity was found in pigs of the imported breeds – the Landrace ( $H_O = 0.459$ ,  $H_E = 0.400$ ) and the Duroc ( $H_O = 0.480$ ,  $H_E = 0.469$ ) – indicating a high selection pressure in these breeds. Based on the results of phylogenetic analysis, the genetic origin of Large White pigs, the breeds, from which the Berkshire pigs originated, and the genetic detachment of the Landrace from the Mangalitsa breeds were revealed. The cluster analysis showed a genetic consolidation of the Black-and-White, the Berkshire, and the Mangalitsa pigs. Additionally, the imported breeds with clustering depending on the origin were characterised by a genetic structure different from that of the other breeds. The information obtained from these studies can serve as a guide for the management and breeding strategies of the pig breeds studied, to allow their better use and conservation.

Key words: pig breeds; microsatellites; genetic diversity.

**For citation:** Kharzinova V.R., Zinovieva N.A. The pattern of genetic diversity of different breeds of pigs based on microsatellite analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7): 747-754. DOI 10.18699/VJ20.669

## Введение

В настоящее время промышленное производство свинины основано на использовании ограниченного числа коммерческих пород свиней импортного происхождения. Данные породы хорошо приспособлены к интенсивным производственным системам, направленным на максимальную реализацию генетического потенциала продуктивности (Миñoz et al., 2019). Наряду с зарубежными существует локальные (местные) породы, которые являются носителями уникальных форм изменчивости и составляют национальные генетические ресурсы сельскохозяйственных видов животных. Несмотря на свою немногочисленность, локальные породы не утратили значения и в современных условиях развития животноводства. Такие породы, имея более низкую продуктивность по сравнению с коммерческими, характеризуются большей индивидуальной изменчивостью, конституциональной крепостью, стрессоустойчивостью и хорошей адаптацией к местным климатическим условиям (Харзинова и др., 2017).

Локальные породы рассматриваются сегодня в качестве незаменимых генетических ресурсов для создания географически ориентированных систем органического производства продукции животноводства. По мнению Ю.А. Столповского (2013), из-за включения в мировое сельское хозяйство транснациональных животноводческих индустрий создается опасность сокращения национальных генетических ресурсов, зависимости от импорта продовольствия и селекционных достижений, а также появляется угроза глобализации распространения инфекций и скрытых генетических дефектов. Отсюда следует все возрастающая важность не только изучения генофондов сельскохозяйственных видов животных импортного происхождения, но и сохранения генетических ресурсов местных пород.

Согласно руководству по разработке национальных планов управления генетическими ресурсами сельскохозяйственных животных (FAO, 1998), была предложена интегрированная программа всемирного управления генетическими ресурсами сельскохозяйственных животных

с использованием эталонных микросателлитных маркеров (короткие tandemные повторы – short tandem repeats, STR) (Egito et al., 2007). На сегодняшний день имеется множество публикаций, в которых показана прикладная значимость STR для характеристики генетического разнообразия и структуры пород свиней как коммерческого (Зиновьева и др., 2012; Vrtková et al., 2012; Szmatola et al., 2016), так и местного разведения (Kaul et al., 2002; Kramarenko et al., 2018). Однако сравнительные исследования всего многообразия локальных и коммерческих пород свиней, разводимых на территории России, до настоящего времени не проводились.

Целью нашего исследования была характеристика генетического разнообразия и популяционной структуры восьми локальных и трех коммерческих пород свиней на основании анализа микросателлитов.

## Материалы и методы

Объектом исследований послужил биологический материал, полученный от 1194 свиней и сохраняемый в коллекции «Банк генетического материала животных и птиц» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. В качестве биологического материала использовали образцы тканей (ушной выщип). Представленная выборка включала восемь локальных пород, разводимых на территории России: кемеровская (Кемеровская область, КЕМ,  $n = 35$ ), беркширская (Ярославская область, BERK,  $n = 80$ ), ливенская (Орловская область, LIV,  $n = 67$ ), мангалица (Алтайский край, MNG,  $n = 52$ ), цивильская (Республика Чувашия, CVL,  $n = 43$ ); Республики Беларусь: крупная белая (BLW,  $n = 47$ ) и черно-пестрая (BBP,  $n = 98$ ); Украины: степная белая (LWUK,  $n = 61$ ), а также три коммерческие породы импортного происхождения отечественной репродукции, разводимые в селекционно-генетических центрах Орловской, Воронежской и Липецкой областей: крупная белая (LW,  $n = 241$ ), ландрас (LDR,  $n = 250$ ) и дюрок (DUR,  $n = 223$ ).

Выделение ДНК проводили с помощью наборов для выделения геномной ДНК серии «ДНК-Экстран» (ЗАО «Син-

тол», Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Анализ полиморфизма десяти микросателлитов (S0155, S0355, S0386, SW24, SO005, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857) осуществляли по ранее описанной методике (Харзинова и др., 2018). Результаты амплифицированных фрагментов визуализировали посредством фрагментного анализа с помощью программного обеспечения Gene Mapper v. 4 (Applied Biosystems, США).

Анализ популяционно-генетических параметров, степень генетической дифференциации на основании матриц попарных значений  $F_{ST}$  и  $D$ , построение филогенетических деревьев по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net) проводили в программном обеспечении GenAlEx 6.503 (Peakall, Smouse, 2012), SplitsTree 4.14.5 (Huson, Bryant, 2006) и R пакете diveRsim с последующей визуализацией в пакете pophelper (Keenan et al., 2013).

Генетическую структуру исследуемых пород свиней оценивали с помощью анализа главных компонент (principal component analysis, PCA) в R пакете adegenet (Jombart, 2008) и с визуализацией в R пакете ggplot2 (Wickham, 2009), а также посредством кластеризации в программе STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), с использованием смешанной модели (число предполагаемых кластеров  $K$  от 1 до 20; длина burn-in периода 100000; модель Марковских цепей Монте-Карло – 100000). Для каждого значения  $K$  выполнялось по 10 итераций. Приложение STRUCTURE HARVESTER (Earl, von Holdt, 2012) использовали для определения оптимального числа кластеров ( $\Delta K$ ) по методу, предложенному G. Evanno et al. (2005). Исходные файлы формировали в формате MS Excel и программной среде R 3.5.0 (R Core Team).

## Результаты и обсуждение

При анализе генотипов десяти микросателлитов по всей выборке было детектировано 69 аллелей, что превосходило число аллелей (48), детектированных при молекуляр-

но-генетическом анализе свиней китайской эруалианской породы с использованием такого же количества маркеров (Yue, Wang, 2003). Лocus SW951 характеризовался наименьшим количеством аллелей (5 аллелей). Аналогичная тенденция по данному locus была выявлена при изучении свиней, разводимых на территории Украины (2 аллеля) (Kramarenko et al., 2018) и Таиланда (7 аллелей) (Charoensook et al., 2019). Наибольшее количество аллелей (22) было выявлено в locus SO005, что согласовалось с результатами исследований (Guastella et al., 2010; Šalamon et al., 2019), в которых этот locus превосходил остальные по количеству аллелей: 19 и 17 соответственно. Минимальные средние значения как наблюдаемой ( $H_O$ ), так и ожидаемой ( $H_E$ ) гетерозиготности отмечены в locus SW951:  $0.437 \pm 0.067$  и  $0.482 \pm 0.071$ . Locus SW857 имел максимальные значения показателей:  $H_O = 0.868 \pm 0.018$ ,  $H_E = 0.783 \pm 0.018$ .

Анализ распределения частот генотипов по генетическому равновесию Харди–Вайнберга по всей выборке в целом показал достоверные отклонения от состояния генетического равновесия по отдельным locusам у всех исследованных пород (табл. 1). У свиней породы ландрас отклонения от генетического равновесия были выявлены по всем locusам, у свиней пород дюрок и крупная белая – по девяти и восьми locusам соответственно. При этом отметим, что локальные породы свиней уступали коммерческим по количеству locusов с достоверными отклонениями от состояния генетического равновесия. Число таких locusов варьировало от трех в ливенской породе до семи в украинской степной белой. Полученные данные можно рассматривать как указание на большее давление отбора в коммерческих породах свиней по сравнению с локальными. Из десяти исследованных locusов высокодостоверные отклонения от генетического равновесия по Харди–Вайнбергу ( $p < 0.001$ ) были установлены для locusа SO005.

**Таблица 1.** Результаты теста десяти микросателлитов при анализе исследуемых пород свиней на соответствие генетическому равновесию Харди–Вайнберга

Порода	Лocus MC									
	SW24	S0155	SO005	SW72	SW951	S0386	S0355	SW240	SW857	S0101
LDR	**	**	***	***	**	**	*	***	***	***
CVL	*	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
LIV	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
BLW	*	ns	***	ns	ns	ns	ns	*	ns	*
MNG	ns	ns	***	*	ns	*	***	ns	***	ns
BERK	ns	**	***	ns	***	ns	***	ns	**	ns
KEM	*	ns	***	ns	ns	**	*	ns	**	**
LWUK	ns	**	***	*	*	***	ns	***	ns	*
BBP	ns	ns	***	ns	ns	***	**	ns	*	ns
DUR	**	***	***	***	***	ns	***	***	***	***
LW	***	***	***	ns	***	***	ns	***	***	***

Примечание. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns – недостоверно.

Здесь и далее порода: KEM – кемеровская, BERK – беркширская, LIV – ливенская, MNG – мангалица, CVL – цивильская, BLW и BBP – крупная белая и чернопестрая Республики Беларусь, LWUK – степная белая Украины, LW – крупная белая, LDR – ландрас, DUR – дюрок.

**Таблица 2.** Параметры генетического разнообразия исследуемых пород свиней на основе анализа микросателлитов

Порода	$n$	$N_A$	$N_E$	$A_R$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$ ( $F_{IS}$ 95 %, CI > 0)
CVL	43	4.875 ± 0.398	2.807 ± 0.295	4.810 ± 0.391	0.590 ± 0.074	0.611 ± 0.047	0.059 [-0.100; 0.218]
LIV	67	5.375 ± 0.596	2.979 ± 0.306	5.073 ± 0.514	0.672 ± 0.041	0.639 ± 0.037	-0.060 [-0.159; 0.039]
BLW	47	5.000 ± 0.535	3.672 ± 0.492	4.934 ± 0.527	0.707 ± 0.052	0.702 ± 0.029	-0.002 [-0.088; 0.084]
MNG	52	4.875 ± 0.639	2.723 ± 0.376	4.659 ± 0.613	0.524 ± 0.113	0.545 ± 0.095	0.100 [-0.120; 0.320]
BERK	80	5.125 ± 0.441	2.789 ± 0.206	4.769 ± 0.342	0.575 ± 0.048	0.627 ± 0.028	0.079 [-0.062; 0.220]
KEM	35	5.125 ± 0.611	3.246 ± 0.443	5.444 ± 0.626	0.550 ± 0.055	0.644 ± 0.054	0.139 [0.034; 0.244]
LWUK	61	6.500 ± 0.802	3.709 ± 0.427	6.020 ± 0.657	0.627 ± 0.043	0.709 ± 0.028	0.118 [0.041; 0.195]
BBP	98	5.375 ± 0.595	3.057 ± 0.331	4.828 ± 0.550	0.645 ± 0.062	0.639 ± 0.049	-0.008 [-0.097; 0.081]
DUR	223	4.875 ± 0.295	2.119 ± 0.274	3.821 ± 0.305	0.480 ± 0.088	0.469 ± 0.070	-0.014 [-0.178; 0.150]
LW	241	6.250 ± 0.559	3.349 ± 0.467	5.126 ± 0.518	0.651 ± 0.047	0.672 ± 0.030	0.036 [-0.039; 0.111]
LDR	249	6.001 ± 0.463	2.396 ± 0.492	4.634 ± 0.475	0.459 ± 0.095	0.490 ± 0.073	0.098 [-0.037; 0.233]

Примечание.  $n$  – количество образцов;  $N_A$  – среднее число аллелей на локус;  $N_E$  – число эффективных аллелей на локус;  $A_R$  – аллельное разнообразие;  $H_O$  и  $H_E$  – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность;  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга с 95 % доверительным интервалом.

Интересен результат исследований, опубликованный S. Kramarenko с коллегами (2018). В них показано, что у свиней породы дюрок, разводимых в некоторых районах Украины, восемь из двенадцати локусов имели недостоверно значимые отклонения от состояния генетического равновесия.

Для оценки степени генетического разнообразия популяций и пород чаще всего используют два основных показателя – уровень полиморфности и степень гомозиготности (гетерозиготности) (Храброва и др., 2011), результаты анализа которых представлены в табл. 2. Минимальные значения среднего числа аллелей на локус ( $N_A = 4.875$ ) были отмечены в трех породах: CVL, MNG и DUR, максимальные (более 6.000) – у свиней породы ландрас (LDR,  $N_A = 6.001$ ), у крупной белой породы, разводимой на территории нашей страны (LW,  $N_A = 6.250$ ), и украинской степной белой (LWUK,  $N_A = 6.500$ ). Число эффективных аллелей на локус ( $N_E$ ) варьировало от 2.119 (DUR) до 3.709 (LWUK).

Еще одной характеристикой уровня полиморфности является аллельное разнообразие ( $A_R$ ), которое рассматривается в качестве сильного индикатора эволюционного потенциала популяции (Allendorf, 1986; Caballero, García-Dorado, 2013). Было высказано предположение, что этот показатель имеет ключевое значение для сохранения популяции и управления ею (Greenbaum et al., 2014). Минимальные значения  $A_R$ , скорректированные методом рарификации, были детектированы у DUR (3.821), макси-

мальные – у LWUK (6.020). По мнению G. Greenbaum с коллегами (2014), уменьшение аллельного разнообразия может привести к снижению способности популяции адаптироваться к будущим изменениям окружающей среды. Более того, есть свидетельства, что высокое аллельное разнообразие даже нейтральных аллелей увеличивает эволюционируемость, делая значительную часть генотипического пространства доступной для меньшего количества мутационных событий (Wagner, 2008).

На сегодняшний день очень часто используют такие показатели генетической характеристики популяций (Vonholdt et al., 2008; Toro et al., 2009; Andras et al., 2011), как наблюдаемая ( $H_O$ ) и ожидаемая ( $H_E$ ) гетерозиготность (Greenbaum et al., 2014). Наблюдаемая гетерозиготность в исследованных породах свиней изменялась в пределах от 0.459 ± 0.095 у LDR до 0.707 ± 0.052 у BLW. По мнению ряда авторов, при уменьшении наблюдаемой гетерозиготности снижается средняя приспособленность особей, т. е. показатель имеет четкие экологические последствия (Reed, Frankham, 2003; Szulkin et al., 2010). Умеренные уровни ожидаемой гетерозиготности (выше 0.5) наблюдались у девяти пород свиней, с варьированием от 0.545 ± 0.095 у MNG до 0.709 ± 0.028 у LWUK. Исключение составили свиньи породы дюрок и ландрас, у которых данный показатель имел минимальные значения: 0.469 ± 0.070 и 0.490 ± 0.073 соответственно.

Согласно значениям индекса фиксации, незначительный недостаток гетерозигот был выявлен в семи породах

свиней (CVL, MNG, BERK, KEM, LWUK, LW, LDR) с варьированием положительных значений показателя от 0.036 у LW до 0.139 у KEM. Однако для этих пород, за исключением KEM и LWUK, область 95 % доверительного интервала индекса фиксации перекрывала нулевое значение, что указывает на незначительные отклонения в количестве гетерозигот от теоретически ожидаемого в данных породах. Незначительное смещение генетического равновесия в сторону избытка гетерозигот было отмечено в четырех породах: LIV, BLW, BBP и DUR, у которых индекс фиксации имел отрицательные значения – 0.060, 0.002, 0.008 и 0.014 соответственно.

Среди локальных пород максимальный уровень полиморфности был выявлен у LWUK ( $N_A = 6.500$ ,  $N_E = 3.709$ ,  $A_R = 6.020$ ), а максимальный уровень генетического разнообразия – у BLW ( $H_O = 0.707$ ,  $H_E = 0.702$ ). Свиньи породы мангалица имели минимальные значения всех анализируемых параметров:  $N_A = 4.875$ ,  $N_E = 2.723$ ,  $A_R = 4.659$ ,  $H_O = 0.524$ ,  $H_E = 0.545$ . Однако в работе (Druml et al., 2012) значения генетических параметров, характеризующих уровень генетического разнообразия свиней породы мангалица Австрии и Национального заповедника Сербии, были еще ниже:  $N_A = 3.8$ ,  $H_O = 0.49$ ,  $H_E = 0.54$  и  $N_A = 3.94$ ,  $H_O = 0.58$ ,  $H_E = 0.54$  соответственно. При сравнении животных импортного происхождения отечественной репродукции группа свиней крупной белой породы превосходила две другие по всем показателям:  $N_A = 6.250$ ,  $N_E = 3.349$ ,  $A_R = 5.126$ ,  $H_O = 0.651$ ,  $H_E = 0.672$ . Из всех исследуемых пород свиней минимальный уровень полиморфности и генетического разнообразия выявлен в породе дюркок:  $N_A = 4.875$ ,  $N_E = 2.119$ ,  $A_R = 3.821$ ,  $H_O = 0.480$ ,  $H_E = 0.469$ . Низкий уровень генетического разнообразия этой породы отмечен и другими авторами. При сравнительном анализе локальных пород Бразилии со свиньями специализированных пород (дюркок, ландрас и крупная белая) минимальные значения как среднего числа аллелей на locus, так и эффективного числа аллелей были выявлены в породе дюркок:  $N_A = 3.65$  и  $N_E = 3.01$  (da Silva et al., 2011). Изучая генетическое разнообразие четырех коммерческих и одной локальной пород свиней Польши с использованием пяти микросателлитов, Т. Szmatoła с коллегами (2016) получили практически идентичные нашим результатам наименьшие значения среднего числа аллелей на locus ( $N_A = 4.6$ ), числа эффективных аллелей на locus ( $N_E = 2.78$ ) и аллельного разнообразия ( $A_R = 4.6$ ). Однако в исследованиях Т. Kim et al. (2005), описывающих генетическое разнообразие и популяционную структуру четырех европейских, двух корейских и трех китайских пород свиней, свиньи породы дюркок превосходили ряд других по перечисленным параметрам. При этом местные корейские свиньи демонстрировали стабильно низкие уровни аллельного разнообразия и гетерозиготности, тогда как китайские породы свиней, за исключением породы учжишань, имели высокую степень генетического разнообразия по сравнению с коммерческими и местными корейскими породами. Детектированные в нашей работе более низкие значения популяционно-генетических параметров как у свиней породы мангалица, так и у свиней породы дюркок, возможно, указывают на высокое давление отбора и минимальную или нулевую миграцию новых генов в породах.

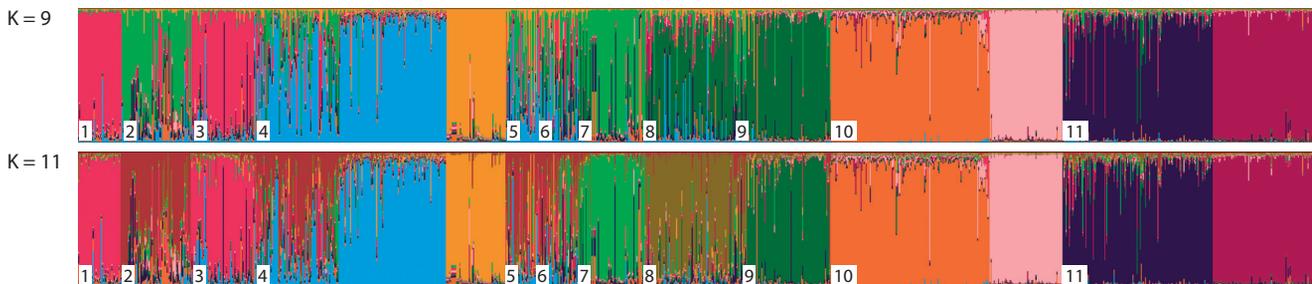
Для оценки генетической структуры исследуемых пород свиней был проведен байесовский кластерный анализ в STRUCTURE (рис. 1), а также координатный анализ с помощью анализа главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) (рис. 2). Несмотря на то что алгоритм, основанный на значениях величины  $\Delta K$  (Earl, von Holdt, 2012), выявил оптимальное число кластеров для данной выборки, равное 9 ( $\Delta K = 136.79$ ), были представлены также результаты при  $K = 11$ .

Смешанным генетическим происхождением характеризуются породы LIV, BLW и LW. Схожий генетический паттерн отмечен также у пород CVL и LWUK. Четкая генетическая структура была выявлена у свиней пород черно-пестрая, беркширская, мангалица. Формирование нескольких кластеров породами импортного происхождения объясняется как различным происхождением, так и применением на предприятиях различных стратегий селекционно-племенной работы.

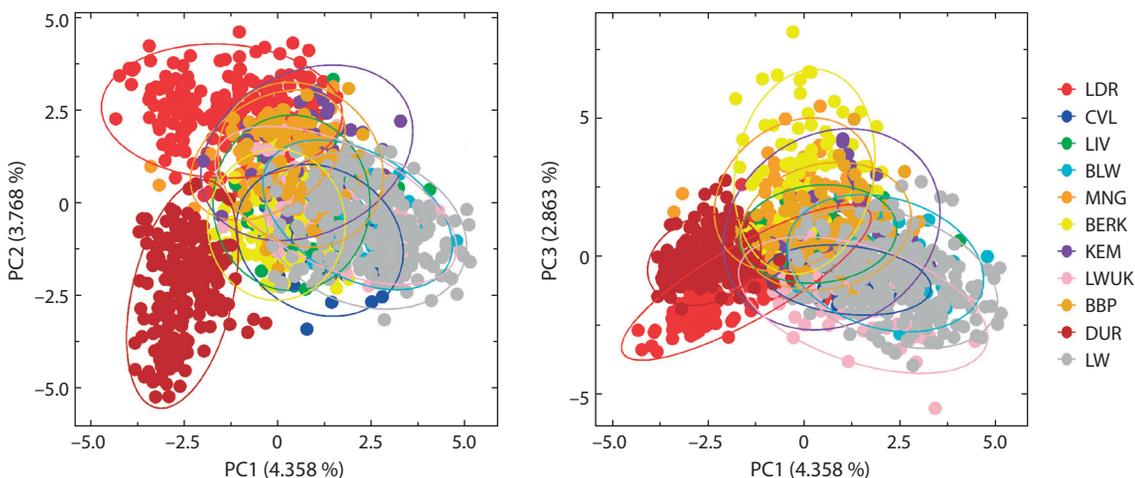
Анализ главных компонент, ключевой особенностью которого является возможность проецирования образцов на ортогональные координатные оси, каждая из которых состоит из линейной комбинации аллельных или генотипических значений (Patterson et al., 2006; Novembre et al., 2008), выявил генетическое смешение и незначительно визуализируемую дифференциацию большинства из исследуемых пород. Независимый кластер сформировали представители коммерческих пород дюркок, ландрас и крупная белая, при этом локальные породы образовали перекрывающиеся массивы. По мнению I. Jolliffe, J. Cadima (2016), отсутствие четкой кластеризации не означает отсутствия различий, а может указывать на сходство наибольшего источника изменчивости. Также данный анализ позволил охарактеризовать размах вариабельности по трем компонентам. Первая компонента отвечала за большую часть генетической изменчивости всего массива данных (4.3 %), а вторая и третья компоненты отражали 3.7 и 2.8 % генетической изменчивости соответственно.

Для оценки степени дифференциации популяций используют два основных класса показателей, определяющих количественную структуру популяций: индексы фиксации  $F_{ST}$  и Nei's  $G_{ST}$  и показатели аллельной дифференциации, такие как Jost's  $D$  и дифференциальная энтропия (Jost et al., 2018). Наиболее часто в популяционных генетических исследованиях применяют стандартный метод оценки индекса фиксации  $F_{ST}$  (Weir, Cockerham, 1984). Однако при расчете генетических расстояний по данным изменчивости высокополиморфных маркеров значения показателя могут быть смещены (Meirmans, Hedrick, 2011; Hopper et al., 2018). В этой связи нами дополнительно были проведены расчеты показателя  $D$ , предложенного L. Jost (2008), который учитывает долю аллельных вариаций в популяциях (табл. 3).

Наибольшая генетическая близость по обоим показателям выявлена для свиней российской и белорусской популяций крупной белой породы: LW/BLW  $F_{ST} = 0.037$ ,  $D = 0.064$ . Однако в отношении максимальных значений индексов были обнаружены различия: наибольшей генетической удаленностью, согласно индексу фиксации  $F_{ST}$ , характеризуется группа LDR/CVL (0.244), а по показателю  $D$  – группа LW/DUR (0.291).



**Рис. 1.** Результаты кластерного анализа одиннадцати пород свиней на основе микросателлитов с использованием программы STRUCTURE 2.3.4. Породы: 1 – CVL (цивильская), 2 – LIV (ливенская), 3 – LWUK (степная белая Украины), 4 – LW (крупная белая), 5 – BLW (крупная белая Республики Беларусь), 6 – KEM (кемеровская), 7 – MNG (мангалица), 8 – BBP (черно-пестрая Республики Беларусь), 9 – BERK (беркширская), 10 – DUR (дюрок), 11 – LDR (ландрас).



**Рис. 2.** Проекция исследуемых образцов пород свиней на плоскости двух координат по данным PCA-анализа.

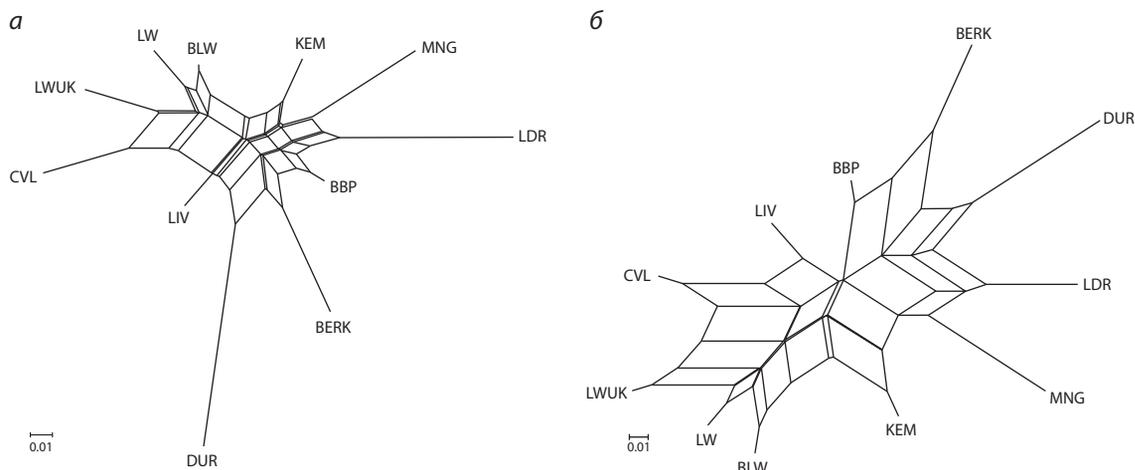
**Таблица 3.** Генетические расстояния между исследуемыми породами свиней на основе анализа микросателлитов

Порода	CVL	LIV	BLW	MNG	BERK	KEM	LWUK	BBP	DUR	LW	LDR
CVL	0	0.101	0.158	0.175	0.271	0.212	0.097	0.207	0.176	0.153	0.250
LIV	0.098	0	0.107	0.147	0.187	0.138	0.195	0.122	0.189	0.168	0.186
BLW	0.098	0.062	0	0.242	0.267	0.113	0.112	0.110	0.285	0.064	0.271
MNG	0.171	0.114	0.132	0	0.265	0.146	0.269	0.185	0.246	0.225	0.150
BERK	0.195	0.120	0.135	0.178	0	0.200	0.277	0.113	0.191	0.221	0.224
KEM	0.152	0.088	0.071	0.099	0.125	0	0.179	0.113	0.270	0.151	0.143
LWUK	0.094	0.125	0.086	0.169	0.168	0.116	0	0.178	0.267	0.077	0.238
BBP	0.150	0.080	0.062	0.118	0.088	0.064	0.120	0	0.249	0.132	0.144
DUR	0.189	0.158	0.199	0.208	0.181	0.208	0.222	0.195	0	0.291	0.186
LW	0.111	0.102	0.037	0.162	0.131	0.107	0.083	0.096	0.190	0	0.224
LDR	0.244	0.171	0.190	0.146	0.189	0.140	0.171	0.115	0.222	0.185	0

Примечание. Значения  $D$  показаны над диагональю, значения  $F_{ST}$  – под диагональю при парном сравнении.

Для наглядного представления генетической степени близости исследуемых пород свиней числовые матрицы полученных попарных генетических дистанций  $F_{ST}$  и  $D$  были визуализированы с помощью алгоритма «сети соседей» (Neighbor-Net) (рис. 3). Обособленный массив сформировали группы свиней корня крупной белой по-

роды (CVL, LWUK, LW и BLW) и примыкающие к нему ветви кемеровской и ливенской пород. Отдельной ветвью расположился кластер пород, в создании которых принимали участие свиньи с кровью беркширской породы: BBP, BERK и DUR. Животные пород ландрас и мангалица представлены другим кластером.



**Рис. 3.** Филогенетическая дендрограмма генетических взаимоотношений исследуемых пород свиней, построенная на основе матрицы попарных генетических дистанций  $F_{ST}$  (a) и Jost's  $D$  (б) по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net).

## Заключение

Проведенные нами исследования были направлены на анализ генетического разнообразия и изучение взаимоотношений восьми локальных пород и трех пород импортного происхождения отечественной репродукции. В целом локальные породы превосходили группы свиней импортного происхождения и по аллельному, и по генетическому разнообразию, что, вероятно, объясняется практическим отсутствием программ постоянного улучшения конкретных характеристик, которым подвержены коммерческие породы. С другой стороны, максимальные положительные значения индекса фиксации были детектированы именно в локальных породах (кемеровская и украинская степная белая), что может привести к смещению генетического равновесия в сторону недостатка гетерозигот. Анализ главных компонент, проведенный на основе частот аллелей исследованных пород свиней, позволил охарактеризовать размах вариабельности и проследить главные закономерности популяционно-генетической дифференциации особей изучаемых пород. Полученная информация может служить руководством для стратегий управления и разведения этих пород с целью лучшего их использования и сохранения. Вместе с тем целесообразно дальнейшее исследование свиней локальных и специализированных пород с большим количеством микросателлитов, методом анализа митохондриальной ДНК и однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Будущий генетический прогресс будет зависеть главным образом от наличия достаточных генетических вариаций, и более целостное представление о состоянии генетического разнообразия и структуры пород свиней даст огромные преимущества для всей отрасли свиноводства.

## Список литературы / References

Зиновьева Н.А., Харзинова В.Р., Сизарева Е.И., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Луговой С.И., Тапиha В.А., Гамко Л.Н., Овсенко Е.В., Шавырина К.М., Эрнст Л.К. Оценка вклада различных популяций в генетическое разнообразие свиней корня крупной белой породы. *С.-х. биология*. 2012;6:35-42.  
[Zinovieva N.A., Kharzinova V.R., Sizareva E.I., Gladyr' E.A., Kostyunina O.V., Lugovoi S.I., Tapiha V.A., Gamko L.N., Ovseen-

ko E.V., Shavyrina K.M., Ernst L.K. Evaluation of the contribution of different pig populations to the genetic diversity of the large white breed. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2012;6:35-42. (in Russian)]

Стопковский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domesticированных видов животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):900-915.

[Stolpovsky Yu.A. Population genetics studies underlying preservation of domesticated animal species gene pools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):900-915. (in Russian)]

Харзинова В.Р., Карпушкина Т.В., Денискова Т.Е., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Популяционно-генетическая характеристика свиней породы крупная белая, ландрас и дюрок с использованием микросателлитов. *Зоотехния*. 2018;4:2-7.

[Kharzinova V.R., Karpushkina T.V., Deniskova T.E., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Populational-genetic characterization of White Large, Landrace, and Duroc pig breeds using microsatellites. *Zootekhnika = Zootechnics*. 2018;4:2-7. (in Russian)]

Харзинова В.Р., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Локальные породы свиней: сравнительная характеристика аллелофонда на основе анализа микросателлитов. *Свиноводство*. 2017;1:5-7.

[Kharzinova V.R., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Comparative characterization of the allele pool of local pig breeds based on microsatellite analysis. *Svinovodstvo = Pig Breeding*. 2017;1:5-7. (in Russian)]

Храброва Л.А., Калинкова Л.В., Зайцева М.А. Методические положения по использованию ДНК-анализа лошадей для оценки генетических ресурсов в коневодстве. Дивово, 2011.

[Khrabrova L.A., Kalinkova L.V., Zaitseva M.A. Guidelines for the Use of Horse DNA Analysis for the Assessment of Genetic Resources in Horse Breeding. Дивово, 2011. (in Russian)]

Allendorf F.W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo. Biol.* 1986;5:181-190.

Andras J., Kirk N., Harvell C. Range-wide population genetic structure of *Symbiodinium* associated with the Caribbean sea fan coral, *Gorgonia ventalina*. *Mol. Ecol.* 2011;20:2525-2542. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05115.x.

Caballero A., García-Dorado A. Allelic diversity and its implications for the rate of adaptation. *Genetics*. 2013;195(4):1373-1384. DOI 10.1534/genetics.113.158410.

Charoensook R., Gatphayak K., Brenig B., Knorr C. Genetic diversity analysis of Thai indigenous pig population using microsatellite markers. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2019;32(10):1491-1500. DOI 10.5713/ajas.18.0832.

- da Silva E.C., Dutra W.M., Jr., Ianella P., Filho M.A.G. de Oliveira C.J.P., de Moura Ferreira D.N., Caetano A.R., Paiva S.R. Patterns of genetic diversity of local pig populations in the State of Pernambuco. *R. Braz. Zootec.* 2011;40(8):1691-1699. DOI 10.1590/S1516-35982011000800010.
- Druml T., Salajpal K., Dikic M. Genetic diversity, population structure and subdivision of local Balkan pig breeds in Austria, Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina and its practical value in conservation programs. *Genet. Sel. Evol.* 2012;44:5. DOI 10.1186/1297-9686-44-5.
- Earl D.A., von Holdt B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2012;4:359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Egito A.A., Paiva S.R., Albuquerque M.S., Mariante A.S., Almeida L.D., Castro S.R., Grattapaglia D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genet.* 2007;8:83-97. DOI 10.1186/1471-2156-8-83.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14:2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- FAO: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original Working Group Report. Rome, FAO, 1998.
- Greenbaum G., Templeton A.R., Zarmi Y., Bar-David S. Allelic richness following population founding events – a stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. *PLoS One.* 2014;10(3):e0119663.
- Guastella A.M., Criscione A., Marletta D., Zuccaro A., Chie L., Bordonaro S. Molecular characterization and genetic structure of the Nero Siciliano pig breed. *Genet. Mol. Biol.* 2010;33(4):650-656. DOI 10.1590/S1415-47572010005000075.
- Hopper J.V., McCue K.F., Pratt P.D., Duchesne P., Grosholz E.D., Hufbauer R.A. Into the weeds: matching importation history to genetic consequences and pathways in two widely used biological control agents. *Evol. Appl.* 2018;12(4):1-18. DOI 10.1111/eva.12755.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23(2):254-267. DOI 10.1093/molbev/msj030.
- Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos. Trans. R. Soc. A.* 2016;374(2065):20150202. DOI 10.1098/rsta.2015.0202.
- Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.* 2008;24:1403-1405. DOI 10.1093/bioinformatics/btn129.
- Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 2008;17:4015-4026. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x.
- Jost L., Archer F., Flanagan S., Gaggiotti O., Hoban S., Latch E. Differentiation measures for conservation genetics. *Evol. Appl.* 2018;11(7):1139-1148. DOI 10.1111/eva.12590.
- Kaul R., Singh A., Vijh R.K., Tandia M.S., Beh R. Evaluation of the genetic variability of 13 microsatellite markers in native Indian pigs. *J. Genet.* 2002;80:149-153. DOI 10.1007/BF02717911.
- Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W., Prodöhl P.A. diveRstity: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol. Evol.* 2013;4:782-788. DOI 10.1111/2041-210X.12067.
- Kim T.H., Kim K.S., Choi B.H., Yoon D.H., Jang G.W., Lee K.T., Chung H.Y., Lee H.Y., Park H.S., Lee J.W. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. *J. Anim. Sci.* 2005;83:2255-2263.
- Kramarenko S.S., Lugovoy S.I., Kharzinova V.R., Lykhach V.Y., Kramarenko A.S., Lykhach A.V. Genetic diversity of Ukrainian local pig breeds based on microsatellite markers. *Regul. Mech. Biosyst.* 2018;9(2):177-182. DOI 10.15421/021826.
- Meirmans P.G., Hedrick P.W. Assessing population structure: F(ST) and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 2011;11(1):5-18. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x.
- Muñoz M., Bozzi R., García-Casco J., Núñez Y., Ribani A., Franci O., García F., Škrlep M., Schiavo G., Bovo S., Utzeri V.J., Charneca R., Martins J.M., Quintanilla R., Tibau J., Margeta V., Djurkin-Kučec I., Mercat M.J., Riquet J., Estellé J., Zimmer C., Razmaite V., Araujo J.P., Radović Č., Savić R., Karolyi D., Gallo M., Čandek-Potokar M., Fernández A.I., Fontanesi L., Óvilo C. Genomic diversity, linkage disequilibrium and selection signatures in European local pig breeds assessed with a high density SNP chip. *Sci. Rep.* 2019;9:13546. DOI 10.1038/s41598-019-49830-6.
- Novembre J., Johnson T., Bryc K., Kutalik Z., Boyko A.R. Genes mirror geography within Europe. *Nature.* 2008;456:98-101.
- Patterson N., Price A.L., Reich D. Population structure and Eigen analysis. *PLoS Genet.* 2006;2(12):e190. DOI 10.1371/journal.pgen.0020190.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155:945-959. PMID: 10835412.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2012. Available at <http://www.Rproject.org>
- Reed D.H., Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Biol. Conserv.* 2003;17:230-237.
- Šalamon D., Margeta P., Klišanić V., Menčik S., Karolyi D., Mahnet Ž., Škorput D., Luković Z., Salajpal K. Genetic diversity of the Banija spotted pig breed using microsatellite markers. *J. Centr. Eur. Agric.* 2019;20:36-42.
- Szmatola T., Ropka-Molik K., Tyra M., Piórkowska K., Żukowski K., Oczkiewicz M., Blicharski T. The genetic structure of five pig breeds maintained in Poland. *Ann. Anim. Sci.* 2016;16(4):1019-1027. DOI 10.1515/aoas-2016-0006.
- Szulkin M., Bierne N., David P. Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. *Evolution.* 2010;64:1202-1217.
- Toro M., Fernández J., Caballero A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livest. Sci.* 2009;120:174-195.
- Vonholdt B.M., Stahler D.R., Smith D.W., Earl D.A., Pollinger J.P. The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Mol. Ecol.* 2008;17:252-274.
- Vrtková I., Stehlík L., Putnová L., Kratochvílová L., Falková L. Genetic structure in three breeds of pigs populations using microsatellite markers in the Czech Republic. *Research in Pig Breeding.* 2012;6(2):83-87.
- Wagner A. Robustness and evaluability: a paradox resolved. *Proc. Biol. Sci.* 2008;275:91-100.
- Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 1984;38(6):1358-1370. DOI 10.2307/2408641.
- Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. NY: Springer-Verlag, 2009.
- Yue G.H., Wang G.L. Molecular genetic analysis of the Chinese Erhualian pig breed. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 2003;33(3):159-165.

#### ORCID ID

V.R. Kharzinova [orcid.org/0000-0002-8067-0404](https://orcid.org/0000-0002-8067-0404)  
N.A. Zinovieva [orcid.org/0000-0003-4017-6863](https://orcid.org/0000-0003-4017-6863)

**Благодарности.** Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (AAAA-A18-118021590138-1 по теме 0445-2019-0026).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2020. После доработки 14.09.2020. Принята к публикации 30.09.2020.

## Селекция продуктивности кур влияет на гены иммунной системы

А.М. Бородин<sup>1, 2</sup>, Я.И. Алексеев<sup>3, 4</sup>✉, К.Е. Герасимов<sup>3</sup>, Н.В. Коновалова<sup>3</sup>, Е.В. Терентьева<sup>3</sup>, Д.Н. Ефимов<sup>1, 5</sup>,  
Ж.В. Емануйлова<sup>1</sup>, Л.И. Тучемский<sup>1</sup>, А.А. Комаров<sup>1</sup>, В.И. Фисинин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Селекционно-генетический центр «Смена», д. Березняки, Московская область, Россия

<sup>2</sup> Институт медико-биологических исследований, Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup> ООО «Синтол», Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук, Сергиев Посад, Московская область, Россия

✉ e-mail: jalex@syntol.ru

**Аннотация.** Локусы количественных признаков, связанные с иммунными свойствами кур, представляют интерес с точки зрения получения устойчивых к инфекционным агентам животных при помощи маркер-опосредованной (геномной) селекции. В процессе подбора маркеров для геномной селекции у кур бройлерного типа выявлена нестандартная частота аллеля гена *RACK1* (SNP Gga\_rs15788101) у кур линии Б5 мясного кросса селекции СГЦ «Смена» и возникло предположение о том, что этот ген вовлечен в селекцию. Поэтому было решено исследовать доступные полиморфизмы в трех генах, ответственных за титр IgY (*DMA*, *RACK1* и *CD1B*). Молекулярное типирование однонуклеотидных полиморфизмов трех локусов показало приближение к фиксации неблагоприятных аллелей генов *DMA* (SNP Gga\_rs15788237) и *RACK1* и преобладание благоприятного аллеля гена *CD1B* (SNP Gga\_rs16057130). При анализе гаплотипов выявлено сильное неравновесное сцепление этих генов. Это свидетельствует о том, что данные гены испытывают селекционное давление. Исследование белок-кодирующих последовательностей генов *CD1B* и *DMA* различных пород кур продемонстрировало негативную селекцию этих генов. Для того чтобы понять, является ли фиксация изученных аллелей результатом направленной селекции кур линии Б5 мясного кросса СГЦ «Смена», проведен анализ аналогичных локусов у кур яичной селекции «Хайсекс белый». Частоты аллелей в локусах гена *CD1B* (Gga\_rs16057130) и гена *RACK1* (Gga\_rs15788101) в геноме кур «Хайсекс белый» отличаются от частот аллелей, полученных для кур линии Б5 мясного кросса селекции СГЦ «Смена». Можно предположить, что фиксация аллеля в гене *DMA* (SNP Gga\_rs15788237) связана с искусственным или естественным отбором, единым для кур мясной и яичной селекции. Изменения в локусах Gga\_rs16057130 и Gga\_rs15788101 у кур линии Б5 мясного кросса селекции СГЦ «Смена», скорее всего, связаны с искусственной селекцией признаков продуктивности бройлеров, которая в дальнейшем может привести к фиксации аллелей в этих локусах. Искусственная селекция кур ведет к деградации вариативности генов, кодирующих элементы иммунной системы и, как следствие, уменьшению резистентности к различным заболеваниям. Изучение негативного влияния селекции хозяйственных признаков на иммунитет должно способствовать снижению отрицательных последствий и поиску способов получения резистентных к заболеваниям животных. Ключевые слова: гены иммунной системы кур; фиксация аллелей; негативная селекция.

**Для цитирования:** Бородин А.М., Алексеев Я.И., Герасимов К.Е., Коновалова Н.В., Терентьева Е.В., Ефимов Д.Н., Емануйлова Ж.В., Тучемский Л.И., Комаров А.А., Фисинин В.И. Селекция продуктивности кур влияет на гены иммунной системы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):755-760. DOI 10.18699/VJ20.670

## Chickens productivity selection affects immune system genes

A.M. Borodin<sup>1, 2</sup>, Ya.I. Alekseev<sup>3, 4</sup>✉, K.E. Gerasimov<sup>3</sup>, N.V. Konovalova<sup>3</sup>, E.V. Terentjeva<sup>3</sup>, D.N. Efimov<sup>1, 5</sup>,  
Zh.V. Emanuilova<sup>1</sup>, L.I. Tuchemskiy<sup>1</sup>, A.A. Komarov<sup>1</sup>, V.I. Fisinin<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Breeding and Genetic Center "Smena", Bereznyaki, Moscow Region, Russia

<sup>2</sup> Institute of Medical and Biological Research, Nizhnii Novgorod, Russia

<sup>3</sup> Limited liability company "Syntol", Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of the Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia

✉ e-mail: jalex@syntol.ru

**Abstract.** The quantitative trait loci associated with the immune properties of chickens are of interest from the point of view of obtaining animals resistant to infectious agents using marker-assisted selection. In the process of selecting markers for genomic selection in broiler-type chickens, a non-standard genotype frequency of the *RACK1* gene allele (SNP Gga\_rs15788101) in the B5 line of broiler-type chicken cross Smena 8 was identified and it was suggested that this gene was involved in selection. Therefore, it was decided to investigate the available polymorphisms in the three genes

responsible for the IgY titer (*DMA*, *RACK1* and *CD1B*). Molecular typing of single nucleotide polymorphisms of three loci revealed an approach to fixation of the unfavorable allele of the *DMA* gene (SNP Gga\_rs15788237), an approach to fixation of the unfavorable allele of the *RACK1* gene and the prevalence of the favorable *CD1B* gene allele (SNP Gga\_rs16057130). Analysis of the haplotypes revealed a strong linkage disequilibrium of these genes. This suggests that these genes experience selection pressure. Analysis of the protein-coding sequences of the *CD1B* and *DMA* genes of various breeds of chickens revealed a negative selection of these genes. In order to understand whether the fixation of the studied alleles is the result of artificial selection of the B5 line of the cross Smena 8, an analysis of similar loci in layer chickens Hisex White was carried out. The frequencies of the alleles at the loci of the *CD1B* gene (Gga\_rs16057130) and the *RACK1* gene (Gga\_rs15788101) in the Hisex White chicken genome differ from the frequencies of the alleles obtained for chickens of the B5 line of the cross Smena 8. It can be assumed that the fixation of the allele in the *DMA* gene (SNP Gga\_rs15723) is associated with artificial or natural selection, consistent in broilers and layers. Changes in the loci Gga\_rs16057130 and Gga\_rs15788101 in the B5 line of the Smena 8 chickens are most likely associated with artificial selection of broiler productivity traits, which can subsequently lead to fixation of alleles at these loci. Artificial breeding of chickens leads to degradation of the variability of genes encoding elements of the immune system, which can cause a decrease in resistance to various diseases. The study of the negative impact of selection of economic traits on immunity should provide means to mitigate negative consequences and help find ways to obtain disease-resistant animals. Key words: chickens immune system genes; allele fixation; negative selection.

**For citation:** Borodin A.M., Alekseev Ya.I., Gerasimov K.E., Konovalova N.V., Terentjeva E.V., Efimov D.N., Emanuilova Zh.V., Tuchemskiy L.I., Komarov A.A., Fisinin V.I. Chickens productivity selection affects immune system genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):755-760. DOI 10.18699/VJ20.670

## Введение

Селекция продуктивных признаков кур мясной селекции негативно влияет на устойчивость к инфекционным заболеваниям (Zekarias et al., 2002) и нарушает иммунную компетентность в отношении инфекционных агентов. Устойчивые к инфекциям куры обычно являются плохими продуцентами. Например, устойчивость к вирусу лейкоза у кур яичной селекции имеет обратную корреляцию с выходом яиц. Исключение составляет связь устойчивости к вирусу болезни Марека с повышенной яйценоскостью (Zekarias et al., 2002). В одном из исследований показано, что для кур мясной селекции характерно производство сильного кратковременного гуморального ответа, а для кур яичной селекции – долгосрочного гуморального ответа в сочетании с сильным клеточным ответом (Коенеп et al., 2002). В другой работе показано, что генетическая селекция по улучшению ростовых характеристик бройлеров ведет к уменьшению гуморального иммунного ответа и увеличению клеточного и воспалительного ответа (Cheema et al., 2003). Также представлены данные, свидетельствующие о том, что интенсивная селекция не оказывает негативного влияния на иммунокомпетентность птицы (Emam et al., 2014). В то же время существует гипотеза, согласно которой ресурсы, необходимые для нормального функционирования физиологии иммунитета, направлены на обеспечение продуктивности птицы (Zekarias et al., 2002).

После того как было установлено, что титры антител наследуются генетически, найдены влияющие на это гены (Yonash et al., 2001; Kaiser et al., 2002). Лocusы количественных признаков, связанные с иммунными свойствами у *Gallus gallus*, располагаются на различных хромосомах (Slawinska, Siwek, 2013; Zhang et al., 2015). Полногеномный поиск ассоциаций показал на хромосомах 1, 3, 5, 12 и 16 девять однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в локусах, ассоциированных с общей концентрацией иммуноглобулина Y (IgY) в сыворотке. Пять наиболее значимых из них расположены в узкой области, охватывающей 0.26 Мб хромосомы 16 в локусе MHC-B. Этот locus определяет устойчивость кур к вирусным, бактериальным и пара-

зитарным инфекциям. Вариабельность в локусе MHC-B связана с устойчивостью к различным патогенам (Iglesias et al., 2019). Учитывая, что число гаплотипов в этом локусе в сравнении с дикими предками кур у бройлеров, по данным Н. Nguyen-Phuc и коллег (2016), снижено почти на порядок, разница в резистентности к различным заболеваниям между ними может быть частично объяснена. Гены, лежащие в этой области, могут играть критическую роль в модуляции иммунного ответа (Zhang et al., 2015). Куры вырабатывают IgY, чтобы обеспечить потомству эффективный гуморальный иммунитет против наиболее распространенных патогенов до полного созревания собственной иммунной системы (Dias da Silva, Tambourgi, 2010). В процессе подбора маркеров для проведения геномной селекции у исходных линий кур бройлерного типа «Смена 8» выявлен нестандартный генотип аллелей гена *RACK1* и возникло предположение о его вовлеченности в селекцию. В связи с этим решено исследовать полиморфизмы в трех генах, ответственных за титр IgY.

## Материалы и методы

Для выделения ДНК использовали перо 100 кур породы корниш 79-й генерации линии Б5 мясного кросса бройлерного типа «Смена 8» селекции СГЦ «Смена». В качестве источника ДНК кур яичной селекции применяли перо 48 кур кросса «Хайсекс белый» из СГЦ «Загорское ЭПХ» – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН. ДНК выделяли из очина пера длиной 0.3–0.5 см в соответствии со стандартным протоколом к набору «М-Сорб» (кат. № HG-501, ООО «Синтол», Россия). В полимеразную цепную реакцию добавляли 1.5 мкл выделенной ДНК. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборе «АНК-М» (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Для амплификации ДНК применяли реакционную смесь для ПЦР-РВ (кат. № М-428, ООО «Синтол», Россия). Типирование однонуклеотидных полиморфизмов ДНК кур проводили двумя методами. В первом использовали праймеры, содержащие на 3'-конце модифицированный LNA нуклеозид, комплементарный исследуемому SNP (Latorra et al., 2003). Во втором

**Таблица 1.** Исследуемые SNP: их позиция на хромосоме 16, гены, ответственные за титры IgY, и структуры праймеров и зондов для анализа методом ПЦР-РВ

SNP	Ген	Обозначение	Последовательности праймеров и зондов (5'→3')
Gga_rs16057130 G > A	<i>CD1B</i>	CF	GGATCTGTCCTCCCTTCC
		CR	CTTCCCAAACATCATCTCA
		CDA	(6FAM)TGCT(A-LNA)CACGAGG(BHQ1)
		CDG	(5R6G)TGCT(G-LNA)CACGAGG(BHQ1)
Gga_rs15788237 T > C	<i>DMA</i>	DMF	GGGACACATCAGTGAGGA
		DMR	AATGGACATCCCAACTGA
		DMA	(6FAM)CCCC(A-LNA)ACGATGT(BHQ1)
		DMG	(5R6G)CCCC(G-LNA)ACGATGT(BHQ1)
Gga_rs15788101 A > G	<i>RACK1</i>	RNF	GCAGCAGCCTCAGTCTCAA
		RNR	GAGATAAAGCCCGGTGAGGA
		RT	(6FAM)CTCA(T-LNA)ATCCCGTC(BHQ1)
		RC	(5R6G)CTCA(C-LNA)ATCCCGTC(BHQ1)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 4 жирным шрифтом выделен нуклеотидный вариант, который приводит к увеличенному титру антител IgY.

вводили два разных LNA-нуклеозида в 5'-концевую область зонда для ПЦР-РВ в положение, комплементарное исследуемому SNP. Несовпадение последовательности зонда и мишени сильно дестабилизирует, а совпадение, наоборот, значительно стабилизирует их взаимодействие. Это происходит из-за того, что наличие LNA-модификации значительно меняет термодинамические характеристики проб (You et al., 2006). Использование двух разных каналов детекции сигнала флуоресценции обеспечивает идентификацию SNP в одной пробирке, что повышает производительность анализа и упрощает интерпретацию данных. Последовательности праймеров и зондов для определения соответствующих полиморфизмов приведены в табл. 1.

В зондах в качестве флуоресцентных меток использовали красители 6-карбоксихлорофлуоресцеин (6FAM) и 5-карбоксихлорофлуоресцеин (5R6G), в качестве гасителя флуоресценции – краситель BHQ1. В работе применяли геномный браузер Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) (Zerbino et al., 2018). Анализ неравновесного сцепления проводили при помощи веб-инструмента CubeX (Gaunt et al., 2007) и программы DNASp v.6 (Rozas et al., 2017). Анализ позитивной и негативной селекции вели с использованием программы HyPhy (Kosakovsky Pond, Frost, 2005) веб-сервера Datamonkey (<http://datamonkey.org>). Для этого использованы последовательности GenBank генов *CD1B* (AB268588.1, AY849318.1, NM\_001024582.1, AB204802.1, AY375530.1), *DMA* (AB268588.1, FJ770458.1, NM\_001099353.2, NM545127.1, AB426148.1), *RACK1* (AY393848.1, M24193.1, NM\_001004378.2, CR386189.1, AY694127.1). Анализ нарушений вторичной структуры белков в результате мутаций проводили на сервере DimPred (Disorder inducing mutation prediction, [http://www.iitm.ac.in/bioinfo/DIM\\_Pred/](http://www.iitm.ac.in/bioinfo/DIM_Pred/)) (Anoosha et al., 2015). Моделирование трехмерных структур белков соответствующих генов осуществлялось на веб-сервере SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Waterhouse et al., 2018).

## Результаты и обсуждение

Проведено типирование SNP трех локусов, ответственных за повышенный титр IgY в линии Б5 кур мясного кросса бройлерного типа «Смена 8». Все три SNP локализованы внутри соответствующих генов. Выявлены фиксация аллеля, определяющего меньший титр IgY в локусе Gga\_rs15788237, фиксация неблагоприятного аллеля в локусе Gga\_rs15788101 и преобладание благоприятного аллеля в локусе Gga\_rs16057130 (табл. 2).

**Ген *CD1*.** Белки CD1 представляют собой семейство сходных с белками MHC-класса I гликопротеинов, которые экспонируют чужеродные и собственные антигены для распознавания Т-клетками (Barral, Brenner, 2007). Анализ соотношения синонимичных (dS) и несинонимичных (dN) мутаций в 5'-кодирующих последовательностях гена *CD1* с помощью программы HyPhy у кур, имеющих различное происхождение, показал наличие негативной селекции в двух сайтах. В гене есть два участка с заменой кодонов, приводящих к замене аминокислот (табл. 3). Если замена неполярного валина на аланин может не отражаться на структуре и функции белка, то замена полярного серина на неполярный глицин может менять как структуру белка, так и его взаимодействие с лигандами. Анализ обеих мутаций на DIM-Pred-сервере продемонстрировал их деструктивное влияние на вторичную структуру белка. Аллельный вариант, кодирующий глицин, оказался сцеплен с благоприятным аллелем SNP Gga\_rs16057130. Моделирование трехмерной структуры белка не показало видимых изменений в случае взаимных замен.

**Ген *DMA*** кодирует альфа-цепь гликопротеина, являющегося рецептором, который экспонирует чужеродные антигены специализированным Т-клеткам (Chazara et al., 2011). Анализ соотношения dN/dS гена позволил предположить один сайт негативной селекции, локализованный в этом гене (см. табл. 3). Замена Ser27Leu не нарушает вторичную структуру белка, но, вероятно, может влиять на взаимодействие с окружением и лигандами. Если сайт негативной селекции действительно присутствует в гене

**Таблица 2.** Распределение генотипов и аллелей у кур линии Б5 мясного кросса селекции СГЦ «Смена» ( $n = 100$ )

SNP	Ген	Генотип	Частота аллелей
Gga_rs16057130 G > A(1)	<i>CD1B</i>	GG = 0.09, AA = 0.47, GA = 0.44	G = 0.31, A = 0.69
Gga_rs15788237 T > C	<i>DMA</i>	TT = 0.92, CC = 0.00, TC = 0.08	T = 0.96, C = 0.04
Gga_rs15788101 A > G	<i>RACK1</i>	AA = 0.87, GG = 0.00, AG = 0.13	A = 0.935, G = 0.065

**Таблица 3.** Нуклеотидные замены в генах *CD1B* и *DMA*, приводящие к аминокислотным заменам

Ген	Нуклеотидная замена	Кодон	Аминокислотная замена
<i>CD1B</i>	T > C	GTG > GCG	Val202Ala
<i>CD1B</i>	G > A	GGC > AGC	Gly283Ser
<i>DMA</i>	CA > TG	TCA > TTG	Ser27Leu

*DMA*, возникает вопрос, почему при этом наблюдается преобладание неблагоприятного аллеля для титра IgY. Возможно, имеет место случай балансирующей селекции, когда изначально, как может показаться, селекция позитивная, а затем, если частота аллеля становится высокой, отрицательная. Фиксация аллеля в этом случае не достигается никогда, а аллели невозможно рассматривать как благоприятные или неблагоприятные (Hurst, 2009). Тем не менее вопрос остается открытым.

Ген *RACK1* кодирует субъединицу рецептора активированной киназы С1. При анализе соотношения dN/dS гена не выявлено признаков селекции, определяемой кодируемой частью гена. Это неудивительно, поскольку белок является очень консервативным и демонстрирует 100 % сходство с соответствующим белком человека. Предположительная причина селекции гена *RACK1* не установлена. Она может быть обусловлена как кодирующими участками, так и регуляторными областями в кодирующих и некодирующих областях (Chen, Blanchette, 2007; Koonin, Wolf, 2010). Структурная консервативность сама по себе может быть сильным селекционным фактором (Drake et al., 2006; Katzman et al., 2007), кроме того, возможно существование нескольких факторов.

Эффект фиксации аллелей с образованием протяженных областей гомозиготности (runs of homozygosity) в ответ на воздействие окружающей среды или искусственной селекции признаков продуктивности у кур выявлен недавно (Rubin et al., 2010; Fleming et al., 2016). Эти участки имеют среднюю длину 3 млн пар оснований и содержат определенное количество сцепленных SNP в гомозиготном состоянии (McQuillan et al., 2008; Keller et al., 2011; Hedrick, Garcia-Dorado, 2016). Поиск таких участков позволяет определить районы генома и гены, вовлеченные в естественный и искусственный отбор. У кур адаптация

**Таблица 4.** Распределение частот генотипов и аллелей в районе генома, несущего гены иммунитета, у кур яичной селекции «Хайсекс белый» ( $n = 48$ )

SNP	Ген	Генотип	Частота аллелей
Gga_rs16057130 G > A	<i>CD1B</i>	GG = 0.21, AA = 0.35, GA = 0.44	G = 0.43, A = 0.57
Gga_rs15788237 T > C	<i>DMA</i>	TT = 0.92, CC = 0.00, TC = 0.08	T = 0.96, C = 0.04
Gga_rs15788101 A > G	<i>RACK1</i>	AA = 0.25, GG = 0.06, AG = 0.69	A = 0.59, G = 0.41

к традиционным условиям производства в тропической среде ведет к естественному отбору животных с благоприятными генотипами с последовательным увеличением частоты соответствующих аллелей в следующих поколениях и затрагивает гены гомеостаза и иммунной системы (Marchesi et al., 2018). Для того чтобы понять, является ли фиксация изученных аллелей результатом направленной селекции кур мясного кросса СГЦ «Смена», проведен анализ аналогичных локусов у кур яичной селекции «Хайсекс белый» (табл. 4).

Аналогично результатам, полученным для генома кур «Смена 8», у кур яичного кросса «Хайсекс белый» отмечается фиксация аллеля в локусе Gga\_rs15788237. Однако частоты аллелей в локусах Gga\_rs16057130 и Gga\_rs15788101 в геноме кур «Хайсекс белый» отличаются от частот аллелей, полученных для линии Б5 кур «Смена 8».

Исходя из полученных данных, можно предположить, что фиксация аллеля в гене *DMA* связана с искусственным или естественным отбором, единым для кур мясной и яичной селекции. Изменения в локусах Gga\_rs16057130 и Gga\_rs15788101 у кур линии Б5 мясного кросса селекции СГЦ «Смена», скорее всего, связаны с искусственной селекцией признаков продуктивности, характерных для бройлеров, которая в дальнейшем может привести к полной фиксации аллелей в этих локусах. В процессе фиксации аллелей может быть задействован так называемый генетический автостоп (genetic hitchhiking), или попутная селекция, когда аллель меняет частоту не потому, что находится под отбором, а потому что находится рядом с геном, который подвергается отбору (Smith, Haigh, 1974; Futuyma, 2013). При этом свою частоту может увеличивать как благоприятный, так и неблагоприятный аллель соседнего гена.

Таким образом, установлена возможность влияния искусственной селекции хозяйственных признаков на иммунную систему кур. Накапливается все больше данных о таком влиянии. Эффект возможного взаимодействия признаков продуктивности и адаптивного иммунитета изучен в работе J.J. Li и коллег (2017). Типирование антивиральных генов врожденного иммунитета *IFIH1* и *IFIT5* показало взаимодействие между признаками продуктивности кур и иммунной системы. Авторы также предполагают, что искусственный отбор коммерческих признаков может привести к пассивному отбору иммунных признаков.

В другом исследовании по идентификации участков искусственной селекции у кур (Ma et al., 2018) обнаружено два гена иммунитета: ген, кодирующий посредник апоптоза, *BCL2L14* и ген *CDH13*, кодирующий белок, участвующий в устойчивости к инфекции *Campylobacter jejuni*. Ресеквенирование генома бойцовых кур (Guo et al., 2016) продемонстрировало множество генов иммунитета, которые были вовлечены в селекцию. Авторы всех перечисленных работ сообщают о вовлечении в селекцию генов, напрямую не связанных с признаками продуктивности.

В перечисленных выше работах не изучали, ведется ли отбор благоприятных или неблагоприятных аллелей генов. О возможности отбора неблагоприятных аллелей известно давно. Как искусственный, так и естественный отбор увеличивает частоту редких рецессивных аллелей, которые негативно влияют на жизнеспособность (Hocking, 2014). Примером таких проявлений являются заболевания скелета и мышц у растущих цыплят и множественная овуляция у взрослых родителей бройлеров (Hocking, 2014). Соответствующие гены этих заболеваний, скорее всего, присутствовали в исходных линиях. К другим негативным проявлениям искусственной селекции относят сниженную устойчивость к инфекционным заболеваниям, легочную гипертензию, остеопороз, которые могут являться результатом негативного плейотропного эффекта генов или попутной селекции (генетического автостопа) (Elferink et al., 2012). Ярким примером неожиданных проявлений отбора является 22 % увеличение массы тела кур от скрещивания кур линий белый леггорн, длительно отбирившихся для продукции яиц, содержащих два желтка (Abplanalp et al., 1977). Все это говорит о том, что при селекции затрагивается множество генов. В исследованных в работе генах обнаружена селекция двух неблагоприятных и одного благоприятного аллеля одного признака. Однако неблагоприятные аллели могут иметь преимущества в контексте искусственной селекции. Прогноз неблагоприятности аллеля опирается на варианты, которые значительно влияют на фенотип и являются неустойчивыми в дикой природе, в искусственных условиях они могут быть вполне жизнеспособными (Hedrick, Garcia-Dorado, 2016; Bosse et al., 2018).

## Заключение

Искусственная селекция кур ведет к деградации вариативности генов, кодирующих элементы иммунной системы. Следствием этого может быть уменьшение резистентности к различным заболеваниям. Изучение негативного влияния селекции хозяйственных признаков на иммунитет должно способствовать снижению отрицательных последствий и поиску способов получения резистентных к заболеваниям животных.

## Список литературы / References

Abplanalp H., Lowry D.C., Van Middelkoop J.H. Selection for increased incidence of double-yolked egg in white leghorn chickens. *Br. Poult. Sci.* 1977;18(5):585-595. DOI 10.1080/00071667708416407.  
Anoosha P., Sakthivel R., Gromiha M.M. Prediction of protein disorder on amino acid substitutions. *Anal. Biochem.* 2015;491:18-22. DOI 10.1016/j.ab.2015.08.028.  
Barral D.C., Brenner M.B. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7(12):929-941. DOI 10.1038/nri2191.

Bosse M., Megens H.J., Derks M.F.L., de Cara Á.M.R., Groenen M.A.M. Deleterious alleles in the context of domestication, inbreeding, and selection. *Evol. Appl.* 2018;12(1):6-17. DOI 10.1111/eva.12691.  
Chazara O., Tixier-Boichard M., Morin V., Zoorob R., Bed'hom B. Organisation and diversity of the class II DM region of the chicken MHC. *Mol. Immunol.* 2011;48(9-10):1263-1271. DOI 10.1016/j.molimm.2011.03.009.  
Cheema M.A., Qureshi M.A., Havenstein G.B. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.* 2003;82(10):1519-1529. DOI 10.1093/ps/82.10.1519.  
Chen H., Blanchette M. Detecting non-coding selective pressure in coding regions. *BMC Evol. Biol.* 2007;7(Suppl 1):S9. DOI 10.1186/1471-2148-7-S1-S9.  
Dias da Silva W., Tambourgi D.V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010;135(3-4):173-180. DOI 10.1016/j.vetimm.2009.12.011.  
Drake J.A., Bird C., Nemesh J., Thomas D.J., Newton-Cheh C., Raymond A., Excoffier L., Attar H., Antonarakis S.E., Dermitzakis E.T., Hirschhorn J.N. Conserved noncoding sequences are selectively constrained and not mutation cold spots. *Nat. Genet.* 2006;38(2):223-227. DOI 10.1038/ng1710.  
Elferink M.G., Megens H.J., Vereijken A., Hu X., Crooijmans R.P., Groenen M.A. Signatures of selection in the genomes of commercial and non-commercial chicken breeds. *PLoS One.* 2012;7(2):e32720. DOI 10.1371/journal.pone.0032720.  
Emam M., Mehrabani-Yeganeh H., Barjesteh N., Nikbakht G., Thompson-Crispi K., Charkhkar S., Mallard B. The influence of genetic background versus commercial breeding programs on chicken immunocompetence. *Poult. Sci.* 2014;93(1):77-84. DOI 10.3382/ps.2013-03475.  
Fleming D.S., Koltes J.E., Markey A.D., Schmidt C.J., Ashwell C.M., Rothschild M.F., Persia M.E., Reecy J.M., Lamont S.L. Genomic analysis of Ugandan and Rwandan chicken ecotypes using a 600 K genotyping array. *BMC Genom.* 2016;17:407. DOI 10.1186/s12864-016-2711-5.  
Futuyma D.J. Evolution: Third Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2013. 656 p.  
Gaunt T.R., Rodrigues S., Day I.N. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinform.* 2007;8:428. DOI 10.1186/1471-2105-8-428.  
Guo X., Fang Q., Ma C., Zhou B., Wan Y., Jiang R. Whole-genome resequencing of Xishuangbanna fighting chicken to identify signatures of selection. *Genet. Sel. Evol.* 2016;48(1):62. DOI 10.1186/s12711-016-0239-4.  
Hedrick P.W., Garcia-Dorado A. Understanding Inbreeding Depression, Purging, and Genetic Rescue. *Trends Ecol. Evol.* 2016;31(12):940-952. DOI 10.1016/j.tree.2016.09.005.  
Hocking P.M. Unexpected consequences of genetic selection in broilers and turkeys: problems and solutions. *Br. Poult. Sci.* 2014;55(1):1-12. DOI 10.1080/00071668.2014.877692.  
Hurst L.D. Fundamental concepts in genetics: genetics and the understanding of selection. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10(2):83-93. DOI 10.1038/nrg2506.  
Iglesias G.M., Canet Z.E., Cantaro H., Miquel M.C., Melo J.E., Miller M.M., Berres M.E., Fulton J.E. Mhc-B haplotypes in "Campero-Inta" chicken synthetic line. *Poult. Sci.* 2019;98(11):5281-5286. DOI 10.3382/ps/pez431.  
Kaiser M.G., Deeb N., Lamont S.J. Microsatellite markers linked to *Salmonella enterica* serovar enteritidis vaccine response in young F1 broiler-cross chicks. *Poult. Sci.* 2002;81(2):193-201. DOI 10.1093/ps/81.2.193.  
Katzman S., Kern A.D., Bejerano G., Fewell G., Fulton L., Wilson R.K., Salama S.R., Haussler D. Human genome ultraconserved elements

- are ultraselected. *Science*. 2007;317(5840):915. DOI 10.1126/science.1142430.
- Keller M.C., Visscher P.M., Goddard M.E. Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense single nucleotide polymorphism data. *Genetics*. 2011;189(1):237-249. DOI 10.1534/genetics.111.130922.
- Koenin M.E., Boonstra-Blom A.G., Jeurissen S.H. Immunological differences between layer and broiler type chickens. *Vet. Immunol. Immunophatol.* 2002;89(1-2):47-56. DOI 10.1016/S0165-2427(02)00169-1.
- Koonin E.V., Wolf Y.I. Constraints and plasticity in genome and molecular-phenome evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2010;11(7):487-498. DOI 10.1038/nrg2810.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 2005;22(5):1208-1222. DOI 10.1093/molbev/msi105.
- Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum. Mutat.* 2003;22(1):79-85. DOI 10.1002/humu.10228.
- Li J.J., Wang Y., Yang C.W., Ran J.S., Jiang X.S., Du H.R., Hu Y.D., Liu Y.P. Genotypes of IFIH1 and IFIT5 in seven chicken breeds indicated artificial selection for commercial traits influenced antiviral genes. *Infect. Genet. Evol.* 2017;56:54-61. DOI 10.1016/j.meegid.2017.10.019.
- Ma Y., Gu L., Yang L., Sun C., Xie S., Fang C., Gong Y., Li S. Identifying artificial selection signals in the chicken genome. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196215. DOI 10.1371/journal.pone.0196215.
- Marchesi J.A.P., Buzanskas M.E., Cantão M.E., Ibelli A.M.G., Peixoto J.O., Joaquim L.B., Moreira G.C.M., Godoy T.F., Sbardella A.P., Figueiredo E.A.P., Coutinho L.L., Munari DP., Ledur M.C. Relationship of runs of homozygosity with adaptive and production traits in a paternal broiler line. *Animal*. 2018;12(6):1126-1134. DOI 10.1017/S1751731117002671.
- McQuillan R., Leutenegger A.L., Abdel-Rahman R., Franklin C.S., Pericic M., Barac-Lauc L., Smolej-Narancic N., Janicijevic B., Polasek O., Tenesa A., Macleod A.K., Farrington S.M., Rudan P., Hayward C., Vitart V., Rudan I., Wild S.H., Dunlop M.G., Wright A.F., Campbell H., Wilson J.F. Runs of Homozygosity in European Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;83(3):359-372. DOI 10.1016/j.ajhg.2008.08.007.
- Nguyen-Phuc H., Fulton J.E., Berres M.E. Genetic variation of major histocompatibility complex (MHC) in wild Red Junglefowl (*Gallus gallus*). *Poult. Sci.* 2016;95(2):400-411. DOI 10.3382/ps/pev364.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34(12):3299-3302. DOI 10.1093/molbev/msx248.
- Rubin C.-J., Zody M.C., Eriksson J., Meadows J.R., Sherwood E., Webster M.T., Jiang L., Ingman M., Sharpe T., Ka S., Hallböök F., Besnier F., Carlborg Ö., Bed'hom B., Tixier-Boichard M., Jensen P., Siegel P., Lindblad-Toh K., Andersson L. Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature*. 2010;464(7288):587-591. DOI 10.1038/nature08832.
- Slawinska A., Siwek M. Meta - and combined - QTL analysis of different experiments on immune traits in chickens. *J. Appl. Genet.* 2013; 54(4):483-7. DOI 10.1007/s13353-013-0177-6.
- Smith J.M., Haigh J. The hitch-hiking effect of a favorable gene. *Genet. Res.* 1974;23(1):23-35. DOI 10.1017/S0016672308009579.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. DOI 10.1093/nar/gky427.
- Yonash N., Cheng H.H., Hillel J., Heller D.E., Cahaner A. DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. *Poult. Sci.* 2001;80(1):22-28. DOI 10.1093/ps/80.1.22.
- You Y., Moreira B.G., Behlke M.A., Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(8):e60. DOI 10.1093/nar/gkl175.
- Zekarias B., Ter Huurne A.A., Landman W.J., Rebel J.M., Pol J.M., Gruys E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet. Res.* 2002;33(2):109-125. DOI 10.1051/vetres:2002001.
- Zerbino D.R., Achuthan P., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Bhai J., Billis K., Cummins C., Gall A., Girón C.G., Gil L., Gordon L., Haggerty L., Haskell E., Hourlier T., Izuogu O.G., Janacek S.H., Juettemann T., To J.K., Laird M.R., Lavidas I., Liu Z., Loveland J.E., Maurel T., McLaren W., Moore B., Mudge J., Murphy D.N., Newman V., Nuhn M., Ogeh D., Ong C.K., Parker A., Patricio M., Riat H.S., Schuilenburg H., Sheppard D., Sparrow H., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Walts B., Zadissa A., Frankish A., Hunt S.E., Kostadima M., Langridge N., Martin F.J., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Staines D.M., Trevanion S.J., Aken B.L., Cunningham F., Yates A., Flicek P. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D754-D761. DOI 10.1093/nar/gkx1098.
- Zhang L., Li P., Liu R., Zheng M., Sun Y., Wu D., Hu Y., Wen J., Zhao G. The identification of loci for immune traits in chickens using a genome-wide association study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0117269. DOI 10.1371/journal.pone.0117269.

#### ORCID ID

A.M. Borodin orcid.org/0000-0002-1478-1261  
Ya.I. Alekseev orcid.org/0000-0002-1696-7684  
K.E. Gerasimov orcid.org/0000-0003-3945-4969  
N.V. Konovalova orcid.org/0000-0003-4316-1077  
E.V. Terentjeva orcid.org/0000-0003-2777-0948

D.N. Efimov orcid.org/0000-0002-4152-2476  
Zh.V. Emanuilova orcid.org/0000-0002-8855-2947  
L.I. Tuchemskiy orcid.org/0000-0002-6951-2843  
A.A. Komarov orcid.org/0000-0002-1026-7513  
V.I. Fisinin orcid.org/0000-0003-0081-6336

**Благодарности.** Работа выполнена по государственному заданию ФГБУ Селекционно-генетический центр «Смена» № 075-01297-20-00 от 18.12.2019.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.03.2020. После доработки 31.08.2020. Принята к публикации 02.09.2020.

# Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок

М.В. Анисимова<sup>1</sup>, Я. Гон<sup>2</sup>, Н.С. Юдин<sup>1</sup> , Ю.М. Мошкин<sup>1</sup>, Л.А. Герлинская<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) занимают все более заметное место в репродуктологии. Кроме того, в развитых странах ВРТ обеспечивают воспроизводство более 50 % крупного рогатого скота, а в коллекциях генетических линий лабораторных животных являются неотъемлемым компонентом криоархивирования и редеривации. Процедуры ВРТ включают развитие ранних эмбрионов вне материнского организма и высокую вероятность неполной синхронизации физиологического состояния суррогатной матери и пересаживаемых эмбрионов. Поскольку все это происходит на стадии наибольшей восприимчивости зародышей к эпигенетическому перепрограммированию, то полный цикл ВРТ и его отдельные составляющие могут приводить к устойчивым фенотипическим изменениям потомков. Данное влияние подтверждают исследования морфофункциональных характеристик половозрелых потомков мышей аутбредной линии CD1, полученных с использованием разных вариантов трансплантации ранних эмбрионов. Сравнительные исследования массы и состава тела, базального уровня глюкозы и реакции на глюкозную нагрузку (глюкозотолерантный тест) выполнены на половозрелых самцах и самках, потомках матерей, не подвергавшихся экспериментальным воздействиям в период беременности (группа контроля); двухклеточных эмбрионах, вымытых у беременных самок, после инкубирования до стадии бластоцист и пересаженных суррогатным матерям (группа 2 кл. – бл.); при пересадках двухклеточных эмбрионов (группа 2 кл. – 2 кл.) и бластоцист (группа бл. – бл.) сразу после вымывания. Во всех экспериментах эмбрионы пересаживали вынашивающим самкам той же линии. Установлено, что половозрелые потомки, полученные при всех вариантах пересадок, характеризуются большим по сравнению с контрольными особями относительным содержанием жира и, соответственно, меньшей тощей массой тела. Этот эффект был выражен сильнее у самок, чем у самцов. В отличие от состава тела пересадки эмбрионов в большей степени влияли на базальную концентрацию глюкозы и показатели глюкозотолерантного теста у самцов, чем у самок. При этом потомки групп 2 кл. – 2 кл. и 2 кл. – бл. характеризовались более высокой толерантностью к нагрузке глюкозой по сравнению с контрольной группой и группой бл. – бл. Устойчивые отклонения состава тела и показателей гомеостаза глюкозы, выявленные у потомков при разных вариантах эмбриотрансплантации, свидетельствуют о фенотипической значимости процедур, используемых при вспомогательных репродуктивных технологиях. Ключевые слова: пересадки эмбрионов; половозрелые потомки; метаболический фенотип; состав тела; глюкозотолерантный тест.

**Для цитирования:** Анисимова М.В., Гон Я., Юдин Н.С., Мошкин Ю.М., Герлинская Л.А. Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):761-769. DOI 10.18699/VJ20.671

## Metabolic phenotype of adult mice offspring obtained from different variants of embryo transfer

M.V. Anisimova<sup>1</sup>, Ya. Gong<sup>2</sup>, N.S. Yudin<sup>1</sup> , Yu.M. Moshkin<sup>1</sup>, L.A. Gerlinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Assisted reproductive technologies (ART) increasingly occupy the study of human reproduction. In addition, in developed countries they contribute to breeding of more than 50 % of cattle. In the management of collections of genetic lines of laboratory animals, these technologies are obligatory components of cryopreservation and redervation. ART procedures include the development of early embryos outside the mother's body and the high probability of incomplete synchronization of the physiological state of the surrogate mother and transplanted embryos. Since all this occurs at the stage of the highest susceptibility of embryos to epigenetic reprogramming, the full cycle of ART and its individual components can lead to stable phenotypic changes in the offspring. Their reality is confirmed by studies of the morphological and functional characteristics of sexually mature offspring of CD1 outbred mice, obtained using

different variants of early embryo transplantation. Comparative studies of body mass and body composition, basal glucose level and response to glucose load (glucose-tolerance test – GTT) have been done on sexually mature males and females. Animals were separated in 4 groups according to the variant of embryo transplantation: group (control) – natural mating; group (2cl-bl) – incubation of 2-cell up to blastocysts; group (2cl-2cl) – removal and transplantation of the 2-cell embryo without incubation; group (bl-bl) removal and transplantation of the blastocysts without incubation. All embryos were transplanted to recipient females of the same line. It was found that sexually mature offspring obtained with all variants of transplantations had a higher relative fat content and, correspondingly, lower lean mass compared to the control. This effect was more pronounced in females than in males. Unlike body compositions, embryo transplantations had a greater effect on basal glucose concentration and GTT in males than in females. In this case, the offspring of the 2cl-2cl and 2cl-bl groups were characterized by a higher tolerance to glucose load (GTT) compared with the control and the bl-bl group. Stable deviations of body compositions and glucose homeostasis indices detected in experimental groups of progenies indicate the phenotypic significance of the embryo transplantations per se.

Key words: embryo transfer; mature offspring; metabolic phenotype; body composition; glucose tolerance test.

**For citation:** Anisimova M.V., Gong Ya., Yudin N.S., Moshkin Yu.M., Gerlinskaya L.A. Metabolic phenotype of adult mice offspring obtained from different variants of embryo transfer. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):761-769. DOI 10.18699/VJ20.671 (in Russian)

## Введение

В мире более 45 млн брачных пар сталкиваются с бесплодием. Преодолеть эту проблему помогают вспомогательные репродуктивные технологии: экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и внутриклеточная инъекция сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection – ИКСИ). Со времени первого успешного применения ВРТ в клинической практике (1978 г.) число детей, рожденных с помощью ЭКО, возросло до 7 млн во всем мире. Сегодня в развитых странах ~1 % детей рождаются методом ЭКО (International Committee..., 2012). Большинство этих детей относят к категории здоровых (Davies et al., 2012), хотя в некоторых исследованиях отмечаются потенциальные риски патологий беременности и новорожденных (Templeton, 2000; Hansen et al., 2013). При проведении ЭКО повышается риск осложнений беременности (Romundstad et al., 2008; Esh-Broder et al., 2011; Chen et al., 2015), среди которых аномальный рост плаценты, перинатальная смертность, преждевременные роды и низкий вес при рождении (Helmerhorst et al., 2004; Ceelen et al., 2008; Rinaudo, Lamb, 2008; Naavaldsen et al., 2012). Дети, зачатые с помощью ЭКО, в подростковом возрасте демонстрируют статистически значимые различия в динамике роста (Ceelen et al., 2009), отложении жира (Ceelen et al., 2007), уровнях артериального давления и концентрации глюкозы в крови (Ceelen et al., 2008).

При использовании ЭКО у лабораторных животных и крупного рогатого скота наблюдается внутриутробное ограничение роста на ранних сроках беременности, за которым следуют ускоренные темпы развития плода от средней до поздней беременности, что коррелирует с увеличением роста плаценты. Исследования на коровах и овцах дополнительно показывают, что потомки, полученные методом ЭКО, демонстрируют уникальный фенотип, так называемый синдром крупного потомства (Young et al., 1998; Sinclair et al., 2000; Farin et al., 2006).

Успешность преимплантационного развития обеспечивается строго скоординированными физиологическими и эпигенетическими трансформациями в период развития от зиготы до бластоцисты. Поддержка здоровой беременности обеспечивается многочисленными материнскими факторами, контролируемыми процессами созревания га-

мет, оплодотворение, доимплантационное развитие и имплантацию бластоцист. Согласно гипотезе Бакера, неблагоприятные условия материнской среды играют ведущую роль в развитии отклонений в период внутриутробного развития и, как следствие, формировании физиологического и метаболического фенотипа новорожденных, ассоциированного с увеличением риска хронических заболеваний во взрослом возрасте (Barker, 2007). Метаболические потребности развивающегося эмбриона зависят от стадии клеточного деления и удовлетворяются за счет гуморального состава внутриматочной среды, включая питательные вещества и факторы роста, которая меняется по мере того, как эмбрион перемещается из яйцевода в матку (Leese, 2012). Важно отметить, что динамичность гуморального окружения практически отсутствует при культивировании эмбрионов *in vitro*.

Риски долговременных неблагоприятных последствий процедур ЭКО зависят от многих переменных, таких как качество и способ получения ооцитов; метод фертилизации *in vitro* (ЭКО/ИКСИ); состав культуральной среды; физические факторы окружающей среды ( $CO_2/O_2$ , температура, влажность); продолжительность развития в условиях *in vitro*. Кроме того, на беременность и онтогенез влияет синхронизация степени развития эмбрионов и морфофункционального состояния организма вынашивающей матери. Плодово-материнская синхронизация во многом зависит от стадии эмбриогенеза и трансплантации зародышей в яйцевод или матку.

В данной работе показаны долговременные последствия инкубирования *in vitro* двухклеточных эмбрионов до стадии бластоцист и пересадок либо двухклеточных эмбрионов в яйцевод, либо бластоцист в матку на метаболический фенотип взрослых потомков. Эти варианты пересадок моделируют ВРТ при: а) редеривации и криоархивировании двухклеточных эмбрионов с последующей пересадкой в яйцевод; б) размножении сельскохозяйственных животных на основе криоархивированных бластоцист; в) выполнении ЭКО или ИКСИ в клинической практике, которые включают оплодотворение *in vitro*, инкубирование до стадии бластоцисты и пересадку суррогатной матери. Результаты показали, что все варианты пересадок влияют на метаболический фенотип половозрелых по-

томков, что проявляется в статистически значимых изменениях состава тела и толерантности к глюкозе. Кроме того, это исследование подтвердило важность использования зачатых *in vivo* эмбрионов с последующей пересадкой суррогатным реципиентам в качестве надлежащих контролей для дальнейшего изучения долговременных фенотипических эффектов экстракорпорального оплодотворения.

## Материалы и методы

### Условия содержания и животные

Исследование выполнено в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Мышей аутбредной линии CD1 содержали в контролируемых условиях среды: фотопериод 14С:10Т, при температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные березовые гранулы (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм (SNIFF, Германия) и воду давали без ограничений. Корм и подстилку предоставляли животным после автоклавирования (121 °С). Протокол эксперимента одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

### Группы животных

Исследования выполнены на потомках обоего пола линии CD1 в возрасте 3–12 нед., полученных с использованием методов ВРТ. В соответствии с методом получения исследованные животные разделены на четыре группы:

- 1) потомки матерей, не подвергавшихся экспериментальным воздействиям в период беременности (контроль). Животных исследовали в возрасте 3 ( $n = 113$ ), 7 ( $n = 113$ ), 10 ( $n = 111$ ) и 12 ( $n = 16$ ) нед.;
- 2) потомки, полученные после культивирования *in vitro* двухклеточных эмбрионов до стадии бластоцист и пересадки самкам-реципиентам (2 кл. – бл.). Животных исследовали в возрасте 3 ( $n = 23$ ), 7 ( $n = 23$ ), 10 ( $n = 19$ ) и 12 ( $n = 16$ ) нед.;
- 3) потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии бластоцисты и пересадки самкам-реципиентам (Бл. – бл.). Животных исследовали в возрасте 3 ( $n = 30$ ), 7 ( $n = 19$ ), 10 ( $n = 19$ ) и 12 ( $n = 16$ ) нед.;
- 4) потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии двух клеток и пересадки самкам-реципиентам (2 кл. – 2 кл.). Животных исследовали в возрасте 3 ( $n = 27$ ), 7 ( $n = 27$ ), 10 ( $n = 27$ ) и 12 ( $n = 16$ ) нед.

### Экспериментальные процедуры

**Вазэктомия самцов.** Самцам в возрасте 8–10 нед. производили вазэктомию путем пережигания семявыносящих канальцев. Процедура проводилась под общей анестезией (домитор 15 мг/100 г веса мыши, золетил 3 мг/100 г веса мыши).

**Подготовка самок-доноров эмбрионов.** Для стимуляции овуляции проводили процедуру суперовуляции самок, которую выполняли в два этапа. На первом этапе самкам за 2 ч до выключения света (18:00 по местному времени) вводили внутривенно по 5 IU гонадотропина сывотки жеребых кобыл (PMSG) (Intervet International B.V.,

Нидерланды). На втором этапе, через 48 ч после введения PMSG, этим же самкам внутривенно вводили по 5 IU человеческого хорионического гонадотропина (hCG) (Intervet International B.V., Нидерланды). Сразу после введения hCG самок по одной подсаживали к фертильным самцам той же линии и утром следующего дня самок проверяли на наличие вагинальных пробок. Через 24 ч после обнаружения вагинальной пробки извлекали яйцеводы и с помощью шприца вымывали двухклеточные эмбрионы. Через 3 сут выделяли матки, из которых вымывали бластоцисты. Вымытые эмбрионы помещали в каплю среды HTF (human tubal fluid). Эмбрионы с нормальной морфологией переносили в заранее подготовленную каплю среды KSOM, покрытую минеральным маслом, и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С) до трансплантации эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам.

**Индукция псевдобеременности у самок-реципиентов эмбрионов.** Перед выключением света в комнате содержания животных (17:00) в клетку с изолированно содержащимся вазэктомизированным самцом подсаживали трех самок. Утром следующего дня самок проверяли на наличие вагинальных пробок. Самок с вагинальными пробками отсаживали в отдельные клетки.

**Культивирование эмбрионов.** Часть двухклеточных эмбрионов, полученных описанным выше методом, в течение 3 дней инкубировали в культуральной среде KSOM AA при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °С. Бластоцисты без морфологических дефектов пересаживали самкам-реципиентам.

**Пересадки эмбрионов.** Самок-реципиентов двухклеточных эмбрионов (12 ч после подсадки самок к вазэктомизированному самцу) и бластоцист (3–3.5 сут после подсадки самок к вазэктомизированному самцу) усыпляли при помощи ингаляционного наркоза – изофлурана (Baxter, США). Наркотизированным самкам подсаживали двухклеточные эмбрионы через воронку в яйцевод, а бластоцисты – в матку через надрез со стороны спины. После подсадки 8–10 эмбрионов самок отсаживали в индивидуальные клетки и содержали одиночно на протяжении беременности и выкармливания.

### Исследование потомков

**Взвешивание потомков.** Потомков взвешивали в возрасте 3 (при отъеме от матерей), 7 и 10 нед.

**Определение состава тела.** Измерения общего жира и тощей массы проводили половозрелым потомкам в возрасте 7 и 10 нед. при помощи низкопольного магнитно-резонансного томографа (EchoMRI, США).

**Глюкозотолерантный тест.** Толерантность к глюкозе исследовали у потомков в возрасте 11–12 нед. За 16 ч до инъекций глюкозы из клеток содержания мышей извлекали кормушку. Глюкозу («ПанЭко», Россия) вводили внутривенно из расчета 10 мкл 20 % глюкозы на 1 г веса мыши. Кровь брали из кончика хвоста в 5 временных точках: 0 – базовый уровень глюкозы до введения и после, 1 – через 15 мин, 2 – через 30 мин, 3 – через 60 мин и 4 – через 120 мин. Измерение уровня глюкозы проводили с помощью глюкометра Contour TS (Bayer, Швейцария). В качестве интегрального показателя глюкозотолерантного теста (ГТТ) рассчитывали площадь под кривой концентрации глюкозы (average under curve – AUC).

### Статистический анализ

Проверка на нормальность распределения эмпирических данных показала, что для всех изучаемых параметров можно использовать параметрическую статистику. Межгрупповые сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, определяя наименьшую достоверную разность (least significant difference – LSD). Статистическую зависимость показателей фенотипа от числа новорожденных и массы тела при отъеме от матерей оценивали на основе линейных корреляций. Влияние вариантов пересадки и пола потомков на массу и состав тела анализировали путем двухфакторного ковариационного анализа (ANCOVA) с факторами «пол» и «вариант пересадки» и ковариатами «число новорожденных» и «масса тела» при отъеме. Для глюкозы и показателей теста толерантности к глюкозе применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

### Результаты

#### Плодовитость и масса тела при отъеме от матерей

На размер пометов при отъеме от матерей значимо влиял способ их получения (табл. 1). При пересадках эмбрионов отмечено существенное снижение размера пометов по

сравнению с контрольной группой. Вместе с тем разные способы пересадок не влияли на среднее число новорожденных ( $p > 0.05$ , LSD-тест, см. табл. 1). Соотношение полов при разных вариантах пересадок и в целом по всем экспериментальным группам хотя и было сдвинуто в пользу самцов (45 самцов, 35 самок), но этот сдвиг не был статистически значимым:  $\chi^2 = 0.63$ ,  $p = 0.43$  при сравнении с теоретически ожидаемым 1:1. Ковариационный анализ (ANCOVA) изменчивости массы тела трехнедельных потомков с факторами «группа», «пол» и размером помета в качестве ковариаты показал значимые эффекты группы:  $F_{3,184} = 11.42$ ,  $p < 0.001$ . Фактор пола потомка, а также взаимодействие факторов группы и пола новорожденных не влияли на массу потомков в этом возрасте:  $F_{1,184} = 0.671$ ,  $p = 0.414$  и  $F_{3,184} = 0.597$ ,  $p = 0.618$  соответственно. При сравнении массы трехнедельных потомков, полученных при разных вариантах пересадок, отмечено, что самцы и самки в группах 2 кл. – бл. были самыми тяжелыми, а в 2 кл. – 2 кл. – самыми легкими (см. табл. 1).

Размер помета и масса тела в возрасте 3 нед. коррелировали с массой тела, относительным содержанием жира и тощей массой потомков в возрасте 7 и 10 нед. (табл. 2), но не коррелировали с концентрацией глюкозы и показателями ГТТ. Исходя из этих результатов, все варианты

**Таблица 1.** Размер помета и масса тела при отъеме у мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок

Группа	Размер помета, среднее $\pm$ SE (n)	Масса тела (г), среднее $\pm$ SE (n)	
		Самцы	Самки
Контроль	12.5 $\pm$ 0.58 (9) <sup>A</sup>	11.7 $\pm$ 0.34 (54) <sup>D</sup>	11.7 $\pm$ 0.30 (59) <sup>D</sup>
2 кл. – 2 кл.	6.75 $\pm$ 1.11 (4) <sup>B</sup>	15.1 $\pm$ 0.77 (17) <sup>C</sup>	15.0 $\pm$ 0.92 (10) <sup>C</sup>
2 кл. – бл.	4.43 $\pm$ 0.78 (7) <sup>B</sup>	20.7 $\pm$ 0.92 (14) <sup>A</sup>	20.1 $\pm$ 1.00 (9) <sup>A</sup>
Бл. – бл.	5.00 $\pm$ 0.93 (6) <sup>B</sup>	18.2 $\pm$ 0.77 (14) <sup>B</sup>	17.8 $\pm$ 0.39 (16) <sup>B</sup>

Примечание. Обозначения групп здесь и далее: контроль – потомки, полученные путем естественных спариваний; 2 кл. – 2 кл. – потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии двух клеток и пересадки самкам-реципиентам; 2 кл. – бл. – потомки, полученные после культивирования *in vitro* двухклеточных эмбрионов до стадии бластоцист и пересадки самкам-реципиентам; Бл. – бл. – потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии бластоцист и пересадки самкам-реципиентам.

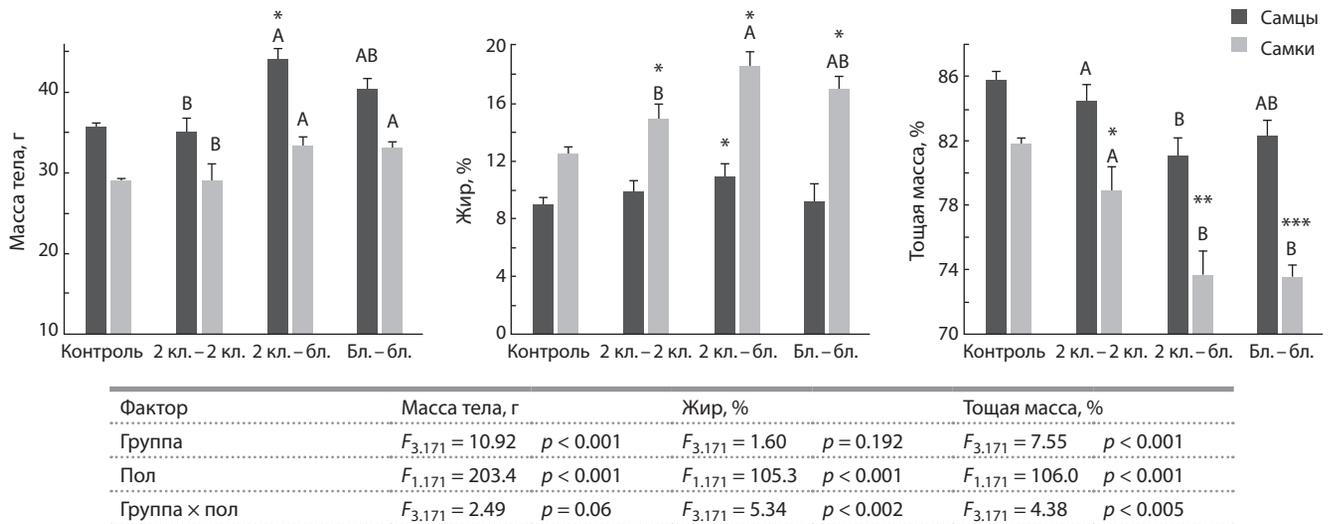
A, B, C, D – разными буквами обозначены достоверно различающиеся средние ( $p < 0.05$ , LSD-тест); SE – стандартная ошибка; n – количество животных в группе.

**Таблица 2.** Корреляция состава тела и показателей теста толерантности к глюкозе

с размером помета и массой тела мышей при отъеме (данные по объединенной выборке)

Признак	Размер помета, r; p		Масса тела, r; p	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Возраст 7 недель				
Масса тела	-0.61; < 0.001	-0.45; < 0.001	0.60; < 0.001	0.39; < 0.001
Жир, %	-0.26; 0.015	-0.54; < 0.001	0.25; 0.19	0.45; < 0.001
Тощая масса, %	0.46; < 0.001	0.70; < 0.001	-0.49; < 0.001	-0.64; < 0.001
Возраст 10 недель				
Масса тела	-0.60; < 0.001	-0.48; < 0.001	0.53; < 0.001	0.31; 0.003
Жир, %	-0.43; < 0.001	-0.61; < 0.001	0.35; 0.001	0.45; < 0.001
Тощая масса, %	0.43; < 0.001	0.60; < 0.001	-0.31; 0.003	-0.41; < 0.001
Концентрация глюкозы и тест толерантности к глюкозе				
Глюкоза, базальный уровень	0.03; 0.880	0.10; 0.599	-0.10; 0.565	0.03; 0.860
Площадь под кривой концентрации глюкозы	0.22; 0.218	0.24; 0.195	0.08; 0.664	-0.31; 0.090

Примечание. r – коэффициент корреляции, p – уровень достоверности.



**Рис. 1.** Масса тела и относительные значения жира и тощей массы у потомков мышей в возрасте 7 нед.

Здесь и далее таблица показывает влияние факторов «группа», «пол» и их взаимодействия. ANCOVA с ковариатами (эффекты не показаны) по размеру пометов и массе тела в трехнедельном возрасте. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся средние ( $p < 0.05$ , LSD-тест). ANCOVA, рассчитанный для самцов и самок каждой экспериментальной группы.

межгрупповых сравнений массы и состава тела выполняли с помощью ковариационного анализа (ANCOVA), в который наряду с анализируемыми факторами включали две ковариаты – «размер помета» и «вес потомков» при отъеме от матерей.

#### Масса и состав тела половозрелых потомков

Ковариационный анализ (ANCOVA) показал значимое влияние факторов группы, пола и их взаимодействия на массу и состав тела потомков в возрасте 7 нед. (рис. 1). Статистическую значимость отличий самцов и самок каждой экспериментальной группы от контрольной группы также оценивали с помощью ANCOVA. У самцов в возрасте 7 нед. установлено достоверное превышение контрольных значений массы тела и относительного содержания жира в группе 2 кл. – бл. Масса тела самок в этом возрасте в контрольной и экспериментальной группах значимо не различалась. Вместе с тем содержание жира у самок, полученных при разных вариантах пересадок, достоверно превосходило значения, наблюдаемые у контрольных особей. Соответственно, тощая масса самок экспериментальных групп была ниже таковой в группе контроля. Различная фенотипическая реакция на пересадки самцов и самок подтверждена статистически значимыми эффектами взаимодействия факторов «группа» и «пол» (см. рис. 1). Объединение в общую группу данных по всем пересаженным потомкам показало, что содержание жира и тощей массы статистически значимо отличалось от группы контроля только у самок: жир –  $16.8 \pm 0.54$  против  $12.5 \pm 0.39$  % ( $p < 0.05$ , ANCOVA); тощая масса –  $75.4 \pm 0.60$  против  $81.9 \pm 0.43$  % ( $p < 0.05$ , ANCOVA).

Поскольку размер помета достоверно не различался между экспериментальными группами, для выявления эффектов, обусловленных разными вариантами пересадок, статистические сравнения между этими группами проводили отдельно для самцов и самок с помощью одно-

факторного дисперсионного анализа. Наибольшие значения массы тела установлены у особей обоего пола в группе 2 кл. – бл., наименьшие – в группе 2 кл. – 2 кл. (см. рис. 1). Относительное содержание жира, как и масса тела, были наибольшими у самцов и самок группы 2 кл. – бл., а значения тощей массы, соответственно, наименьшими.

Статистический анализ межгрупповых различий в возрасте 10 нед., выполненный по изложенной выше схеме, показал значимое влияние экспериментальной группы, пола и взаимодействия факторов (группы и пола) на общую и тощую массу потомков (рис. 2). На содержание жира фактор «группа» не оказывал значимого влияния, но достоверно влиял фактор пола, а также взаимодействие факторов – «пол» и «группа». При сравнении экспериментальных групп с контрольной установлено, что у самцов доля жира превышала контрольные значения только в группе 2 кл. – 2 кл., а тощая масса была ниже, чем в контроле, в группах 2 кл. – бл. и Бл. – бл. У самок всех экспериментальных групп относительное содержание жира превышало контрольные значения. Соответственно, тощая масса была ниже, чем в контроле, но статистически значимым это различие было только в группе Бл. – бл. Как и в возрасте 7 нед., изменение состава тела, обусловленное пересадкой эмбрионов, было более выраженным у самок, чем у самцов. При объединении данных групп потомков разных вариантов эмбриональных пересадок статистически значимые отличия от контрольной группы были выявлены только у самок: жир –  $19.5 \pm 0.65$  против  $13.4 \pm 0.46$  % ( $p < 0.05$ , ANCOVA); тощая масса –  $71.8 \pm 0.65$  против  $77.5 \pm 0.46$  % ( $p < 0.05$ , ANCOVA).

Экспериментальные группы обоего пола между собой достоверно не различались. Эти результаты показывают, что если влияние способа получения потомков на массу тела нивелируется в возрасте 10 нед., то различия в жире и тощей массе по сравнению с группой контроля сохраняются и в этом возрасте.

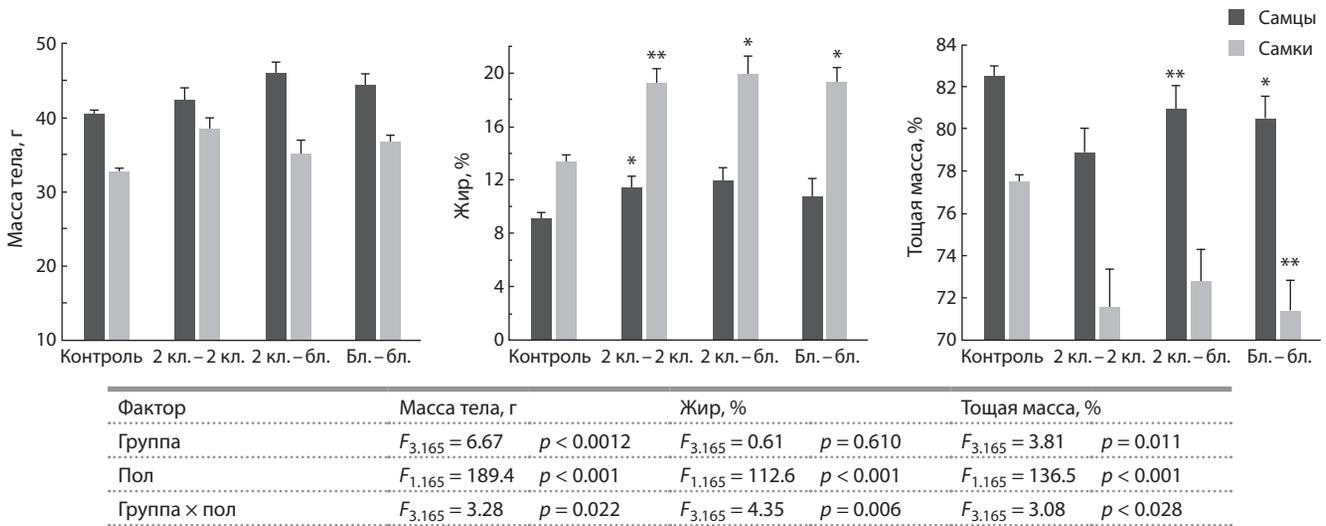


Рис. 2. Масса тела и относительные значения жира и тощей массы у потомков мышей в возрасте 10 нед.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с контролем. ANCOVA с ковариатами по размеру пометов и массе тела в трехнедельном возрасте.

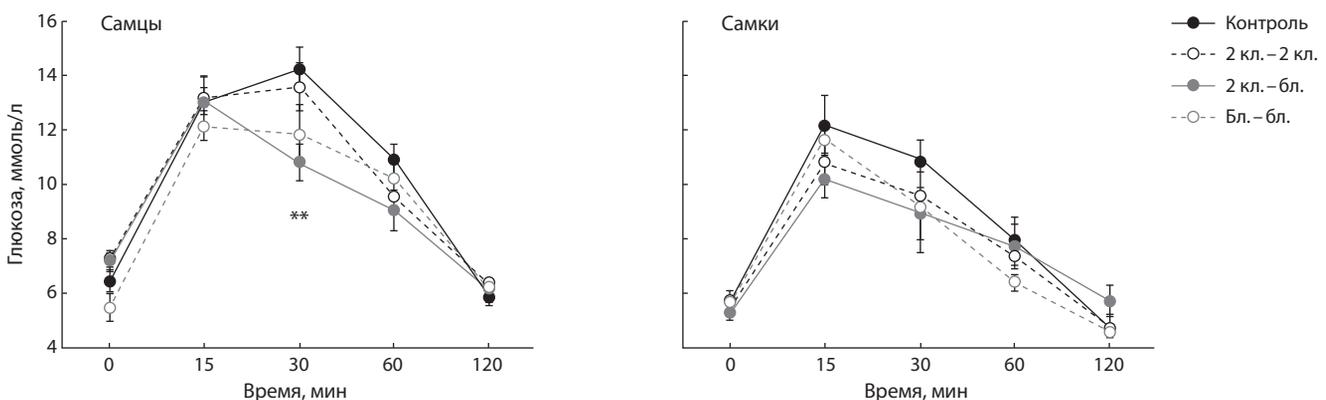
### Глюкозотолерантный тест

Уровень глюкозы до и во время нагрузочной пробы (ГТТ) не коррелировал с числом потомков в пометах и массой тела при отъеме от матерей. Это обстоятельство позволило проанализировать влияние пересадок и пола, не прибегая к использованию ковариат. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что базальный уровень глюкозы существенно зависел от пола потомков ( $F_{1,56} = 19.74$ ,  $p < 0.001$ ) и взаимодействия факторов «пол» и «группа» ( $F_{3,56} = 3.69$ ,  $p = 0.017$ ) (табл. 3). Собственный эффект экспериментальной группы был статистически незначимым ( $F_{3,56} = 1.90$ ,  $p = 0.14$ ). Концентрация глюкозы в разные сроки нагрузочной пробы (ГТТ) была достоверно ниже у самок разных групп, чем у самцов (рис. 3). Варианты

Таблица 3. Базальная концентрация глюкозы у половозрелых самцов и самок мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок

Группа	Самцы, среднее ± SE (n)	Самки, среднее ± SE (n)
Контроль	6.46 ± 0.39 (8) <sup>A, B</sup>	5.65 ± 0.46 (8)
2 кл. – 2 кл.	7.23 ± 0.35 (9) <sup>A</sup>	5.46 ± 0.18 (7)
2 кл. – бл.	7.17 ± 0.34 (9) <sup>A</sup>	5.24 ± 0.21 (7)
Бл. – бл.	5.50 ± 0.50 (7) <sup>B</sup>	5.62 ± 0.18 (9)

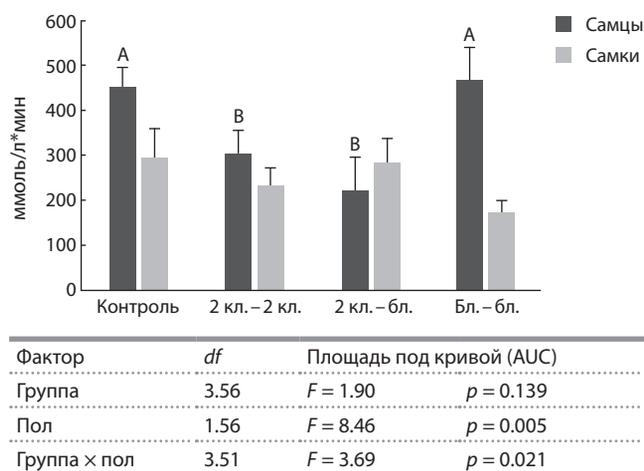
A, B – разными буквами обозначены достоверно различающиеся средние ( $p < 0.05$ , LSD-тест); SE – стандартная ошибка, n – количество животных в группе.



Фактор	df	0 мин	15 мин	30 мин	60 мин	120 мин
Группа	3.56	$F = 1.90$ $p = 0.139$	$F = 0.58$ $p = 0.631$	$F = 4.20$ $p = 0.009$	$F = 1.40$ $p = 0.251$	$F = 1.22$ $p = 0.311$
Пол	1.56	$F = 19.74$ $p < 0.001$	$F = 9.22$ $p = 0.004$	$F = 25.6$ $p < 0.001$	$F = 31.37$ $p < 0.001$	$F = 17.42$ $p < 0.001$
Группа × пол	3.56	$F = 3.69$ $p = 0.017$	$F = 1.09$ $p = 0.361$	$F = 0.63$ $p = 0.600$	$F = 1.33$ $p = 0.272$	$F = 1.03$ $p = 0.386$

Рис. 3. Концентрация глюкозы после углеводной нагрузки.

Таблица показывает влияние экспериментальной группы и пола на концентрацию глюкозы в разные сроки после углеводной нагрузки. \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с контрольной группой (t-тест Стьюдента).



**Рис. 4.** Площади под кривой прироста концентрации глюкозы у потомков экспериментальных групп.

Таблица показывает влияние экспериментальной группы и пола на значения AUC. Различающиеся средние значения ( $p < 0.05$ , LSD-тест) обозначены разными буквами.

пересадок статистически значимо влияли на уровень глюкозы, измеренный на 30-й мин ГТТ. При этом наибольшие значения отмечены у контрольных особей, а наименьшие – у потомков группы 2 кл. – бл.

Площадь под кривой прироста концентрации глюкозы (AUC) варьировала в зависимости от пола животных и взаимодействия факторов пола и группы (рис. 4). Последнее обстоятельство выразилось в том, что варианты пересадок влияли на AUC только у самцов. При этом наибольшие значения AUC отмечены у контрольных животных и потомков, полученных при вымывании и пересадке blastocyst (группа Бл. – бл.). У самцов групп 2 кл. – 2 кл. и 2 кл. – бл. значения AUC были достоверно ниже.

## Обсуждение

Результаты наших исследований показали, что пересадка эмбрионов суррогатной матери даже без предварительной инкубации оказывает долгосрочное влияние на метаболический фенотип взрослых потомков. Эти данные подтверждают положение о высокой вероятности эпигенетического перепрограммирования на доимплантационной стадии развития (Fleming et al., 2004; Rehfeldt, Kuhn, 2006; Burdge et al., 2007; Nelson, Lawlor, 2011; Fleming et al., 2012; Mulligan et al., 2012). Следует отметить, что в подавляющем большинстве исследований долгосрочных последствий ЭКО в качестве главного фактора рассматривают состав культуральной среды (Fernández-Gonzalez et al., 2004; Dumoulin et al., 2010; Bouillon et al., 2016). Наше исследование показывает, что влияние культивирования эмбрионов *in vitro* от двух клеток до blastocyst проявляется главным образом в большей массе тела и содержании жира у самцов в возрасте 7 нед. по сравнению с самцами, полученными естественным способом. В отличие от самцов масса тела самок, полученных при разных вариантах пересадок, не отличалась от группы контроля в возрасте 7 и 10 нед. Однако самки экспериментальных групп имели большее, чем в группе контроля, относительное содержа-

ние жира и меньшие значения тощей массы. Поскольку эти же отличия от контрольных особей были статистически достоверными как в экспериментах с культивированием эмбрионов от двух клеток до blastocyst, так и при пересадке двух клеточных эмбрионов и blastocyst без культивирования, можно заключить, что сама процедура эмбриотрансплантации вносит вклад в метаболические изменения потомков женского пола.

Кроме того, условия преимплантационного этапа и стадия развития в момент пересадки влияли на толерантность к глюкозе потомков мужского пола, полученных после пересадок двух клеточных эмбрионов и blastocyst и после культивирования *in vitro*. При этом следует отметить, что самцы, рожденные после пересадок интактных blastocyst, не отличались по этому признаку от контрольных особей. Полученные в нашем исследовании данные массы тела и толерантности к глюкозе демонстрируют некоторую схожесть долговременных последствий культивирования на преимплантационной стадии развития с метаболическими изменениями у взрослых потомков (Donjacour et al., 2014; López-Cardona et al., 2015). Анализ данных литературы о влиянии ВРТ на пре- и постимплантационное развитие, а также постнатальный фенотип показывает, что воздействие ВРТ зависит от вида млекопитающих, пола, используемой культуральной среды, а также возраста модельных видов (Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018). При этом авторы подчеркивают, что очень трудно сделать общие выводы, за исключением того факта, что процедуры ВРТ влияют на липидный обмен и метаболизм глюкозы. Предложено несколько связанных между собой гипотез, объясняющих, каким образом неблагоприятные факторы на ранних этапах развития могут оказывать долгосрочное влияние на здоровье потомков (Feuer, Rinaudo, 2012, 2017).

Гипотеза начального триггера предполагает, что в основе относительно сходных метаболических фенотипов (метаболизм глюкозы, липидный обмен и изменения артериального давления) лежат эпигенетические механизмы программирования генома. Период развития от стадии зиготы до blastocyst является наиболее эпигенетически уязвимым, поэтому считается, что реакция эмбриона на искусственную среду приводит к изменениям экспрессии генов, которые включены в программу формирования обмена веществ. Согласно следующей гипотезе, влияние манипуляций *in vitro* на экспрессию ключевых генов, выполняющих функции регулятора транскрипции в преимплантационных эмбрионах, может по-разному влиять на типы клеток и объяснить специфичность профилей экспрессии генов в разных тканях, наблюдаемых при использовании ВРТ. Наконец, предполагается влияние условий преимплантационного развития на глобальную экспрессию генов, обусловленную транскрипционными изменениями, которые эпигенетически поддерживаются в нескольких локусах, в том числе при дифференцировке клеток (Feuer et al., 2014).

Следует отметить, что значительно меньше внимания уделяется долговременным последствиям ВРТ, обусловленным реакцией суррогатной матери на эмбриональные антигены, формирующей гуморальное обеспечение для нормального развития плодов. Сегодня уже нет никаких сомнений, что материнские Т- и В-клетки распознают

антигены плода и реагируют на его присутствие. Это явление подтверждено на экспериментальных моделях, в которых ответы Т- и В-клеток на природные или модельные антигены прослеживались *in vivo* и *in vitro* (Moldenhauer et al., 2010; Taglauer et al., 2010). Кроме того, наличие антиген-реактивных Т-лимфоцитов и антител к генам гистосовместимости хорошо известно и задокументировано у беременных женщин (James et al., 2003; Kahn, Baltimore, 2010). Результаты наших ранее опубликованных исследований показывают долговременные эффекты иммуногенетических различий между суррогатной матерью и эмбрионом на стадиях двух клеток и бластоцисты на метаболический и поведенческий фенотип взрослых потомков (Gerlinskaya, Evsikov, 2001; Gerlinskaya et al., 2019). Влияние факторов иммуногенетического диалога матери и плода на фенотип потомков может отличаться при пересадках, выполняемых на аутбредных (в нашем случае линия CD1) и инбредных линиях мышей.

## Заключение

Таким образом, развитие доимплантационных эмбрионов *in vitro* и даже их пересадки без предварительного культивирования влияют на метаболический фенотип потомков. Эти ключевые процедуры ВРТ могут существенно влиять на воспроизводимость результатов при использовании технологий криоархивирования для воспроизводства генетических линий лабораторных животных, хозяйственно значимые признаки и репродукцию ценных пород сельскохозяйственных животных, а также вероятность метаболических отклонений у новорожденных, зачатых с помощью экстракорпорального оплодотворения.

## Список литературы / References

- Barker D.J. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 2007;261(5):412-417. DOI 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
- Bouillon C., Léandri R., Desch L., Ernst A., Bruno C., Cerf C., Chiron A., Souchay C., Burguet A., Jimenez C., Fauque P. Does embryo culture medium influence the health and development of children born after *in vitro* fertilization? *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0150857. DOI 10.1371/journal.pone.0150857.
- Burdge G.C., Hanson M.A., Slater-jefferies J.L., Lillycrop K.A. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br. J. Nutr.* 2007;97(6):1036-1046. DOI 10.1017/S0007114507682920.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Roos J.C., Vermeiden J.P., van Leeuwen F.E., Delemarre-van de Waal H.A. Body composition in children and adolescents born after *in vitro* fertilization or spontaneous conception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(9):3417-3423. DOI 10.1210/jc.2006-2896.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Roos J.C., Vermeiden J.P., van Leeuwen F.E., Delemarre-van de Waal H.A. Cardiometabolic differences in children born after *in vitro* fertilization: Follow-up study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(5):1682-1688. DOI 10.1210/jc.2007-2432.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Prein J., Smit J.J., Vermeiden J.P., Spreeuwenberg M., van Leeuwen F.E., Delemarre-van de Waal H.A. Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8–18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. *Hum. Reprod.* 2009;24(11):2788-2795. DOI 10.1093/humrep/dep273.
- Chen S., Sun F.Z., Huang X., Wang X., Tang N., Zhu B., Li B. Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction linked to reduced fetal weight in mice. *Sci. Rep.* 2015;5:10596. DOI 10.1038/srep10596.
- Davies M.J., Moore V.M., Willson K.J., Van Essen P., Priest K., Scott H., Haan E.A., Chan A. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(19):1803-1813. DOI 10.1056/NEJMoa1008095.
- Donjacour A., Liu X., Lin W., Simbulan R., Rinaudo P.F. *In vitro* fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. *Biol. Reprod.* 2014;90(4):80. DOI 10.1095/biolreprod.113.113134.
- Dumoulin J.C., Land J.A., Van Montfoort A.P., Nelissen E.C., Coonen E., Derhaag J.G., Schreurs I.L., Dunselman G.A., Kester A.D., Geraedts J.P., Evers J.L. Effect of *in vitro* culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum. Reprod.* 2010;25(3):605-612. DOI 10.1093/humrep/dep456.
- Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? *Mol. Reprod. Dev.* 2018;85(4):348-368. DOI 10.1002/mrd.22970.
- Esh-Broder E., Ariel I., Abas-Bashir N., Bdolah Y., Celnikier D.H. Placenta accreta is associated with IVF pregnancies: a retrospective chart review. *BJOG*. 2011;118(9):1084-1089. DOI 10.1111/j.1471-0528.2011.02976.x.
- Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2006;65(1):178-191. DOI 10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.
- Fernández-Gonzalez R., Moreira P., Bilbao A., Jiménez A., Pérez-Crespo M., Angel Ramírez M., Rodríguez De Fonseca F., Pintado B., Gutiérrez-Adán A. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(16):5880-5885. DOI 10.1073/pnas.0308560101.
- Feuer S.K., Liu X., Donjacour A., Lin W., Simbulan R.K., Giritharan G., Kolahi K., Ameri K., Maltepe E., Rinaudo P.F. Use of a mouse *in vitro* fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. *Endocrinology*. 2014;155(5):1956-1969. DOI 10.1210/en.2013-2081.
- Feuer S.K., Rinaudo P. Preimplantation stress and development. *Birth Defects Res. C Embryo Today*. 2012;96(4):299-314. DOI 10.1002/bdrc.21022.
- Feuer S.K., Rinaudo P.F. Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of *in vitro* fertilization (IVF) in the mouse. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2017;8(4):403-410. DOI 10.1017/S204017441700023X.
- Fleming T.P., Kwong W.Y., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D.J., Watkins A.J., Eckert J.J. The embryo and its future. *Biol. Reprod.* 2004;71(4):1046-1054. DOI 10.1095/biolreprod.104.030957.
- Fleming T.P., Velazquez M.A., Eckert J.J., Lucas E.S., Watkins A.J. Nutrition of females during the peri-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. *Anim. Reprod. Sci.* 2012;130(3-4):193-197. DOI 10.1016/j.anireprosci.2012.01.015.
- Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Influence of genetic dissimilarity of mother and fetus on progesterone concentrations in pregnant mice and adaptive features of offspring. *Reproduction*. 2001;121(3):409-117. DOI 10.1530/rep.0.1210409.
- Gerlinskaya L.A., Litvinova E.A., Kontsevaya G.V., Feofanova N.A., Ahasova K.M., Anisimova M.V., Maslennikova S.O., Zolotykh M.A., Moshkin Y.M., Moshkin M.P. Phenotypic variations in transferred progeny due to genotype of surrogate mother. *Mol. Hum. Reprod.* 2019;1:25(2):88-99. DOI 10.1093/molehr/gay052.
- Haavaldsen C., Tanbo T., Eskild A. Placental weight in singleton pregnancies with and without assisted reproductive technology: a population study of 536,567 pregnancies. *Hum. Reprod.* 2012;27(2):576-582. DOI 10.1093/humrep/der428.
- Hansen M., Kurinczuk J.J., Milne E., de Klerk N., Bower C. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*. 2013;19(4):330-353. DOI 10.1093/humupd/dmt006.

- Helmerhorst F.M., Perquin D.A., Donker D., Keirse M.J. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ Open*. 2004;328(7434):261. DOI 10.1136/bmj.37957.560278.EE.
- International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART), European Society of Human Reproduction and Embryology Annual Meeting, 2012. Istanbul, Turkey.
- James E., Chai J.G., Dewchand H., Macchiarulo E., Dazzi F., Simpson E. Multiparity induces priming to male-specific minor histocompatibility antigen, HY, in mice and humans. *Blood*. 2003;102(1):388-393. DOI 10.1182/blood-2002-10-3170.
- Kahn D.A., Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(20):9299-9304. DOI 10.1073/pnas.1003909107.
- Leese H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*. 2012;143(4):417-427. DOI 10.1530/REP-11-0484.
- López-Cardona A.P., Fernández-González R., Pérez-Crespo M., Alén F., de Fonseca F.R., Orío L., Gutierrez-Adan A. Effects of synchronous and asynchronous embryo transfer on postnatal development, adult health, and behavior in mice. *Biol. Reprod.* 2015;93(4):85. DOI 10.1095/biolreprod.115.130385.
- Moldenhauer L.M., Hayball J.D., Robertson S.A. Utilising T cell receptor transgenic mice to define mechanisms of maternal T cell tolerance in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 2010;87(1-2):1-13. DOI 10.1016/j.jri.2010.05.007.
- Mulligan C.J., D'Errico N.C., Stees J., Hughes D.A. Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics*. 2012;7(8):853-857. DOI 10.4161/epi.21180.
- Nelson S.M., Lawlor D.A. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Med.* 2011;8(1):e1000386. DOI 10.1371/journal.pmed.1000386.
- Rehfeldt C., Kuhn G. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *J. Anim. Sci.* 2006;84(Suppl.):113-123. DOI 10.2527/2006.8413\_supple113x.
- Rinaudo P.F., Lamb J. Fetal origins of perinatal morbidity and/or adult disease. *Semin. Reprod. Med.* 2008;26(5):436-445. DOI 10.1055/s-0028-1087109.
- Romundstad L.B., Romundstad P.R., Sunde A., von Düring V., Skjaerven R., Gunnell D., Vatten L.J. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet*. 2008;372(9640):737-743. DOI 10.1016/S0140-6736(08)61041-7.
- Sinclair K.D., Young L.E., Wilmut I., McEvoy T.G. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum. Reprod.* 2000;15(Suppl. 5):68-86. DOI 10.1093/humrep/15.suppl\_5.68.
- Taglauer E.S., Adams Waldorf K.M., Petroff M.G. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int. J. Dev. Biol.* 2010;54(2-3):421-430. DOI 10.1387/ijdb.082800et.
- Templeton A. Infertility and the establishment of pregnancy-overview. *Br. Med. Bul.* 2000;56(3):577-587. DOI 10.1258/0007142001903283.
- Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 1998;3(3):155-163. DOI 10.1530/ror.0.0030155.

#### ORCID ID

M.V. Anisimova orcid.org/0000-0003-1522-9433  
N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554  
L.A. Gerlinskaya orcid.org/000-0002-8118-1362

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке РФФ, грант № 20-14-00055. В работе использованы ресурсы ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН, который поддерживается бюджетными проектами № АААА-А17-17072710029-7 и 0259-2019-0004.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.06.2020. После доработки 20.07.2020. Принята к публикации 21.07.2020.

## Субпопуляционный состав периферических иммунокомпетентных клеток и содержание цитокинов в структурах мозга у мутантных мышей линии *Disk1-Q31L*

М.М. Геворгян, С.Я. Жанаева, Е.Л. Альперина, Т.В. Липина, Г.В. Идова 

Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

 e-mail: galina-idova@mail.ru

**Аннотация.** Нарушения в гене *DISC1* (*disrupted in schizophrenia 1*) ассоциированы с дисфункциями мозга, характерными для ряда психических заболеваний (шизофрения, депрессия, биполярное расстройство и др.). В данной работе впервые изучены иммунологические параметры у мышей линии *Disk1-Q31L* с точечной мутацией во втором экзоне гена *DISC1* (замена глутамина на лейцин в 31-м положении) по сравнению с мышами линии C57BL/6Ncr1 (дикий тип). Методом проточной цитофлуориметрии показано, что по сравнению с мышами дикого типа у интактных *Disk1-Q31L* мышей в периферической крови увеличено процентное содержание CD3<sup>+</sup> T-лимфоцитов, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-хелперов и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-регуляторных клеток при снижении CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-цитотоксических/супрессорных клеток. С помощью мультиплексного анализа выявлены различия в содержании цитокинов в структурах мозга *Disk1-Q31L* мышей по сравнению с мышами дикого типа. Содержание провоспалительных цитокинов повышалось во фронтальной коре (IL-6, IL-17 и IFN $\gamma$ ) и стриатуме (IFN $\gamma$ ), а в гиппокампе и гипоталамусе, напротив, уменьшалось. При этом IL-1 $\beta$  снижался во всех исследованных структурах. Наряду с этим обнаружено увеличение количества противовоспалительного цитокина IL-4 во фронтальной коре и снижение IL-10 в гиппокампе. Иммуная реактивность на введение антигена эритроцитов барана, анализируемая по числу антителообразующих клеток в селезенке, на пике иммунного ответа у *Disk1-Q31L* мышей была выше, чем у мышей дикого типа. Таким образом, мыши линии *Disk1-Q31L* характеризуются изменением паттерна цитокинов в структурах мозга, усилением периферического T-клеточного звена с повышением субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-хелперов и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-регуляторных клеток, а также увеличением иммунной реактивности на антиген в селезенке.

Ключевые слова: *Disk1-Q31L* мыши; цитокины; T-клетки; В-клетки; антителообразующие клетки; мозг; периферическая кровь; селезенка.

**Для цитирования:** Геворгян М.М., Жанаева С.Я., Альперина Е.Л., Липина Т.В., Идова Г.В. Субпопуляционный состав периферических иммунокомпетентных клеток и содержание цитокинов в структурах мозга у мутантных мышей линии *Disk1-Q31L*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(7):770-776. DOI 10.18699/VJ20.672

## The composition of peripheral immunocompetent cell subpopulations and cytokine content in the brain structures of mutant *Disk1-Q31L* mice

М.М. Gevorgyan, S.Ya. Zhanaeva, E.L. Alperina, T.V. Lipina, G.V. Idova 

Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Novosibirsk, Russia

 e-mail: galina-idova@mail.ru

**Abstract.** The *DISC1* (*disrupted in schizophrenia 1*) gene is associated with brain dysfunctions, which are involved in a variety of mental disorders, such as schizophrenia, depression and bipolar disorder. This is the first study to examine the immune parameters in *Disk1-Q31L* mice with a point mutation in the second exon of the *DISC1* gene compared to mice of the C57BL/6Ncr1 strain (WT, wild type). A flow cytometry assay has shown that intact *Disk1-Q31L* mice differ from the WT strain by an increase in the percentage of CD3<sup>+</sup> T cells, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T helper cells and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells and a decrease in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cytotoxic/suppressor cells in the peripheral blood. A multiplex analysis revealed differences in the content of cytokines in the brain structures of *Disk1-Q31L* mice compared to WT mice. The content of pro-inflammatory cytokines was increased in the frontal cortex (IL-6, IL-17 and IFN $\gamma$ ) and striatum (IFN $\gamma$ ), and decreased in the hippocampus and hypothalamus. At the same time, the levels of IL-1 $\beta$  were decreased in all structures being examined. In addition, the content of anti-inflammatory cytokines IL-4 was increased in the frontal cortex, while IL-10 amount was decreased in the hippocampus. Immune response to sheep red blood cells analyzed by the number of antibody-forming cells in the spleen was higher in *Disk1-Q31L* mice at the peak of the reaction than in WT mice. Thus, *Disk1-Q31L* mice are characterized by changes in the pattern of cytokines in the brain structures, an amplification of the peripheral T-cell link with an increase in the

content of the subpopulations of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T helpers and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells, as well as elevated immune reactivity to antigen in the spleen.

Key words: *Disc1*-Q31L mice; cytokines; T cells; B cells; antibody-forming cells; brain; peripheral blood; spleen.

**For citation:** Gevorgyan M.M., Zhanaeva S.Ya., Alperina E.L., Lipina T.V., Idova G.V. The composition of peripheral immunocompetent cell subpopulations and cytokine content in the brain structures of mutant *Disc1*-Q31L mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):770-776. DOI 10.18699/VJ20.672

## Введение

К настоящему времени показано, что воздействие различных факторов (психосоциальный стресс, влияние внешней среды, генетическая предрасположенность) способствует развитию воспаления, длительное течение которого может приводить к соматическим и психическим заболеваниям (Haroon et al., 2012; Felger, Lotrich, 2013; Dantzer, 2018). Воспалительный процесс сопровождается значительными изменениями продукции цитокинов (IL-6, IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и др.), состава Т-клеточных субпопуляций, обладающих различной функциональной активностью (CD4<sup>+</sup> Т-клеток-хелперов, CD8<sup>+</sup> цитотоксических/супрессорных Т-клеток, Т-регуляторных клеток), как в периферической иммунной системе, так и в структурах мозга (Haroon et al., 2012; Felger, Lotrich, 2013; Dantzer, 2018). Применение экспериментальных моделей существенно расширяет возможности изучения вклада иммунных нарушений и связанных с ними нейромедиаторных и гормональных изменений в патогенез заболеваний, ассоциированных с разными факторами риска, включая наследственную предрасположенность. У животных с генетически обусловленным депрессивным или агрессивным поведением изменяются распределение и соотношение основных субпопуляций Т-клеток в крови и селезенке, иммунная реактивность на антиген, а также содержание различных цитокинов на периферии и в структурах мозга (Alperina et al., 2007, 2019; Idova et al., 2013, 2015, 2019; Takahashi et al., 2018).

Известно, что нарушения в гене *DISC1* (*disrupted in schizophrenia 1*) ассоциированы с дисфункциями мозга, а именно с aberrантным развитием нервной системы и внутриклеточных сигнальных путей, характерными для ряда психических заболеваний, таких как шизофрения, биполярное расстройство, депрессия (Lipina et al., 2010; Hikida et al., 2012; Mathieson et al., 2012; Lipina, Roder, 2014; Serykh et al., 2020). В настоящее время создана гомозиготная линия мышей *Disc1*-Q31L<sup>-/-</sup> с точечной мутацией во втором экзоне гена *DISC1* хромосомы 8 (замещение глутамина на лейцин в 31-м положении), которая на основе оценки эмоционального, социального и когнитивного поведения может относиться к депрессивноподобному эндотипу (Lipina et al., 2013; Lipina, Roder, 2014; Dubrovina et al., 2018; Serykh et al., 2020). Показано также, что мутация Q31L в гене *DISC1* приводит к изменению активности дофаминергической (DA), а также других нейромедиаторных систем (Lipina et al., 2013), играющих важную роль в механизмах развития различных психопатологий и в контроле иммунной функции (Saurer et al., 2006; Девойно и др., 2009; Альперина, 2014).

Однако особенности иммунного статуса на периферии и в мозге, характерные для мутантных мышей линии *Disc1*-Q31L, до сих пор не известны. В связи с вышесказанным

целью нашего исследования был анализ базального содержания субпопуляций Т- и В-клеток в периферической крови и в селезенке, уровня про- и противовоспалительных цитокинов в структурах мозга, включенных в процессы развития различных психоэмоциональных состояний и нейроиммунотензии (Девойно и др., 2009; Idova et al., 2018, 2019; Alperina et al., 2019), а также иммунной реактивности на антиген по числу антителообразующих клеток.

## Материалы и методы

**Экспериментальные животные.** Опыты проведены на 23 гомозиготных мышках-самцах линии *Disc1*-Q31L<sup>-/-</sup> и 23 мышках-самцах линии C57BL/6NCrl (WT, дикий тип) в возрасте 3–3.5 мес. массой 27–30 г. Животные были получены из УНУ «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейropsychических заболеваний» (№ 493387) Научно-исследовательского института физиологии и фундаментальной медицины (НИИФФМ) и содержались в стандартных условиях вивария НИИФФМ в пластиковых клетках (OptiMice Biotech A.S., 34 × 29 × 15 см). Пищу («ПроКорм») и воду животные получали без ограничений. Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директивах Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по биомедицинской этике НИИФФМ (протокол № 10 от 17.12.2015).

**Дизайн эксперимента.** У интактных мышей линий *Disc1*-Q31L и WT (по 10 животных каждой линии) определяли уровень Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови и в селезенке, а также содержание провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-17, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов в структурах мозга (префронтальная кора, стриатум, гиппокамп, гипоталамус). У иммунизированных эритроцитами барана (ЭБ) животных (по 13 мышей каждой линии) определяли иммунную реактивность на антиген по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке. ЭБ вводили в дозе 5 · 10<sup>8</sup> клеток в 0.5 мл физиологического раствора, однократно, внутривенно в хвостовую вену.

Кровь забирали после мгновенной декапитации мышшей в пробирки, содержащие K<sub>3</sub>EDTA (Becton Dickinson, США). Селезенку у иммунизированных мышшей извлекали на холоде на 4-й день после введения антигена ЭБ и помещали ее в пробирки с охлажденной средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США). Структуры мозга выделяли на холоде, пробирки с образцами немедленно после выделения помещали в жидкий азот и переносили в холодильник с температурой –70 °С до последующего определения в них антител.

**Для определения субпопуляций клеток** в периферической крови 25 мкл крови инкубировали в течение 30 мин в защищенном от света месте с 1.5 мкл (0.2–0.5 мкг/мкл)

меченных крысиных антимышиных моноклональных антител к поверхностным маркерам клеток: CD3 (allophycocyanin, APC), CD4 (peridinin-chlorophyll protein, perCP), CD8 (phycoerythrin, PE), CD25 (Brilliant Violet 421), CD19 (fluorescein isothiocyanate, FITC) (все антитела производства BD Pharmingen™, США). Лизис эритроцитов в исследуемых пробах осуществляли раствором BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, США). После 10-минутной инкубации клетки однократно отмывали в избытке фосфатно-солевого раствора (PBS). Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS.

Чтобы определить субпопуляции лимфоцитов в селезенке, ее механически измельчали и готовили однородную клеточную суспензию. Полученную клеточную взвесь фильтровали через нейлоновый фильтр (размер пор 50 мкм) и дважды промывали в избытке среды RPMI-1640. Клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640, концентрацию клеток доводили до  $1 \cdot 10^6/100$  мкл суспензии и помещали в планшеты в объеме 100 мкл на лунку. Суспензию клеток инкубировали с теми же антителами, что и клетки крови, в течение 20 мин и фиксировали после окрашивания в 1 % растворе формальдегида. В качестве контроля использовали изотипические антитела.

Исследование популяций клеток проводили на точном цитофлуориметре FACS CANTO™ II (Becton Dickinson) с использованием многоэтапного гейтирования. В каждом образце анализировали не менее 50000 клеток с единичными настройками для всех проб. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения FACSDiva. Находили содержание  $CD3^+$  лимфоцитов,  $CD3^+CD4^+$  Т-хелперов,  $CD3^+CD8^+$  в основном цитотоксических/супрессорных Т-лимфоцитов,  $CD3^+CD4^+CD25^+$  Т-регуляторных клеток и  $CD19^+$  В-лимфоцитов в процентах от общего количества клеток. По соотношению процентного содержания  $CD4^+$  к  $CD8^+$  Т-клеткам вычисляли иммунорегуляторный индекс.

**Цитокины в структурах мозга.** Для анализа цитокинов готовили детергент-растворимые фракции тканей мозга. Пробы размораживали на льду, гомогенизировали в охлажденном до  $+4^\circ\text{C}$  лизирующем буфере, содержащем PBS (рН 7.4), 0.1 % Тритон X-100, 1 mM EDTA и 1 mM PMSF, с помощью пластиковых пестиков. Гомогенаты инкубировали на льду в течение 30–40 мин. Полученные экстракты тканей центрифугировали (Centrifuge 5415 R) при температуре  $+4^\circ\text{C}$  и 4500 об/мин в течение 20 мин. В супернатантах определяли концентрации цитокинов. Концентрацию нормировали на вес ткани (пг/г ткани).

Содержание цитокинов в гомогенатах мозга определяли согласно протоколу фирмы-производителя методом мультиплексного иммунного анализа на мультиплексном анализаторе белков и нуклеиновых кислот Milliplex Luminex 200 (Merk Millipore) с помощью набора Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения xPONENT и Analyst.

**Антителообразующие клетки.** Иммунный ответ оценивали по относительному (на  $10^6$  клеток селезенки) и абсолютному (на общее число клеток в селезенке) числу IgM-АОК общепринятым методом (Ladics, 2007).

**Статистический анализ** данных выполняли в программе STATISTICA 10.0. Соответствие полученных значений нормальному распределению оценивали с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. При нормальном распределении показателей (содержание Т-клеток и их субпопуляций и В-клеток) достоверность различий в группах оценивали однофакторным дисперсионным анализом ANOVA. В случае ненормального распределения (содержание цитокинов и число АОК) сравнение выборок проводилось с использованием критерия Манна–Уитни. Данные представляли как среднее  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Выявленные различия считали статистически значимыми при величине  $p < 0.05$ .

## Результаты

**Содержание Т-клеток, их субпопуляций и В-клеток в периферической крови и селезенке у мышей линии *Disc1-Q31L*.** У неиммунизированных мышей линии *Disc1-Q31L* в периферической крови содержание всех исследованных иммунокомпетентных клеток отличалось от уровня клеток у WT мышей. Процентное содержание  $CD3^+$  Т-лимфоцитов было более высоким по сравнению с неиммунизированными мышами дикого типа ( $F(1.18) = 45.2, p < 0.001$ ). При этом анализ субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что процентное содержание  $CD3^+CD4^+$  Т-хелперов у этих мышей было увеличено ( $F(1.17) = 15.5, p < 0.01$ ), а количество  $CD3^+CD8^+$  Т-цитотоксических/супрессорных клеток, напротив, снижено по сравнению с WT мышами ( $F(1.17) = 12.6, p < 0.01$ ). В результате иммунорегуляторный индекс, определяемый как отношение содержания  $CD4^+$  к  $CD8^+$  Т-лимфоцитам, у мутантных мышей был в 1.3 раза выше ( $F(1.18) = 27.5, p < 0.01$ ), чем у мышей дикого типа. Содержание регуляторных Т-клеток с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD25^+$  у линии *Disc1-Q31L* также было выше, чем у WT мышей ( $F(1.17) = 5.3, p < 0.05$ ). Количество  $CD19^+$  В-лимфоцитов в периферической крови у мутантных мышей было снижено по сравнению с мышами дикого типа ( $F(1.17) = 5.7, p < 0.05$ ) (см. таблицу).

В отличие от увеличения числа  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в крови, в селезенке их процентное содержание снижалось ( $F(1.18) = 10.58, p < 0.01$ ). Субпопуляции же  $CD3^+CD4^+$  Т-хелперов ( $F(1.18) = 0.68, p > 0.05$ ),  $CD3^+CD4^+CD25^+$  Т-регуляторных клеток ( $F(1.18) = 0.23, p > 0.05$ ),  $CD3^+CD8^+$  Т-цитотоксических/супрессорных клеток ( $F(1.18) = 1.66, p > 0.05$ ), отношение  $CD4^+/CD8^+$  Т-клеток ( $F(1.18) = 1.36, p > 0.05$ ), а также  $CD19^+$  В-клеток ( $F(1.18) = 0.23, p > 0.05$ ) мало отличались от соответствующих уровней в селезенке у WT мышей (см. таблицу).

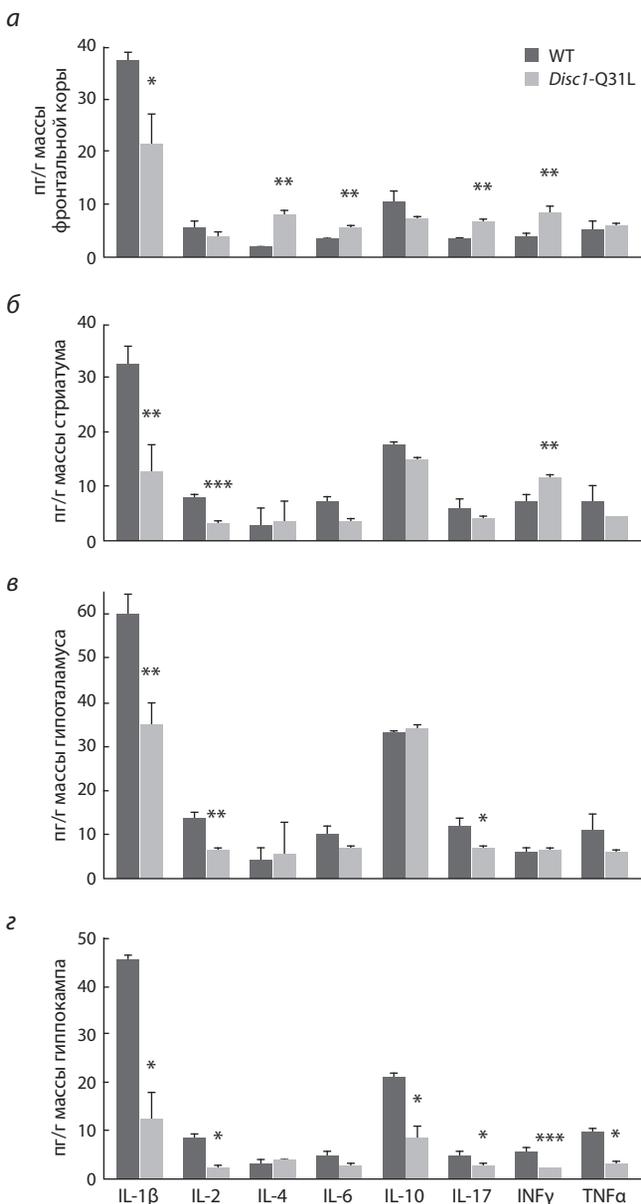
**Цитокины в структурах мозга у мышей линии *Disc1-Q31L*.** Анализ профиля цитокинов в мозге у интактных мышей линии *Disc1-Q31L* выявил существенные различия в содержании цитокинов у мутантных и WT мышей, которые зависели от исследуемой структуры (рис. 1).

Во фронтальной коре у мышей линии *Disc1-Q31L* обнаружено повышение уровня трех из пяти исследованных провоспалительных цитокинов – IL-6 ( $p < 0.01$ ), IL-17 ( $p < 0.01$ ) и IFN $\gamma$  ( $p < 0.01$ ) и снижение IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) по сравнению с аналогичными показателями у WT мышей. Уровень IL-2 и TNF $\alpha$  не изменялся ( $p > 0.05$ ). Что касается противовоспалительных цитокинов, то содержание

Содержание субпопуляций T- и В-лимфоцитов (%) у мышей линии *Disc1-Q31L* в крови и селезенке (M ± m)

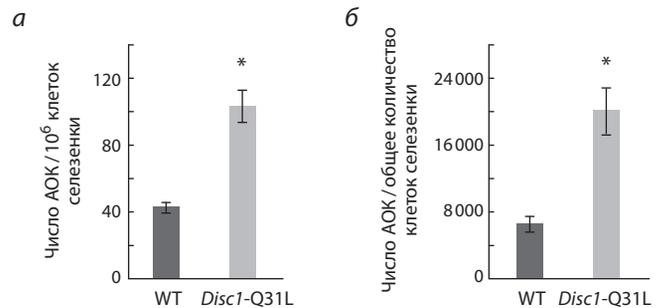
CD-маркеры клеток	Кровь		Селезенка	
	WT	<i>Disc1-Q31L</i>	WT	<i>Disc1-Q31L</i>
CD3 <sup>+</sup>	30.8 ± 0.8	37.8 ± 0.7***	36.8 ± 1.1	26.4 ± 1.0**
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	62.6 ± 0.8	68.3 ± 1.4**	59.9 ± 0.6	59.0 ± 9.7
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	6.3 ± 0.5	8.3 ± 0.7*	10.7 ± 0.4	10.5 ± 0.3
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	35.5 ± 0.6	30.1 ± 1.5**	35.9 ± 0.7	36.9 ± 0.5
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1.8 ± 0.05	2.3 ± 0.09**	1.67 ± 0.05	1.61 ± 0.04
CD19 <sup>+</sup>	64.4 ± 1.4	60.6 ± 1.1*	59.9 ± 1.8	59.0 ± 0.7

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с WT мышами (ANOVA анализ). В каждой группе 9–10 животных.



**Рис. 1.** Содержание цитокинов в структурах мозга: во фронтальной коре (а), стриатуме (б), гипоталамусе (в) и гиппокампе (г) у WT и *Disc1-Q31L* мышей.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с WT мышами (тест Манна–Уитни). В каждой группе 10 животных.



**Рис. 2.** Относительное (а) и абсолютное (б) число АОК в селезенке WT и *Disc1-Q31L* мышей на 4-й день после иммунизации эритроцитами барана ( $5 \cdot 10^8$ ).

\*  $p < 0.001$  по сравнению с WT мышами (тест Манна–Уитни). В каждой группе 13 животных.

IL-10 не изменялась ( $p > 0.05$ ), а IL-4 было более высоким ( $p < 0.01$ ), чем у WT мышей (см. рис. 1, а).

В стриатуме мутантных мышей показано увеличение количества  $IFN\gamma$  ( $p < 0.01$ ) по сравнению с мышами дикого типа. При этом содержание других провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ), IL-2 ( $p < 0.001$ ) – было снижено, а IL-6, IL-17 и TNF $\alpha$  не изменялось ( $p > 0.05$ ), так же как и количество противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 ( $p > 0.05$ ) (см. рис. 1, б).

В гипоталамусе мышей линии *Disc1-Q31L* содержание IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ), IL-2 ( $p < 0.01$ ) и IL-17 ( $p < 0.05$ ) было меньше, чем у WT мышей. Уровень остальных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10,  $IFN\gamma$ , TNF $\alpha$ ) не изменялся ( $p > 0.05$ ) (см. рис. 1, в).

В гиппокампе у *Disc1-Q31L* мышей был снижен уровень провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-17, TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) и особенно  $IFN\gamma$  ( $p < 0.001$ ), а содержание IL-6 оставалось на уровне мышей дикого типа ( $p > 0.05$ ). Противовоспалительный цитокин IL-10 тоже понижался ( $p < 0.05$ ) при неизменном содержании IL-4 ( $p > 0.05$ ) (см. рис. 1, г).

**Иммунная реакция мышей линии *Disc1-Q31L* на антиген.** Иммунизация *Disc1-Q31L* мышей ЭБ вызвала значительно более высокий иммунный ответ на пике его развития в селезенке, чем у WT мышей. Относительное ( $p < 0.001$ ) и абсолютное ( $p < 0.001$ ) число АОК у *Disc1-Q31L* мышей значительно превышало эти показатели у мышей дикого типа (рис. 2).

## Обсуждение

Известно, что мутации, изменяющие функционирование белка DISC1, кодируемого одноименным геном, играют роль в развитии различных психических заболеваний, таких как шизофрения, депрессия, биполярное расстройство и др. (Lipina et al., 2010, 2013, 2014; Hikida et al., 2012; Mathieson et al., 2012). Наблюдаемые при этом иммунные нарушения затрагивают разные стороны функционирования иммунной системы и имеют характерные для каждой патологии черты. Так, типичными признаками шизофрении являются увеличение количества В-клеток, снижение Т-клеток, CD4<sup>+</sup> Т-хелперов, отношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клеток в сыворотке крови (Steiner et al., 2010). Сходные изменения с увеличением CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и иммунорегуляторного индекса, а также усиление иммунного ответа на антиген отмечаются при моделировании различных форм агрессивного поведения (Девоино и др., 2009; Idova et al., 2015; Takahashi et al., 2018).

Депрессия же, напротив, сопровождается повышением уровня CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-супрессорных/цитотоксических клеток, снижением иммунорегуляторного индекса и подавлением иммунной реакции на антиген (Alperina et al., 2007; Девоино и др., 2009; Haroon et al., 2012; Felger, Lotrich, 2013; Idova et al., 2013).

Как показано в настоящем исследовании, у интактных мышей линии *Disc1*-Q31L в периферической крови происходит увеличение содержания CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и их субпопуляции – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток, а также иммунорегуляторного индекса. При этом в селезенке *Disc1*-Q31L мышей отмечается более низкое, по сравнению с мышами дикого типа, процентное содержание CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, что приводит к преобладанию CD19<sup>+</sup> В-клеток и свидетельствует о перераспределении этих субпопуляций в иммунной системе.

Динамическое перераспределение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, продуцирующих свой набор цитокинов, и их соотношение в иммунокомпетентных органах в значительной мере влияют на иммунологические и воспалительные процессы при наследственно обусловленном поведении и психопатологиях (Ottaway, Husband, 1994; Девоино и др., 2009), что, вероятно, и определило высокую способность *Disc1*-Q31L мышей отвечать на антиген, о чем можно судить по увеличенному числу АОК.

Картина распределения цитокинов в структурах мозга у интактных мышей линии *Disc1*-Q31L существенно отличается от мышей дикого типа и зависит от области, в которой они локализованы. При этом только во фронтальной коре отмечалось одновременное повышение, по сравнению с WT мышами, трех типов провоспалительных цитокинов – IL-6, IL-17 и IFN $\gamma$ , известных сигнальных молекул нейровоспаления, которые вовлечены в патофизиологию депрессии, биполярного расстройства и шизофрении (Григорьян и др., 2014; Lesh et al., 2018). Эта структура играет важную роль в когнитивных реакциях, и ее дисфункция вносит важный вклад в этиологию многих психопатологий (Clarpcote et al., 2007).

В стриатуме, в отличие от WT мышей, имело место повышение лишь IFN $\gamma$ , тогда как концентрация остальных цитокинов была снижена. В гиппокампе и гипоталамусе

тоже отмечалось снижение провоспалительных цитокинов по сравнению с WT мышами. Выявленное у мышей группы *Disc1*-Q31L нарушение цитокинового баланса позволяет полагать, что наличие данной мутации ассоциировано с нейровоспалением, одним из патогенетических признаков аффективных расстройств. Наблюдаемое при этом повышение количества провоспалительного IL-4 во фронтальной коре, где происходил наиболее выраженный подъем провоспалительных цитокинов, можно рассматривать как действие фактора, направленное на сдерживание процесса нейровоспаления. Полученные результаты согласуются с существующими данными о том, что формирование различных форм депрессивноподобного поведения и агрессии у животных сопряжено со значительными изменениями соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в таких областях мозга, как гиппокамп и фронтальная кора (Takahashi et al., 2018; Alperina et al., 2019; Idova et al., 2019).

Ген *DISC1* образует комплекс с некоторыми транскрипционными факторами внутри ядра и тем самым может существенно модулировать экспрессию многих генов и оказывать влияние на поведение (Lipina, Roder, 2014). Что касается мышей линии *Disc1*-Q31L, то литературные сведения об особенностях их поведения противоречивы. Большинство авторов установлено преобладание у этой линии депрессивноподобного поведения (Lipina et al., 2013; Dubrovina et al., 2018; Serykh et al., 2020). Согласно же другим авторам, поведение *Disc1*-Q31L мышей не отличается от контроля (Shoji et al., 2012) или, как показано недавно, включает элементы агрессии (Serykh et al., 2020). В нашем исследовании выявлена более высокая иммунная реактивность мутантных мышей по сравнению с дикими, что существенно отличает этих животных от других моделей депрессии, в которых, как отмечалось выше, наблюдается подавление иммунной функции (Alperina et al., 2007; Девоино и др., 2009; Idova et al., 2013). В то же время характеристика иммунитета у мышей линии *Disc1*-Q31L в большей степени соответствует таковой у агрессивных животных. Очевидно, это связано с тем, что мыши данной линии обладают смешанным поведенческим фенотипом и наряду с депрессивным поведением могут проявлять повышенную агрессивность (Serykh et al., 2020), ассоциированную с усилением иммунной функции и определенным структурным паттерном цитокинов.

Механизмы, лежащие в основе выявленных у *Disc1*-Q31L мышей изменений иммунных параметров на периферии и цитокинового профиля в структурах мозга, до настоящего времени не известны. Вместе с тем установлено, что цитокины участвуют не только в обеспечении иммунологических реакций, но и во взаимодействии иммунной и нейроэндокринной систем. Оказывая влияние на активность центральных нейромедиаторных систем, они вносят вклад в когнитивные, поведенческие и структурные нарушения в мозге при психических заболеваниях (Григорьян и др., 2014; Lesh et al., 2018). Можно полагать, что особенности иммунного статуса мышей линии *Disc1*-Q31L ассоциированы с нейрхимической картиной мозга, присущей этой линии. Так, у них в прилежащем ядре, принимающем участие в нейроиммуномодуляции (Saurer et al., 2006; Девоино и др., 2009; Альперина, 2014), сни-

жается уровень DA, но повышается содержание DOPAC (Lipina et al., 2013). Соотношение DOPAC/DA, которое отражает активность распада DA и активность синаптических процессов, увеличивается при иммуностимуляции в условиях формирования агрессивного поведения, связанного с повышением активности DA системы (Девойно и др., 2009; Альперина, 2014). Учитывая изменение активности DA системы в структурах мозга у *Disc1*-Q31L мышей (Lipina et al., 2013), а также ее роль в агрессивном поведении и процессе нейроиммунотуляции (Saurer et al., 2006; Девойно и др., 2009; Альперина, 2014), кажется вероятным, что DA мозга включен в механизмы повышения иммунной функции, выявленной у мышей линии *Disc1*-Q31L.

Однако в настоящее время трудно сказать, меняется ли профиль цитокинов под воздействием характерного для *Disc1*-Q31L нейромедиаторного фона или измененное содержание цитокинов является первичным признаком при мутации Q31L. К тому же известно, что как нейромедиаторы могут воздействовать на продукцию цитокинов (Kawano et al., 2018), так и цитокины влияют на нейромедиаторную нейропередачу и могут изменять нейрохимическую картину мозга (Dunn, 2006; Felger, Lotrich, 2013).

## Заключение

Результаты нашего исследования показали, что наличие точечной мутации Q31L (замещение глутамин на лейцин в 31-м положении) в гене *DISC1* оказывает влияние на состояние иммунной системы и характеризуется усилением периферического T-клеточного звена с повышением субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток, а также более высокой способностью клеток селезенки отвечать на антиген. Наряду с периферическими иммунными показателями существенно меняется паттерн распределения про- и противовоспалительных цитокинов в структурах мозга, включенных в контроль различных форм поведения и иммунной функции. Линия мышей *Disc1*-Q31L может использоваться для дальнейшего изучения взаимосвязи генетических факторов и нейроиммунологических механизмов и их роли в развитии психоэмоциональных расстройств.

## Список литературы / References

Альперина Е.Л. Вклад допаминергической системы в механизмы иммуномодуляции. *Успехи физиол. наук.* 2014;45(3):45-56. <https://elibrary.ru/item.asp?id=22265117>  
[Al'perina E.L. Involvement of the dopaminergic system in the mechanisms of immunomodulation. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Advances in Physiological Sciences.* 2014;45(3):45-56. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=22265117>. (in Russian)]  
Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степанчиков М.Ю., Гуляева Н.В. Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. Роль глюкокортикоидов, цитокинов, нейротрансмиттеров и трофических факторов в генезе депрессивных расстройств. *Успехи физиол. наук.* 2014;45(2):3-19.  
[Grigor'yan G.A., Dygalo N.N., Gekht A.B., Stepanichev M.Iu., Gulyaeva N.V. Molecular and cellular mechanisms of depression. Role of glucocorticoids, cytokines, neurotransmitters, and trophic factors in genesis of depressive disorders. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Advances in Physiological Sciences.* 2014;45(2):3-19. (in Russian)]

Девойно Л.В., Идова Г.В., Альперина Е.Л. Психонейроиммунотуляция: поведение и иммунитет. Роль «нейромедиаторной» установки мозга. Новосибирск: Наука, 2009. <https://elibrary.ru/item.asp?id=19548477>  
[Devoyno L.V., Idova G.V., Alperina E.L. Psychoneuroimmunomodulation: Behavior and Immunity. A Role of "Neuromediator Pattern of the Brain". Novosibirsk: Nauka Publ., 2009. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=19548477> (in Russian)]  
Alperina E., Idova G., Zhukova E., Zhanaeva S., Kozhemyakina R. Cytokine variations within brain structures in rats selected for differences in aggression. *Neurosci. Lett.* 2019;692:193-198. DOI 10.1016/j.neulet.2018.11.012.  
Alperina E.L., Kulikov A.V., Popova N.K., Idova G.V. Immune response in mice of a new strain ASC (Antidepressants Sensitive Catelepsy). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007;144(2):221-223. DOI 10.1007/s10517-007-0294-5.  
Clapcote S.J., Lipina T.V., Millar J.K., Mackie S., Christie S., Ogawa F., Lerch J.P., Trimble K., Uchiyama M., Sakuraba Y., Kaneda H., Shiroishi T., Houslay M.D., Henkelman R.M., Sled J.G., Gondo Y., Porteous D.J., Roder J.C. Behavioral phenotypes of *Disc1* missense mutations in mice. *Neuron.* 2007;54(3):387-402. DOI 10.1016/j.neuron.2007.04.015.  
Dantzer R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiol. Rev.* 2018;98(1):477-504. DOI 10.1152/physrev.00039.2016.  
Dubrovina N.I., Khrapova M.V., Lipina T.V. Characteristics of the formation of memories relating to fear in mice with depression- and schizophrenia-like phenotypes: effects of gender and age. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2018;48(4):488-495. DOI 10.1007/s11055-018-0590-8.  
Dunn A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin. Neurosci. Res.* 2006;6(1-2):52-68. DOI 10.1016/j.cnr.2006.04.002.  
Felger J.C., Lotrich F.E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience.* 2013;246:199-229. DOI 10.1016/neuroscience.2013.04/060.  
Haroon E., Raison C.L., Miller A.H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37(1):137-162. DOI 10.1038/npp.2011.205.  
Hikida T., Gamo N.J., Sawa A. DISC1 as a therapeutic target for mental illnesses. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2012;16(12):1151-1160. DOI 10.1517/14728222.2012.719879.  
Idova G., Alperina E., Gеворгян М., Zhukova E., Kulikov A., Yur'ev D. T-lymphocyte subpopulation composition and the immune response in depression-like behavior in ASC mice. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2013;43(8):946-950. DOI 10.1007/s11055-013-9833-x.  
Idova G., Alperina E., Plyusnina I., Gеворгян М., Zhukova E., Koshenchenko M., Kozhemyakina R., Wang S.W. Immune reactivity in rats selected for the enhancement or elimination of aggressiveness towards humans. *Neurosci. Lett.* 2015;609:103-108. DOI 10.1016/j.neulet.2015.10.027.  
Idova G.V., Al'perina E.L., Zhanaeva S.Ya., Gеворгян М.М., Rogozhnikova A.A. Cytokine content in the hypothalamus and hippocampus of C57BL/6J mice with depressive-like behavior. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;167(1):11-16. DOI 10.1007/s10517-019-04450-y.  
Idova G., Gеворгян М., Alperina E., Zhanaeva S.Ya., Markova E.V. Cytokine production by splenic cells in C57BL/6J mice with depressive-like behavior depends on the duration of social stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018;164(5):645-649. DOI 10.1007/s10517-018-4050-9.  
Kawano M., Takagi R., Saika K., Matsui M., Matsushita S. Dopamine regulates cytokine secretion during innate and adaptive immune responses. *Int. Immunol.* 2018;30(12):591-606. DOI 10.1093/intimm/dxy057.  
Ladies G.S. Primary immune response to sheep red blood cells (SRBC) as the conventional T-cell dependent antibody response (TDAR) test. *J. Immunotoxicol.* 2007;4(2):149-152. DOI 10.1080/15476910701337357.

- Lesh T.A., Careaga M., Rose D.R., McAllister A.K., Van de Water J., Carter C.S. Ashwod P. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia and bipolar disorder: relationships to brain structure and symptom. *J. Neuroinflammation*. 2018;15:165. DOI 10.1186/s12974-018-1197-2s.
- Lipina T.V., Fletcher P.J., Lee F.H., Wong A.H., Roder J.C. Disrupted-in-schizophrenia-1 Gln31Leu polymorphism results in social anhedonia associated with monoaminergic imbalance and reduction of CREB and  $\beta$ -arrestin-1,2 in the nucleus accumbens in a mouse model of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(3):423-436. DOI 10.1038/npp.2012.197.
- Lipina T.V., Niwa M., Jaaro-Peled H., Fletcher P.J., Seeman P., Sawa A., Roder J.C. Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. *Brain Behav*. 2010;9:777-789. DOI 10.1111/j.1601-183X.2010.00615.x.
- Lipina T.V., Roder J.C. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) interactome and mental disorders: impact of mouse models. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2014;45:271-294. DOI 10.1016/j.neubiorev.2014.07.001.
- Mathieson I., Munafò M.R., Flint J. Meta-analysis indicates that common variants at the DISC1 locus are not associated with schizophrenia. *Mol. Psychiatry*. 2012;17(6):634-641. DOI 10.1038/mp.2011.41.
- Ottaway C.A., Husband A. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol. Today*. 1994;5(11):511-571. DOI 10.1016/0167-5699(94)90206-2.
- Saurer T.B., Carrigan K.A., Ijames S.G., Lysle D.T. Suppression of natural killer cell activity by morphine is mediated by the nucleus accumbens shell. *J. Neuroimmunol*. 2006;173(1-2):3-11. DOI 10.1016/j.jneuroim.2005.11.009.
- Serykh A., Khrapova M.V., Dubrovina N.I., Petrova E.S., Mikhnevich N., Starostina M.V., Amstyslavskaja T.G., Lipina T.V. The increased density of the habenular neurons, high impulsivity, aggression and resistant fear memory in *Disc1*-Q31L genetic mouse model of depression. *Behav. Brain Res*. 2020;392:112693. DOI 10.1016/j.bbr.2020.112693.
- Shoji H., Toyama K., Takamiya Y., Wakana S., Gondo Y., Miykawa T. Comprehensive behavioral analysis of ENU-induced *Disc1*-Q31L and -L100P mutant mice. *BMC Res. Notes*. 2012;5:108. DOI 10.1186/1756-0500-5-108.
- Steiner J., Jacobs R., Panteli B., Brauner M., Schiltz K., Bahn S., Herberth M., Westphal S., Gos T., Walter M., Bernstein H.G., Myint A.M., Bogerts B. Acute schizophrenia is accompanied by reduced T cell and increased B cell immunity. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*. 2010;260(7):509-518. DOI 10.1007/s00406-010-0098-x.
- Takahashi A., Flanigan M.E., McEwen B.S., Russo S.J. Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. *Front. Behav. Neurosci*. 2018;12:56. DOI 10.3389/fnbeh.2018.00056.

---

**Благодарности.** Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № АААА-А16-116021010228-0). Авторы выражают благодарность м.н.с. Е.В. Мельниковой за техническую помощь и консультацию при постановке метода проточной цитофлуориметрии.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.02.2020. После доработки 19.08.2020. Принята к публикации 19.08.2020.

# The cell cycle regulatory gene polymorphisms *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) in lung cancer: a meta-analysis

O. Bulgakova , A. Kussainova, R. Bersimbaev

L.N. Gumilyov Eurasian National University, Institute of Cell Biology and Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan

 e-mail: ya.summer13@yandex.kz

**Abstract.** Lung cancer is one of the most common types of cancer in the world. Although the mechanism of lung cancer is still unknown, a large number of studies have found a link between gene polymorphisms and the risk of lung cancer. The tumor suppressor p53 plays a crucial role in maintaining genomic stability and tumor prevention. MDM2 is a critical regulator of the p53 protein. Despite the importance of p53 pathway in cancer, data on the contribution of SNPs of *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) to the development of lung cancer are very contradictory. A meta-analysis that collects quantitative data from individual studies and combines their results has the advantage of improving accuracy, providing reliable estimates, and resolving those issues in which studies on individual associations are not effective enough. The aim of this study was to determine whether the *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) polymorphisms confer susceptibility to lung cancer. A meta-analysis was conducted on the associations between the *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) polymorphisms and lung cancer. A total of 51 comparison studies including 25,366 patients and 25,239 controls were considered in this meta-analysis. The meta-analysis showed no association between lung cancer and *MDM2* (*rs2279744*) under any model. A noteworthy association of *TP53* (*rs1042522*) with susceptibility to lung cancer in overall pooled subjects was observed under three different models (allele contrast, homozygote contrast (additive) and dominant). Stratification by ethnicity indicated an association between the *TP53* (*rs1042522*) and lung cancer in Asians and Caucasians. This meta-analysis demonstrates that the *TP53* (*rs1042522*), but not *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism may confer susceptibility to lung cancer.

Key words: *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) gene polymorphism; lung cancer; meta-analysis.

**For citation:** Bulgakova O., Kussainova A., Bersimbaev R. The cell cycle regulatory gene polymorphisms *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) in lung cancer: a meta-analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):777-784. DOI 10.18699/VJ20.673

## Полиморфизмы генов *TP53* (*rs1042522*) и *MDM2* (*rs2279744*) в раке легкого: метаанализ

O. Булгакова , А. Кусаинова, Р. Берсимбаев

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Институт клеточной биологии и биотехнологии, Нур-Султан, Казахстан

 e-mail: ya.summer13@yandex.kz

**Аннотация.** Рак легкого – один из наиболее распространенных видов рака в мире. Хотя механизм возникновения заболевания по-прежнему остается в значительной степени неизвестным, благодаря многочисленным исследованиям была выявлена связь между полиморфизмами генов и риском развития рака легкого. Решающую роль в поддержании стабильности генома и профилактике опухолей играет онкосупрессор p53. Ключевым регулятором белка p53 является MDM2. Несмотря на важность p53 сигнального пути в канцерогенезе, данные о вкладе SNP *TP53* (*rs1042522*) и *MDM2* (*rs2279744*) в развитие рака легкого очень противоречивы. Метаанализ, собирающий количественные данные из отдельных исследований и объединяющий их результаты, имеет преимущество, которое заключается в повышении точности, предоставлении надежных оценок и решении тех вопросов, когда исследование отдельных ассоциаций недостаточно эффективно. Целью нашей работы было изучение роли полиморфизмов *TP53* (*rs1042522*) и *MDM2* (*rs2279744*) в формировании предрасположенности к раку легкого. Проведен метаанализ ассоциации полиморфизмов *TP53* (*rs1042522*) и *MDM2* (*rs2279744*) и рака легкого. В общей сложности рассмотрено 51 исследование типа «случай–контроль», включающее 25 366 пациентов с раком легкого и 25 239 здоровых индивидуумов. Результаты метаанализа показали отсутствие связи между раком легкого и *MDM2* (*rs2279744*) во всех моделях. Примечательно, что ассоциация *TP53* (*rs1042522*) с предрасположенностью к раку легкого наблюдалась в трех разных моделях (мультипликативная, аддитивная и доминантная). Стратификация по этническому признаку также указывает на связь между *TP53* (*rs1042522*) и риском развития рака легкого как в азиатской, так и в европейской популяции. Проведенный метаанализ позволяет сделать вывод, что полиморфизм *TP53* (*rs1042522*), но не *MDM2* (*rs2279744*), может обуславливать предрасположенность к раку легкого.

Ключевые слова: полиморфизм генов *TP53* (*rs1042522*) и *MDM2* (*rs2279744*); рак легкого; метаанализ.

## Introduction

Lung cancer remains one of the most common forms of cancer in the world. Every year World Health Organization (WHO) includes lung cancer in the lists of the leading cause of death worldwide. Thus, there were 2.1 million cases of lung cancer and 1.8 million deaths in 2018 (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Cancer incidence rate varies in different regions of our planet, so the highest incidence of lung cancer is observed in Eastern Europe and Central and East Asia (Bray et al., 2018).

A large number of researches have been conducted to study the molecular base of lung cancer. One of the risk factors for the development of pulmonary neoplasms is genes polymorphisms. The main cause of carcinogenesis is disorders in the regulation of cell cycle control. The tumor suppressor gene *TP53* plays an important role in regulating the cell cycle. p53 protein is known as the “guardian of the genome”. p53 regulates many genes expression in response to cellular stress induced by various adverse environmental factors (Haronikova et al., 2019). This protein plays a key role in processes such as DNA repair, cell cycle arrest, apoptosis and senescence (Nicolai et al., 2015). *MDM2* is a key regulator of p53 protein activity and degradation. Polymorphic variants of the *TP53* and *MDM2* genes have been found in various types of cancer, including lung cancer. Analysis of the literature data showed that polymorphisms of the *TP53 Arg72Pro* (*rs1042522*) and *MDM2 SNP309* (*rs2279744*) genes cause an increased predisposition to tumor development. The *TP53* (*rs1042522*) gene polymorphism is localized on chromosome 17 position 7676154 Genotype frequency in the Caucasian population GG: 0.074, CC: 0.503, CG: 0.423. In the East Asian population, GG: 0.173, CC: 0.345, CG: 0.482 (<http://www.ensembl.org/>).

Meta-analyses have shown that the *TP53 Arg72Pro* polymorphic allele is associated with the development of stomach cancer (Xiang et al., 2012), bladder (Xu et al., 2012), colorectal cancer (Tian et al., 2017) and acute lymphocytic leukemia (Tian et al., 2016). However, no association was found between *TP53 Arg72Pro* and the risk of acute myeloid leukemia (Tian et al., 2016), oral squamous cell carcinoma (Sun et al., 2018), and esophagus cancer (Jiang et al., 2011).

The polymorphic allele of the *MDM2* gene *rs2279744* is located at 68808800 position on chromosome 12 Genotype frequency in the Caucasian population TT: 0.404, GG: 0.113, GT: 0.483. In the East Asian population TT: 0.200, GG: 0.276, GT: 0.524 (<http://www.ensembl.org/>). The *MDM2 SNP309* polymorphism was also found to increase the risk of colorectal cancer (Qin et al., 2013), breast cancer (Cheng et al., 2012) and liver cancer (Tang et al., 2014). But there was no association with prostate, urinary tract (Ding et al., 2016) and stomach (Ma et al., 2013).

Many population studies have been conducted on the influence of the mutant alleles *TP53 Arg72Pro* (*rs1042522*) and *MDM2 SNP309* (*rs2279744*) on the predisposition to the development of pulmonary neoplasia. It was shown that the polymorphism of the *TP53 Arg72Pro* gene is associated with a high risk of small cell lung cancer among Spaniards (Fernández-Rubio et al., 2008). Similar data were found for non-small cell lung cancer in Norwegians (Lind et al., 2007) and Poles (Szymanowska et al., 2006), squamous cell lung

cancer in German residents (Popanda et al., 2007), and lung adenocarcinoma in the Chinese population (Zhang X. et al., 2006; Ren et al., 2013).

Data on the contribution of *MDM2 SNP309* to the development of lung cancer are very contradictory. Most studies have shown an association of the *MDM2* (*rs2279744*) mutant allele with a high risk of lung tissue carcinogenesis (Enokida et al., 2014; Wang X. et al., 2015; Li, 2017). However, Pine et al. (2006) did not find that *MDM2 SNP309* is associated with lung neoplasia in the European population.

The data on the association of polymorphisms of the *TP53* genes *Arg72Pro* (*rs1042522*) and *MDM2 SNP309* (*rs2279744*) with the development of tumors as a whole are very contradictory. Therefore, it would be interesting to perform a meta-analysis on the association of *TP53 Arg72Pro* (*rs1042522*) and *MDM2 SNP309* (*rs2279744*) with a risk of developing lung cancer in Asian and European populations.

## Materials and methods

**Search strategy.** Search for relevant studies was conducted using online databases, such as Scopus, PubMed and Web of Science. The search strategy was performed using a combination of the following keywords: “*TP53*”, “MURINE DOUBLE MINUTE 2” or “*MDM2*”, “polymorphism”, “SNP”, “*rs1042522*”, “*rs2279744*”, “*Arg72Pro*”, “*codon 72 Arg*”, “c.215C > G”, “*SNP309*”, “c.291 T > G” “lung cancer”, “non-small cell lung cancer”, “association”.

**Inclusion and exclusion criteria.** The eligible inclusion criteria for the meta-analysis were (i) case-control study, (ii) identification of different histological types of lung cancer which was confirmed histologically or pathologically, (iii) having an available genotype for estimating an odds ratio (OR) with 95 % confidence interval (95 % CI), (iv) genotype frequencies in controls were consistent with those expected from Hardy–Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ).

The studies were excluded when (i) they were not case-control studies, (ii) with duplicated data from previous articles, (iii) they were not original articles, e. g. review, (iv) inadequate genotype data were available.

**Data extraction and quality assessment.** Two researchers (O.B. and A.K.) evaluated the eligibility of all retrieved studies and extracted the pertinent data from the specified publications in standardized tables. The extracted data included: (i) the first author name, (ii) publication year, (iii) ethnicity, (iv) lung cancer patients and healthy controls sample size for each studied polymorphism. Disagreement was resolved by consulting with a third investigator (R.B.). The study quality was assessed in accordance with the Newcastle–Ottawa Scale (NOS) (Wells et al., 2009).

**Statistical analysis.** Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in control population was assessed utilizing the “Calculation of Chi-square test for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium” online software (<http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm>). The statistical analysis was performed using Comprehensive Meta Analysis version 2.2.064 (Biosta, Englewood, NJ, USA). Estimates were summarized as ORs with 95 % CIs for each study. The heterogeneity was evaluated by using the  $I^2$  index. An  $I^2$  value of  $> 50\%$  was considered to indicate high heterogeneity (Lee, 2015). The random effects model for analysis was used in case

**Table 1.** Characteristics of the studies of *TP53* (*rs1042522*) polymorphism included in the meta-analysis

First author, year	Lung cancer			Control			Ethnicity	<i>p</i> (HWE) Control
	GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Kawajiri, 1993	148	127	53	144	165	38	Asian	0.65
Murata, 1996	80	89	22	53	76	23		0.59
Wang Y., 1999	68	74	52	47	75	30		0.56
Pierce, 2000	41	51	19	82	65	23		0.67
Hiraki, 2003	68	99	24	90	106	43		0.60
Sakiyama, 2004	398	460	144	302	310	73		0.67
Zhang X., 2006	321	506	279	425	731	264		0.56
Jung, 2008	108	130	42	120	136	37		0.64
Sreeja, 2009	70	84	57	98	76	37		0.65
Sobti, 2009	37	73	41	42	73	36		0.54
Chua, 2010	28	69	26	42	88	31		0.53
Kiyohara, 2010	206	194	62	162	175	42		0.66
Piao, 2011	1458	1821	657	734	776	190		0.66
Liu D., 2013	144	137	79	126	115	119		0.51
Li Y., 2013	118	146	99	161	196	89		0.58
Mostaid, 2014	27	40	39	62	35	19		0.69
Saikia, 2014	95	125	52	225	260	59		0.65
Zhang F., 2014	124	311	205	133	330	222	0.44	
Chowdhury, 2015	19	19	12	11	18	21	0.40	
Bulgakova, 2019	12	62	11	30	6	6	0.78	
Birgander, 1995	148	127	53	144	165	38	Caucasian	0.65
To-Figueras, 1996	52	32	6	92	47	8		0.79
Pierce, 2000	84	46	8	87	76	10		0.72
Fan, 2000	212	204	66	237	212	61		0.67
Liu G., 2001	604	465	99	728	441	87		0.76
Papadakis, 2002	27	27	0	24	64	11		0.56
Miller, 2002	367	299	101	496	339	92		0.72
Wu, 2002	299	177	40	352	156	32		0.80
Su, 2003	28	31	4	9	9	3		0.64
Szymanowska, 2006	110	120	10	311	225	40		0.74
Popanda, 2007	209	156	40	244	131	29		0.75
Nadji, 2007	55	64	10	41	29	19		0.62
Mechanic, 2007	166	125	16	193	122	20		0.76
Giuliani, 2007	32	26	5	30	15	5		0.75
Fernández-Rubio, 2008	308	249	32	338	209	35		0.76
Buyru, 2008	32	25	8	24	49	14		0.56
Souto-García, 2012	341	267	43	318	198	32		0.76

high heterogeneity (Lee, 2015). Otherwise, the fixed-effects model was used. Publication bias was measured via “Begg’s funnel plot” and “Egger’s linear regression” method (Egger et al., 1997). A two-tailed *p*-value < 0.05 implied a statistically significant publication bias.

## Results

### Studies included in the meta-analysis

A total of 531 potential articles were identified from the databases search. After 236 duplicate records were removed, a total of 295 potential articles were reviewed. Amongst these articles, 216 were excluded after titles and abstracts review. Afterwards, we excluded 28 studies for no case-control design. Finally, 51 studies with a total of 25,239 controls and

25,366 cases that met the inclusion criteria were included in this meta-analysis (Suppl. Fig. 1)<sup>1</sup>.

### Characteristics of studies included in this meta-analysis

A total of 37 articles that examined *TP53* (*rs1042522*) association with lung cancer risk were determined. Two of these articles included data of two different sets (*TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*)) (Zhang X. et al., 2006; Chua et al., 2010) and these sets were examined autonomously. Thus, the identified 37 articles encompassed case-controls studies involving 16,229 lung cancer patients and 14,897 controls (Table 1). Among 37 articles, 20 studies were established in Asian populations and 17 in Caucasian populations. The

<sup>1</sup> Supplementary Figures 1–5 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx13.pdf>

**Table 2.** Characteristics of the studies of *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism included in the meta-analysis

First author, year	Lung cancer			Control			Ethnicity	<i>p</i> (HWE) Control
	GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Hu, 2006	166	373	178	274	538	271	Asian	0.5
Zhang X., 2006	249	561	296	418	711	291		0.54
Jun, 2007	113	280	189	122	299	161		0.47
Chua, 2010	29	65	29	51	83	25		0.58
Kohno, 2011	68	183	126	79	151	95		0.48
Enokida, 2014	153	379	230	152	335	213		0.46
Li, 2017	58	96	32	44	101	51		0.48
Li G., 2006	419	472	135	408	573	164	Caucasian	0.60
Lind, 2006	130	156	55	161	207	44		0.64
Pine, 2006	150	167	54	182	187	52		0.65
Liu G., 2008	702	802	283	530	631	199		0.62
Mittelstrass, 2008	270	293	70	547	598	149		0.65
Zhuo, 2012	419	472	135	408	573	164		0.61
Javid, 2015	20	56	24	40	50	10		0.65

genotype frequencies in controls of all studies were consistent with those expected from HWE ( $p > 0.05$ ).

Another 14 articles identified *MDM2* (*rs2279744*) association with increased lung cancer risk were retrieved (Table 2). These 14 articles encompassed case-controls studies involving 9,137 lung cancer patients and 10,342 controls. Among 14 articles, 7 studies were established in Asian populations and 7 in Caucasian populations. The genotype frequencies in controls of all studies were consistent with those expected from HWE ( $p > 0.05$ ).

All estimated published articles were executed under accredited genotyping methods.

#### Meta-analysis of the relationship between the *TP53* (*rs1042522*) polymorphism and lung cancer risk

Meta-analysis of *TP53* (*rs1042522*) polymorphism was associated with lung cancer (G versus C: OR = 0.82, 95 % CI 0.71–0.94,  $p = 0.005$ ; GG versus CC: OR = 0.86, 95 % CI 0.74–0.99,  $p = 0.039$ ; GG+GC versus CC: OR = 0.86, 95 % CI 0.76–0.98,  $p = 0.02$ ; GG versus GC+CC: OR = 1.12, 95 % CI 0.89–1.42,  $p = 0.336$ ). And the association was statistically significant under allele model (G versus C), homozygote model (GG versus CC) (Suppl. Fig. 2) and dominant model (GG+GC vs. CC) (Suppl. Fig. 3) ( $p < 0.05$ ). A summary of meta-analysis findings concerning associations between the *TP53* (*rs1042522*) polymorphism and lung cancer risk is shown in Table 3.

Further subgroup analysis was conducted on the association between *TP53* (*rs1042522*) polymorphism and the risk of lung cancer (see Table 3). After stratifying by ethnicity, this meta-analysis indicated an obvious association of *TP53* (*rs1042522*) and lung cancer risk among Caucasians (G versus C: OR = 0.83, 95 % CI 0.73–0.95,  $p = 0.005$ ; GG versus CC: OR = 0.83, 95 % CI 0.73–0.95,  $p = 0.005$ ; GG+GC versus CC: OR = 0.88, 95 % CI 0.77–1.00,  $p = 0.045$ ) and among Asians (G versus C: OR = 0.76, 95 % CI 0.63–0.92,  $p = 0.005$ ; GG versus CC: OR = 0.84, 95 % CI 0.67–1.06,  $p = 0.136$ ; GG+GC versus CC: OR = 0.81, 95 % CI 0.69–0.96,  $p = 0.012$ ).

#### Meta-analysis of the relationship between the *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism and lung cancer risk

In this meta-analysis was shown no association *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism with lung cancer (G versus T: OR = 0.86, 95 % CI 0.71–1.03,  $p = 0.1$ ; GG versus TT: OR = 0.86, 95 % CI 0.71–1.03,  $p = 0.1$ ; GG+GT versus TT: OR = 0.90, 95 % CI 0.79–1.02,  $p = 0.5$ ; GG versus GT+TT: OR = 1.10, 95 % CI 0.94–1.22,  $p = 0.276$ ). A summary of meta-analysis findings concerning associations between the *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism and lung cancer risk is shown in Table 4. Subgroup analysis detected no association *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism with lung cancer.

#### Heterogeneity and publication bias

Between-study heterogeneities were found in all subjects for both polymorphisms *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) (see Table 3, 4). Because of this the meta-analysis was designed using “a random effect model” to establish pooled OR and corresponding 95 % CI for all models. We performed the meta-regression to explore the potential source of between-study. A big problem for meta-analysis is the disproportionate number of positive studies that leads to a bias in the publication. The funnel plot indicated some evidence of publication bias for Caucasians, but not for Asians in analysis of *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) gene polymorphisms (Suppl. Fig. 4, 5). The publication bias was observed from Egger’s test ( $p \leq 0.05$ ) also for Caucasian population (see Table 3, 4).

#### Discussion

The tumor suppressor gene *TP53* (previously named *p53*), is key regulator of a cell cycle network, apoptosis and DNA repair pathway. *TP53* is one of the most carcinogenesis-associated genes. There were several studies assessing the effects of *TP53* polymorphisms on the risk of lung cancer, but the results are very contradictory. For example, no associations of the *TP53* (*rs1042522*) polymorphism with lung cancer were found in Jung et al.’s (2008) article. But, increased risk

**Table 3.** Meta-analysis of the association between *TP53* (*rs1042522*) polymorphism and lung cancer risk

Polymorphism	Test of association			Test of heterogeneity		
	OR	95 % CI	<i>p</i>	Model	<i>I</i> <sup>2</sup>	<i>p</i>
<b>G versus C</b>						
Overall	0.82	0.71–0.94	0.005	Random effects model	64	0.02
Asian	0.76	0.63–0.92	0.005	Random effects model	73	0.5
Caucasian	0.83	0.73–0.95	0.005	Fix effects model	26	0.001
<b>GG versus CC</b>						
Overall	0.859	0.744–0.993	0.039	Random effects model	66	0.001
Asian	0.84	0.67–1.06	0.136	Random effects model	82	0.001
Caucasian	0.83	0.73–0.95	0.005	Fix effects model	34	0.06
<b>Dominant model (GG+GC vs. CC)</b>						
Overall	0.86	0.76–0.98	0.02	Random effects model	62	0.01
Asian	0.81	0.69–0.96	0.012	Random effects model	71	0.29
Caucasian	0.88	0.77–1.00	0.045	Fix effects model	39	0.002
<b>Recessive model (GG vs. GC+CC)</b>						
Overall	1.08	0.89–1.42	0.336	Random effects model	86	0.624
Asian	1.12	0.89–1.42	0.336	Random effects model	91	0.749
Caucasian	1.12	0.98–1.27	0.086	Random effects model	61	0.01

**Table 4.** Meta-analysis of the association between *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism and lung cancer risk

Polymorphism	Test of association			Test of heterogeneity		
	OR	95 % CI	<i>p</i>	Model	<i>I</i> <sup>2</sup>	<i>p</i>
<b>G versus T</b>						
Overall	0.86	0.71–1.03	0.10	Random effects model	75	0.38
Asian	0.81	0.63–1.10	0.122	Fix effects model	73	0.49
Caucasian	0.82	0.63–1.10	0.122	Random effects model	26	0.49
<b>GG versus TT</b>						
Overall	0.86	0.71–1.03	0.10	Random effects model	75	0.001
Asian	0.82	0.63–1.06	0.122	Random effects model	73	0.001
Caucasian	0.90	0.71–1.06	0.435	Random effects model	72	0.04
<b>Dominant model (GG+GT vs. TT)</b>						
Overall	0.90	0.79–1.02	0.50	Random effects model	60	0.09
Asian	0.89	0.74–1.10	0.212	Random effects model	66	0.58
Caucasian	0.91	0.76–1.10	0.303	Random effects model	56	0.05
<b>Recessive model (GG vs. GT+TT)</b>						
Overall	1.10	0.94–1.22	0.276	Random effects model	74	0.14
Asian	1.18	0.99–1.40	0.059	Random effects model	57	0.43
Caucasian	0.98	0.84–1.14	0.812	Random effects model	69	0.05

to develop lung cancer was observed in association with the *Pro/Pro* genotype variant in Chowdhury et al.'s (2015) research. Mostaid et al. (2014) found that *TP53 Arg72Pro* and *Pro72Pro* genotype significantly associated with increased relative risk of lung cancer. Our previous study also demonstrated the association of genotype *Arg72Pro* of *TP53* gene with lung cancer risk (Bulgakova et al., 2019). Papadakis et al. (2002) demonstrated that subjects with *Arg72Arg* genotype of *rs1042522* had significantly increased lung cancer risk. We comprehensively searched the up-to-date electronic databases to reveal the associations between *TP53* genetic polymor-

phisms (*rs1042522*) and risk of lung cancer. The genome-wide association study (GWAS) is very popular method to detect a variation in SNPs with variation in common diseases. In 2017, data from a study of new loci of susceptibility to lung cancer were published. The study identified *RNASET2*, *SECISBP2L*, *NRG1*, *CHRNA2*, *OFBC1* and *RTEL1* as candidate genes associated with lung cancer (McKay et al., 2017). The polymorphisms of *TP53* (*rs1042522*) and *MDM2* (*rs2279744*) weren't detected in this GWAS (McKay et al., 2017).

A total of 37 case-control comparisons for *TP53* (*rs1042522*) (16,229 lung cancer patients and 14,897 healthy controls) were

investigated in this meta-analysis. A noteworthy association of *TP53* (*rs1042522*) with susceptibility to lung cancer in overall pooled subjects was observed under three different models: the allele contrast, homozygote contrast (additive) and dominant model. Also, stratification analysis explained a strong evidence of this variant with risk of lung cancer among Asians and Caucasian under allelic, homozygote (only for Caucasian) and dominant models. Moreover, the *Arg72Arg* genotype was associated with the obvious protective effect (OR = 0.82, 95 % CI 0.71–0.94,  $p = 0.005$ ).

Compared to *TP53*, whose role has been widely discussed in lung cancer developing, its main negative modifier – *MDM2*, has not been sufficiently studied. The data on the association of polymorphism of *MDM2* (*rs2279744* or *309T > G*) with the risk of developing lung cancer as well as in the case of *TP53* (*rs1042522*) are contradictory. Thus, Enokida et al. (2014) did not find any association between polymorphism of *MDM2* (*rs2279744*) and lung cancer risk. Chua et al. (2010) demonstrated that the *MDM2* (*rs2279744*) TT rather than the GG genotype is associated with increased risk of lung cancer in Asian. But, the *MDM2* TT genotype was associated with a decreased risk of developing NSCLC compared with that of the *MDM2* GG genotypes in Li G. et al.'s (2006) research. A total of 14 case-control comparisons for *MDM2* (*rs2279744*) (9,137 lung cancer patients and 10,342 healthy controls) were investigated in this meta-analysis. There were no significant associations between *MDM2* (*rs2279744*) polymorphisms and lung cancer with regard to G allele vs. T allele: OR = 0.86, 95 % CI 0.71–1.03,  $p = 0.1$ ; homozygote model: OR = 0.86, 95 % CI 0.71–1.03,  $p = 0.1$ ; dominant model: OR = 0.90, 95 % CI 0.79–1.02,  $p = 0.5$  and recessive model: OR = 1.10, 95 % CI 0.94–1.22,  $p = 0.276$ . The stratification analysis also did not demonstrate the association of this polymorphism with risk of lung cancer among Asians and Caucasian under all models. Thus, *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism does not affect the risk of developing lung cancer.

This meta-analysis has some limitations. First, heterogeneity level was high. But we tried to eliminate this effect using a random effects model rather than a fixed effects model. Publication bias could also have biased the results, as studies that produced negative results may not have been published. Despite our use of Egger's regression test, we cannot eliminate the possibility of bias. Second, the relative importance of the *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism during the development of lung cancer may vary between ethnic groups, but we were only able to perform ethnic-specific meta-analysis in Asians and Europeans. Thus, our results are applicable to only these ethnic groups. Therefore, additional studies with other ethnic populations are warranted to assess the association between *MDM2* (*rs2279744*) polymorphism and the risk of lung cancer.

But, the present meta-analysis has also several strengths. We used a strong comprehensive search strategy, and had a well-defined inclusion and exclusion criteria. Reviewers performed the study selection and extracted data independently. Moreover, we assessed the quality of the included studies by predefined criteria and the score of included studies was high. Finally, all genotype data extracted from the studies were reported in the study. The advantage of this study over other meta-analyses is a more complete review of literature and the inclusion of recent data.

## Conclusion

In summary, this meta-analysis study indicated evidence of association for *TP53* (*rs1042522*), but not *MDM2* (*rs2279744*) variants with lung cancer based on 51 case-control published studies. Additionally, stratified analysis based on ethnicity observed an obvious association of *TP53* (*rs1042522*) both among Asian and European subjects under allelic, homozygote and dominant models. However, polymorphism *MDM2* (*rs2279744*) may not impart susceptibility to lung cancer in either Asians or Europeans.

## References

- Birgander R., Sjalander A., Rannug A., Alexandrie A.K., Sundberg M.I., Seidegard J. P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*. 1995;16(9):2233-2236. DOI 10.1093/carcin/16.9.2233.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018;68:394-424. DOI 10.3322/caac.21492.
- Bulgakova O., Kussainova A., Kakabayev A., Kausbekova A., Bersimbaev R. Association of polymorphism *TP53 Arg72Pro* with radon-induced lung cancer in the Kazakh population. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):594-599. DOI 10.18699/VJ19.530.
- Buyru N., Altinisik J., Isin M., Dalay N. p53 codon 72 polymorphism and HPV status in lung cancer. *Med. Sci. Monit.* 2008;14(9):CR493-497.
- Cheng H., Ma B., Jiang R., Wang W., Guo H., Shen N., Li D., Zhao Q., Wang R., Yi P., Zhao Y., Liu Z., Huang T. Individual and combined effects of *MDM2* SNP309 and *TP53* Arg72Pro on breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(9):9265-9274. DOI 10.1007/s11033-012-1800-z.
- Chowdhury M.K., Moniruzzaman M., Emran A.A., Mostafa M.G., Kuddus R.H., Uddin M.A. TP53 codon 72 polymorphisms and lung cancer risk in the Bangladeshi population. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015;16(8):3493-3498. DOI 10.7314/apjcp.2015.16.8.3493.
- Chua H.W., Ng D., Choo S. Effect of *MDM2* SNP309 and p53 codon 72 polymorphisms on lung cancer risk and survival among non-smoking Chinese women in Singapore. *BMC Cancer*. 2010;10:88. DOI 10.1186/1471-2407-10-88.
- Ding H., Dai Y., Ning Zh., Fan N., Wang Zh., Li P., Zhang L., Tao Y., Wang H. Murine double minute 2 SNP T309G polymorphism and urinary tract cancer risk: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(12):e2941. DOI 10.1097/MD.0000000000002941.
- Egger M., Smith G., Schneider M., Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 1997;315(7109):629-634. DOI 10.1136/bmj.315.7109.629.
- Enokida Y., Shimizu K., Kakegawa S., Atsumi J., Takase Y., Miyamae Y., Nagashima T., Ohtaki Y., Kaira K., Sunaga N., Yanagitani N., Yoshino R., Tsunekawa K., Igai H., Kamiyoshihara M., Usui K., Lezhava A., Tomizawa Y., Ishikawa T., Murakami M., Hayashizaki Y., Takeyoshi I. Single-nucleotide polymorphism (c.309T > G) in the *MDM2* gene and lung cancer risk. *Biomed. Rep.* 2014;2(5):719-724. DOI 10.3892/br.2014.305.
- Fan R., Wu M.T., Miller D., Wain J.C., Kelsey K.T., Wiencke J. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000;9:1037-1042.
- Fernández-Rubio A., López-Cima M.F., González-Arriaga P., García-Castro L., Pascual T., Marrón M.G., Tardón A. The *TP53* Arg72Pro polymorphism and lung cancer risk in a population of Northern Spain. *Lung Cancer*. 2008;61(3):309-316. DOI 10.1016/j.lungcan.2008.01.017.
- Giuliani L., Jaxmar T., Casadio C., Gariglio M., Manna A., D'Antonio D. Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and

- p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2007; 57(3):273-281. DOI 10.1016/j.lungcan.2007.02.019.
- Haronikova L., Olivares-Illana V., Wang L., Karakostis K., Chen S., Fähræus R. The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(7):3257-3271. DOI 10.1093/nar/gkz124.
- Hiraki A., Matsuo K., Hamajima N., Ito H., Hatoooka S., Suyama M., Mitsudomi T., Tajima K. Different risk relations with smoking for nonsmall-cell lung cancer: comparison of *TP53* and *TP73* genotypes. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2003;4:107-112.
- Hu Z., Ma H., Lu D. Genetic variants in the *MDM2* promoter and lung cancer risk in a Chinese population. *Int. J. Cancer.* 2006;118:1275-1278.
- Javid J., Mir R., Julka P.K., Ray P.C., Saxena A. Association of p53 and mdm2 in the development and progression of non-small cell lung cancer. *Tumour. Biol.* 2015;36(7):5425-5432. DOI 10.1007/s13277-015-3208-6.
- Jiang D.K., Yao L., Wang W.Zh., Peng B., Ren W.H., Yang X.M., Yu L. *TP53* Arg72Pro polymorphism is associated with esophageal cancer risk: a meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 2011;17(9):1227-1233. DOI 10.3748/wjg.v17.i9.1227.
- Jun H.J., Park S.H., Lee W.K. Combined effects of *p73* and *MDM2* polymorphisms on the risk of lung cancer. *Mol. Carcinog.* 2007;46: 100-105. DOI 10.1002/mc.20279.
- Jung H.Y., Whang Y.M., Sung J.S., Shin H.D., Park B.L., Kim J.S., Shin S.W., Seo H.Y., Seo J.H., Kim Y.H. Association study of *TP53* polymorphisms with lung cancer in a Korean population. *J. Hum. Genet.* 2008;53:508-514. DOI 10.1007/s10038-008-0278-y.
- Kawajiri K., Nakachi K., Imai K. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis.* 1993;14:1085-1089. DOI 10.1093/carcin/14.6.1085.
- Kiyohara C., Horiuchi T., Miyake Y., Takayama K., Nakanishi Y. Cigarette smoking, TP53 Arg72Pro, TP53BP1 Asp353Glu and the risk of lung cancer in a Japanese population. *Oncol. Rep.* 2010;23(5): 1361-1368. DOI 10.3892/or\_00000772.
- Kohno T., Kunitoh H., Mimaki S. Contribution of the *TP53*, *OGG1*, *CHRNA3*, and *HLA-DQA1* genes to the risk for lung squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2011;6:813-817. DOI 10.1097/JTO.0b013e3181ee80ef.
- Lee Y.H. Meta-analysis of genetic association studies. *Ann. Lab. Med.* 2015;35(3):283-287. DOI 10.3343/alm.2015.35.3.283.
- Li G., Zhai X., Zhang Z., Chamberlain R.M., Spitz M.R. *MDM2* gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis.* 2006;27:2028-2033. DOI 10.1093/carcin/bgl047.
- Li W., Wang S.S., Deng J., Tang J.X. Association of p73 gene G4C14-A4T14 polymorphism and *MDM2* gene SNP309 with non-small cell lung cancer risk in a Chinese population. *Oncol. Lett.* 2017; 14(2):1817-1822. PMID: 28789416. PMCID: PMC5529775. DOI 10.3892/ol.2017.6327.
- Li Y., Chang S.-C., Niu R., Li Y., Chang S.-C., Niu R., Liu L., Crabtree-Ide C.R., Zhao B., Shi J., Han X., Li J., Su J., Cai L., Yu S., Zhang Z.-F., Mu L. *TP53* genetic polymorphisms, interactions with lifestyle factors and lung cancer risk: a case control study in a Chinese population. *BMC Cancer.* 2013;13:607. DOI 10.1186/1471-2407-13-607.
- Lind H., Ekström P.O., Ryberg D., Skaug V., Andreassen T. Frequency of *TP53* mutations in relation to Arg72Pro genotypes in non-small cell lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007;16(10): 2077-2081. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-07-0153.
- Lind H., Zienoldddy S., Ekstrom P.O., Skaug V., Haugen A. Association of a functional polymorphism in the promoter of the *MDM2* gene with risk of nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer.* 2006;119: 718-721. DOI 10.1002/ijc.21872.
- Liu D., Wang F., Guo X., Wang Q., Wang W., Xu H., Xu G. Association between p53 codon 72 genetic polymorphisms and tobacco use and lung cancer risk in a Chinese population. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 40(1):645-649. DOI 10.1007/s11033-012-2103-0.
- Liu G., Miller D.P., Zhou W., Thurston S.W., Fan R., Xu L.L. Differential association of the codon 72 p53 and *GSTM1* polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2001;61(24):8718-8722.
- Liu G., Wheatley-Price P., Zhou W. Genetic polymorphisms of *MDM2*, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk. *Int. J. Cancer.* 2008;122:915-918. DOI 10.1002/ijc.23178.
- Ma Y., Bian J., Cao H. *MDM2* SNP309 rs2279744 polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(2):e56918. DOI 10.1371/journal.pone.0056918.
- McKay J.D., Hung R.J., Han Y., Zong X., Carreras-Torres R., Christiani D.C., Caporaso N.E., ... Bossé Y., Chanock S., Brennan P., Landi M.T., Amos C.I. Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. *Nat. Genet.* 2017;49(7): 1126-1132. DOI 10.1038/ng.3892.
- Mechanic L.E., Bowman E.D., Welsh J.A., Khan M.A., Hagiwara N., Enewold L. Common genetic variation in *TP53* is associated with lung cancer risk and prognosis in African Americans and somatic mutations in lung tumors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007;16(2):214-222. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-06-0790.
- Miller D.P., Liu G., De Vivo I., Lynch T.J., Wain J.C., Su L., Christiani D.C. Combinations of the variant genotypes of *GSTP1*, *GSTM1*, and *p53* are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res.* 2002;62:2819-2823.
- Mittelstrass K., Sauter W., Rosenberger A. Early onset lung cancer, cigarette smoking and the SNP309 of the murine double minute-2 (*MDM2*) gene. *BMC Cancer.* 2008;8:113. DOI 10.1186/1471-2407-8-113.
- Mostaid M.S., Ahmed M.U., Islam M.S., Bin Sayeed M.S., Hasnat A. Lung cancer risk in relation to TP53 codon 47 and codon 72 polymorphism in Bangladeshi population. *Tumour Biol.* 2014;35(10): 10309-10317. DOI 10.1007/s13277-014-2285-2.
- Murata M., Tagawa M., Kimura M., Kimura H., Watanabe S., Saisho H. Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients: discrete results with smoking history. *Carcinogenesis.* 1996;17(2):261-264. DOI 10.1093/carcin/17.2.261.
- Nadji S.A., Mahmoodi M., Ziaee A.A., Naghshvar F., Torabizadeh J., Yahyapour Y. An increased lung cancer risk associated with codon 72 polymorphism in the TP53 gene and human papillomavirus infection in Mazandaran province, Iran. *Lung Cancer.* 2007;56(2): 145-151. DOI 10.1016/j.lungcan.2006.12.006.
- Nicolai S., Rossi A., Daniele N., Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M., Raschella G. DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1050-1065. DOI 10.18632/aging.100858.
- Papadakis E.D., Soultz N., Spandidos D.A. Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. *Br. J. Cancer.* 2002;87(9):1013-1018. DOI 10.1038/sj.bjc.6600595.
- Piao J.M., Kim H.N., Song H.R., Kweon S.S., Choi J.S., Yun W.J. p53 codon 72 polymorphism and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer.* 2011;73(3):264-267. DOI 10.1016/j.lungcan.2010.12.017.
- Pierce L.M., Sivaraman L., Chang W., Lum A., Donlon T., Seifried A. Relationships of *TP53* codon 72 and *HRAS1* polymorphisms with lung cancer risk in an ethnically diverse population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000;9:1199-1204.
- Pine S.R., Mechanic L.E., Bowman E.D., Welsh J.A., Chanock S.C., Shields P.G., Harris C.C. *MDM2* SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15(8):1559-1561. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-06-0217.
- Popanda O., Edler L., Waas P., Schattenberg T., Butkiewicz D., Muley T., Dienemann H., Risch A., Bartsch H., Schmezer P. Elevated risk of squamous-cell carcinoma of the lung in heavy smokers carrying the variant alleles of the *TP53* Arg72Pro and *p21* Ser31Arg

- polymorphisms. *Lung Cancer*. 2007;55(1):25-34. DOI 10.1016/j.lungcan.2006.09.006.
- Qin X., Peng Q., Tang W., Lao X., Chen Zh., Lai H., Deng Y., Mo C., Sui J., Wu J., Zhai L., Yang Sh., Li Sh., Zhao J. An updated meta-analysis on the association of MDM2 SNP309 polymorphism with colorectal cancer risk. *PLoS One*. 2013;8(9):e76031. DOI 10.1371/journal.pone.0076031.
- Ren Y.W., Yin Zh., Wan Y., Guan P., Wu W., Li X., Zhou B. P53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms cooperate to increase lung adenocarcinoma risk in Chinese female non-smokers: a case control study. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2013;14(9):5415-5420. DOI 10.7314/apjcp.2013.14.9.5415.
- Saikia B.J., Das M., Sharma S.K., Sekhon G.S., Zomawia E., Singh Y.M., Mahanta J., Phukan R.K. Association of a p53 codon 72 gene polymorphism with environmental factors and risk of lung cancer: a case control study in Mizoram and Manipur, a high incidence region in North East India. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2014;15:10653-10658. DOI 10.7314/apjcp.2014.15.24.10653.
- Sakiyama T., Kohno T., Mimaki S., Ohta T., Yanagitani N., Sobue T., Kunitoh H., Saito R., Shimizu K., Hiramata C., Kimura J., Maeno G. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes *TP53*, *POLL*, *REV1* and *LIG4* with lung cancer risk. *Int. J. Cancer*. 2004;114:730-737. DOI 10.1002/ijc.20790.
- Sobti R.C., Kaur P., Kaur S., Janmeja A.K., Jindal S.K., Kishan J. Impact of interaction of polymorphic forms of p53 codon 72 and N-acetylation gene (*NAT2*) on the risk of lung cancer in the North Indian population. *DNA Cell Biol*. 2009;28(9):443-449. DOI 10.1089/dna.2008.0797.
- Souto-García A., Fernández-Somoano A., Pascual T., Álvarez-Avellón S.M., Tardón A. Association of p21 Ser31Arg and p53 Arg72Pro polymorphisms with lung cancer risk in CAPUA study. *Lung Cancer (Auckl)*. 2012;3:69-78. DOI 10.2147/LCTT.S35287.
- Sreeja L., Syamala V., Raveendran P.B., Santhi S., Madhavan J., Ananthil R. p53 Arg72Pro polymorphism predicts survival outcome in lung cancer patients in Indian population. *Cancer Invest*. 2009;26:41-46. DOI 10.1080/07357900701638459.
- Su L., Sai Y., Fan R., Thurston S.W., Miller D.P., Zhou W., Wain J.C., Lynch T.J., Liu G., Christiani D.C. P53 (codon 72) and P21 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21. *Lung Cancer*. 2003;40(3):259-266. DOI 10.1016/s0169-5002(03)00081-3.
- Sun Zh., Gao W., Cui G.T. Effect of *TP53* rs1042522 on the susceptibility of patients to oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia: a meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):143. DOI 10.1186/s12903-018-0603-6.
- Szymanowska A., Jassem E., Dziadziuszko R., Borg A., Limon J., Kobierska-Gulida G., Rzyman W., Jassem J. Increased risk of non-small cell lung cancer and frequency of somatic *TP53* gene mutations in Pro72 carriers of *TP53* Arg72Pro polymorphism. *Lung Cancer*. 2006;52(1):9-14. DOI 10.1016/j.lungcan.2005.12.007.
- Tang T., Song X., Yang Zh., Huang L., Wang W., Tan H. Association between murine double minute 2 T309G polymorphism and risk of liver cancer. *Tumour Biol*. 2014;35(11):11353-11357. DOI 10.1007/s13277-014-2432-9.
- Tian X., Dai Sh., Sun J., Jiang Sh., Jiang Y. Association between *TP53* Arg72Pro polymorphism and leukemia risk: a meta-analysis of 14 case-control studies. *Sci. Rep*. 2016;6:24097. DOI 10.1038/srep24097.
- Tian X., Dai Sh., Sun J., Jiang Sh., Jiang Y. The association between the *TP53* Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer: an updated meta-analysis based on 32 studies. *Oncotarget*. 2017;8(1):1156-1165. DOI 10.18632/oncotarget.13589.
- To-Figueras J., Gene M., Gomez-Catalan J., Galan C., Firvida J., Fuentes M. Glutathione-S-Transferase M1 and codon 72 p53 polymorphisms in a northwestern Mediterranean population and their relation to lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 1996;5(5):337-342.
- Wang X., Jin L., Cui J., Ma K., Chen X., Li W. Mouse double minute-2 homolog (*MDM2*)-rs2279744 polymorphism associated with lung cancer risk in a Northeastern Chinese population. *Thorac. Cancer*. 2015;6(1):91-96. DOI 10.1111/1759-7714.12153.
- Wang Y.C., Chen C.Y., Chen S.K., Chang Y.Y., Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin. Cancer Res*. 1999;5:129-134.
- Wells G.A., Shea B., O'Connell D., Peterson J., Welch V., Losos M., Tugwell P. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality if nonrandomized studies in meta-analyses. Available online: [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.htm](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm) (Accessed on 19 October 2009).
- Wu X., Zhao H., Amos C.I., Shete S., Maman N., Hong W.K., Kadlubar F.F., Spitz M.R. p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J. Natl. Cancer Inst*. 2002;94:681-690. DOI 10.1093/jnci/94.9.681.
- Xiang B., Mi Y.Y., Li T.F., Liu P.F. Updated meta-analysis of the *TP53* Arg72Pro polymorphism and gastric cancer risk. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2012;13(5):1787-1791. DOI 10.7314/apjcp.2012.13.5.1787.
- Xu T., Xu Z.Ch., Zou Q., Yu B., Huang X.E. P53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk – meta-analysis evidence for a link in Asians but not Caucasians. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2012;13(5):2349-2354. DOI 10.7314/apjcp.2012.13.5.2349.
- Zhang F., Li D., Li Y., Li H., Sun J., Li X., Li X. Quantitative assessment of the association between *TP53* Arg72Pro polymorphism and risk of glioma. *Tumour Biol*. 2014;35(1):747-751. DOI 10.1007/s13277-013-1101-8.
- Zhang X., Miao M., Guo Y., Tan W., Zhou Y., Sun T., Wang Y., Lin D. Genetic polymorphisms in cell cycle regulatory genes *MDM2* and *TP53* are associated with susceptibility to lung cancer. *Hum. Mutat*. 2006;27(1):110-117. DOI 10.1002/humu.20277.
- Zhuo W., Zhang L., Zhu B., Ling J., Chen Z. Association of *MDM2* SNP309 variation with lung cancer risk: evidence from 7196 cases and 8456 controls. *PLoS One*. 2012;7:e41546. DOI 10.1371/journal.pone.0041546.

#### ORCID ID

O. Bulgakova [orcid.org/0000-0003-3272-0638](https://orcid.org/0000-0003-3272-0638)  
A. Kussainova [orcid.org/0000-0002-1313-9779](https://orcid.org/0000-0002-1313-9779)  
R. Bersimbaev [orcid.org/0000-0002-9671-1178](https://orcid.org/0000-0002-9671-1178)

**Acknowledgements.** This study was partially supported by the Ministry of Science and Education of the Republic of Kazakhstan (grant No. AP05135213).

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

Received June 16, 2020. Revised September 8, 2020. Accepted September 10, 2020.

## Кандидатные SNP-маркеры, изменяющие сродство TBP к промоторам Y-связанных генов *CDY2A*, *SHOX*, *ZFY*, снижают ряд показателей репродуктивного потенциала мужчин

М.П. Пономаренко<sup>1,2</sup>✉, Е.Б. Шарыпова<sup>1</sup>, И.А. Драчкова<sup>1</sup>, Л.К. Савинкова<sup>1</sup>, И.В. Чадаева<sup>1</sup>, Д.А. Рассказов<sup>1</sup>, П.М. Пономаренко<sup>1</sup>, Л.В. Осадчук<sup>1</sup>, А.В. Осадчук<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: pon@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Репродуктивный потенциал – уровень физического и психического состояния организма, позволяющий при достижении социальной зрелости воспроизводить здоровое потомство. В узком биомедицинском смысле определение включает комплекс функциональных показателей репродуктивной системы, но в более широком смысле его можно рассматривать как совокупность физиологических, поведенческих, адаптивных, ментальных, антропометрических и генетических характеристик особи, способствующих размножению. Целью настоящей работы было расширить область применимости созданного ранее Web-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester для поиска кандидатных маркеров однонуклеотидного полиморфизма (SNP) на хромосоме Y человека, связанных с мужским репродуктивным потенциалом (МРП). В поиске кандидатных SNP-маркеров для МРП мы сосредоточились на генах хромосомы Y человека. Изучены 35 SNP в промоторах генов *CDY2A*, *SHOX* и *ZFY*, представляющих все три типа генов хромосомы Y человека: уникальный, псевдоаутосомный и паралог гена хромосомы X человека соответственно. Предсказаны 11 кандидатных SNP-маркеров ослабления МРП из-за изменения сродства TATA-связывающего белка (TBP) к этим промоторам. Выборочно верифицированы *in vitro* величины сродства «TBP-промотор», предсказанные в этой работе. Установлена достоверная корреляция ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.005$ ) между ними и результатами измерения *in vitro* сродства TBP человека к олигонуклеотидам, идентичным сайтам TBP-связывания исследуемых промоторов. Проведя поиск в базе данных PubMed по ключевым словам, мы нашли клиническое описание патологических состояний человека, соответствующих изменению экспрессии генов, несущих предсказанные нами кандидатные SNP-маркеры. Среди них оказались такие патологии, как нарушение сперматогенеза (*ZFY*: rs1388535808 и rs996955491), задержка полового созревания (*CDY2A*: rs200670724), нарушения эмбриогенеза (*SHOX*: rs28378830) и непропорционально низкий рост с деформациями Маделунга (*SHOX*: rs1452787381). Они свидетельствуют, что в случае SNP-промоторов генов хромосомы Y человека следует ожидать изменений широкого круга показателей МРП, выходящих далеко за рамки генетического контроля собственно мужской репродуктивной функции.

Ключевые слова: человек; репродуктивный потенциал; хромосома Y; ген; промотор; TATA-связывающий белок (TBP); TBP-связывающий сайт (TATA-бокс); однонуклеотидный полиморфизм (SNP); SNP-маркер; верификация *in vitro*.

**Для цитирования:** Пономаренко М.П., Шарыпова Е.Б., Драчкова И.А., Савинкова Л.К., Чадаева И.В., Рассказов Д.А., Пономаренко П.М., Осадчук Л.В., Осадчук А.В. Кандидатные SNP-маркеры, изменяющие сродство TBP к промоторам Y-связанных генов *CDY2A*, *SHOX*, *ZFY*, снижают ряд показателей репродуктивного потенциала мужчин. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):785-793. DOI 10.18699/VJ20.674

## Candidate SNP-markers altering TBP binding affinity for promoters of the Y-linked genes *CDY2A*, *SHOX*, and *ZFY* are lowering many indexes of reproductive potential in men

M.P. Ponomarenko<sup>1,2</sup>✉, E.B. Sharypova<sup>1</sup>, I.A. Drachkova<sup>1</sup>, L.K. Savinkova<sup>1</sup>, I.V. Chadaeva<sup>1</sup>, D.A. Rasskazov<sup>1</sup>, P.M. Ponomarenko<sup>1</sup>, L.V. Osadchuk<sup>1</sup>, A.V. Osadchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: pon@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Reproductive potential is the most important conditional indicator reflecting the ability of individuals in a population to reproduce, survive and develop under optimal environmental conditions. As for humans, the concept of reproductive potential can include the level of the individual's mental and physical state, which allows them to reproduce healthy offspring when they reach social and physical maturity. Female reproductive potential has been investigated in great detail, whereas the male reproductive potential (MRP) has not received the equal amount of attention as yet. Therefore, here we focused on the human Y chromosome and found candidate single-nucleotide polymorphism (SNP) markers of MRP. With our development named Web-service SNP\_TATA\_Z-tester, we examined *in silico* all 35 unannotated SNPs within 70-bp

proximal promoters of the three Y-linked genes, *CDY2A*, *SHOX* and *ZFY*, which represent all types of human Y-chromosome genes, namely: unique, pseudo-autosomal, and human X-chromosome gene paralogs, respectively. As a result, we found 11 candidate SNP markers for MRP, which can significantly alter the TATA-binding protein (TBP) binding affinity for promoters of these genes. First of all, we selectively verified *in vitro* the values of the TBP-promoter affinity under this study, Pearson's linear correlation between predicted and measured values of which were  $r = 0.94$  (significance  $p < 0.005$ ). Next, as a discussion, using keyword search tools of the PubMed database, we found clinically proven physiological markers of human pathologies, which correspond to a change in the expression of the genes carrying the candidate SNP markers predicted here. These were markers for spermatogenesis disorders (*ZFY*: rs1388535808 and rs996955491), for male maturation arrest (*CDY2A*: rs200670724) as well as for disproportionate short stature at Madelung deformity (e.g., *SHOX*: rs1452787381) and even for embryogenesis disorders (e.g., *SHOX*: rs28378830). This indicates a wide range of MRI indicators, alterations in which should be expected in the case of SNPs in the promoters of the human Y-chromosome genes and which can go far beyond changes in male fertility.

Key words: human; reproductive potential; chromosome Y; gene; promoter; TATA-binding protein (TBP); TBP-binding site (TATA-box); single nucleotide polymorphism (SNP); candidate SNP marker; verification *in vitro*.

**For citation:** Ponomarenko M.P., Sharypova E.B., Drachkova I.A., Savinkova L.K., Chadaeva I.V., Rasskazov D.A., Ponomarenko P.M., Osadchuk L.V., Osadchuk A.V. Candidate SNP-markers altering TBP binding affinity for promoters of the Y-linked genes *CDY2A*, *SHOX*, and *ZFY* are lowering many indexes of reproductive potential in men. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):785-793. DOI 10.18699/VJ20.674 (in Russian)

## Введение

Следуя идеям R.N. Chapman (1931) и E.R. Pianka (1976), популяционные экологи используют концепцию репродуктивного потенциала в качестве самого важного показателя шансов воспроизвести потомков и довести их до репродуктивного возраста при наилучших условиях как на уровне индивида, так и на уровне популяции (Axelsson et al., 2010). Теория ожидаемой продолжительности жизни (Bowles, 1998) связывает репродуктивный потенциал, качество и продолжительность жизни человека с предрасположенностью к болезням и стрессам, закодированной в его геноме. Наконец, прогресс медицины, достижения науки, развитие технологий и улучшение образования позволяют увеличить репродуктивный потенциал суперпопуляции людей, хотя рост народонаселения, урбанизация, загрязнение окружающей среды и эпидемии могут его уменьшить.

Базовая концепция предиктивно-превентивной персонализированной медицины (Trovato, 2014), предполагающая достоверные различия между больными и здоровыми добровольцами по встречаемости у них клинических маркеров однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (Varzari et al., 2016), указывает на возможность по расшифрованным индивидуальным геномам людей улучшить качество и продолжительность жизни как их, так и потомков. По SNP-маркерам генов, контролирующим показатели репродуктивного потенциала в геноме пациента, врач может прогнозировать способность к зачатию, предрасположенность к репродуктивным нарушениям, стрессорную реактивность и хронические болезни, способные ухудшить его репродуктивное здоровье, качество жизни и долголетие, а также рекомендовать адекватный образ жизни, профилактические мероприятия, диету и форму взаимодействия пациента с врачом во избежание развития нежелательного жизненного сценария.

Крупнейший научный проект XXI в., «1000 геномов» (Telenti et al., 2016), как основа предиктивно-превентивной персонализированной медицины, уже выявил сотни миллионов SNP, собранных в базе данных dbSNP (Sherry et al., 2001), между десятками тысяч расшифрованных индивидуальных геномов людей и эталонным (референсным)

геномом человека в базе данных Ensembl (Cunningham et al., 2019). Наконец, база данных dbWGF (Wu et al., 2016) собирает, систематизирует и приоритизирует сведения о каждом из всех 10 млрд потенциально возможных SNP человека в качестве первоосновы анализа индивидуального генома пациента в предиктивно-превентивной персонализированной медицине (Trovato, 2014).

Поскольку врачебное решение на основе наличия или отсутствия тех или иных SNP-маркеров в геноме пациента нацелено на его здоровье, продолжительность и качество жизни, то приемлемы только биомедицинские SNP-маркеры, клинически доказанные сравнением больных и условно здоровых людей (Varzari et al., 2016). Учет необходимых затрат времени, ручного труда и финансов для каждого такого теста исключает возможность оценить на практике проявление каждого из 10 млрд SNP человека (Wu et al., 2016) в патогенезе каждой из 55 тыс. болезней человека, согласно Международной классификации болезней и сопутствующих проблем со здоровьем людей, МКБ-11 (Pocai, 2019). Однако остается неясным, необходимо ли клинически проверять все SNP человека при условии, что дилемма J.B.S. Haldane (1957) и теория нейтральной эволюции (Kimura, 1968) предсказывают нейтральность абсолютного большинства SNP человека. Сейчас для будущего клинического теста чаще всего вручную эвристически выбирают кандидатный SNP-маркер заданной патологии среди всех SNP генов, уже связанных с этой болезнью (Varzari et al., 2016). Выбор таких кандидатных SNP-маркеров можно сделать объективнее, быстрее и прицельнее за счет малозатратного биоинформатического выявления абсолютного большинства нейтральных SNP во всем референсном геноме человека (Ponomarenko M. et al., 2017). Хотя точность биоинформатических прогнозов для SNP все еще остается ниже порога их применимости в клинической практике (Yoo et al., 2015), она непрерывно увеличивается с каждым годом (Putlyayeva et al., 2018).

Сейчас наилучшую точность биоинформатических прогнозов достигли для SNP белок-кодирующих частей генов (Amberger et al., 2015), чье негативное влияние неустранимо ни сменой образа жизни, ни терапией (Mitsuasu et al., 1998). В то же время значительно меньше

исследованы SNP регуляторных районов генов (Zerbino et al., 2015), лишь модулирующих уровень экспрессии, что корректируемо как сменой образа жизни, так и лекарствами (Ponomarenko M. et al., 2013)). Поэтому регуляторные SNP сайта связывания ТАТА-связывающего белка (ТВР, каноническая форма сайта – ТАТА-бокс, ≈15 % ТАТА-содержащих генов у человека), который необходим перед стартом любого транскрипта (Martianov et al., 2002; Rhee, Pugh, 2012) и который модулирует транскрипцию пропорционально сродству ТВР-промотор (Mogno et al., 2010), выглядят многообещающими в силу их предсказуемости и пользы для медицины (Ponomarenko M. et al., 2013, 2017).

Ранее мы создали Web-сервисы SNP\_TATA\_Comparator (Ponomarenko M. et al., 2015) и SNP\_TATA\_Z-tester (Sharypova et al., 2018) для оценки статистической значимости влияния SNP на сродство ТВР к промоторам генов человека и других эукариот с использованием библиотеки BioPerl (Stajich et al., 2002), доступа к базе данных Ensembl (Cunningham et al., 2019) и с помощью других источников данных соответственно. На этой методической основе мы предсказали кандидатные SNP-маркеры ожирения (Arkova et al., 2015), агрессивности (Chadaeva et al., 2016), нарушений циркадного ритма (Ponomarenko P. et al., 2016), атеросклероза (Ponomarenko M. et al., 2019), аутоиммунных заболеваний (Ponomarenko M. et al., 2016), болезни Альцгеймера (Ponomarenko P. et al., 2017), резистентности к противоопухолевой химиотерапии (Turnaev et al., 2016), предрасположенности к социальному доминированию и подчинению у людей (Chadaeva et al., 2019).

Целью настоящей работы было расширить область применимости наших Web-сервисов (Ponomarenko M. et al., 2015; Sharypova et al., 2018) для оценки SNP сайтов ТВР-связывания посредством поиска кандидатных SNP-маркеров на хромосоме Y человека, связанных с показателями мужского репродуктивного потенциала (МРП). Эта методология была использована при изучении женского репродуктивного потенциала (Chadaeva et al., 2018), тогда как МРП еще не получил должного внимания.

## Материалы и методы

**Биоинформатический анализ данных.** Мы исследовали последовательности ДНК  $S = \{s_{-70} \dots s_{-1}\}$  длиной 70 п.о. перед стартами транскрипции ( $TSS \equiv s_0$ ; где  $s_i \in \{a, c, g, t\}$ ) промоторов белок-кодирующих генов хромосомы Y человека, как показано на рис. 1 и описано ранее, например в недавней работе (Ponomarenko M. et al., 2019). Стрелками на рис. 1 указано, как с помощью (а) Web-сервиса UCSC Genome Browser (Haeussler et al., 2015) и (б) базы данных dbSNP (Sherry et al., 2001) мы вводили исходные данные в наш (в) Web-сервис SNP\_TATA\_Z-tester (Sharypova et al., 2018), где окно “Result” содержит результат обработки этих исходных данных в рамках нашей биоинформатической модели трехшагового связывания ТВР/промотор (Ponomarenko P. et al., 2008).

Каждый SNP анализировали независимо от остальных таким образом, что если было предсказано неустойчивое изменение сродства ТВР к минорному варианту промотора с этим SNP в сравнении с нормой, то он исключался из дальнейшего анализа (данные не показаны). Для оставшихся SNP с помощью стандартного поиска в базе

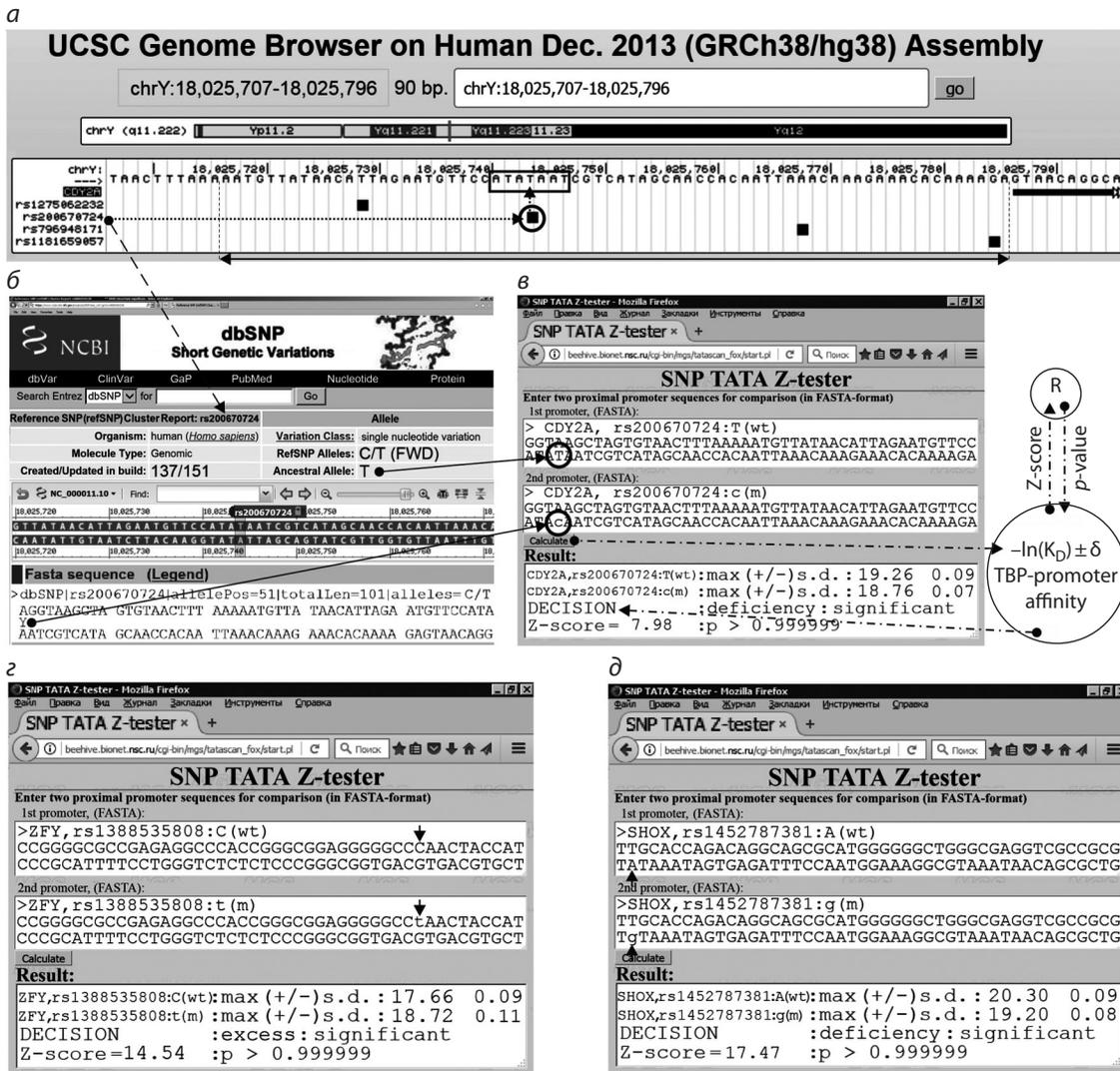
данных PubMed (Lu, 2011) по ключевым словам находили сообщения о клинически значимых показателях МРП, которые соответствовали значимым изменениям экспрессии генов, несущих предсказанные кандидатные SNP, вследствие достоверного изменения сродства ТВР к промоторам этих генов.

**Эксперимент *in vitro*.** Рекомбинантный ТВР человека (hТВР) экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hТВР (любезно предоставлена проф. В. Puhg, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, США) согласно (Peterson et al., 1990; Pugh, 1995), за исключением концентрации ИПТГ (1 мМ вместо 0.1 мМ) и времени индукции (3 ч вместо 1.5 ч).

В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (ODN) длиной 26 п. о., синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ («Биоссет», Новосибирск). Для получения меченых двуцепочечных ODN обе цепи метили  $^{32}P$ -АТФ («Биосан», Новосибирск) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы («СибЭнзим», Новосибирск), отжигали при 95 °С (в эквимольном соотношении) и медленно (не менее 3 ч) охлаждали до комнатной температуры. Отожженные дуплексы очищали и анализировали электрофорезом в 15 % ПААГ в неденатурирующих условиях с последующей радиоавтографией на фосфоримиджере Molecular Imager PharosFX Plus (Bio-Rad) (Drachkova et al., 2005). Немеченые дуплексы получали так же и использовали без дополнительной очистки в ПААГ.

Для определения равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ), а также времени полураспада ( $t_{1/2}$ ) констант скорости образования ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) комплексов ТВР-ODN проводили не менее трех экспериментов по связыванию ТВ-ODN при 25 °С в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.6), 5 мМ  $MgCl_2$ , 70 мМ KCl, 1 мМ DTT, 100 мкг/мл BSA, 0.01 % NP-40, и 5 % глицерина с фиксированной концентрацией 2 нМ активного ТВР. Каждый эксперимент включал 32 реакции связывания (8 временных точек, каждая с четырьмя концентрациями ODN). Четверка реакций связывания (1 временная точка) запускалась одновременно добавлением ТВР к реакционной смеси, содержащей ODN, и немедленным переносом в термостат на 25 °С. По окончании реакции связывания все реакционные смеси наносили на ПААГ одновременно при напряженности поля 10 В/см. Комплексы ТВР-ODN отделяли от несвязанного ODN с помощью количественного метода электрофоретической задержки (EMSA). Электрофорез проводили в нативном 5 % ПААГ на Tris-глициновом буфере (pH 8.3) в течение 40 мин при температуре 10 °С и напряженности поля 25 В/см.

Затем гели высушивали и экспонировали с экраном Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоимиджера Molecular Imager PharosFX Plus (Bio-Rad). Экран сканировали на фосфоимиджере и с помощью программы Quantity One – 4.5.0 (Bio-Rad) проводили количественный анализ радиоавтографов. Полученные зависимости концентрации комплексов ТВР-ODN от концентраций ODN вводили как исходные данные в общедоступный Web-сервис GraphPad Prism 5 (<http://graphpad-prism.software.informer.com/5.01>), результатом которого были величины  $K_D$ ,  $t_{1/2}$ ,  $k_a$  и  $k_d$  анализируемых комплексов ТВР-ODN, а также оценки стандартных ошибок средних ( $\pm$  SEM) для этих величин.



**Рис. 1.** Пример применения Web-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester к анализу проксимального промотора длиной 70 п.о. (↔) перед стартом транскрипции района гена *CDY2A* человека с четырьмя неаннотированными SNP (■), среди которых был предсказан один кандидатный SNP-маркер rs200670724 (пунктирная стрелка) снижения мужского репродуктивного потенциала из-за задержки мужского созревания при дефицитной экспрессии этого гена (Stahl et al., 2012) в случае этого SNP в сайте TBP-связывания (рамка).

Обозначения: а – визуализация промотора гена *CDY2A* человека с помощью Web-сервиса “UCSC Genome Browser” (Haeussler et al., 2015); б – описание SNP rs200670724 в базе данных dbSNP (Sherry et al., 2001); в – наш ранее созданный Web-сервис SNP\_TATA\_Z-tester, строка “DECISION”, в окне “Result” которого содержит прогноз дефицита белка CDY2A при минорном варианте промотора в сравнении с нормой (анцестральный вариант этого SNP), здесь символ «R» в кружке обозначает стандартный статистический пакет программ R (Waardenberg et al., 2015); з и д – аналогичные прогнозы SNP\_TATA\_Z-tester для кандидатных SNP-маркеров rs1388535808 и rs1452787381 снижения МПП в генах *ZFY* и *SHOX* соответственно.

**Статистический анализ.** Биоинформатические оценки сродства ТВР к вариантам SNP-промоторов генов хромосомы Y человека сравнивали с экспериментальными величинами сродства ТВР к ODN, идентичным этим промоторам, с помощью STATISTICA (Statsoft™).

### Результаты и обсуждение

Проанализированы все 35 неаннотированных SNP, доступных в выпуске № 151 базы данных dbSNP (Sherry et al., 2001), для проксимальных промоторов длиной 70 п.о. генов *CDY2A*, *SHOX* и *ZFY*, представляющих все три типа генов на хромосоме Y человека: уникальный, псевдоаутосомный и паралог гена хромосомы X человека

соответственно (табл. 1). В результате было выявлено 11 кандидатных SNP-маркеров снижения МПП из-за достоверных изменений сродства ТВР к этим промоторам (см. табл. 1). Рассмотрим сначала наиболее подробно единственный кандидатный SNP-маркер rs200670724 в гене *CDY2A*, связанный с ослаблением МПП, чтобы затем, благодаря аналогиям с этим иллюстративным примером, кратко описать 10 остальных кандидатных SNP-маркеров в генах *ZFY* и *SHOX*.

Уникальный ген *CDY2A* на хромосоме Y человека кодирует хромодомен 2A и несет четыре неаннотированных SNP в своем проксимальном промоторе длиной 70 п.о. (см. рис. 1, а), лишь один среди которых, rs2276109 (см.

**Таблица 1.** Кандидатные SNP-маркеры мужского репродуктивного потенциала, способные изменять сродство ТВР к промоторам генов хромосомы Y человека

Ген	dbSNP (Sherry et al., 2001)	5'-фланк	wt mut	3'-фланк	K <sub>D</sub> , нМ			Кандидатный SNP-маркер	♂ Лит. источник	
					wt mut	Δ	Z			
<i>CDY2A</i> (уникальный ген)	rs200670724	atgttcata	t c	aatcgcata	$\frac{4}{7}$	<	7	10 <sup>-6</sup>	Выше риск задержки полового созревания	↓ Stahl et al., 2012
	rs1388535808	ggagggggcc	c t	aactaccatc	$\frac{21}{7}$	>	15	10 <sup>-6</sup>	Выше риск азооспермии и бесплодия	↓ Jan et al., 2018
<i>SHOX</i> (псевдо- аутосомный ген)	rs996955491	ggggcccaa	c a	taccatcccg	$\frac{21}{13}$	>	8	10 <sup>-6</sup>		↓
	rs1452787381	gtcgcgcgct	a g	taaatagtga	$\frac{2}{5}$	<	17	10 <sup>-6</sup>	Выше риск непропорционально низкого роста с деформациями Маделунга	↓ Ramachandrapa et al., 2018
	rs1405831103	gtcgcgcgct	ataa t	atagtggat	$\frac{2}{8}$	<	22	10 <sup>-6</sup>	↓	
	rs1273755135	tcgccgcgta	t c	aaatagtgag	$\frac{2}{4}$	<	17	10 <sup>-6</sup>	↓	
	rs375938368	aggtcggcgc	g t	tataaatagt	$\frac{1.5}{1.9}$	<	3	10 <sup>-3</sup>	↓	
	rs771395540	caggagccea	t c	aggggtcttc	$\frac{62}{70}$	<	2	0.05	↓	
	rs28378830	aggggtcttc	g a*	agtcaccctg	$\frac{62}{30}$	>	13	10 <sup>-6</sup>	Выше риск нарушений эмбриогенеза	↓ Brosens et al., 2014
	rs894540003	caataggggt	c a	ttcagtcac	$\frac{62}{23}$	>	15	10 <sup>-6</sup>	↓	
rs970127768	cgaggtcgcc	g a*	cgataaata	$\frac{1.5}{1.3}$	>	2	0.05	↓		

Примечание. wt – норма (референсный геном человека); mut – минорный аллель; K<sub>D</sub> – равновесная константа диссоциации комплекса ТВР-промотор; Δ – изменение сродства ТВР-промотор: увеличение – (<), уменьшение – (>); Z – Z-статистика; α – значимость (α = 1 – p, где p – вероятность на рис. 1, 2); ♂ – изменение МПП: увеличение – (↑), уменьшение – (↓). Гены: *CDY2A* – Y-связанный хромодомен 2A; *ZFY* – Y-связанный белок с цинковым пальцем; *SHOX* – гомеобокс низкорослости.

\* – обозначает наличие кроме указанного минорного аллеля рассматриваемой SNP также других его аллелей, которые недостоверно изменяют сродство ТВР к промотору указанного гена человека.

рис. 1, б), достоверно снижает экспрессию этого гена, согласно нашему прогнозу (см. рис. 1, в). Как представлено в первой строке табл. 1, этот дефицит экспрессии гена *CDY2A* вызван снижением сродства «ТВР-промотор» с 4 нМ в норме до 7 нМ для минорного аллеля rs2276109.

Прежде всего мы экспериментально проверили этот прогноз методом задержки электрофоретической подвижности (EMSA). Электрофореграммам для нормального и минорного аллелей rs2276109 соответствуют рис. 2, а и рис. 2, б, тогда как зависимость концентрации комплексов ТВР-ODN от концентраций ODN, которые были построены на основе этих электрофореграмм, демонстрируют рис. 2, в и 2, г.

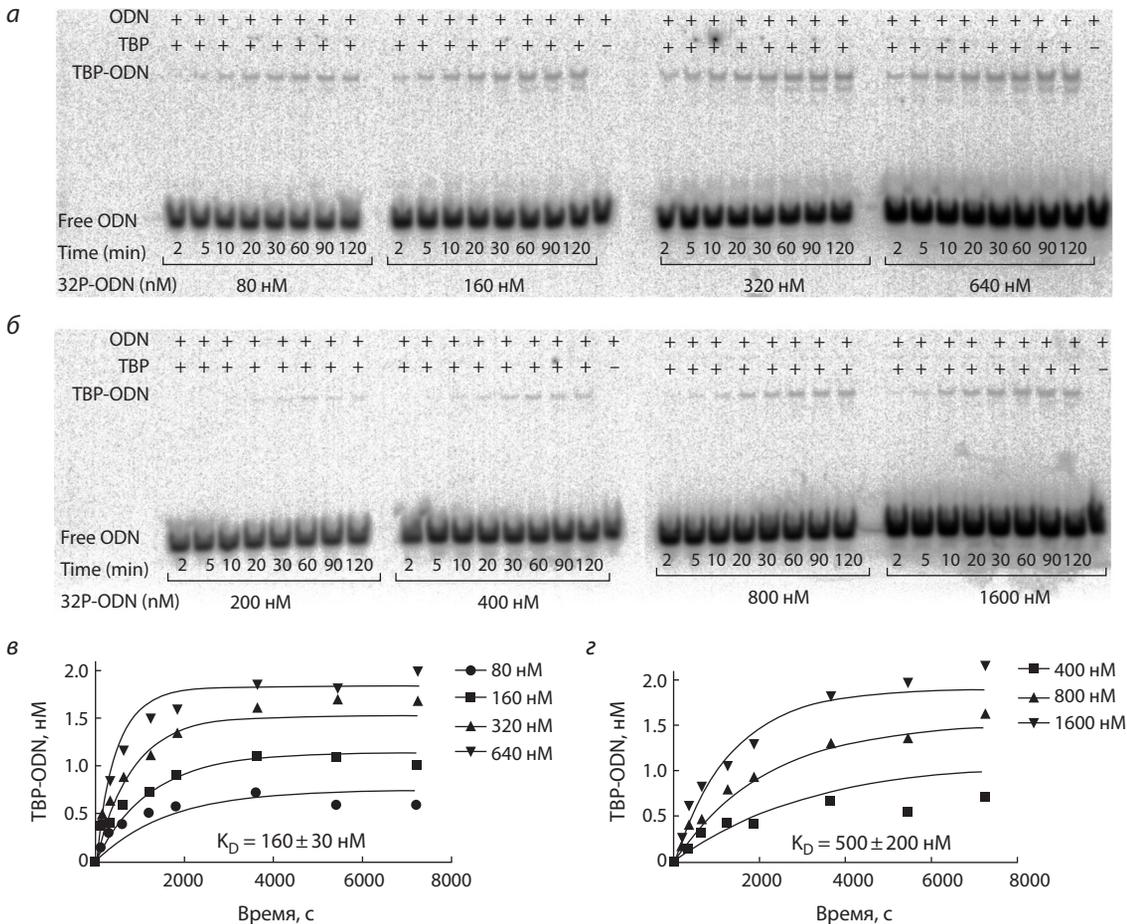
На этих рисунках можно видеть снижение сродства «ТВР-ODN» с 160 нМ в норме до 500 нМ для минорного аллеля rs2276109. Это свидетельствует об адекватности оценок Web-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester (Sharypova et al., 2018) для оценки сродства ТВР к промоторам генов на хромосоме Y человека.

Наконец, с помощью поиска по ключевым словам в базе данных PubMed (Lu, 2011) мы нашли клинические данные (Stahl et al., 2012) о дефиците экспрессии гена *CDY2A* при задержке полового созревания. Это позволило нам предложить кандидатный SNP-маркер rs200670724 как генетическую причину снижения МПП вследствие задержки полового созревания мужского организма.

**Ген *ZFY*** (Y-связанный белок «цинковый палец») является паралогом гена *ZFX* на хромосоме X человека. В его промоторе мы нашли два неаннотированных SNP, rs1388535808 и rs996955491, способных вызвать избыток *ZFY*, как представлено на рис. 1, г.

S.Z. Jan с коллегами (2018) сообщили о суперэкспрессии *ZFY* в сперматоцитах как клиническом маркере остановки их мейоза, азооспермии и бесплодия у мужчин. В границах применимости этих клинических наблюдений без гипотез о причинно-следственных связях мы предсказали rs1388535808 и rs996955491 как кандидатные SNP-маркеры, повышающие риск остановки сперматогенеза на стадии мейоза с последующей азооспермией и бесплодием, что безусловно, значительно снижает мужской репродуктивный потенциал (см. табл. 1).

**Ген *SHOX*** (гомеобокс низкорослости) локализован в псевдо-аутосомном районе 1 (PAR1) хромосомы Y человека. В проксимальных промоторах длиной 70 п. о. перед его стартами транскрипции мы нашли пять кандидатных SNP-маркеров для дефицита этого транскрипционного фактора (см. рис. 1, е: rs1452787381) и три кандидатных SNP-маркера для его избытка (см. табл. 1: rs28378830). Согласно табл. 1, они снижают МПП посредством непропорционально низкого роста с деформациями Маделунга (Ramachandrapa et al., 2018) либо нарушений эмбриогенеза (Brosens et al., 2014) соответственно.



**Рис. 2.** Измерение кинетики связывания ТВР с двумя ТАТА-содержащими синтетическими олигоДНК (ODN), идентичными промотору гена *CDY2A* человека.

Обозначения: а и б – электрофореграммы для нормального и минорного аллелей неаннотированного SNP rs200670724; концентрация ТВР составляла 2 нМ во всех экспериментах; указаны концентрации ODN; в и з – зависимости концентрации комплексов ТВР-ODN от концентраций ODN в случаях нормального и минорного аллелей SNP rs200670724 соответственно; значение  $K_D$  константы равновесной диссоциации комплекса ТВР-ODN – результат расчетов общедоступного Web-сервиса GraphPad Prism 5 (<http://graphpad-prism.software.informer.com/5.01>) в случае приведенных зависимостей между концентрациями ТВР-ODN и ODN в качестве входных данных для него.

Экспериментальные данные *in vitro* для выборочной проверки трех кандидатных SNP-маркеров снижения МРП, rs20067072 (*CDY2A*), rs1452787381 (*ZFY*) и rs1452787381 (*SHOX*), представлены в табл. 2. С использованием метода EMSA были измерены, прежде всего, равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ), а также время полураспада ( $t_{1/2}$ ), константы скорости сборки ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) комплексов ТВР-ODN, как это было показано на иллюстративном примере rs200670724 (см. рис. 2).

Достоверные робастные корреляции – линейная Пирсона ( $r$ ), обобщенная Гудмана–Крускала ( $\gamma$ ), ранговые Спирмена ( $R$ ) и Кендалла ( $\tau$ ), – между нашими предсказанными (см. табл. 1) и экспериментальными (см. табл. 2) значениями равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ), выраженными в натуральных логарифмических единицах, показаны на рис. 3. Они доказывают адекватность наших прогнозов для величин сродства ТВР к промоторам генов Y-хромосомы человека. В порядке обсуждения можно коротко отметить, что несовпадение между шкалами вертикальной (эксперимент) и горизонтальной (прогноз) осей на рис. 3 соответствует различию в концентрациях ТВР

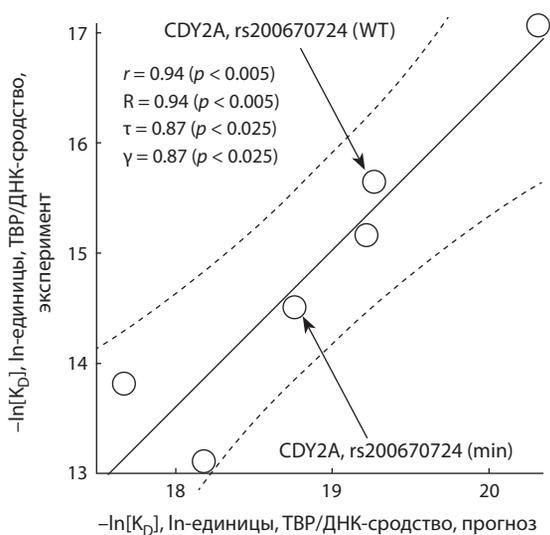
(т. е. в неконтролируемой доле димеров ТВР, которые имеют  $K_D = 4 \pm 1.5$  нМ (Coleman et al., 1995) и не связывают ДНК) в этой работе (2 нМ) и ранее (Ponomarenko P. et al., 2008) при оптимизации трехшаговой модели связывания «ТВР-промотор» (0.3 нМ), использованной Web-сервисом SNP\_TATA\_Z-tester (Sharypova et al., 2018) для прогнозов в этой работе.

Самая близкая к канонической последовательность ТАТА-бокса наблюдается в промоторе гена *SHOX* с  $K_D = 39 \pm 7$  нМ (см. табл. 2). Минорный вариант SNP rs1452787381 (замена «А» на «G» в ТАТА-боксе) приводит к снижению сродства почти в 7 раз, что обусловлено снижением скорости образования комплексов ( $k_a$ ) в 22 раза. Скорость распада комплексов ( $k_d$ ) снижается в 3 раза, а также увеличивается время жизни комплексов ( $t_{1/2}$ ). Все эти характеристики могут привести к повышенному риску формирования непропорционально низкого роста с деформациями Маделунга.

Наихудшее сродство «ТВР-OND»,  $K_D = 1000 \pm 400$  нМ, было определено для комплексов ТВР с промотором гена *ZFY*, имеющего последовательность (СССААСТАС),

**Таблица 2.** Измерение *in vitro* методом задержки электрофоретической подвижности (EMSA) времени полураспада ( $t_{1/2}$ ), равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ), констант скоростей сборки ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) для комплексов ТВР с синтетическими олигоДНК (ODN)

Ген dbSNP ID (Sherry et al., 2001)	Аллель	ODN, последовательность, 26 п. о.	Прогноз		Эксперимент			
			$-\ln(K_D)$	$K_D$ , нМ	$t_{1/2}$ , мин	$k_a$ , $M^{-1}c^{-1}$	$k_d$ , $c^{-1} \times 10^{-4}$	
<i>CDY2A</i> rs200670724	WT	agaatgttccataTaatcgatagc	19.27	160 ± 30	28.2 ± 5.4	2500 ± 300	4.1 ± 0.7	
	T-43C	agaatgttccataCaatcgatagc	18.76	500 ± 200	64.2 ± 18.2	350 ± 50	1.8 ± 0.6	
<i>ZFY</i> rs1388535808	WT	ggcggagggggccCaactaccatccc	17.67	1000 ± 400	50.2 ± 15.8	230 ± 40	2.3 ± 0.6	
	C-56T	ggcggagggggccTaactaccatccc	18.18	2000 ± 1000	57.8 ± 17.8	90 ± 50	2.0 ± 0.7	
<i>SHOX</i> rs1452787381	WT	gaggtcgccgcgtAataatagtgaga	20.31	39 ± 7	19.3 ± 3.1	17000 ± 2000	6.0 ± 1.0	
	A-45G	gaggtcgccgcgtGataatagtgaga	19.21	260 ± 70	57.8 ± 14.5	770 ± 80	2.0 ± 0.5	



**Рис. 3.** Достоверные робастные корреляции между предсказанными *in silico* и измеренными *in vitro* величинами сродства ТВР-ODN (выражены в натуральных логарифмических единицах).

Обозначения: Линия и пунктир – линейная регрессия и границы ее 95 % доверительного интервала, рассчитанные с помощью стандартного программного комплекса STATISTICA (Statsoft™, Tulsa, США); стрелками указаны нормальный (WT) и минорный (min) аллели SNP rs200670724, использованные в качестве иллюстративных примеров на рис. 1, а–в и 2;  $r$ ,  $\gamma$ ,  $R$ ,  $\tau$  и  $p$  – корреляции: линейная Пирсона, обобщенная Гудмана–Крускала, ранговые Спирмена и Кендалла – и их статистическая значимость соответственно.

лишь весьма отдаленно напоминающую консенсус ТАТА бокса (ТАТААААГ). Замена «С» на «Т» не спасает положение – скорость образования комплексов ( $k_a$ ) снижается в 2.5 раза, и незначительно изменяется скорость их распада ( $k_d$ ) и время жизни ( $t_{1/2}$ ). Можно предположить, что предсказанная нами *in silico* суперэкспрессия минорного аллеля SNP rs1388535808 в сперматocyтах, приводящая к остановке сперматогенеза на стадии мейоза, азооспермии и бесплодию, в условиях *in vivo* обеспечивается участием ТВР-ассоциированных факторов (ТАFs) и других регуляторных белков в образовании транскрипционного комплекса в случае ТАТА-несодержащего промотора гена *ZFY* человека.

Полученные данные о снижении сродства ТВР к промотору гена *CDY2A* более чем в 3 раза для аллеля С со-

ответствуют клиническим данным о дефиците продукта этого гена как генетической причине задержки полового созревания.

### Заклучение

В настоящей работе исследованы все 35 SNP в промоторах генов *CDY2A*, *SHOX* и *ZFY*, представлявших все три типа генов хромосомы Y человека: уникальный, псевдоаутосомный и паралог гена хромосомы X человека соответственно. Из них отобраны 11 кандидатных SNP-маркеров, способных изменить сродство ТВР к этим промоторам и таким образом способствовать ослаблению МРП. Прежде всего, мы выборочно верифицировали *in vitro* величины сродства «ТВР-промотор», предсказанные в этой работе, и установили статистически достоверную линейную корреляцию между ними и экспериментально измеренными величинами ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.005$ ). Используя поиск по ключевым словам в базе данных PubMed, мы нашли клинические данные о физиологических признаках патологий человека, которые соответствовали изменению экспрессии генов, несущих предсказанные кандидатные SNP-маркеры. Среди них были показатели процесса сперматогенеза (*ZFY*: rs1388535808 и rs996955491), задержки полового созревания (*CDY2A*: rs200670724), непропорционально низкого роста с деформациями Маделунга (например, *SHOX*: rs1452787381) и нарушения процесса эмбриогенеза (например, *SHOX*: rs28378830). В совокупности полученные результаты свидетельствуют, что в случае SNP-промоторов генов хромосомы Y человека следует ожидать изменений широкого круга показателей МРП, выходящих далеко за рамки генетического контроля собственно мужской репродуктивной функции.

Это заключение согласуется с выводом авторов реконструкции коэволюции хромосом X и Y у разных видов (опоссум, бык, крыса, мышь, мармозетка, макака-резус, шимпанзе и человек) на основе данных высокопроизводительного секвенирования (Bellott et al., 2014), что, кроме мужской репродуктивной функции, хромосома Y определяет также гендерный диморфизм в предрасположенности к заболеваниям и жизнеспособность мужчин. Предсказанные и экспериментально подтвержденные здесь изменения сродства ТВР к минорным вариантам SNP генов *CDY2A*, *SHOX* и *ZFY* человека могут снизить МРП лишь при аномальных изменениях уровней белков, кодируемых этими генами, в соответствующих тканях на

определенных стадиях онтогенеза. Это с необходимостью требует клинической проверки, на снижение затрат которой благодаря улучшению ее адресности нацелено наше экспериментально-биоинформатическое исследование.

## Список литературы / References

- Amberger J., Bocchini C., Schiettecatte F., Scott A., Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D789-D798. DOI 10.1093/nar/gku1205.
- Arkova O.V., Ponomarenko M.P., Rasskazov D.A., Drachkova I.A., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Obesity-related known and candidate SNP markers can significantly change affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genomics.* 2015;16(Suppl. 13):S5. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S5.
- Axelsson J., Bonde J.P., Giwercman Y.L., Rylander L., Giwercman A. Gene-environment interaction and male reproductive function. *Asian J. Androl.* 2010;12(3):298-307. DOI 10.1038/aja.2010.16.
- Bellott D.W., Hughes J.F., Skaletsky H., Brown L.G., Pyntikova T., Cho T.-J., Koutseva N., Zaghlul S., Graves T., Rock S., Kremitzki C., Fulton R.S., Dugan S., Ding Y., Morton D., Khan Z., Lewis L., Buhay C., Wang Q., Watt J., Holder M., Lee S., Nazareth L., Alfoldi J., Rozen S., Muzny D.M., Warren W.C., Gibbs R.A., Wilson R.K., Page D.C. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature.* 2014;508(7497):494-499. DOI 10.1038/nature13206.
- Bowles J.T. The evolution of aging: a new approach to an old problem of biology. *Med. Hypotheses.* 1998;51(3):179-221. DOI 10.1016/s0306-9877(98)90079-2.
- Brosens E., de Jong E., Barakat T., Eussen B., D'Haene B., De Baere E., Verdin H., Poddighe P., Galjaard R., Gribnau J., Brooks A., Tibboel D., de Klein A. Structural and numerical changes of chromosome X in patients with esophageal atresia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014;22:1077-1084. DOI 10.1038/ejhg.2013.295.
- Chadaeva I.V., Ponomarenko M.P., Rasskazov D.A., Sharypova E.B., Kashina E.V., Matveeva M.Yu., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Arkova O.V., Bondar N.P., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Candidate SNP markers of aggressiveness-related complications and comorbidities of genetic diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genomics.* 2016;17(Suppl. 14):995. DOI 10.1186/s12864-016-3353-3.
- Chadaeva I., Ponomarenko P., Rasskazov D., Sharypova E., Kashina E., Zhechev D., Drachkova I., Arkova O., Savinkova L., Ponomarenko M., Kolchanov N., Osadchuk L., Osadchuk A. Candidate SNP markers of reproductive potential are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genomics.* 2018;19(Suppl. 3):19. DOI 10.1186/s12864-018-4478-3.
- Chadaeva I., Ponomarenko P., Rasskazov D., Sharypova E., Kashina E., Kleshchev M., Ponomarenko M., Naumenko V., Savinkova L., Kolchanov N., Osadchuk L., Osadchuk A. Natural selection equally supports the human tendencies in subordination and domination: a genome-wide study with *in silico* confirmation and *in vivo* validation in mice. *Front. Genet.* 2019;10:73. DOI 10.3389/fgene.2019.00073.
- Chapman R.N. Animal Ecology with Special Reference to Insects. N. Y.; London: McGraw-Hill Book Co Inc, 1931.
- Coleman R., Taggart A., Benjamin L., Pugh B. Dimerization of the TATA binding protein. *J. Biol. Chem.* 1995;270:13842-13849.
- Cunningham F., Achuthan P., Akanni W., Allen J., Amode M., Armean I., Bennett R., Bhai J., Billis K., Boddu S., Cummins C., Davidson C., Dodiya K., Gall A., Giron C., Gil L., Grego T., Haggerty L., Haskell E., Hourlier T., Izuogu O., Janacek S., Juettmann T., Kay M., Laird M., Lavidas I., Liu Z., Loveland J., Marugan J., Maurel T., McMahon A., Moore B., Morales J., Mudge J., Nuhn M., Ogeh D., Parker A., Parton A., Patricio M., Abdul Salam A., Schmitt B., Schuilenburg H., Sheppard D., Sparrow H., Stapleton E., Szuba M., Taylor K., Threadgold G., Thormann A., Vullo A., Walts B., Winterbottom A., Zadissa A., Chakiachvili M., Frankish A., Hunt S., Kostadima M., Langridge N., Martin F., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Staines D., Trevanion S., Aken B., Yates A., Zerbino D., Flicek P. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D745-D751. DOI 10.1093/nar/gky1113.
- Drachkova I.A., Lysova M.V., Repkova M.N., Prokuda O.V., Sokolenko A.A., Arshinova T.V., Kobzev V.F., Iamkovoï V.I., Savinkova L.K. Interaction of proteins from general transcription complex RNA polymerase II with oligoribonucleotides. *Mol. Biol. (Mosk).* 2005;39(1):139-146.
- Haeussler M., Raney B.J., Hinrichs A.S., Clawson H., Zweig A.S., Karolchik D., Casper J., Speir M.L., Haussler D., Kent W.J. Navigating protected genomics data with UCSC Genome Browser in a box. *Bioinformatics.* 2015;31(5):764-766. DOI 10.1093/bioinformatics/btu712.
- Haldane J.B.S. The cost of natural selection. *J. Genet.* 1957;55:511-524. DOI 10.1007/BF02984069.
- Jan S.Z., Jongejan A., Korver C.M., van Daalen S.K.M., van Pelt A.M.M., Repping S., Hamer G. Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development.* 2018;145(16):dev160614. DOI 10.1242/dev.160614.
- Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature.* 1968;217(5129):624-626. DOI 10.1038/217624a0.
- Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. Database (Oxford). 2011;2011:baq036. DOI 10.1093/database/baq036.
- Martianov I., Viville S., Davidson I. RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science.* 2002;298(5595):1036-1039. DOI 10.1126/science.1076327.
- Mitsuyasu H., Izuhara K., Mao X., Gao P., Arinobu Y., Enomoto T., Kawai M., Sasaki S., Dake Y., Hamasaki N., Shirakawa T., Hopkin J. Ile50Val variant of IL4R-alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat. Genet.* 1998;19:119-120. DOI 10.1038/472.
- Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B.A. TATA is a modular component of synthetic promoters. *Genome Res.* 2010;20(10):1391-1397. DOI 10.1101/gr.106732.110.
- Peterson M.G., Tanese N., Pugh B.F., Tjian R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science.* 1990;248(4963):1625-1630.
- Pianka E.R. Natural selection of optimal reproductive tactics. *Am. Zool.* 1976;16(4):775-784. www.jstor.org/stable/3882142.
- Pocai B. The ICD-11 has been adopted by the World Health Assembly. *World Psychiatry.* 2019;18(3):371-372. DOI 10.1002/wps.20689.
- Ponomarenko M., Arkova O., Rasskazov D., Ponomarenko P., Savinkova L., Kolchanov N. Candidate SNP markers of gender-biased autoimmune complications of monogenic diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Front. Immunol.* 2016;7:130. DOI 10.3389/fimmu.2016.00130.
- Ponomarenko M., Mironova V., Gunbin K., Savinkova L. Hogness Box. In: Maloy S., Hughes K. (Eds.). Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2nd edn. San Diego: Academic Press, Elsevier Inc. 2013;3:491-494. DOI 10.1016/B978-0-12-374984-0.00720-8.
- Ponomarenko M., Rasskazov D., Arkova O., Ponomarenko P., Suslov V., Savinkova L., Kolchanov N. How to use SNP\_TATA\_Comparator to find a significant change in gene expression caused by the regulatory SNP of this gene's promoter via a change in affinity of the TATA-binding protein for this promoter. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:35983004625. DOI 10.1155/2015/359835.
- Ponomarenko M., Rasskazov D., Chadaeva I., Sharypova E., Drachkova I., Ponomarenko P., Oshchepkova E., Savinkova L., Kolchanov N. Candidate SNP markers of atherosclerosis that may significantly change the affinity of the TATA-binding protein for the human gene promoters. *Russ. J. Genet.* 2019;55(9):1137-1151. DOI 10.1134/s1022795419090114.

- Ponomarenko M., Rasskazov D., Chadaeva I., Sharypova E., Ponomarenko P., Arkova O., Kashina E., Ivanisenko N., Zhechev D., Savinkova L., Kolchanov N. SNP\_TATA\_Comparator: genomewide landmarks for preventive personalized medicine. *Front. Biosci. (Schol Ed.)*. 2017;9(2):276-306. DOI 10.2741/S488.
- Ponomarenko P., Chadaeva I., Rasskazov D., Sharypova E., Kashina E.V., Drachkova I., Zhechev D., Ponomarenko M., Savinkova L., Kolchanov N. Candidate SNP markers of familial and sporadic Alzheimer's diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Front. Aging Neurosci.* 2017;9:231. DOI 10.3389/fnagi.2017.00231.
- Ponomarenko P., Rasskazov D., Suslov V., Sharypova E., Savinkova L., Podkolodnaya O., Podkolodny N., Tverdokhlebov N., Chadaeva I., Ponomarenko M., Kolchanov N. Candidate SNP markers of chronicopathologies are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BioMed Res. Int.* 2016;2016:8642703. DOI 10.1155/2016/8642703.
- Ponomarenko P., Savinkova L., Drachkova I., Lysova M., Arshinova T., Ponomarenko M., Kolchanov N. A step-by-step model of TBP/TATA box binding allows predicting human hereditary diseases by single nucleotide polymorphism. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008;419:88-92. DOI 10.1134/S1607672908020117.
- Pugh B.F. Purification of the human TATA-binding protein, TBP. *Methods Mol. Biol.* 1995;37:359-367. DOI 10.1385/0-89603-288-4:359.
- Putlyaeva L.V., Demin D.E., Korneev K.V., Kasyanov A.S., Tatosyan K.A., Kulakovskiy I.V., Kuprash D.V., Schwartz A.M. Potential markers of autoimmune diseases, alleles rs115662534(T) and rs548231435(C), disrupt the binding of transcription factors STAT1 and EBF1 to the regulatory elements of human CD40 gene. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(12):1534-1542. DOI 10.1134/S0006297918120118.
- Ramachandrapa S., Kulkarni A., Gandhi H., Ellis C., Hutt R., Roberts L., Hamid R., Papageorghiou A., Mansour S. SHOX haploinsufficiency presenting with isolated short long bones in the second and third trimester. *Eur. J. Hum. Genet.* 2018;26:350-358. DOI 10.1038/s41431-017-0080-4.
- Rhee H., Pugh B. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*. 2012;483(7389):295-301. DOI 10.1038/nature10799.
- Sharypova E., Drachkova I., Kashina E., Rasskazov D., Ponomarenko P., Ponomarenko M., Kolchanov N., Savinkova L. An experimental study of the effect of rare polymorphisms of human HBB, HBD and F9 promoter TATA boxes on the kinetics of interaction with the TATA-binding protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342. (in Russian)
- Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-311. DOI 10.1093/nar/29.1.308.
- Stahl P., Mielnik A., Barbieri C., Schlegel P., Paduch D. Deletion or underexpression of the Y-chromosome genes *CDY2* and *HSFY* is associated with maturation arrest in American men with nonobstructive azoospermia. *Asian J. Androl.* 2012;14(5):676-682. DOI 10.1038/aja.2012.55.
- Stajich J., Block D., Boulez K., Brenner S., Chervitz S., Dagdigan C., Fuellen G., Gilbert J., Korf I., Lapp H., Lehvaslaiho H., Matsalla C., Mungall C., Osborne B., Pocock M., Schattner P., Senger M., Stein L., Stupka E., Wilkinson M., Birney E. The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res.* 2002;12(10):1611-1618. DOI 10.1101/gr.361602.
- Telenti A., Pierce L.C., Biggs W.H., di Iulio J., Wong E.H., Fabani M.M., Kirkness E.F., Moustafa A., Shah N., Xie C., Brewerton S.C., Bulsara N., Garner C., Metzker G., Sandoval E., Perkins B.A., Och F.J., Turpaz Y., Venter J.C. Deep sequencing of 10,000 human genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(42):11901-11906. DOI 10.1073/pnas.1613365113.
- Trovato G.M. Sustainable medical research by effective and comprehensive medical skills: overcoming the frontiers by predictive, preventive and personalized medicine. *EPMA J.* 2014;5(1):14. DOI 10.1186/1878-5085-5-14.
- Turnaev I., Rasskazov D., Arkova O., Ponomarenko M., Ponomarenko P., Savinkova L., Kolchanov N. Hypothetical SNP markers that significantly affect the affinity of the TATA-binding protein to VEGFA, ERBB2, IGF1R, FLT1, KDR, and MET oncogene promoters as chemotherapy targets. *Mol. Biol. (Mosc)*. 2016;50(1):161-173. DOI 10.7868/S0026898416010201.
- Varzari A., Deyneko I.V., Tudor E., Turcan S. Polymorphisms of glutathione S-transferase and methylenetetrahydrofolate reductase genes in Moldavian patients with ulcerative colitis: Genotype-phenotype correlation. *Meta Gene*. 2016;7:76-82. DOI 10.1016/j.mgene.2015.12.002.
- Waardenberg A.J., Basset S.D., Bouveret R., Harvey R.P. CompGO: an R package for comparing and visualizing Gene Ontology enrichment differences between DNA binding experiments. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:275.
- Wu J., Wu M., Li L., Liu Z., Zeng W., Jiang R. dbWGFP: a database and web server of human whole-genome single nucleotide variants and their functional predictions. Database (Oxford). 2016;2016:baw024. DOI 10.1093/database/baw024.
- Yoo S., Jin C., Jung D., Choi Y., Choi J., Lee W., Lee S., Lee J., Cha S., Kim C., Seok Y., Lee E., Park J. Putative functional variants of XRCC1 identified by RegulomeDB were not associated with lung cancer risk in a Korean population. *Cancer Genet.* 2015;208(1-2):19-24. DOI 10.1016/j.cancergen.2014.11.004.
- Zerbino D.R., Wilder S.P., Johnson N., Juettemann T., Flicek P.R. The ensembl regulatory build. *Genome Biol.* 2015;16(1):56. DOI 10.1186/s13059-015-0621-5.

#### ORCID ID

M.P. Ponomarenko orcid.org/0000-0003-1663-318X  
I.V. Chadaeva orcid.org/0000-0002-2724-5441  
D.A. Rasskazov orcid.org/0000-0003-4795-0954  
P.M. Ponomarenko orcid.org/0000-0003-2715-9612  
L.V. Osadchuk orcid.org/0000-0002-7597-9204  
A.V. Osadchuk orcid.org/0000-0002-4210-7354

**Благодарности.** Идея, общая координация работы, компьютерные прогнозы и их биологическая интерпретация (ЛВО и АВО) осуществлены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00075). Текст рукописи написан МПП и ИВЧ при поддержке Минобрнауки РФ по Программе повышения конкурентоспособности российских университетов среди мировых научно-образовательных центров (Проект 5-100), Web-сервис (МПП и ДАР) и эксперимент *in vitro* (ЕБШ, ИАД и ЛКС) – при поддержке бюджетных проектов № 0324-2019-0040-С-01 и № 0324-2019-0042-С-01 соответственно.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.12.2019. После доработки 13.07.2020. Принята к публикации 15.07.2020.

## Эколого-генетическая оценка последствий влияния радиации на загрязненных территориях

А.Б. Бигалиев<sup>1</sup>✉, К.З. Шалабаева<sup>1</sup>, Б.Е. Шимшиков<sup>1</sup>, С.С. Кобегенова<sup>1</sup>, Л.М. Адилова<sup>2</sup>, А.Н. Кожаметова<sup>1</sup>, С. Шарахметов<sup>1</sup>, М.Н. Бурханова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

<sup>3</sup> Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга, Алматы, Казахстан

✉ e-mail: aitkhazha@gmail.com

**Аннотация.** Объектами исследования являются районы Западно-Казахстанской области Республики Казахстан, прилегающие к полигону Капустин Яр: Бокейординский, Жангалинский, Жанибекский, Казталовский, Акжайыкский и Сырымский. Цель работы – радиоэкологическое обследование загрязненных территорий и исследование содержания загрязнителей в объектах среды, биоте (грызунах, рыбах и биосубстратах домашних животных) физико-химическими методами для оценки воздействия полигона на биоту и человека. Представлены результаты экспедиционных и лабораторных исследований объектов окружающей среды прилегающих к полигону районов. Приведены показатели гамма-съемки уровней радиационного фона обследуемых территорий, данные о загрязнении почвы, поверхностных и подземных вод, доминантных форм растений, биосубстратов (шерсти домашних животных: верблюда, лошади, коровы). Используются стандартные способы отбора проб, общепринятые методы исследования: радиологический и цитогенетический (микроядерный), атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Проведено рекогносцировочное и радиоэкологическое обследование объектов окружающей среды с использованием аналитических методик, что позволило определить количественное содержание токсичных компонентов, приоритетных загрязнителей и радиоактивных изотопов. Установлено, что значения объемной активности природных и техногенных радионуклидов в пробах почвы, питьевой воды и биосубстратах (шерсти домашних животных, образцах периферической крови человека) из населенных пунктов соответствуют величине контрольного уровня для данного региона. Измерения гамма-излучения показали, что по периметру территории полигона и в близлежащих населенных пунктах уровень радиации находится в пределах 0.06–0.14 мкЗв/ч. Незначительное превышение уровня радиоактивности сохраняется вблизи падения ракет в Бокейординском районе. Исследованные районы характеризуются незначительным уровнем радиационного фона: среднее значение МЭД составляет 0.014 мкЗв/ч. Абсолютный максимум, 0.73 мкЗв/ч, зарегистрирован в пунктах падения ракет в Казталовском районе. Ключевые слова: радиация; радионуклиды; радиоактивность; биосубстрат; полигон; мутация; цитогенетика; мутагены; экология.

**Для цитирования:** Бигалиев А.Б., Шалабаева К.З., Шимшиков Б.Е., Кобегенова С.С., Адилова Л.М., Кожаметова А.Н., Шарахметов С., Бурханова М.Н. Эколого-генетическая оценка последствий влияния радиации на загрязненных территориях. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):794-801. DOI 10.18699/VJ20.675

## Ecological and genetic assessment of the consequences of radiation influence on contaminated areas

A.B. Bigaliev<sup>1</sup>✉, K.Z. Shalabaeva<sup>1</sup>, B.E. Shimshikov<sup>1</sup>, S.S. Kobegenova<sup>1</sup>, L.M. Adilova<sup>2</sup>, A.N. Kozhakhmetova<sup>1</sup>, S. Sharakhmetov<sup>1</sup>, M.N. Burkhanova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

<sup>3</sup> Scientific and Practical Center for Sanitary and Epidemiological Expertise and Monitoring, Almaty, Kazakhstan

✉ e-mail: aitkhazha@gmail.com

**Abstract.** The objects of study are the territory of the districts of the West Kazakhstan region of the Republic of Kazakhstan adjacent to the Kapustin Yar test site: Bokeyordinsky, Zhangalinsky, Zhanibeksky, Kaztalovsky, Akzhayiksky and Syrymsky. The purpose of the work is to conduct a radioecological survey of contaminated areas and to study the content of pollutants in environmental objects, biota (rodents, fish and biosubstrates of domestic animals) by physicochemical methods to assess the risk of the landfill's impact on biota and humans. This paper presents the results of expeditionary and laboratory research on the pollution of environmental objects in the areas adjacent to the landfill. Indicators of the gamma-survey of the levels of radiation background of the surveyed territories as well as data on pollution of soil, surface and ground waters, dominant forms of plants, biosubstrates (hair of domestic animals: camel, horse, cow) are given. The generally accepted research methods were used: standard sampling me-

thods, radiological, atomic adsorption spectrophotometry, cytogenetic (micronucleus) method. A reconnaissance and radioecological examination of environmental objects was carried out using analytical methods, which made it possible to determine the quantitative content of toxic components, the content of priority pollutants and radioactive isotopes. It has been established that the values of the volumetric activity of natural and man-made radionuclides in soil samples, drinking water and biosubstrates (pet hair, human peripheral blood samples) from settlements correspond to the value of the control level for this region. The measurements of radiation activity by gamma radiation showed that along the perimeter of the surveyed territory of the test site and in nearby settlements the radiation level is in the range of 0.06–0.014  $\mu\text{Sv/h}$ . A slight excess of the level of radioactivity persists in the area near the fall of missiles in the Bokeyordin region. The investigated regions are characterized by an insignificant level of background radiation, the average DER value for the regions as a whole is 0.14  $\mu\text{Sv/h}$ . The absolute maximum, 0.73  $\mu\text{Sv/h}$ , was recorded at the points of missile impact in the Kaztal region.

Key words: radiation; radionuclides; radioactivity; biosubstrate; polygon; mutation; cytogenetics; mutagens; ecology.

**For citation:** Bigaliev A.B., Shalabaeva K.Z., Shimshikov B.E., Kobegenova S.S., Adilova L.M., Kozhakhmetova A.N., Sharakhmetov S., Burkhanova M.N. Ecological and genetic assessment of the consequences of radiation influence on contaminated areas. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7): 794–801. DOI 10.18699/VJ20.675 (in Russian)

## Введение

Вокруг ракетно-ядерных полигонов в Атырауской и Западно-Казахстанской областях Республики Казахстан сложилась сложная экологическая обстановка, вызванная радиационным загрязнением природной среды. В 2004–2008 гг. на территории военных полигонов Капустин Яр и Азгир и в прилегающих районах проведен ряд экологических работ с применением полевых и аналитических методов исследования. Тем не менее вопрос о степени влияния деятельности полигонов на окружающую среду и здоровье населения остается нерешенным<sup>1</sup> (Мухаметжанова, 2017). На протяжении нескольких десятков лет ученые Казахского национального университета имени аль-Фараби проводят исследования, направленные на поиск чувствительных биологических маркеров, специфичных для оценки радиационного воздействия и информативных как в раннем, так и отдаленном периоде облучения. В настоящее время одними из немногих биологических показателей (наряду с ЭПР-спектроскопией эмали зубов), в полной мере отвечающих этим требованиям, являются хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови. Принципы цитогенетического метода индикации радиационного воздействия достаточно убедительно обоснованы во многих отечественных и зарубежных исследованиях, результаты которых послужили основой для рекомендаций ВОЗ, МАГАТЭ и НКДАР ООН по использованию анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови в качестве тест-системы для количественной оценки действия мутагенных факторов радиационной природы (WHO..., 2010). Данные о «биологической» дозе, полученные с помощью цитогенетических методов шире, чем ее физическое значение, так как отражают не только результат радиационного воздействия на организм человека, но и его индивидуальную радиочувствительность, что позволяет более корректно прогнозировать ранние и отдаленные последствия облучения. В настоящее время в большинстве случаев, при которых люди подвергаются воздействию радиации как от естественных, так и техногенных источников, речь идет об облучении в небольших

дозах (Zhumadilov et al., 2013). Поэтому основную проблему составляют последствия радиационного воздействия в малых дозах, особенности биологических эффектов которого до сих пор являются предметом активных дискуссий (Hoshi, Saimova, 2017).

Актуальность предлагаемой работы определена необходимостью изучения современного состояния природных популяций растений, животных и человека в условиях различного фона ионизирующей радиации при длительном хроническом облучении в местах ядерных испытаний на территории полигона Капустин Яр. В свою очередь, оценка влияния деятельности полигона требует разработки природоохранных мероприятий по уменьшению техногенного воздействия, ранней диагностики устойчивости генома природных популяций, подвергающихся давлению антропогенного пресса. При этом требуются учет и прогнозирование текущих и отдаленных последствий влияния факторов среды обитания на биоту и здоровье населения, что представляет чрезвычайную актуальность для данного региона и имеет научно-практическую значимость (Bigaliev, 2016; Markabayeva et al., 2018).

## Материалы и методы

Использованы общепринятые методы отбора проб почвы, воды, образцов растений, животных и человека. Отбор проб почвы производили согласно стандартной методике № 5.05.008-99 г. (Островская и др., 2014). Пробы почвы плотно запечатывали в кюветах и перед спектрометрическими измерениями выдерживали в течение 2–3 нед. для установления подвижного равновесия между изотопами  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  и продуктами их распада ( $^{222}\text{Ra}$ ,  $^{220}\text{Ra}$  и др.). Исследования проводили согласно утвержденному и внесенному в государственный реестр Республики Казахстан документу «Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного гамма-спектрометра с программным обеспечением «Прогресс» (рег. № KZ.07.00.00304-2014)<sup>2</sup>. Из населенных пунктов, расположенных на прилегающей к полигону территории, отобраны биосубстраты домашних животных, образцы доминантных видов растений, взяты образцы периферической крови жителей. Все они являются зве-

<sup>1</sup> Национальный доклад о состоянии окружающей среды и использовании природных ресурсов Республики Казахстан за 2011–2014 годы. Под ред. РГП на ПХВ «Информационно-аналитический центр охраны окружающей среды». Алматы, 2015;214.

<sup>2</sup> Инструкция по отбору проб почвы при радиационном обследовании загрязненной территории, 1987.

нями трофической цепи питания и участвуют в миграции радионуклидов и тяжелых металлов (Постановление Правительства РК «Об утверждении Правил объявления чрезвычайной экологической ситуации» № 431 от 5 мая 2005 г.). Определение активности радионуклидов проводили спектрометрическим методом с использованием гамма-спектрометров «МКС-01А Мультирад» (ООО «НТЦ «Амплитуда», Россия), Canberra CR-4018 (США). Для выявления содержания тяжелых металлов применена атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Исследования проведены в физико-химической лаборатории факультета биологии и биотехнологии Казахского национального университета имени аль-Фараби в соответствии с общепринятыми стандартами (ГОСТ 26929-86, ГОСТ 30178-96, ИСО 8288-1986) на спектрофотометре «МГА-915МД» (ГК «Люмэкс», Россия) (Техногенные потоки..., 2001).

Для цитогенетического исследования использовали микроядерный тест. Цитологические препараты для микроядерного анализа готовили согласно общепринятым методикам (Руководство..., 2002), фотографировали в световых микроскопах Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) и Micro Optic (Австрия). Забор образцов крови для микроядерного анализа проводили из фаланги пальцев в условиях сельских поликлиник, соблюдая принципы антисептики. Объектом исследования служила популяция коренных жителей, включающая 107 человек, проживающих на территории, прилегающей к полигону Капустин Яр.

## Результаты и обсуждение

Планомерные работы по оценке влияния деятельности полигонов Капустин Яр и Азгир на окружающую среду начались в 2001 г., став первым этапом программы исследований в регионе, охватывающем шесть южных районов Западно-Казахстанской области и два района Атырауской области. Работы первого этапа завершены в 2002 г. (Loomis et al., 1990) – представлены результаты полевых и лабораторных исследований в Бокейординском и южной части Жангалинского районов. Выполнены инструментальные измерения радиационных параметров территории данных районов, используемой для падения отделяющихся частей ракет. Однако изучение состояния здоровья населения проведено только с использованием медицинской и демографической статистики. Данные медицинских исследований получены разными составами врачей, без сравнения с контрольным районом и проведения необходимых генетических исследований (популяционных и цитогенетических), должной статистической обработки полученных результатов.

В 2018–2019 гг. мы впервые взяли пробы, образцы и биосубстраты в этих же районах Западно-Казахстанской области для лабораторных исследований. Для рекогносцировочного изучения загрязненных участков, выявленных по результатам предыдущих исследований, проведено экспедиционное обследование экологического состояния компонентов окружающей среды: произведен отбор проб почвы, воды (подземных и поверхностных), растений, биосубстратов (шерсти домашних животных, органов и тканей рыб, грызунов, ящериц, образцов периферической крови жителей). В 2018 г. в Жангалинском районе взято 78 проб и образцов, Бокейординском районе – 89, Жани-

бекском районе – 75, Казталовском районе – 91. Всего по четырем районам – 333. В 2019 г. в Акжайыкском районе отобрано 78 проб и образцов, бывшем Тайпакском районе – 89, Сырымском районе – 46. Всего по трем районам – 213. Проведены измерения радиометрических параметров среды в точках отбора проб в соответствии с методикой гамма-съемки<sup>3</sup>.

## Полевые исследования

Результаты радиологического исследования активности радионуклидов техногенного происхождения в пробах и образцах тест-объектов, взятых с территорий зоны полигона, представлены в табл. 1.

Проведенные радиоэкологические исследования объектов окружающей среды с использованием аналитических методик позволили определить количественное содержание приоритетных загрязнителей и радиоактивных изотопов. Установлено, что значения объемной активности природных и техногенных радионуклидов в пробах почвы, питьевой воды и биосубстратах (шерсти домашних животных) из исследуемых населенных пунктов соответствуют показателям контрольного уровня. Измерения радиационной активности методом гамма-излучения показали, что по периметру обследованной территории полигона и в близлежащих населенных пунктах уровень радиации находится в пределах 0.06–0.014 мкЗв/ч, что соответствует уровню радиации для данного региона. Незначительное превышение уровня радиоактивности сохраняется на территории вблизи падения ракет в Бокейординском районе. Таким образом, исследованные районы характеризуются незначительным уровнем радиационного фона, среднее значение МЭД составляет 0.14 мкЗв/ч (Постановление Правительства РК «Об утверждении Правил объявления чрезвычайной экологической ситуации» № 431 от 5 мая 2005 г.). Абсолютный максимум, 0.73 мкЗв/ч, зарегистрирован в пунктах падения ракет в Казталовском районе.

Определено содержание тяжелых металлов в подготовленных пробах (почвы, растений и воды) методом атомно-абсорбционной спектрометрии согласно ГОСТ СТ РК ИСО 11047-2008 на приборах «МГА-915» и ASS-1 (табл. 2).

Наибольшая концентрация тяжелых металлов выявлена в подземных водах обследованных районов. Так, максимальные показатели содержания Zn составили 0.05–0.71 мг/л, Mn – 0.838 (с. Базаршолан), Cr – 0.052, Fe – 0.06–0.88 мг/л (с. Базартобе).

Незначительно увеличенное содержание тяжелых металлов определено на территориях с относительно повышенным радиационным фоном (с. Харкен, Базаршолан, Базартобе) – как в образцах почвы, так и растений. Значительное накопление тяжелых металлов Ni, Zn, Co, Cr установлено в почвах обследованных территорий, прилегающих к полигону. Полученные результаты позволяют констатировать, что загрязнение окружающей среды представляет определенную опасность для биоты и человека. К стойким химическим загрязнителям кумулятивного действия со специфическими токсическими свойствами

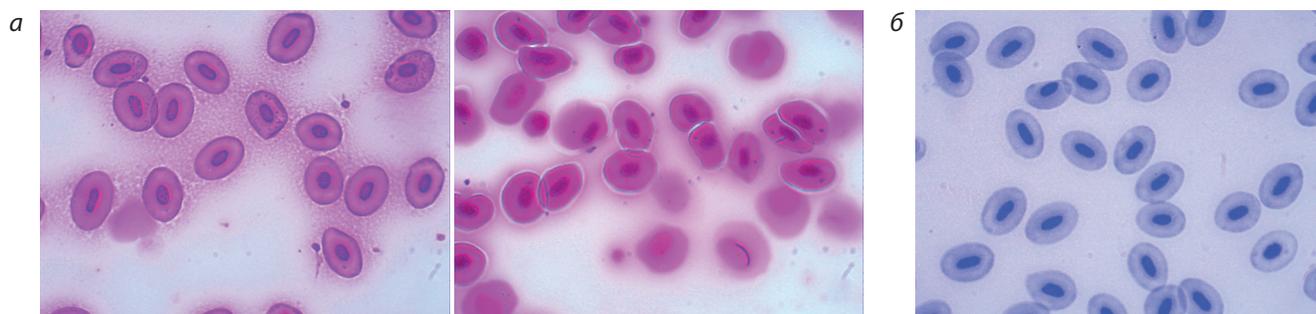
<sup>3</sup> Коллектив авторов ИРБЭ НЯЦ РК – отчет по теме: «Оценка влияния деятельности военных полигонов на окружающую среду и определение мер по ее реабилитации», 2002.

**Таблица 1.** Активность радионуклидов техногенного происхождения в пробах и образцах тест-объектов

Наименование пункта	Вид объекта	Масса, г	Cs-137	Ra-226	Th-232	K-40	r-90
<b>Бокейординский район</b>							
с. Бисен	Растения	89	< 3.0	38.5 ± 18.3	16.7 ± 9.0	220.0 ± 32.0	< 3.0
	Почва	942		36.8 ± 15.2	18.2 ± 7.0	324.0 ± 42.0	
с. Хан Ордасы (место падения ракеты)	Почва	108		30.6 ± 11.6	19.2 ± 6.0	251.0 ± 37.0	
	Растения	249		30.7 ± 14.0	20.0 ± 10.0	100.0 ± 27.0	
	Солевая пленка на поверхности грунтовых вод	40		40.9 ± 16.0	27.0 ± 13.0	110.0 ± 24.0	
<b>Жанибекский район</b>							
с. Маштексай (кладбище)	Почва	494	< 3.0	55.8 ± 11.7	7.7 ± 5.0	98.0 ± 27.0	< 3.0
	Растения	55		57.9 ± 13.2	9.4 ± 4.0	105.0 ± 23.0	
с. Онеге (точка отбора 3 км севернее)	Растения	90		59.3 ± 15.4	7.6 ± 5.0	109.0 ± 25.0	
	Почва	542		56.6 ± 11.0	11.3 ± 6.0	104.0 ± 20.0	
<b>Жангалинский район</b>							
с. Жанаказан (берег р. Большой Узень)	Почва	95	< 3.0	44.7 ± 11.0	18.7 ± 7.0	90.8 ± 28.0	< 3.0
	Растения	97		40.5 ± 14.0	23.3 ± 11.0	97.2 ± 26.0	
<b>Казталовский район</b>							
с. Казталовка (пункт Сексенбай-1)							
точка отбора 3 км западнее	Растения	54	< 3.0	62.6 ± 10.0	21.1 ± 10.0	218.5 ± 13.0	< 3.0
точка отбора 3 км южнее	Почва	355		73.5 ± 9.0	22.6 ± 12.0	226.2 ± 14.0	
с. Казталовка (пункт Сексенбай-2)							
точка отбора 3 км севернее	Растения	50		59.5 ± 10.0	24.4 ± 10.0	195.9 ± 18.0	
точка отбора 3 км юго-западнее	Почва	297		54.9 ± 12.0	17.9 ± 13.0	97.7 ± 20.0	
с. Бозой							
три точки по периметру	Растения	240		49.7 ± 15.0	25.4 ± 9.0	223.3 ± 10.0	
3 км севернее	Почва	1002		58.6 ± 13.0	18.2 ± 9.0	228.2 ± 11.0	
с. Коныс							
три точки по периметру	Растения	24		56.8 ± 11.0	17.6 ± 10.0	193.6 ± 19.0	
3 км севернее	Почва	257		55.8 ± 13.0	25.9 ± 8.0	219.4 ± 12.0	
с. Новоказанка (сор вдоль дороги)	Растения	137		59.4 ± 10.0	21.8 ± 9.0	195.5 ± 20.0	
<b>Объединенные пробы 5 особей каждого вида (биосубстраты)</b>							
Бокейординский район (с. Сайхин)	Шерсть коровы	104	< 3.0	13.8 ± 8.05	< 3.0	15.0 ± 10.0	< 3.0
	Шерсть лошади	102		11.6 ± 6.03		13.2 ± 8.0	
	Шерсть верблюда	107		12.5 ± 7.11		13.43 ± 7.1	
Жангалинский район (с. Новоказанка, Жангала)	Шерсть коровы	100	< 3.0	11.6 ± 6.15	< 3.0	12.2 ± 7.31	< 3.0
						11.2 ± 6.30	
	Шерсть лошади	102		10.4 ± 5.83		13.11 ± 8.2	
	Шерсть верблюда	107		11.5 ± 6.22		12.2 ± 7.31	
Жанибекский район (с. Бозой, Коныс)	Шерсть коровы	120	< 3.0	12.4 ± 7.51	< 3.0	13.3 ± 6.52	< 3.0
	Шерсть лошади	125		13.6 ± 8.14		13.7 ± 6.82	
	Шерсть верблюда	135		14.7 ± 7.66		15.2 ± 9.33	
Казталовский район (место падения ракет)	Шерсть коровы	110	< 3.0	11.4 ± 6.42	< 3.0	10.7 ± 5.81	< 3.0
	Шерсть лошади	125		13.6 ± 8.14		13.7 ± 6.73	
	Шерсть верблюда	105		10.8 ± 5.54		11.2 ± 7.12	

**Таблица 2.** Содержание тяжелых металлов в пробах почв, растений и воды (поверхностных и подземных) в зоне полигона Капустин Яр

Наименование пункта	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni	Co	Mn	Cr	Fe
В образцах почвы в слое 0–10 см, мг/кг									
пос. Лбищенский (у акимата)	18.67	118.71	0.77	15.00	91.43	17.08	766.66	71.43	52100.80
с. Аксуат (Батурино)	23.11	121.29	0.56	27.50	377.14	17.50	883.33	65.71	47058.82
с. Шандаржап (Харкен)	16.00	83.87	0.21	17.50	331.43	13.33	608.33	45.71	26890.75
с. Томпак	14.89	87.74	0.28	27.50	3371.42	15.42	666.66	42.86	31932.77
с. Тинали (у колодца)	22.44	127.74	0.70	27.50	480.00	16.25	733.33	54.28	33613.44
с. Базаршолан	18.44	105.80	0.49	35.00	245.71	13.33	733.33	45.71	35294.41
с. Караултобе	21.11	116.13	0.63	62.50	411.43	19.58	950.00	68.57	48739.49
с. Базартобе	17.11	149.68	0.35	32.50	251.43	4.58	633.33	37.14	16806.72
с. Толепколь	26.22	121.29	0.56	40.00	137.14	13.75	416.66	37.14	48739.50
с. Сайкудук	18.22	110.97	0.63	57.50	297.14	14.17	725.00	48.57	18487.39
с. Ж. Молдагалиева	15.11	103.22	0.70	37.50	131.43	10.00	725.00	37.44	33613.44
с. Жымпиты	20.33	117.42	0.77	47.50	262.86	14.17	900.00	51.43	21848.74
В пробах растений, мг/кг									
пос. Лбищенский (у акимата), полынь серая	15.83	90.11	0.80	3.81	10.90	3.00	7.14	16.18	694.44
с. Аксуат (Батурино), полынь серая	11.33	67.03	0.76	5.71	8.00	2.33	26.19	25.43	944.44
с. Чапаев, полынь белая	14.33	60.44	0.53	7.62	8.73	2.33	3.81	34.68	333.33
с. Тинали (у колодца), полынь	6.67	49.45	0.49	9.52	5.09	2.00	17.62	32.37	777.77
с. Томпак, полынь серая	8.00	27.47	0.53	5.71	5.82	1.67	12.38	39.31	750.00
с. Шандаржап (Харкен), итсигек	6.83	40.66	0.98	11.43	5.82	3.00	10.95	34.68	694.44
с. Толепколь, полынь зеленая	9.67	65.93	0.49	7.62	7.27	4.00	3.33	18.50	916.66
с. Базаршолан, кохия	10.33	39.56	0.71	9.52	10.18	2.67	20.00	32.37	1916.66
с. Базартобе, полынь	9.50	59.34	0.53	7.62	9.45	2.67	11.91	34.68	1527.77
с. Караултобе, полынь	8.16	26.37	0.58	93.52	5.09	1.67	12.38	23.12	694.44
с. Сайкудук, полынь	9.16	42.86	0.53	13.33	10.90	2.67	14.29	32.37	1666.66
с. Ж. Молдагалиева, полынь	12.16	60.44	0.71	11.43	8.73	2.67	13.33	34.68	1472.22
с. Жымпиты, полынь	9.16	52.75	0.89	13.33	5.09	3.67	9.05	23.12	1027.77
В пробах воды, мг/л									
с. Аксуат (Батурино), водонапорная башня	0.00322	0.05358	0.001145	0.02365	0.0095	0.0084	0.008571	0.02446	0.1277
с. Базаршолан, питьевая вода	0.00458	0.04956	0.001955	0.02514	0.0183	0.01503	0.8380	0.034335	0.024
с. Тинали, колодец	0.00967	0.02677	0.000773	0.01546	0.01353	0.05993	0.001933	0.033526	0.0177
Озеро у с. Аксуат	0.0048	0.03428	0.000773	0.009143	0.0136	0.0050	0.2743	0.01387	0.0053
пос. Лбищенский, подземная вода	0.003513	0.05859	0.000772	0.01771	0.005787	0.005373	0.01476	0.03583	0.0689
с. Караултобе, питьевая вода	0.00447	0.02279	0.00057	0.00813	0.006913	0.004473	0.002614	0.02538	0.01525
с. Ж. Молдагалиева, питьевая вода	0.000353	0.00058	0.00024	0.00505	0.003180	0.002297	0.00025	0.02696	0.0029
с. Сайкудук	0.00171	0.0089	0.00074	0.01131	0.00612	0.00540	0.0108	0.02122	0.0120
с. Жымпиты, питьевая вода	0.00219	0.01704	0.00074	0.01131	0.004387	0.004543	0.00201	0.02065	0.0235
с. Бударино	0.00324	0.02314	0.00122	0.02057	0.00544	0.00918	0.002571	0.0250	0.0195
с. Базартобе, вода из колодца	0.00544	0.01266	0.00448	0.07863	0.03456	0.0528	0.021486	0.05216	0.8800
с. Толепколь, колодец для овец	0.0050	0.05220	0.00096	0.01905	0.007393	0.006667	0.1357	0.03237	0.0250
с. Шандаржап (Харкен), водопровод	0.00309	0.7011	0.000772	0.01105	0.005027	0.00522	0.00193	0.02145	0.02094



Патологии эритроцитов карася.

а – микроядра, смещение ядра к периферии, анизоцитоз; б – микроядра, инвагинация ядра (ув. × 1000, окрашивание основным фуксином по Пфейферу).

относятся прежде всего тяжелые металлы. Тройку наиболее экологически опасных тяжелых металлов составляют свинец, ртуть и кадмий. Данные металлы являются потенциально опасными токсикантами, способными вызывать нарушения жизнедеятельности водной и наземной биоты, и, следовательно, могут быть дестабилизирующим фактором в экологической системе сложившегося биоценоза (Фомин Г.С., Фомин А.Г., 2001). Также общеизвестно, что тяжелые металлы, накапливаясь в тканях организма, изменяют транскрипционную активность хромосом (Теплая, 2013; Chaizhunusova et al., 2017; Serzhanova et al., 2018) и приводят к нарушениям устойчивости генома. Обнаруженный относительно высокий уровень активности радионуклидов в локальных точках среди исследуемых тест-объектов отмечается в почвах, подземных водах, растениях и биосубстратах в пределах контрольных величин.

#### Цитогенетические исследования

В популяциях человека и животных имеются индивидуумы и особи с различной устойчивостью к мутагенным факторам. Особое внимание в этой связи следует обратить на виды с выраженной нестабильностью генома (Bigalyev et al., 2014).

**Микроядерный анализ образцов рыб.** Из образцов отловленных на исследуемой территории видов рыб были приготовлены гематологические препараты для микроядерного теста. У обследованных рыб эритроциты были представлены молодыми бластными формами и зрелыми клетками (см. рисунок). Молодые клетки в зависимости от степени развития представляли собой круглые или слегка вытянутые клетки, размеры ядер которых варьировали от крупных, занимавших большую часть клетки, до мелких. В большинстве случаев зрелые эритроциты имели эллипсоидную форму, вытянутое ядро красно-фиолетового цвета, прозрачную цитоплазму серо-розового цвета. Наряду со здоровыми клетками были зарегистрированы и патологические.

**Вобла.** Клетки крови воблы в большинстве случаев характеризовались неправильной формой эритроцитов. Патологии эритроцитов включали микроядра, смещение ядра к периферии, анизоцитоз, инвагинацию ядра, что несколько затрудняло проведение микроядерного анализа.

**Судак.** У особой судака умеренно часто встречались патологии двух групп: смещение ядра к периферии, вызываемое набуханием клетки, микроядра, возникающие

при нарушениях клеточного деления, и инвагинация ядра, являющаяся маркером дегенерации эритроцитов. Отмечены единичные очаги ядерных теней, возникающих при разрушении эритроцитов.

**Жерех.** У особой жереха были наиболее выражены патологии первой группы. Отмечено большое количество эритроцитов неправильной формы – грушевидной, серповидной, пятиугольной (пойкилоцитоз). Незначительно представлены ядерные патологии в виде инвагинации ядра и микроядер.

**Карась.** В эритроцитах изученных карасей присутствовали как относительно крупные, так и мелкие микроядра. При этом в одной клетке в некоторых случаях наблюдалось по одной-две и более микроядер. Однако наиболее часто встречались клетки с одним микроядром помимо основного ядра. Кроме того, наблюдались смещение ядра к периферии клетки и инвагинация ядра (см. рисунок).

Нарушения эритроцитов, выявленные у исследуемых видов, свидетельствовали о дестабилизации физиологических процессов в организме обследованных рыб, приводящей к развитию патологии митоза. Так, анизо- и пойкилоцитоз показывают функциональную недостаточность кроветворных органов, а также наблюдаются при анемии. Наряду с вышеуказанными патологиями обнаружено смещение ядер к периферии (возникающее при набухании). К дегенеративным изменениям также можно отнести инвагинацию ядра, свидетельствующую о деградации самого эритроцита. Последующий микроядерный анализ мазков показал увеличение спонтанной частоты клеток с микроядрами в 1.5–2 раза в загрязненных районах. Вероятность встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови при спонтанном мутагенезе составляет 0.5–1.0 % (Fenech, 2011).

Полученные результаты в дальнейшем будут сопоставлены с результатами гистопатологического анализа внутренних органов (жабр, печени, кишечника, мышц и гонад) для оценки токсикологического состояния среды обитания рыб.

**Микроядерный анализ клеток человека.** Объектом исследования служила свежеполученная кровь из пальца смешанной популяции, включающей 107 человек, проживающих в районах с неблагоприятной экологической обстановкой из-за близости полигона Капустин Яр. Сводные группы для микроядерного анализа составили 23 человека с наследственными дегенеративными заболеваниями

**Таблица 3.** Число эритроцитов с микроядрами в крови исследованных лиц

Группа обследованных	Больные, <i>n</i>	Проанализированные эритроциты, тыс.	Эритроциты с микроядрами	
			абс.	%
Контрольная группа	50	482.4		0.427 ± 0.01
Исследованные пациенты:				
с перинатальной патологией	25	212.6	148	1.411 ± 0.07
дети с врожденной патологией развития	24	258.8	300	2.99 ± 0.11
с гепатоцеребральной дистрофией	27	259.6	774	3.82 ± 0.12
с другими наследственными дегенеративными заболеваниями	23	245.1	991	3.68 ± 0.13
с болезнью Дауна	8	98.1	902	4.3 ± 0.11

нервной системы, 27 – с гепатоцеребральной дистрофией, 24 – с врожденными пороками развития, 25 – с перинатальной патологией, 8 – с синдромом Дауна. Средний возраст больных – 33.9 года. В контрольную группу вошли 50 практически здоровых людей в возрасте 20–37 лет. Результаты микроядерного теста представлены в табл. 3.

Количество выявленных микроядер достоверно выше у пациентов с наследственно-дегенеративными заболеваниями ( $t = 21.68, p < 0.01$ ), гепатоцеребральной дистрофией ( $t = 33.93, p < 0.01$ ), врожденными пороками развития ( $t = 25.63, p < 0.01$ ), синдромом Дауна ( $t = 38.73, p < 0.01$ ) и перинатальной патологией ( $t = 14.05, p < 0.01$ ) в сравнении с контрольной группой –  $0.427 \pm 0.01$ .

По данным различных авторов, спонтанный уровень микроядер у здоровых людей колеблется от  $0.24 \pm 0.01$  до  $0.34 \pm 0.1$  %. Больные с высоким показателем микроядер обследованы повторно через месяц, у них обнаружена тенденция повышения количества микроядер в эритроцитах периферической крови.

В зависимости от размера микроядра распределены на две группы: крупные и мелкие. Эритроциты с мелкими микроядрами составляли 88 %, а с крупными микроядрами – 12 %. Типы нарушений ядер соматических клеток различаются по количеству и форме в зависимости от видовой, тканевой принадлежности. По данным авторов, высокий уровень эритроцитов с микроядрами зарегистрирован у больных с различными формами миопатии. Дальнейшие исследования позволили прийти к выводу, что нестабильность генома подтверждается и другими тестами (Ильинских и др., 1992). Проведен корреляционный анализ, который свидетельствует, что образование крупных микроядер тесно связано с геномными нарушениями хромосомного аппарата ( $r = 0.70, p < 0.05$ ), тогда как уровень клеток с мелкими микроядрами коррелирует с частотой нарушений в структуре хромосом ( $r = 0.60, p < 0.05$ ). Установлено, что частота эритроцитов с мелкими микроядрами не зависит от уровня патологии митоза, многогрупповых мета- и анафаз с мостами (во всех случаях  $p > 0.05$ ). Уровень клеток с крупными микроядрами тесно связан с патологией митоза – отставанием отдельных хромосом в мета- и анафазах – и свидетельствует о том, что крупные микроядра, по-видимому, образованы отставшими хромосомами, в то время как мелкие – в основном структурными aberrациями хромосом. Авто-

ры утверждают, что приведенные данные показывают тесную связь между цитогенетическими нарушениями и образованием микроядер (Djokovic-Davidovic et al., 2016).

### Заключение

Значения объемной активности природных и техногенных радионуклидов в пробах почвы, питьевой воды, биосубстратах (шерсти домашних животных и образцах периферической крови человека) из населенных пунктов, расположенных рядом с полигоном Капустин Яр, соответствуют величине контрольного для Западно-Казахстанской области уровня (радиационный фон в пределах  $0.06–0.014$  мкЗв/ч). Незначительное превышение уровня радиоактивности сохраняется на территории вблизи падения ракет в Бокеевском районе. Цитогенетические исследования с использованием микроядерного теста в соматических клетках рыб показали увеличение спонтанной частоты клеток с микроядрами в 1.5–2 раза в загрязненных районах. Вероятность встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови при спонтанном мутагенезе составляет 0.5–1.0 %. Анализ мазков крови человека на микроядерный тест также показал увеличение спонтанной частоты клеток с микроядрами в 1.5–2 раза в загрязненных районах по сравнению со спонтанной частотой 0.5–1.0 %.

### Список литературы / References

- Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Том. гос. ун-т, 1992;1:272.  
[Ilyinskikh N.N., Novitskiy V.V., Vanchugova N.N., Ilyinskikh I.N. Micronucleus analysis and cytogenetic instability. Tomsk: Tomsk State University Publ., 1992;1:272. (in Russian)]
- Мухаметжанова З.Т. Современное состояние проблемы загрязнения окружающей среды. *Гигиена труда и медицинская экология*. 2017;2(55):11-20.  
[Mukhametzhanova Z.T. The current state of the problem of environmental pollution. *Gigiena Truda i Meditsinskaya Ekologiya = Journal of Occupational Hygiene and Medical Ecology*. 2017;2(55): 11-20. (in Russian)]
- Островская С.С., Шаторная В.Ф., Бельская Я.А. Влияние тяжелых металлов и радиации на кроветворение у крыс. *Мир медицины и биологии*. 2014;4(47):177-179.  
[Ostrovskaya S.S., Shatornaya V.F., Belskaya Ya.A. Effects of heavy metals and radiation on hematopoiesis in rats. *Mir meditsiny i bio-*

- logii = World of Medicine and Biology*. 2014;4(47):177-179. (in Russian)]
- Руководство по методам контроля за радиоактивностью окружающей среды. Под ред. Соболева И.А., Беляева Е.Н. М., Медицина, 2002;123.  
[Guide to Methods for Monitoring Environmental Radioactivity. Sobolev I.A., Belyaeva E.N. (Eds.). Moscow: Medicine Publ., 2002; 123. (in Russian)]
- Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы). *Астраханский вестник экологического образования*. 2013;1(23):182-192.  
[Teplaya G.A. Heavy metals as environmental pollutants: a review. *Astrakhanskiy Vestnik Ekologicheskogo Obrazovaniya = Astrakhan Herald of Environmental Education*. 2013;1(23):182-192. (in Russian)]
- Техногенные потоки вещества и состояние экосистем. М., Наука. 2001;256.  
[Technogenic flows of matter and the state of ecosystems. Moscow: Science Publ., 2001;256. (in Russian)]
- Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Справочник. М., 2001.  
[Fomin G.S., Fomin A.G. The soil. Quality control and environmental safety in accordance with international standards. Handbook. Moscow, 2001. (in Russian)]
- Bigaliev A.B. Ecological genetics, monograph. Almaty: Kazakh University, 2016;245.
- Bigalyev B., Kobegenova S., Vasil'ev V., Vasil'eva E., Imentai A., Shametov A. Study of Caspian Goby *Neogobius* sp. Karyotype Flexibility from Several Biotops. *J. Life Sci*. 2014;8(5):442-446.
- Chaizhunusova N., Madiyeva M., Tanaka K., Hoshi M., Kawano N., Noso Y., Takeichi N., Rakhypbekov T., Urazalina N., Dovgal G., Rymbaeva T., Tokanova S., Beisengazina M., Kembayeva K., Inoue K. Cytogenetic abnormalities of the descendants of permanent residents of heavy metals contaminated East Kazakhstan. *Radiat. Environ. Biophys*. 2017;56(4):337-343. DOI 10.1007/s00411-017-0717-2.
- Djokovic-Davidovic J., Milovanovic A., Milovanovic J., Antic V. Gajic Analysis of chromosomal aberrations frequency, haematological parameters and received doses by nuclear medicine professionals. *J. BUON*. 2016;21(5):1307-1315.
- Fenech M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. *Mutagenesis*. 2011;26:63-67. DOI 10.1093/mutage/geq084.
- Hoshi M., Saimova A.Zh. Problem in assessing the effects of radiation with "low doses". Review. *Nauka i Zdravookhranenie = Science & Healthcare*. 2017;2:115-127.
- Loomis D.P., Shy C.M., Allen J.W., Saccomanno G. Micronuclei epithelial cells from sputum of uranium workers. *Scand. J. Work Environ. Health*. 1990;16(5):355-362. DOI 10.5271/sjweh.1773.
- Markabayeva A., Bauer S., Pivina L., Björklund G., Chirumbolo S., Kerimkulova A., Semenova Y., Belikhina T. Increased prevalence of essential hypertension in areas previously exposed to fallout due to nuclear weapons testing at the Semipalatinsk Test Site, Kazakhstan. *Environ. Res*. 2018;167:129-135. DOI 10.1016/j.envres.2018.07.016.
- Serzhanova Z.B., Aidarkhanova A.K., Lukashenko S.N., Lyakhova O.N., Timonova L.V., Raimkanova A.M. Researching of tritium speciation in soils of "Balapan" site. *J Environ. Radioact*. 2018;192: 621-627. DOI 10.1016/j.jenvrad.2018.02.016.
- WHO human health risk assessment toolkit: chemical hazards. Geneva, World Health Organization (IPCS Harmonization Project Document, No. 8. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241548076\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241548076_eng.pdf). 2010; accessed 22 April 2013.
- Zhumadilov K., Ivannikov A., Stepanenko V., Zharlyganova D., Toyoda S., Zhumadilov Z., Hoshi M. ESR dosimetry study of population in the vicinity of the Semipalatinsk Nuclear Test Site. *J. Radiat. Res*. 2013;54(4):775-779. DOI 10.1093/jrr/rtr008.

#### ORCID ID

A. Bigaliev [orcid.org/0000-0003-4274-6305](http://orcid.org/0000-0003-4274-6305)  
K. Shalabaeva [orcid.org/0000-0001-6836-4829](http://orcid.org/0000-0001-6836-4829)  
B.E. Shimshikov [orcid.org/0000-0002-0196-3373](http://orcid.org/0000-0002-0196-3373)  
S.S. Kobegenova [orcid.org/0000-0003-1455-3987](http://orcid.org/0000-0003-1455-3987)  
L. Adilova [orcid.org/0000-0001-8048-6116](http://orcid.org/0000-0001-8048-6116)  
A. Kozhakhmetova [orcid.org/0000-0002-0612-0957](http://orcid.org/0000-0002-0612-0957)  
S. Sharakhmetov [orcid.org/0000-0001-7278-5351](http://orcid.org/0000-0001-7278-5351)  
M. Burhanova [orcid.org/0000-0002-8955-0978](http://orcid.org/0000-0002-8955-0978)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.09.2020. После доработки 16.10.2020. Принята к публикации 16.10.2020.

## Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-CoV-2

А.А. Ильичев , Л.А. Орлова, С.В. Шарабрин, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия  
 e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru

**Аннотация.** После того как была опубликована последовательность генома SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), а количество заболевших стало стремительно возрастать, многие глобальные компании начали разработку вакцины от данного вируса. Для создания вакцины задействованы практически все известные на данный момент способы – это вакцины на основе инактивированного вируса, мРНК и ДНК, вирусных векторов, синтетических пептидов и рекомбинантных белков, произведенных в клетках насекомых и млекопитающих. В обзоре рассматривается одна из перспективных вакцинных платформ, созданная на основе матричной РНК (мРНК). До недавнего времени мРНК-вакцинация не рассматривалась с практической точки зрения в силу высокой чувствительности к нуклеазной деградации и, как следствие, нестабильности препаратов на основе мРНК. Последние технологические достижения в значительной степени преодолели проблемы низкой иммуногенности, нестабильности и трудности доставки РНК-вакцин. Важно отметить, что мРНК-вакцины способны эффективно активизировать оба звена иммунитета – как Т-клеточный, так и гуморальный ответы. Существенным преимуществом мРНК-вакцин является быстрое недорогое масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*. После синтеза и процедуры очистки технологически значительно проще добиться получения препарата мРНК инъекционной чистоты. Таким образом, производство мРНК путем транскрипции *in vitro* предпочтительнее в сравнении с производством ДНК-вакцин, так как в действительности является химическим процессом без использования клеток. По сравнению с производством вакцин на основе инактивированного вируса или рекомбинантного белка мРНК-технологии позволяют гораздо быстрее пройти все этапы разработки. Этот параметр имеет первостепенное значение для создания препаратов против вирусных патогенов, основной проблемой борьбы с которыми является временной разрыв между эпидемией и разработкой вакцины. В данном обзоре мы обсуждаем работы, связанные с разработкой вакцины против коронавирусов, включая SARS-CoV-2, с акцентом на технологии мРНК.  
Ключевые слова: коронавирус; SARS-CoV-2; COVID-19; мРНК-вакцины.

**Для цитирования:** Ильичев А.А., Орлова Л.А., Шарабрин С.В., Карпенко Л.И. Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-CoV-2. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):802-807. DOI 10.18699/VJ20.676

## mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development

A.A. Ilyichev , L.A. Orlova, S.V. Sharabrin, L.I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia  
 e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru

**Abstract.** After the genome sequence of SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) was published and the number of infected people began to increase rapidly, many global companies began to develop a vaccine. Almost all known approaches to vaccine design were applied for this purpose, including inactivated viruses, mRNA and DNA-vaccines, vaccines based on various viral vectors, synthetically generated peptides and recombinant proteins produced in cells of insects and mammals. This review considers one of the promising vaccine platforms based on messenger RNA. Until recent years, mRNA-vaccination was out of practical implementation due to high sensitivity to nuclease degradation and consequent instability of drugs based on mRNA. Latest technological advances significantly mitigated the problems of low immunogenicity, instability, and difficulties in RNA-vaccine delivery. It is worth noting that mRNA-vaccines can efficiently activate both components of the immune system, i.e. T-cell and humoral responses. The essential advantage of mRNA-vaccines includes fast, inexpensive, scalable and uniform production providing a large output of desirable products *in vitro*. Synthesis and purification processes significantly simplify the process technology of mRNA drugs with injectable purity. Thus, mRNA production via *in vitro* transcription is more advantageous as compared with DNA-vaccines since it is a chemical process without the use of cells. mRNA techniques make it possible to pass all the phases of vaccine development much faster in comparison with the production of vaccines based on inactivated viruses or recombinant proteins. This property is critically

important when designing vaccines against viral pathogens as the main problem of disease control includes a time gap between an epidemic and vaccine development. This paper discusses studies on the development of vaccines against coronaviruses including SARS-CoV-2 with special attention to the mRNA technique.

Key words: coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; mRNA-vaccines.

**For citation:** Ilyichev A.A., Orlova L.A., Sharabrin S.V., Karpenko L.I. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):802-807. DOI 10.18699/VJ20.676

После того как в январе 2020 г. китайские исследователи опубликовали первую последовательность генома SARS-CoV-2 (Zhou P. et al., 2020), многие научные организации и фармацевтические компании начали разработку вакцины от SARS-CoV-2, в том числе с использованием методов генной иммунизации – на основе ДНК и матричной РНК (мРНК). В данной работе мы рассмотрим преимущества мРНК-иммунизации.

SARS-CoV-2 относится к семейству коронавирусов *Coronaviridae*, которое включает также опасные вирусы SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) и MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus), вызвавшие эпидемии в 2002 и 2012 гг. соответственно<sup>1</sup>. Эти вирусы имеют положительный одноцепочечный РНК-геном размером около 30 кб, самый большой среди известных РНК-вирусов. Полные геномы SARS-CoV-2 и SARS-CoV высоко гомологичны, что позволяет говорить о сходстве механизмов проникновения этих вирусов в клетки человека (Zhou P. et al., 2020). Вирусная оболочка состоит из липидного бислоя, в котором закреплены структурные белки мембраны (М), оболочки (Е) и шипа (S). Внутри оболочки находится нуклеокапсид, который образуется из множества копий белка нуклеокапсид (N), связанных с РНК-геномом. Соотношение белков S/E/M/N соответствует 20:1:300:100. Глобулярная часть протеина S содержит много доминантных антигенных сайтов, участвующих в механизмах гуморального и Т-клеточного (цитотоксического) иммунного ответов (Zhou Y. et al., 2018). Белок S играет важную роль в прикреплении коронавирусов к клеточному рецептору, слиянии и проникновении в клетки хозяина. Для SARS-CoV-2 и SARS-CoV рецептором S-белка является ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2). Поэтому именно белок S рассматривается как наиболее подходящая мишень для разработки вакцины (He et al., 2006).

Работы по созданию вакцин от вирусов SARS-CoV (2002 г.) и MERS-CoV (2012 г.) проводились, но так и не были завершены. Отчасти это связано с тем, что эпидемия, вызванная SARS-CoV, продолжалась относительно недолго – около 15 мес.; последний случай зафиксирован в июне 2003 г. В целом заражению подверглись более восьми тысяч человек (Kim et al., 2019). С 2004 г. не зарегистрировано ни одного случая заражения SARS-CoV. Вирус MERS-CoV вызывал спорадические вспышки в разных странах, последний случай выявлен в феврале 2020 г. в Катаре (de Wit et al., 2020). Тем не менее работы по созданию вакцины против этих вирусов обеспечили понимание механизмов реализации ряда защитных иммунных ответов и учитываются разработчиками вакцины от SARS-CoV-2.

В некоторых исследованиях продемонстрировано, что генерируемые против белка S антитела SARS-CoV защищают от инфекции лабораторных животных (мышей) (Yang et al., 2004). Однако у людей, перенесших инфекцию SARS-CoV, гуморальный ответ был кратковременным (Tang et al., 2011). В то же время вирус-специфический Т-клеточный ответ регистрировался вплоть до 11 лет после заражения (Ng et al., 2016). Эти данные свидетельствуют о важности Т-клеточного ответа и должны быть учтены при разработке иммуногенов, способных стимулировать цитотоксические и хелперные ответы против SARS-CoV-2.

Для разработки вакцин от SARS-CoV и MERS-CoV использованы разные способы, в том числе создание вакцин на основе инактивированного вируса, рекомбинантных белков, пептидов, а также различных конструкций на основе вирусных векторов, ДНК и РНК. Эти же методы применяют и при создании вакцины против SARS-CoV-2. Так, согласно данным Всемирной организации здравоохранения на 13 августа 2020 г., во всем мире разрабатывают более 100 прототипов вакцин от SARS-CoV-2 (Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines, 2020). Такое разнообразие создаваемых прототипов на первых этапах вполне объяснимо, поскольку однозначного решения задачи на настоящий момент нет. Следует отметить, что более 10 вакцин из этого списка создают на основе активно развивающейся в последние годы технологии мРНК (таблица).

Среди разработчиков мРНК-вакцин можно отметить такие научные центры и компании, как Moderna Inc. (США), CureVac и BioNTech (Германия), Оксфордский университет (Великобритания), CanSino Biologics Inc. (Китай), VIDO-InterVac (Канада) и BIOCAD (Россия).

До недавнего времени разработка профилактических и терапевтических вакцин на основе РНК была сопряжена с проблемами, обусловленными нестабильностью мРНК и ее неэффективной доставкой. Прогресс в этой области связан с технологией синтеза мРНК; оптимизацией вторичной структуры мРНК и структуры кэпа; повышением устойчивости к деградации РНК-нуклеазами путем включения в молекулу модифицированных нуклеозидов, таких как псевдоуридин, 5-метилцитозин; совершенствованием методов очистки РНК и ее доставки (Pardi et al., 2018). В настоящее время коммерчески доступны необходимые ферменты и ингредиенты, что позволяет нарабатывать мРНК в необходимых количествах для массовой вакцинации населения. За последние годы создан и протестирован ряд мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний (вирусы гриппа, бешенства, Зика, HCV, HNV и др.) и нескольких типов рака. Эти вакцины показали обнадеживающие результаты при испытаниях как на животных моделях, так и на людях (Pardi et al., 2018). Важно отме-

<sup>1</sup> ВОЗ, <https://www.who.int>

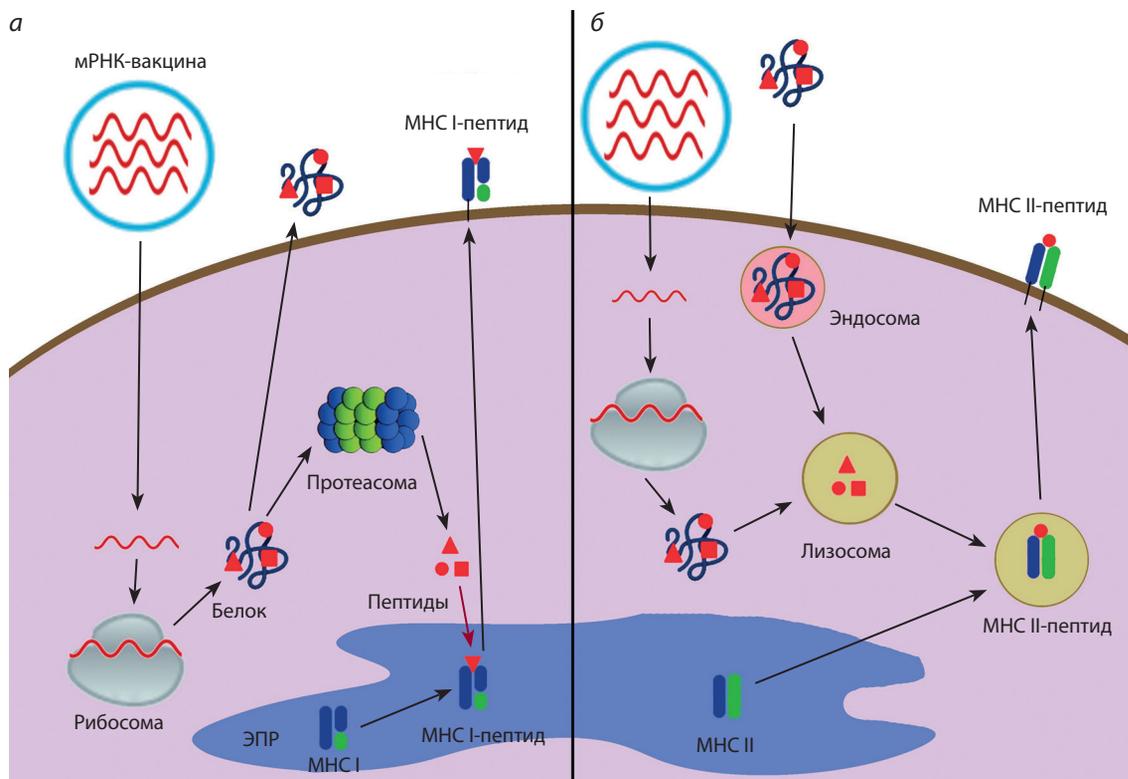
Разрабатываемые вакцины на основе мРНК против COVID-19, зарегистрированные ВОЗ, по данным на 2 октября 2020 г.

Кандидатные вакцины на стадии клинических исследований	
Вектор и(или) тип кандидатной вакцины	Разработчик, стадия испытания, регистрационный номер клинических исследований
мРНК, инкапсулированная в липидные наночастицы	Moderna / Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний США (NIAID): фаза 1 – NCT04283461, фаза 2 – NCT04405076, фаза 3 – NCT04470427  BioNTech / Fosun Pharma / Pfizer: фаза ½ – 2020-001038-36 ChiCTR2000034825, фаза 3 – NCT04368728
мРНК	Arcturus / Медицинская школа Duke-NUS: фаза ½ – NCT04480957  Curevac: фаза 1 – NCT04449276, фаза 2 – NCT04515147  Академия военных наук Народно-освободительной армии Китая (People's Liberation Army Academy of Military Sciences) / Walvax Biotech: фаза 1 – ChiCTR2000034112
мРНК, инкапсулированная в липидные наночастицы	Имперский колледж Лондона (Imperial College London): фаза 1 – ISRCTN17072692
Кандидатные вакцины на стадии доклинических исследований	
Вектор и(или) тип кандидатной вакцины	Разработчик
мРНК	Сельчукский университет (Selcuk University)
мРНК, инкапсулированная в липидные наночастицы	Translate Bio / Sanofi Pasteur  CanSino Biologics / Precision NanoSystems
Смесь нескольких мРНК, инкапсулированных в липидные наночастицы	Фуданьский университет (Fudan University) / Шанхайский университет транспорта (Shanghai Jiao Tong University) / RNACure BioPharma
мРНК, кодирующая RBD, инкапсулированная в липидные наночастицы	
РНК SARS-CoV-2, дефектная по репликации	Национальный центр биотехнологий Высшего совета по научным исследованиям Испании (The National Centre for Biotechnology, Spain)
мРНК, инкапсулированная в липидные наночастицы	Токийский университет (University of Tokyo) / Daiichi-Sankyo
мРНК, инкапсулированная в липосомы	BIOCAD (Россия)
Смесь РНК-кандидатов	RNA immune Inc.
мРНК	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия)  Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний (China CDC) / Университет Тунцзи (Tongji University) / Stermina
мРНК, инкапсулированная в липидные наночастицы	Chula Vaccine Research Center / Пенсильванский университет (University of Pennsylvania)
мРНК – интраназальная система доставки	eTheRNA
мРНК	Greenlight Biosciences  IDIBAPS-Hospital Clinic, Испания
Самореплицирующаяся мРНК	Gennova

тить, что мРНК-вакцины способны эффективно активировать оба звена иммунитета – Т-клеточный и гуморальный ответы (Zhang et al., 2019).

Вакцины на основе РНК разделяют на два типа: нереплицирующиеся и самоамплифицирующиеся (Iavarone et al., 2017). Нереплицирующиеся РНК-вакцины – это мРНК со всеми необходимыми элементами, обеспечивающими процесс трансляции, кодирующая аминокислотную по-

следовательность целевого белка-иммуногена. Самоамплифицирующиеся РНК-вакцины – это репликоны, сконструированные на основе положительных одноцепочечных РНК-вирусов, таких как альфа- и флавивирусы. Данные репликоны обычно состоят из двух частей: одна из них кодирует неструктурные белки, обеспечивающие репликацию вирусной РНК, тогда как другая – целевой белок-иммуноген (Iavarone et al., 2017). Для самоампли-



мРНК-вакцинация и презентация антигена.  
а – клетки мышцы; б – антигенпрезентирующие клетки.

фицирующихся РНК-вакцин характерен более высокий и продолжительный уровень экспрессии целевого гена по сравнению с нереплицирующимися аналогами. Однако эти РНК-репликоны очень чувствительны к размеру целевой встройки. Кроме того, большой размер вектора (около 10 кб) может ограничивать эффективность интернализации клеток (Schwendener, 2014).

Механизм действия мРНК-вакцин схематически представлен на рисунке. После проникновения мРНК в клетку происходит ее трансляция с использованием клеточного механизма синтеза белка. Трансляция может быть как на рибосомах, находящихся в цитоплазме в свободном виде, так и на рибосомах, ассоциированных с мембранами эндоплазматического ретикула.

Синтезированный белок может развиваться по трем сценариям (см. рисунок).

1. Белок может поступать в протеасому, где подвергается процессингу и расщепляется на пептиды – антигенные эпитопы. Далее эпитопы переносятся в просвет эндоплазматического ретикула с помощью транспортных белков ТАР (transporter associated with antigen processing), где связываются с образующимися молекулами МНС I класса. Образовавшийся комплекс в составе везикулы направляется к плазматической мембране клетки и экспонируется на поверхности клетки, где распознается рецепторами  $CD8^+$ -цитотоксических лимфоцитов, что приводит к стимуляции специфического цитотоксического клеточного ответа.
2. Белок может попадать в лизосомы, где антиген расщепляется на пептидные фрагменты под действием

кислых протеаз. Лизосома сливается с везикулой, которая несет молекулу МНС II класса. Внутри этой структуры образуется комплекс эпитопа с МНС II. Комплекс транспортируется к мембране клетки и выносится на поверхность, где распознается рецепторами  $CD4^+$ -лимфоцитов. В результате происходит активация как Т-хелперного ответа, так и гуморального иммунитета (активация В-лимфоцитов).

3. Белок может секретироваться из клетки и, встречаясь с В-лимфоцитом, активировать гуморальный иммунный ответ, т.е. синтез антител.

Вакцины на основе мРНК имеют ряд преимуществ в сравнении с другими типами вакцин, такими как классические (на основе «живого», аттенуированного, или инактивированного вирусов), белковые и ДНК-вакцины. В первую очередь это безопасность. Известно, что мРНК, в отличие от классических вирусных вакцин, неинфекционны и обладают низкой реактогенностью. Кроме того, важным отличием является отсутствие строгого контроля температуры для хранения препаратов на основе мРНК. В настоящее время большинство используемых вакцин необходимо транспортировать и хранить в непрерывном процессе холодной цепи, что вызывает серьезные трудности с их доставкой в отдаленные регионы. Лиофилированная мРНК-вакцина может быть стабильной при  $5-25\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 36 мес. В сравнении с ДНК-вакциной мРНК не может интегрироваться в геном клеток и вызывать мутации. Таким образом, отсутствует риск инсерции чужеродной генетической информации в геном пациента. Матричная РНК, являясь минимальным генетическим век-

тором, не приводит к антивекторному иммунному ответу, наблюдаемому при использовании вирусных носителей, а следовательно, может вводиться повторно.

Матричная РНК подвержена физиологическому разрушению в результате процессов, происходящих в клетке. Период ее полувыведения можно регулировать с помощью модификаций последовательности РНК и различных способов доставки (Kauffman et al., 2016; Guan, Rosenecker, 2017).

Существенным преимуществом мРНК-вакцин является быстрое недорогое масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*. Оно не требует культивирования бактерий и использования клеточных культур или куриных эмбрионов, необходимых для большинства типов противовирусных вакцин. Все что нужно для производства мРНК-вакцины, это ДНК-матрица, несущая под контролем промотора фага T7 целевой ген, и набор ферментов для матричного синтеза. После синтеза и процедуры очистки технологически гораздо проще добиться получения препарата мРНК инъекционной чистоты, чем ДНК-вакцин. Таким образом, производство мРНК путем транскрипции *in vitro* предпочтительнее в сравнении с производством ДНК-вакцин, так как в действительности является химическим процессом без использования клеток (Liu et al., 2019).

Важный, но не до конца исследованный аспект технологии мРНК-вакцин – доставка. Для выполнения своей задачи мРНК должна попасть в цитоплазму клетки, где происходит трансляция закодированного в ней белка. Описан ряд методов доставки мРНК: введение вакцины с помощью электропорации, инъекционно – в мышцы, лимфатические узлы или непосредственно в органы, а также интраназально, ректально или перорально (Gómez-Aguado et al., 2020; Wadhwa et al., 2020). Помимо клеточной мембраны препятствием для мРНК-вакцинации является ее деградация различными внеклеточными рибонуклеазами, которые в избытке присутствуют в тканях и межклеточном пространстве (Houseley, Tollervey, 2009).

Для доставки и защиты мРНК от деградации нуклеазами используют ряд подходов. Липидные наночастицы на сегодняшний день – одни из наиболее часто применяемых средств доставки мРНК. Стандартные липидные наночастицы состоят из четырех компонентов, включая катионный липид, холестерин, а также вспомогательные фосфолипиды и полиэтиленгликоль. Значительный потенциал для доставки нуклеиновых кислот имеют такие катионные полимерные материалы, как дендримеры, полиэтиленимин и др. Кроме того, можно использовать генную пушку и электропорацию (Capasso et al., 2018; Kowalski et al., 2019). Повысить стабильность молекулы мРНК можно путем включения аналогов нуклеотидов, например псевдоуридина, метилпсевдоуридина, метилцитозина и др. Однако иногда использование таких модификаций приводит к снижению эффективности трансляции.

Важным преимуществом мРНК-вакцин по сравнению с вакцинами на основе инактивированного вируса или рекомбинантного белка является возможность быстрого прохождения всех этапов разработки. Этот параметр крайне важен для создания вакцин против вирусных патогенов,

основной проблемой борьбы с которыми является временной разрыв между эпидемией и разработкой вакцины. Для предотвращения всплеск вновь возникающих и быстро эволюционирующих патогенов первостепенное значение имеет скорость реагирования на пандемию путем создания профилактической вакцины. Недавно показано, что с помощью метода синтетической биологии, включающего биоинформатику, прототип вакцины в формате мРНК против целевого вирусного патогена можно наработать в недельные сроки (Rauch et al., 2018).

Так, американские разработчики мРНК-вакцины против SARS-CoV-2 (компания Moderna Inc. совместно с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний, NIAID) создали прототип вакцины мРНК-1273 в беспрецедентно короткие сроки. Потребовалось всего 63 дня от выбора вирусной последовательности для создания вакцины до проведения первой фазы клинических испытаний, в которых 45 добровольцам были введены три разные дозы в течение шести недель с целью получения начальных данных о безопасности и демонстрации желаемого иммунного ответа<sup>2</sup>.

Стоит отметить, что вакцина мРНК-1273 не проходила полных доклинических испытаний и после доказательства специфической активности была использована в первой фазе клинических испытаний. Чем руководствовались исследователи из США, чтобы решиться на это? Прежде всего, в основу разработки легли проекты вакцин этих разработчиков против предыдущих типов коронавируса – SARS и MERS, которые, к сожалению, так и не были завершены. Кроме того, имеются десятки работ по использованию мРНК в виде терапевтических вакцин для лечения онкологических заболеваний, при этом существенных отрицательных реакций на вакцину не наблюдалось (Sebastian et al., 2014; Pardi et al., 2020).

Таким образом, можно с определенной долей уверенности утверждать, что вакцины на основе РНК могут быть эффективным средством против пандемий, вызванных вирусами, в том числе SARS-CoV-2, поскольку данные препараты предлагают сравнительно простое и быстрое решение для вновь возникающих и возвращающихся вирусных патогенов.

## Список литературы / References

- Capasso P.U., Kaczmarek J.C., Fenton O.S., Anderson D.G. Poly(beta-amino ester)-co-poly(caprolactone) Terpolymers as Nonviral Vectors for mRNA Delivery In Vitro and In Vivo. *Adv. Healthc. Mater.* 2018;7(14):e1800249. DOI 10.1002/adhm.201800249.
- de Wit E., Feldmann F., Cronin J., Jordan R., Okumura A., Thomas T., Scott D., Cihlar T., Feldmann H. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117(12):6771-6776. DOI 10.1073/pnas.1922083117.
- Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. World Health Organization. 2020. Available at: <https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
- Gómez-Aguado I., Rodríguez-Castejón J., Vicente-Pascual M., Rodríguez-Gascón A., Solinís M.A., Del Pozo-Rodríguez A. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives

<sup>2</sup> Пресс-релиз Moderna, <https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-ships-mrna-vaccine-against-novel-coronavirus-mrna-1273>

- tives. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(2):364. DOI 10.3390/nano10020364.
- Guan S., Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Therapy*. 2017;24(3):133-143. DOI 10.1038/gt.2017.5.
- He Y., Li J., Heck S., Lustigman S., Jiang S. Antigenic and immunogenic characterization of recombinant baculovirus-expressed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein: Implication for vaccine design. *J. Virol.* 2006;80:5757-5767. DOI 10.1128/JVI.00083-06.
- Houseley J., Tollervey D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*. 2009;136(4):763-776. DOI 10.1016/j.cell.2009.01.019.
- Iavarone C., O'hagan D.T., Yu D., Delahaye N.F., Ulmer J.B. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. 2017;16(9):871-881. DOI 10.1080/14760584.2017.1355245.
- Kauffman K.J., Webber M.J., Anderson D.G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J. Control. Release*. 2016;240:227-234. DOI 10.1016/j.jconrel.2015.12.032.
- Kim J.H., Kang M., Park E., Chung D.R., Kim J., Hwang E.S. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *Biochip J.* 2019;13(4):341-351. DOI 10.1007/s13206-019-3404-3.
- Kowalski P.S., Rudra A., Miao L., Anderson D.G. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol. Ther.* 2019;27(4):710-728. DOI 10.1016/j.ymthe.2019.02.012.
- Liu M.A. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines*. 2019;7(2):37. DOI 10.3390/vaccines7020037.
- Ng O.-W., Chia A., Tan A.T., Jadi R.S., Leong H.N., Bertoletti A., Tan Y.-J. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008-2014. DOI 10.1016/j.vaccine.2016.02.063.
- Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018;17(4):261-279. DOI 10.1038/nrd.2017.243.
- Pardi N., Hogan M.J., Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr. Opin. Immunol.* 2020;65:14-20. DOI 10.1016/j.coi.2020.01.008.
- Rauch S., Jasny E., Schmidt K.E., Petsch B. New vaccine technologies to combat outbreak situations. *Front. Immunol.* 2018;9:1963. DOI 10.3389/fimmu.2018.01963.
- Schwendener R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines*. 2014;2(6):159-182. DOI 10.1177/2051013614541440.
- Sebastian M., Papachristofilou A., Weiss C., Früh M., Cathomas R., Hilbe W., Wehler T., Rippin G., Koch S.D., Scheel B., Fotin-Mleczek M., Heidenreich R., Kallen K.-J., Gnad-Vogt U., Zippelius A. Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:748. DOI 10.1186/1471-2407-14-748.
- Tang F., Quan Y., Xin Z.T., Wrammert J., Ma M.-J., Lv H., Wang T.-B., Yang H., Richardus H.J., Liu W., Cao W.-Ch. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: A six-year follow-up study. *J. Immunol.* 2011; 86(12):7264-7268. DOI 10.4049/jimmunol.0903490.
- Wadhwa A., Aljabbari A., Lokras A., Foged C., Thakur A. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):102. DOI 10.3390/pharmaceutics12020102.
- Yang Z.Y., Kong W.P., Huang Y., Roberts A., Murphy B.R., Subbarao K., Nabel G.J. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*. 2004;428(6982):561-564. DOI 10.1038/nature02463.
- Zhang C., Maruggi G., Shan H., Li J. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front. Immunol.* 2019;10:594. DOI 10.3389/fimmu.2019.00594.
- Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., Chen H.-D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shen X.-R., Wang X., Zheng X.-S., Zhao K., Chen Q.-J., Deng F., Liu L.-Li., Yan B., Zhan F.-X., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Shi Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. DOI 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Zhou Y., Jiang S., Du L. Prospects for a MERS-CoV spike vaccine. *Expert Rev. Vaccines*. 2018;17(8):677-686. DOI 10.1080/14760584.2018.1506702.

#### ORCID ID

A.A. Ilyichev orcid.org/0000-0001-5356-0843  
L.A. Orlova orcid.org/0000-0001-7214-1855  
S.V. Sharabrin orcid.org/0000-0003-0664-3587  
L.I. Karpenko orcid.org/0000-0003-4365-8809

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.05.2020. После доработки 12.10.2020. Принята к публикации 13.10.2020.

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/](http://bionet.nsc.ru/vogis/)  
платформе Elpub – [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour)  
платформе Научной электронной библиотеки – [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://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](mailto: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 20.11.2020. Выход в свет 30.11.2020. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 14.65.

Уч.-изд. л. 16.8. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.). Заказ № 178. Цена свободная.

.....  
Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.