

Научный рецензируемый журнал

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ20.605

## Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

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

## Ответственный секретарь

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

## Редакционный совет

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

## Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

## VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ20.605

**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

- 115 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) Азиатской России с помощью CAPS-анализа. А.В. Агафонов, Е.В. Шабанова (Кобозева), С.В. Асбаганов, А.В. Мглинец, В.С. Богданова

- 123 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Динамика генетического разнообразия сортов овса в Тюменской области по авенин-кодирующим локусам. А.В. Любимова, Г.В. Тоболова, Д.И. Еремин, И.Г. Лоскутов

## Селекция растений на иммунитет

- 131 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Стеблевая ржавчина в Западной Сибири – расовый состав и эффективные гены устойчивости. В.П. Шаманин, И.В. Потоцкая, С.С. Шепелев, В.Е. Пожерукова, Е.А. Салина, Е.С. Сколотнева, Д. Ходсон, М. Хоумвёллер, М. Паттур, А.И. Моргунов

- 139 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Эпифитотический процесс септориоза на сортах яровой пшеницы. Е.Ю. Торопова, О.А. Казакова, В.В. Пискарев

## Генетика микроорганизмов

- 149 **ОБЗОР**  
Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в геной инженерии. А.С. Розанов, Е.Г. Першина, Н.В. Богачева, В. Шляхтун, А.А. Сычев, С.Е. Пельтек

- 158 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Перспективы использования Illumina MiSeq для идентификации грибов арбускулярной микоризы. А.А. Крюков, А.О. Горбунова, Э.М. Мачс, Ю.В. Михайлова, А.В. Родионов, П.М. Журбенко, А.П. Юрков (на англ. языке)

- 168 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Изменение кишечного микробиома пациентов с язвенным колитом после трансплантации кишечной микробиоты. А.Ю. Тикунов, В.В. Морозов, А.Н. Швалов, А.В. Бардашева, Е.В. Шрайнер, О.А. Максимова, И.О. Волошина, В.В. Морозова, В.В. Власов, Н.В. Тикунова

## Генетика животных

- 176 **ОБЗОР**  
Современное состояние проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц *in vitro*. Ю.Л. Силюкова, О.И. Станишевская, Н.В. Дементьева

- 185 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Полногеномные ассоциативные исследования распространения пороков развития и других селекционно значимых качественных признаков у потомства хряков крупной белой породы российской селекции. А.А. Траспов, О.В. Костюнина, А.А. Белоус, Т.В. Карпушкина, Н.А. Свеженцева, Н.А. Зиновьева

## Физиологическая генетика

- 191 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Коэкспрессия глутаматергических генов и генов аутистического спектра в гиппокампе у самцов мышей с нарушением социального поведения. И.Л. Коваленко, А.Г. Галямина, Д.А. Смагин, Н.Н. Кудрявцева

- 200 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
У мышей с мутацией *lethal yellow* ( $A^y$ ) фармакологические эффекты фактора роста фибробластов 21 зависят от пола. Е.Н. Макарова, Т.В. Яковлева, Н.Ю. Балыбина, К.О. Баранов, Е.И. Денисова, А.Д. Дубинина, Н.А. Феофанова, Н.М. Бажан (на англ. языке)

## Генетика человека

- 209 **ОБЗОР**  
Участие мобильных элементов в нейрогенезе. Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова

- 219 **ОБЗОР**  
Современная классификация и молекулярно-генетические аспекты незавершенного остеогенеза. А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова

## Plant genetics

- 115 ORIGINAL ARTICLE  
Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis. A.V. Agafonov, E.V. Shabanova (Kobozeva), S.V. Asbaganov, A.V. Mglinets, V.S. Bogdanova
- 123 ORIGINAL ARTICLE  
Dynamics of genetic diversity of oat varieties in the Tyumen region at avenin-coding loci. A.V. Lyubimova, G.V. Tobolova, D.I. Eremin, I.G. Loskutov

## Plant breeding for immunity

- 131 ORIGINAL ARTICLE  
Stem rust in Western Siberia – race composition and effective resistance genes. V.P. Shamanin, I.V. Pototskaya, S.S. Shepelev, V.E. Pozherukova, E.A. Salina, E.S. Skolotneva, D. Hodson, M. Hovmøller, M. Patpour, A.I. Morgounov
- 139 ORIGINAL ARTICLE  
*Septoria* blotch epidemic process on spring wheat varieties. E.Yu. Toropova, O.A. Kazakova, V.V. Piskarev

## Microbial genetics

- 149 REVIEW  
Diversity and occurrence of methylotrophic yeasts used in genetic engineering. A.S. Rozanov, E.G. Pershina, N.V. Bogacheva, V. Shlyakhtun, A.A. Sychev, S.E. Peltek
- 158 ORIGINAL ARTICLE  
Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi. A.A. Kryukov, A.O. Gorbunova, E.M. Machs, Y.V. Mikhaylova, A.V. Rodionov, P.M. Zhurbenko, A.P. Yurkov
- 168 ORIGINAL ARTICLE  
Fecal microbiome change in patients with ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation. A.Y. Tikunov, V.V. Morozov, A.N. Shvalov, A.V. Bardasheva, E.V. Shrayner, O.A. Maksimova, I.O. Voloshina, V.V. Morozova, V.V. Vlasov, N.V. Tikunova

## Animal genetics

- 176 REVIEW  
The current state of the problem of *in vitro* gene pool preservation in poultry. Y.L. Silyukova, O.I. Stanishevskaya, N.V. Dementieva
- 185 ORIGINAL ARTICLE  
Whole-genome association studies of distribution of developmental abnormalities and other breeding-valuable qualitative traits in offspring of the Russian large-white boars. A.A. Traspov, O.V. Kostyunina, A.A. Belous, T.V. Karpushkina, N.A. Svejenceva, N.A. Zinovieva

## Physiological genetics

- 191 ORIGINAL ARTICLE  
Co-expression of glutamatergic and autism-related genes in the hippocampus of male mice with disturbances of social behavior. I.I. Kovalenko, A.G. Galyamina, D.A. Smagin, N.N. Kudryavtseva
- 200 ORIGINAL ARTICLE  
Pharmacological effects of fibroblast growth factor 21 are sex-specific in mice with the *lethal yellow* ( $A^y$ ) mutation. E.N. Makarova, T.V. Yakovleva, N.Yu. Balyibina, K.O. Baranov, E.I. Denisova, A.D. Dubinina, N.A. Feofanova, N.M. Bazhan

## Human genetics

- 209 REVIEW  
Involvement of transposable elements in neurogenesis. R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova
- 219 REVIEW  
Modern classification and molecular-genetic aspects of osteogenesis imperfecta. A.R. Zaripova, R.I. Khusainova

# Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) Азиатской России с помощью CAPS-анализа

А.В. Агафонов<sup>1</sup>✉, Е.В. Шабанова (Кобозева)<sup>1</sup>, С.В. Асбаганов<sup>1</sup>, А.В. Мглинец<sup>2</sup>, В.С. Богданова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

✉ e-mail: agalex@mail.ru

**Аннотация.** Род *Elymus* L. наряду с пшеницей, рожью и ячменем принадлежит к трибе Triticeae. Помимо своего хозяйственного значения, эта триба характеризуется широким распространением аллополиплоидных таксонов, которые формируются в ходе межвидовой и межродовой гибридизации и последующих преобразований вовлеченных в гибридизацию диплоидных геномов. Для идентификации исходных геномов в составе полиплоидов удобны малокопийные ядерные гены, менее подверженные процессам реорганизации, чем повторенные некодирующие элементы. В настоящей работе разработан удобный CAPS-маркер для различения базисных геномов St, H, Y, входящих в состав азиатских видов рода *Elymus*, с помощью электрофоретического анализа фрагментов рестрикции ПЦР-амплифицированного участка гена, кодирующего β-амилазу. В России распространено около 50 видов *Elymus* предположительно трех гапломных комбинаций: StH, StY и StHY. Наименее изученными остаются бореальные StH-геномные виды – эндемики Российской Федерации. По результатам анализа ранее изученных разными авторами нуклеотидных последовательностей гена β-амилазы была отобрана эндонуклеаза рестрикции *TaqI*, которая имела различающиеся по положению сайты узнавания в составе вышеуказанного фрагмента из геномов St, H и Y. В результате расщепления ПЦР-продукта эндонуклеазой *TaqI* у каждого из исходных гапломов формировался специфичный паттерн фрагментов рестрикции, легко визуализируемый в агарозном геле. Проанализирована выборка из 68 образцов, принадлежащих 32 видам. У 15 видов была подтверждена ранее известная геномная конституция, у *E. kamoji* этот метод не позволил выявить присутствие генома H. Предполагается возможное происхождение данного варианта генома H от другого вида *Hordeum*. У 16 видов геномная конституция определена впервые. Показано, что большинство изученных видов бореальной группы видов из Сибири и Российского Дальнего Востока имеют геномную конституцию StStHH. Исключение составил *E. amurensis*, филогенетически близкий к StY-геномному виду *E. ciliaris* и также имеющий геномный состав StStYY. Сделан вывод, что основное видовое разнообразие StH-геномной группы находится севернее центра происхождения большинства StY-геномных видов рода.

Ключевые слова: *Elymus*; таксономия; аллополиплоиды; геномная конституция; CAPS-маркеры.

**Для цитирования:** Агафонов А.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Асбаганов С.В., Мглинец А.В., Богданова В.С. Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) Азиатской России с помощью CAPS-анализа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):115-122. DOI 10.18699/VJ20.606

## Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis

A.V. Agafonov<sup>1</sup>✉, E.V. Shabanova (Kobozeva)<sup>1</sup>, S.V. Asbaganov<sup>1</sup>, A.V. Mglinets<sup>2</sup>, V.S. Bogdanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, Novosibirsk, Russia

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

✉ e-mail: agalex@mail.ru

**Abstract.** The genus *Elymus* L., together with wheat, rye, and barley, belongs to the tribe Triticeae. Apart from its economic value, this tribe is characterized by abundance of polyploid taxa formed in the course of remote hybridization. Single-copy nuclear genes are convenient markers for identification of source genomes incorporated into polyploids. In the present work, a CAPS-marker is developed to distinguish basic St, H, and Y genomes comprising polyploid genomes of Asiatic species of the genus *Elymus*. The test is based on electrophoretic analysis of restriction patterns of a PCR-amplified fragment of the gene coding for beta-amylase. There are about 50 *Elymus* species in Russia, and most of them are supposed to possess one of three haplome combinations, StH, StY and StHY. Boreal StH-genomic species endemic for Russia are the least studied. On the basis of nucleotide sequences from public databases, *TaqI* restrictase was selected, as it produced patterns of restriction fragments specific for St, H, and Y haplomes easily recognizable in agarose gel. A sample of 68 accessions belonging to 32 species was analyzed. In 15 species, the earlier known genomic constitutions were confirmed, but in *E. kamoji* this assay failed to reveal the presence of H genome. This unusual H ge-

nome was suggested to originate from a different *Hordeum* species. In 16 species, genomic constitutions were identified for the first time. Fifteen accessions from Asian Russia possessed the genomic constitution StStHH, and *E. amurensis*, phylogenetically close to the StY-genomic species *E. ciliaris*, had the genomic constitution StStYY. It is inferred that the center of species diversity of the StH-genomic group is shifted to the north as compared to the center of origin of StY-genomic species, confined to China.

Key words: *Elymus*; taxonomy; allopolyploids; genome constitution; CAPS markers.

**For citation:** Agafonov A.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Asbaganov S.V., Mglinets A.V., Bogdanova V.S. Identification of genome compositions in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) in the Asian part of Russia by CAPS analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):115-122. DOI 10.18699/VJ20.606

## Введение

Род *Elymus* L. – крупнейший род трибы Triticeae Dum. и, по оценкам, насчитывает от 150 до 200 видов (Dewey, 1984; Barkworth, 2000). Он представлен исключительно аллополиплоидными таксонами с геномным составом, включающим несколько основных геномов (гапломов) в разных сочетаниях. Генетическая основа рода *Elymus* образована пятью гапломами (St, H, Y, P, W), происходящими от различных родов трибы Triticeae (St – *Pseudoroegneria*, H – *Hordeum*, P – *Agropyron*, W – *Astralopyrum*, Y – донор неизвестен). С момента установления геномной конституции видов рода *Elymus* ее стали предлагать в качестве стабильного генетического критерия для классификации таксонов (Löve, 1984). За относительно короткий промежуток времени в систематике трибы Triticeae произошли существенные изменения в связи с геномной системой классификации, предложенной D.R. Dewey (1984). За 20 последующих лет было идентифицировано шесть самостоятельных родов в соответствии с геномной конституцией входящих в них таксонов: *Douglasdeweya* C. Yen, J.L. Yang & B.R. Baum (PPStSt), *Roegneria* C. Koch (StStYY), *Anthosachne* Steudel (StStWWYY), *Kengyia* C. Yen & J.L. Yang (PPStStYY), *Campeiostrachys* Drobow (HHStStYY) и *Elymus* L. (StStHH, StStStHH, StStHHHH).

Однако, отклоняясь от принципов A. Löve, многие ботаники до настоящего времени помещают несколько геномных комбинаций в единый род *Elymus* s. l. При этом примерно у 40 % видов геномная конституция еще не определена (Okito et al., 2009). Для территории России в настоящее время признается 53 вида рода *Elymus*, подразделенного на четыре секции (Цвелев, 2008; Цвелев, Пробатова, 2010). При этом в состав двух секций (*Elymus* и *Goulardia* (Husn.) Tzvelev) включены виды с разными геномными формулами, что с очевидностью нарушает филогенетический принцип их построения. По нашему предположению, в России распространены виды только трех гапломных комбинаций: StH, StY и StHY (Агафонов и др., 2015). Наименее изученными остаются бореальные StH-геномные виды – эндемики РФ. Если придерживаться зарубежной системы таксонов, то виды *Elymus* должны быть распределены по трем родам в соответствии с геномной конституцией: *Elymus*, *Roegneria* и *Campeiostrachys*. На наш взгляд, подразделение видов рода территории России на отдельные самостоятельные роды нецелесообразно из-за сложностей в морфологической идентификации таких родов. Но при этом классификация внутривидовых таксонов на основе геномной конституции видов абсолютно необходима для построения филогенетически ориентированной системы рода.

Ранее для идентификации геномов у представителей трибы Triticeae были применены CAPS-маркеры (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – полиморфизм рестриционных фрагментов амплифицированной ДНК) (Gostimsky et al., 2005; Li et al., 2007; Hu et al., 2014; Шавруков, 2015). Из преимуществ использования CAPS-маркеров можно отметить кодоминантность наследования, нетребовательность к количеству геномной ДНК и невысокую стоимость.

CAPS-маркеры были впервые применены нами в целях идентификации геномной конституции видов рода *Elymus* (Кобозева и др., 2017). Для этого были разработаны праймеры на основе известных последовательностей гена β-амилазы (Mason-Gamer, 2013), которые включали 38 последовательностей из гапллома St, 23 – из гапллома H и 15 – из гапллома Y, принадлежащих 24 видам *Elymus*, в том числе 14 – с геномным составом StStHH, 9 – с геномным составом StStYY и 1 – StStHHUkUk (*Elytrigia repens*). Проведен поиск вариабельных позиций, которые одинаковы у всех представителей одного генома и отличаются этот геном от двух остальных. При этом особое внимание уделялось тем геном-специфичным заменам, которые приводят к возникновению/исчезновению сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции. Установлено, что обработка ПЦР-продукта рестриктазой *TaqI* приводила к возникновению геном-специфичных паттернов рестрикции. В настоящей работе мы применяем метод CAPS-анализа для изучения большой выборки видов *Elymus* с территории азиатской части России для выяснения их геномной конституции, которая до настоящего времени не была известна.

## Материалы и методы

В анализ были взяты 68 образцов видов, распространенных на территории России, с ранее установленной (табл. 1) и неизвестной (табл. 2) геномной конституцией (ГК). Номенклатура видов приведена согласно Н.Н. Цвелеву и Н.С. Пробатовой (2010). Были использованы образцы из биоресурсной научной коллекции Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) – «Коллекция живых растений в открытом и закрытом грунте», их идентификационные номера приведены в табл. 1 и 2. Префиксы соответствуют географическому происхождению образцов.

Тотальную ДНК выделяли из 20 мг сухой зеленой массы с использованием набора NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel, Германия) по протоколу производителя. Реакцию амплификации фрагмента гена β-амилазы проводили в термоциклере C-1000 (Bio-Rad, США) с исполь-

**Таблица 1.** Образцы видов рода *Elymus* с известной геномной конституцией, установленной классическим цитогенетическим методом

№ образца	Вид <i>Elymus</i> ; образец	Геномная конституция	Местонахождение, авторы сбора
1	<i>E. kamoji</i> ; CCH-1395	StHY (Zhou et al., 1999)	КНР, провинция Сичуань, окрестности г. Ченду, фрагмент леса в Панда-парке, alt. 527 м, N 30°44.253' E 104°8.453' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
2	<i>E. kamoji</i> ; SLA-1276	»	Приморский край, Хасанский р-н, г. Славянка, прибрежный луг, alt. 1 м, N 42°52.101' E 131°22.987' (А. Агафонов)
3	<i>E. dahuricus</i> ; BUD-0781	StHY (Dewey, 1984)	Республика Бурятия, Джиргинский р-н, окрестности пос. Нижний Торей, долина р. Торейка, луговой склон, alt. 863 м, N 50°34.567' E 104°52.571' (Н. Бадмаева)
4	<i>E. dahuricus</i> ; CHJ-1516	»	Китайская Народная Республика, провинция Цзилинь, лесопосадки в окрестностях оз. Цаган-Нур, alt. 138 м, N 45°12.106' E 124°25.074' (С. Асбаганов)
5	<i>E. schrenkianus</i> ; AKA-0702	StHY (Lu, Bothmer, 1992)	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, каменистый луг в долине р. Каланегир, alt. 2283 м, N 49°37.896' E 88°29.441' (С. Лукьянчиков)
48	<i>E. schrenkianus</i> ; AUK-0652	»	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, плато Укок, 80 м севернее автотрассы, каменистый луг в долине ручья, alt. 2445 м, N 49°30.418' E 88°5.012' (А. Агафонов, В. Salomon)
6	<i>E. pendulinus</i> ; VOK-0738	StY (Jensen, 1990)	Приморский край, окрестности г. Владивосток, кустарник в зоне отчуждения у железнодорожной станции Океанская; alt. 7 м, N 43°14.10' E 132°0.19' (А. Агафонов)
7	<i>E. pendulinus</i> ; CHE-1044	»	Республика Алтай, окрестности Чемальского р-на, окрестности пос. Чемал, район слияния рек Катунь и Чемал, alt. 434 м, N 51°23.533' E 86°00.197' (Е. Кобозева)
8	<i>E. gmelinii</i> ; AUS-1013	StY (Jensen, Hatch, 1989)	Республика Алтай, Шебалинский р-н, окрестности г. Усть-Сема, галечник в пойме р. Катунь, левый берег, alt. 341 м, N 51°37.620' E 85°45.923' (А. Агафонов, Е. Кобозева)
9	<i>E. sibiricus</i> ; ACH-1601	StH (Dewey, 1974)	Республика Алтай, перевал Чике-Таман, правая обочина автотрассы, 500 м севернее смотровой площадки, alt. 1250 м, N 50°38.911' E 86°18.789' (Е. Кобозева)
10	<i>E. caninus</i> ; OSE-1423	StH (Dewey, 1968)	Республика Северная Осетия–Алания, Алагирский р-н, экотропа в долине р. Цейдон, alt. 1951 м, N 42°47.139' E 43°53.605' (А. Агафонов, М. Агафопова)
11	<i>E. caninus</i> ; OSE-1427	»	Республика Северная Осетия–Алания, Ирафский р-н, окрестности пос. Стур-Дигора, западный склон хр. Большой Кавказ, долина правее притока р. Урух, alt. 1996 м, N 42°52.898' E 43°35.959' (С. Асбаганов)
12	<i>E. caninus</i> ; UKU-1617	»	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, сухой луг в смешанном лесу, alt. 618 м, N 53°48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
13	<i>E. gmelinii</i> ; BKA-0962	StY (Jensen, Hatch, 1989)	Приморский край, окрестности г. Большой Камень, подножие каменистых осыпей, alt. 41 м, N 43°7.513' E 132°25.133' (А. Агафонов)
14	<i>E. fedtschenkoi</i> ; KSA-0935	StY (Liu, Dewey, 1983)	Казахстан, хр. Южный Алтай, западный макросклон, alt. 1791 м, N 49°05.077' E 86°04.483' (Д. Герус)
49	<i>E. fedtschenkoi</i> ; KME-1729	»	Казахстан, хр. Заилийский Алатау, окрестности пос. Медеу, высокогорный каменистый луг, alt. 3223 м, N 43°07.101' E 77°06.828' (С. Асбаганов)
50	<i>E. fedtschenkoi</i> ; AUR-1714	»	Республика Алтай, Улаганский р-н, долина р. Ярлы-Амры, высокогорный каменистый луг, alt. 2180 м, N 50°19.044' E 087°43.049' (Е. Кобозева)
51	<i>E. nevskii</i> ; KME-1728	StY (Dewey, 1980)	Казахстан, хр. Заилийский Алатау, окрестности пос. Медеу, высокогорный каменистый луг, alt. 3223 м, N 43°07.101' E 77°06.828' (С. Асбаганов)
15	<i>E. fibrosus</i> ; ABZ-1602	StH (Dewey, 1984)	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, обочина грунтовой дороги в смешанном лесу, alt. 546 м, N 53°47.845' E 58°37.291' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
16	<i>E. mutabilis</i> ; KHA-1210	»	Красноярский край, Шушенский р-н, Шушенский бор, alt. 495 м, N 52°49.622' E 91°26.609' (С. Асбаганов)
17	<i>E. mutabilis</i> ; ABZ-1607	»	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, обочина грунтовой дороги в смешанном лесу, alt. 546 м, N 53°47.845' E 58°37.291' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
26	<i>E. abolinii</i> ; BUD-0780	StY (Jensen, 1989)	Республика Бурятия, Джиргинский р-н, окрестности пос. Нижний Торей, долина р. Торейка, опушка лиственничного леса, alt. 863 м, N 50°34.634' E 104°52.781' (Н. Бадмаева)
27	<i>E. ciliaris</i> ; VOK-0711	StY (Dewey, 1984)	Окрестности г. Владивосток, кустарник в зоне отчуждения между железнодорожными станциями Санаторная и Океанская, alt. 4 м, N 43°13.94' E 131°59.95' (Д. Герус, А. Агафонов)
38	<i>E. panormitanus</i> ; H4152*	StY (Lu, Salomon, 1992)	СССР, Украина, Крым
39	<i>E. caucasicus</i> ; H3207*	StY (Jensen, Wang, 1991)	СССР, Армения, окрестности г. Дилижан
66	<i>E. confusus</i> ; BUM-0505	StH (Lu et al., 1995)	Республика Бурятия, Тункинский р-н, окрестности пос. Монды, южный макросклон Тункинского хребта, каменистый берег ручья, alt. 1738 м, N 51°42.610' E 100°59.967' (Д. Герус, А. Агафонов)
67	<i>E. confusus</i> ; TAR-0730	»	Республика Тува, Тес-Хемский р-н, перевал Шуурмак–Самагалтай, северо-западные отроги хр. Хорумнуг–Тайга, елово-лиственничный лес, alt. 1545 м, N 50°36.870' E 95°10.729' (И. Артемов)

Примечание. Нумерация образцов соответствует трекам на рис. 2.

\* Образцы получены от д-ра В. Salomon (Шведский аграрный университет, отделение селекции растений, Алнарп, Швеция).

**Таблица 2.** Образцы видов рода *Elymus* с неизвестной геномной конституцией с территории России

№ об-разца	Вид <i>Elymus</i> ; образец	Местонахождение, авторы сбора
18	<i>E. uralensis</i> ; UKU-1617	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, сухой луг в смешанном лесу, alt. 618 м, N 53°48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
19	<i>E. viridiglumis</i> ; UKU-1618	Республика Башкортостан, Белорецкий р-н, окрестности пос. Новоабзаково, гора Куркак, высокотравный луг в березовом редколесье, alt. 619 м, N 53°48.718' E 58°40.377' (А. Агафонов, С. Асбаганов)
20	<i>E. transbaicalensis</i> ; AKU-0422	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, 10 км на север от пос. Чаган-Узун по Чуйскому тракту, лог Куюктанар, alt. 1815 м, N 50°9.783' E 88°19.054' (А. Агафонов, Д. Герус)
21	<i>E. transbaicalensis</i> ; GAR-0530	Республика Бурятия, Окинский р-н, автотрасса на пос. Орлик, галечник у р. Гарган, alt. 1610 м, N 52°05.947' E 100°23.005' (А. Агафонов, Д. Герус)
22	<i>E. margaritae</i> ; GUK-1009	Республика Алтай, Усть-Коксинский р-н, гора Красная, комплекс курумов и высокогорных лугов, alt. 2028 м, N 50°4.495' E 85°13.073' (Д. Никонова, Е. Кобозева)
23	<i>E. margaritae</i> ; AUK-0650	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, плато Уюк, 80 м севернее автотрассы, каменистый луг в долине ручья, alt. 2438 м, N 49°30.418' E 88°05.012' (А. Агафонов, В. Salomon)
24	<i>E. komarovii</i> ; AKU-0458	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, 10 км на север от пос. Чаган-Узун по Чуйскому тракту, лог Куюктанар, alt. 1815 м, N 50°9.783' E 88°19.054' (А. Агафонов, Д. Герус)
25	<i>E. transbaicalensis</i> ; TUV-9697	Республика Тува, Тоджинский р-н, заповедник Азас, кордон Илги-Чул (Д. Шауло)
28	<i>E. komarovii</i> ; AKT-0417	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, Северо-Чуйский хребет, ущелье Актру, граница леса и грунтовой дороги, alt. 2061 м, N 50°6.518' E 87°48.193' (А. Агафонов, Д. Герус)
29	<i>E. komarovii</i> ; GAR-0501	Республика Бурятия, Окинский р-н, долина р. Ока, лесная поляна в 50 м от русла р. Гарган, alt. 1607 м, N 52°05.947' E 100°23.005' (А. Агафонов, Д. Герус)
30	<i>E. komarovii</i> ; JPO-1505	Республика Якутия (Саха), Хангаласский р-н, окрестности г. Покровск, луг у автостанции, alt. 131 м, N 61°29.367' E 129°08.225' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
31	<i>E. subfibrosus</i> ; ANA-1118	Чукотский автономный округ, окрестности г. Анадырь (Д. Лысенко)
32	<i>E. subfibrosus</i> ; LEN-1524	Республика Саха (Якутия), Хангаласский улус, западные Ленские столбы, alt. 156 м, N 61°6.370' E 127°21.593' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
33	<i>E. macrourus</i> ; 12-0135	Восточный Таймыр, район слияния рек Большая Лесная Рассоха и Новая. Галечная пойма в устье Большой Лесной Рассохи, alt. 2 м, N 72°37.363' E 101°17.793' (Е. Поспелова)
34	<i>E. jacutensis</i> ; 13-0443	Юго-Восточный Таймыр, окраина Анабарского плато, район слияния рек Эриечка и Нямакит-Далдын, лужайка под скалами, alt. 218 м, N 71°15.250' E 105°37.452' (И. Поспелов)
35	<i>E. sajanensis</i> ; ZUN-0502	Республика Бурятия, Окинский р-н, окрестности пос. Зун-Холбо, alt. 1682 м, N 52°10.092' E 100°57.581' (А. Агафонов, Д. Герус)
36	<i>E. sajanensis</i> ; ART-0202	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, хр. Чихачева, галечник по левому притоку р. Бугузун, alt. 2254 м, N 50°1.914' E 89°23.620' (И. Артемов)
37	<i>E. amurensis</i> ; MES-1111	Приморский край, Хасанский р-н, окрестности Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН, луговой фрагмент у обочины грунтовой дороги, alt. 93 м, N 42°37.045' E 131°8.650' (Е. Кобозева, А. Агафонов)
40	<i>E. transbaicalensis</i> ; AKT-0628	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, Северо-Чуйский хребет, ущелье Актру, ивняк у альплагеря, alt. 2118 м, N 50°5.038' E 87°46.820' (А. Агафонов, Д. Герус)
41	<i>E. kronokensis</i> ; BER-0804	Республика Бурятия, Еравнинский р-н, юго-восточнее вахтового пос. Озерный, лиственничник, alt. 1154 м, N 52°58.625' E 111°38.166' (О. Аненхонов)
42	<i>E. kronokensis</i> ; MMA-1103	Магаданская область, Тенькинский р-н, окрестности пос. Мадаун, горенник в пойме р. Арманы, alt. 627 м, N 60°35.861' E 150°40.862' (Д. Лысенко)
43	<i>E. kronokensis</i> ; KES-9603	Камчатский край, Быстринский р-н, южный склон горы на север от пос. Эссо, alt. 627 м, N 55°55.945' E 158°41.275' (А. Агафонов, В. Salomon)
44	<i>E. lenensis</i> ; 12-0125	Восточный Таймыр, район слияния рек Большая Лесная Рассоха и Новая, байджарах на берегу озера, alt. 39 м, N 72°39.613' E 101°17.079' (И. Поспелов)
45	<i>E. kamczadalarum</i> ; KSO-9623	Камчатский край, Елизовский р-н, окрестности пос. Сосновка, alt. 247 м, N 53°5.046' E 158°17.918' (А. Агафонов, В. Salomon)
46	<i>E. charkeviczii</i> ; KES-9670	Камчатский край, Быстринский р-н, окрестности пос. Эссо, обочина грунтовой дороги, alt. 484 м, N 55°55.014' E 158°42.116' (А. Агафонов, В. Salomon)
47	<i>E. charkeviczii</i> ; MSN-1202	Городской округ Магадан, пос. Снежный, тропа у границы леса, alt. 145 м, N 59°43.466' E 150°52.677' (Н. Бадмаева)
52	<i>E. lenensis</i> ; LEN-1520	Республика Саха (Якутия), Хангаласский р-н, луговой склон на правом берегу р. Лена, alt. 114 м, N 61°6.369' E 127°21.593' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
53	<i>E. lenensis</i> ; ALD-1539-3	Республика Саха (Якутия), Алданский р-н, левый берег р. Алдан, кустарник у песчаной отмели, alt. 228 м, N 58°40.878' E 128°33.081' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)

**Окончание табл. 2**

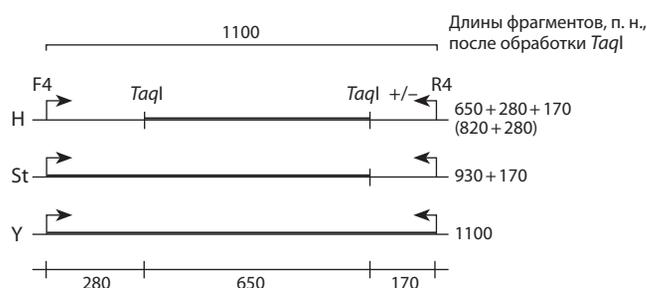
№ образца	Вид <i>Elymus</i> ; образец	Местонахождение, авторы сбора
54	<i>E. kronokensis</i> ; KRT-1611	Красноярский край, Эвенкийский р-н, окрестности пос. Тура, р. Нижняя Тунгуска, лиственничник, обочина тропы, alt. 169 м, N 64°16.478' E 100°16.445' (Л. Кривобоков)
55	<i>E. kronokensis</i> ; 12-0137	Восточный Таймыр, береговой обрыв на р. Большая Лесная Рассоха, alt. 2 м, N 72°35.808' E 101°15.900' (Е. Поспелова)
56	<i>E. kronokensis</i> ; TAL-0602	Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, долина р. Талдура, лиственничник по склону горы, alt. 2095 м, N 49°57.472' E 87°57.552' (Д. Герус, А. Агафонов)
57	<i>E. subfibrosus</i> ; KRT-1612	Красноярский край, Эвенкийский р-н, пос. Тура, обочина грунтовой дороги, alt. 309 м, N 64°16.920' E 100°14.880' (Л. Кривобоков)
58	<i>E. subfibrosus</i> ; JRO-1733	Республика Саха (Якутия), Томпонский р-н, автотрасса Колыма, южные отроги Верхоянского хребта, долина р. Росомаха, приток р. Ильгувеем, alt. 460 м, N 63°2.879' E 137°52.610' (Н. Бадмаева)
59	<i>E. jacutensis</i> ; ALU-1711	Республика Алтай, Улаганский р-н, разнотравный луг на левом берегу р. Чулышман под перевалом Кату-Ярык, alt. 733 м, N 50°55.497' E 088°12.226' (Е. Кобозева)
60	<i>E. jacutensis</i> ; GAN-1516	Республика Алтай, Чемальский р-н, окрестности пос. Анос, склон к левому берегу р. Анос у моста, alt. 380 м, N 51°30.014' E 85°57.160' (Е. Кобозева)
61	<i>E. jacutensis</i> ; ALD-1541	Республика Саха (Якутия), Алданский р-н, левый берег р. Алдан, кустарник у песчаной отмели, alt. 228 м, N 58°40.878' E 128°33.081' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
62	<i>E. macrourus</i> ; MTE-1210	Магаданская область, Тенькинский р-н, обочина автотрассы у границы смешанного леса, alt. 970 м, N 60°26.034' E 150°58.558' (Н. Бадмаева)
63	<i>E. macrourus</i> ; LEN-1524_1	Республика Саха (Якутия), Хангаласский р-н, луговой склон на правом берегу р. Лена, alt. 114 м, N 61°6.369' E 127°21.593' (Е. Кобозева, С. Асбаганов)
64	<i>E. turuchanensis</i> ; KRE-1440	Красноярский край, Туруханский р-н, пос. Бор, на песке по берегу р. Енисей, alt. 30 м, N 61°36.265' E 90°0.143' (М. Ломоносова)
65	<i>E. peschkovae</i> ; MJA-1106	Магаданская область, Хасынский р-н, Яблоновый перевал, пойменный луг у дороги, alt. 755 м, N 60°19.467' E 151°10.540' (Д. Лысенко)
68	<i>E. peschkovae</i> ; AMU-8804	Амурская область, 60 км вниз по р. Гилкой от г. Тында, песчаный берег, alt. 445 м, N 54°56.216' E 125°21.854' (О. Потемкин)

Примечание. Нумерация образцов соответствует трекам на рис. 2.

зованием праймеров El\_balg\_F4 (5'-GGTACCATCGT GGACATTGAA-3') и El\_balg\_R4 (5'-CTGTACCACCA GTGAATGCC-3') (Кобозева и др., 2017). Реакционная смесь для ПЦР в объеме 15 мкл содержала однократный Taq буфер, по 0.2 мМ каждого dNTP, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл каждого праймера, 20 нг геномной ДНК, 1 ед. HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», РФ). Использовали следующий режим: первичная денатурация при 94 °C – 4 мин; 40 циклов: денатурация при 94 °C – 20 с, отжиг праймеров при 60 °C – 25 с, элонгация при 72 °C – 90 с; финальная элонгация – 5 мин при 72 °C. CAPS-анализ (Konieczny, Ausubel, 1993) проводили следующим образом: к 8 мкл ПЦР-амплификата добавляли TaqI буфер (до 1×), 1 ед. TaqI рестриктазы (Thermo Scientific, США), MQ-H<sub>2</sub>O до 15 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 65 °C в течение 1 ч, затем анализировали электрофорезом в 1.7 % агарозном геле, содержащем однократный TAE-буфер.

**Результаты и обсуждение**

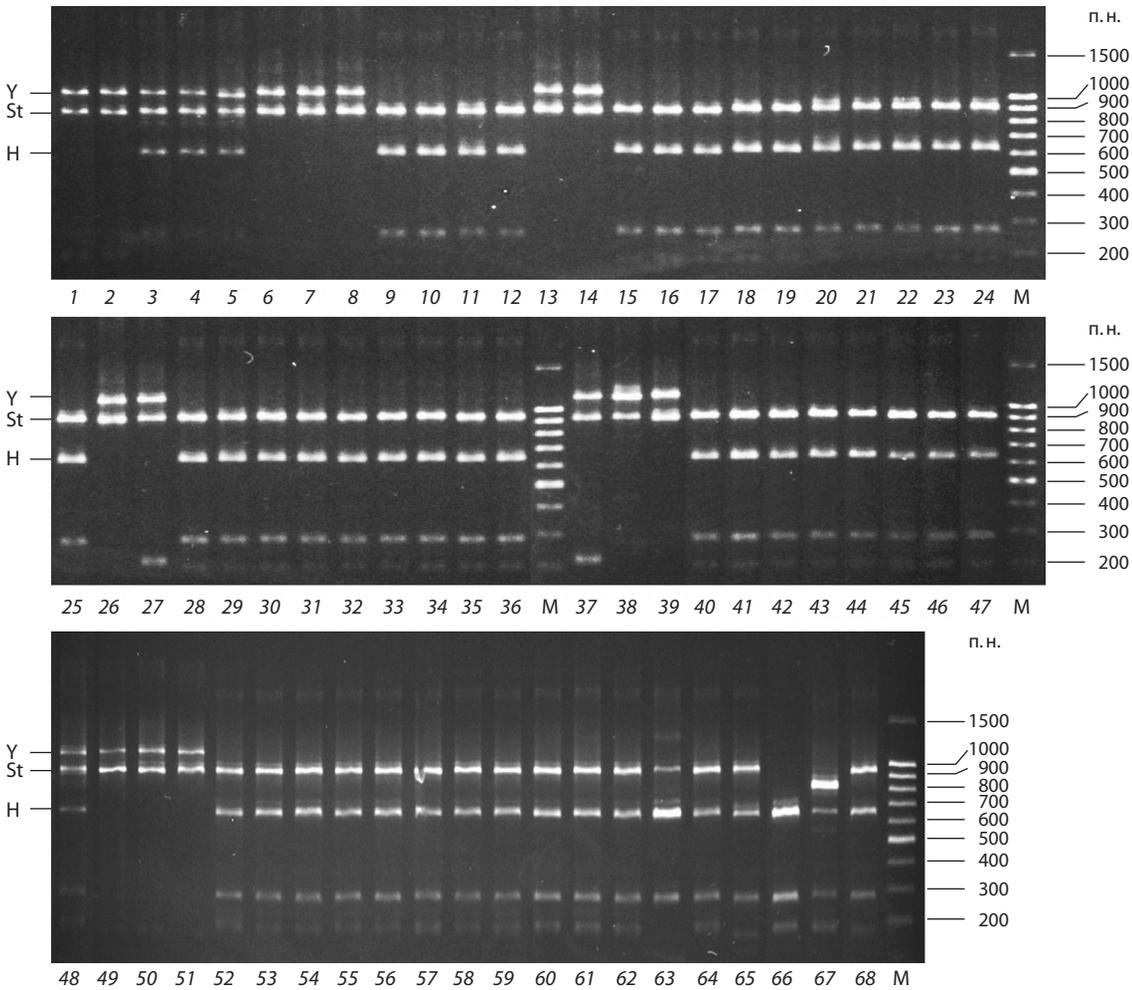
Сравнительный анализ последовательностей гена β-амилазы, опубликованных в работе R. Mason-Gamer (2013), показал, что изучаемый фрагмент генома Y длиной около 1100 п. н. не содержал ни одного сайта рестрикции TaqI, тогда как в геноме St у него был один сайт узнавания на расстоянии ~170 п. н. от праймера El\_balg\_R4. Этот же сайт мог присутствовать в некоторых H-содержащих образцах, кроме того, все геномы H имели сайт узнавания на расстоянии ~280 п. н. от праймера El\_balg\_F4. Таким



**Рис. 1.** Схема расположения сайтов узнавания эндонуклеазой TaqI во фрагменте гена β-амилазы в трех базисных гапломах, входящих в состав полиплоидного генома *Elymus*.

образом, при визуализации в геле геномы распознавались по самым крупным фрагментам: геном H – по наличию фрагмента длиной около 650 п. н., St – 930 п. н., Y – 1100 п. н. (рис. 1).

Нами был проведен анализ CAPS-маркера у 68 образцов (см. табл. 1 и 2). Электрофореграммы фрагментов рестрикции TaqI эндонуклеазой представлены на рис. 2. По результатам этого анализа была определена ГК исследованных образцов. Из 16 видов рода ранее известная ГК была подтверждена у 15 видов, за исключением *E. kamoi*. У 16 видов ГК была определена впервые, 15 из них имели геномный состав StStHh и 1 вид, *E. amurensis*, – геномный состав StStYy (табл. 3). Вместе с тем были обнаружены некоторые ограничения при применении



**Рис. 2.** Полиморфизм длин продуктов рестрикции эндонуклеазой *TaqI* амплифицированного фрагмента гена  $\beta$ -амилазы у видов рода *Elymus*.

Нумерация образцов соответствует табл. 1 и 2. В качестве маркера длины фрагментов использовали 100+ bp DNA Ladder («Евроген»).

**Таблица 3.** Список бореальных видов *Elymus* с территории азиатской части России, у которых геномная конституция (ГК) впервые определена CAPS-методом

№ п/п	Вид <i>Elymus</i>	Число изученных образцов	ГК	№ п/п	Вид <i>Elymus</i>	Число изученных образцов	ГК
1	<i>E. amurensis</i>	1	StY	9	<i>E. margaritae</i>	2	StH
2	<i>E. charkeviczii</i>	2	StH	10	<i>E. sajanensis</i>	2	StH
3	<i>E. jacutensis</i>	4	StH	11	<i>E. subfibrosus</i>	4	StH
4	<i>E. kamczadalarum</i>	1	StH	12	<i>E. transbaicalensis</i>	4	StH
5	<i>E. komarovii</i>	4	StH	13	<i>E. uralensis</i>	1	StH
6	<i>E. kronokensis</i>	6	StH	14	<i>E. viridiglumis</i>	1	StH
7	<i>E. lenensis</i>	3	StH	15	<i>E. turuchanensis</i>	1	StH
8	<i>E. macrourus</i>	3	StH	16	<i>E. peschkovae</i>	2	StH

этого метода. Так, у двух генотипов *E. kamoji* с помощью CAPS-анализа удалось обнаружить только два гаплота, St и Y, хотя, исходя из известного числа хромосом, вид является гексаплоидом, следовательно, должен содержать три базисных генома (гаплота) (см. рис. 2, 1, 2). Маловероятно, что отсутствие рестрикционных фрагментов,

соответствующих гаплоту H, обусловлено неполным гидролизом. Поскольку все представители рода содержат геном St, имеющий сайт узнавания эндонуклеазой *TaqI*, то наличие фрагментов, специфичных для этого генома, служит внутренним контролем прохождения гидролиза. Это соответствует зарубежной классификации, где вид

*E. kamoji* отнесен к роду *Campeiostrachys* (Baum et al., 2011), содержащему виды с геномной формулой StHY. Проведенная нами цитологическая проверка показала число хромосом  $2n = 42$  у обоих образцов *E. kamoji*. Наличие у *E. kamoji* генома H, лишённого двух сайтов узнавания эндонуклеазой *TaqI*, ставит вопрос о его происхождении, которое остается невыясненным. Не исключено, что у разных представителей рода геном H получен от разных предковых таксонов, что соответствует предположению о полифилии доноров базисных гаплов (Mason-Gamer, 2013).

Интересный паттерн фрагментов рестрикции показали два образца *E. confusus* (см. рис. 2, 66 и 67), ГК которого была определена ранее как StStHH (Lu et al., 1995). У образца TAR-0730 (см. рис. 2, 67) более длинный фрагмент, соответствующий аллелю из генома St, видимо, укорочен, может быть, вследствие делеции. В спектре фрагментов образца BUM-0505 (рис. 2, 66) отсутствует фрагмент длиной около 930 п. н., происходящий из генома St, тогда как более мелкий фрагмент длиной около 170 п. н., характерный для этого гаплота, отчетливо виден. Вероятно, это объясняется мутацией в составе исследуемого гена генома St, например, приводящей к возникновению сайта узнавания для *TaqI*. Не исключена также возможность рекомбинации и/или интрогрессии между геномами St и H в ходе интенсивных микроэволюционных процессов, что косвенно подтверждается высокой морфологической изменчивостью внутри этого вида.

Таким образом, по данным CAPS-анализа, почти все вновь изученные образцы бореальной группы видов из Сибири и Дальнего Востока России имеют StH-геномный состав. Исключение составил *E. amurensis*, филогенетически близкий к StY-геномному виду *E. ciliaris* и имеющий геномный состав StY. Это означает, что центр разнообразия азиатской StH-геномной группы расположен севернее, по сравнению с таковым у StY-геномной группы, который, как считается, находится на территории Китая (Lu, Salomon, 1992). Примечательно, что в Северной Америке состав рода *Elymus* также представлен в основном StH-геномными видами, за исключением *Elymus californicus* с неясным происхождением (Mason-Gamer, 2001). Кроме того, там отмечено несколько заносных азиатских StHY- и StY-геномных видов (Barkworth et al., 2007).

Метод показал высокую точность: в данной работе ранее известная геномная конституция была подтверждена CAPS-анализом у 15 из 16 видов *Elymus*. Для 10 видов геномная формула, вновь определенная CAPS-анализом как StH, была независимо подтверждена секвенированием нуклеотидных последовательностей клонированного фрагмента гена *GBSSI* (*waxy*) (Kobozeva et al., 2018; Агафонов и др., 2019). При этом необходимо отметить относительно высокую трудоемкость секвенирования генов у полиплоидных видов ввиду необходимости использования микробиологических процедур при клонировании.

## Заключение

Главное достоинство CAPS-анализа фрагмента гена  $\beta$ -амилазы – в его скорости и методической доступности, позволяющей анализировать большое число образцов у видов

с обширными ареалами и широкой морфологической и генетической вариабельностью. Однако следует иметь в виду, что никакой отдельно взятый молекулярный маркер не может однозначно идентифицировать вид или геном, он служит лишь маркером, но не диагнозом. Поэтому разработка дополнительных простых и доступных методов геномной идентификации новых или неизученных биотипов из локальных местообитаний остается актуальной.

## Список литературы / References

- Агафонов А.В., Асбаганов С.В., Шабанова (Кобозева) Е.В., Морозов И.В., Бондарь А.А. Геномная конституция и дифференциация субгеномов эндемичных сибирских и дальневосточных видов рода *Elymus* (Poaceae) по данным секвенирования ядерного гена *waxy*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):817-826. DOI 10.18699/VJ19.555.  
[Agafonov A.V., Asbaganov S.V., Shabanova (Kobozeva) E.V., Morozov I.V., Bondar A.A. Genome constitution and differentiation of subgenomes in Siberian and Far Eastern endemic species of the genus *Elymus* (Poaceae) according to the sequencing of the nuclear gene *waxy*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):817-826. DOI 10.18699/VJ19.555. (in Russian)]
- Агафонов А.В., Кобозева Е.В., Асбаганов С.В., Шмаков Н.А. Современные достижения и перспективы в построении филогенетически ориентированной системы таксонов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae). Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Сб. статей XIV междунар. науч.-практ. конференции. Барнаул. 2015;314-322.  
[Agafonov A.V., Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Shmakov N.A. Current achievements and prospects of construction of a phylogenetically oriented taxonomy of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae). Proceedings of the 14th International Scientific and Practical Conference "Problems of Botany of Southern Siberia and Mongolia". Barnaul. 2015;314-322. (in Russian)]
- Кобозева Е.В., Мглинец А.В., Агафонов А.В. Выявление геномного состава аллополиплоидных видов рода *Elymus* (Poaceae: Triticeae) с помощью CAPS-анализа. В: Проблемы изучения растительного покрова Сибири: Матер. VI междунар. науч. конференции. Томск. 2017;155-157. DOI 10.17223/9785946216371/51.  
[Kobozeva E.V., Mglinets A.V., Agafonov A.V. Identification of the genomic composition in allopolyploid species of the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) with CAPS-analysis. In: Proceedings of the 6th International Conference "Issues in the Study of the Vegetation Cover in Siberia". Tomsk. 2017;155-157. DOI 10.17223/9785946216371/51. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н. О роде *Elymus* L. (Poaceae) в России. Бот. журнал. 2008;93(10):1587-1596.  
[Tsveliyov N.N. On the genus *Elymus* (Poaceae) in Russia. Botanicheskiy Zhurnal = Botanical Journal. 2008;93(10):1587-1596. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С. Роды *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski и *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) во флоре России. В: Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2010;57:5-102.  
[Tsveliyov N.N., Probatova N.S. The genera *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski, and *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the flora of Russia. In: V.L. Komarov Memorial Lectures. Vladivostok: Dalnauka Publ., 2010;57:5-102. (in Russian)]
- Шавруков Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(2):205-213. DOI 10.18699/VJ15.026.

- [Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2016;6(3):279-287. DOI 10.1134/S2079059716030114.]
- Barkworth M.E. Changing perceptions of the Triticeae. In: Jacobs S.W.L., Everett J. (Eds.). Grasses: Systematics and Evolution. Melbourne: CSIRO, 2000;110-120.
- Barkworth M.E., Cambell J.J.N., Salomon B. *Elymus* L. In: Barkworth M.E., Capels K.M., Long S., Anderton L.K., Piep M.B. (Eds.). Flora of North America. New York; Oxford: Oxford University Press, 2007;24:288-343.
- Baum B.R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A.V. A taxonomic revision of the genus *Campepistachys* Drobov. J. Syst. Evol. 2011;49(2):146-159.
- Dewey D.R. Synthetic *Agropyron-Elymus* hybrids. III. *Elymus canadensis* × *Agropyron caninum*, *A. trachycaulum* and *A. striatum*. Amer. J. Bot. 1968;55:1133-1139.
- Dewey D.R. Cytogenetics of *Elymus sibiricus* and its hybrids with *Agropyron tauri*, *Elymus canadensis* and *Agropyron caninum*. Bot. Gaz. 1974;135:80-87.
- Dewey D.R. Cytogenetics of *Agropyron ugamicum* and six of its interspecific hybrids. Bot. Gaz. 1980;141:305-312.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson J.P. (Ed.). Gene Manipulation in Plant Improvement. New York: Plenum Publ. Corp., 1984;209-279.
- Gostimsky S.A., Kokaeva Z.G., Kononov F.A. Studying plant genome variation using molecular markers. Russ. J. Genet. 2005;41(4):378-388. DOI 10.1007/s11177-005-0101-1.
- Hu C.Y., Tsai Y.Z., Lin S.F. Development of STS and CAPS markers for variety identification and genetic diversity analysis of tea germplasm in Taiwan. Bot. Stud. 2014;55:12. DOI 10.1186/1999-3110-55-12.
- Jensen K.B. Cytology, fertility, and origin of *Elymus abolinii* (Drob.) Tzvelev and its F<sub>1</sub> hybrids with *Pseudoroegneria spicata*, *E. lanceolatus*, *E. dentatus* ssp. *ugamicus*, and *E. drobovii* (Poaceae: Triticeae). Genome. 1989;32:468-474. DOI 10.1139/g89-470.
- Jensen K.B. Cytology and morphology of *Elymus pendulinus*, *E. pendulinus* ssp. *multiculmis*, and *E. parviglume* (Poaceae: Triticeae). Bot. Gaz. 1990;151(2):245-251.
- Jensen K.B., Hatch S. Genome analysis, morphology, and taxonomy of *Elymus gmelinii* and *E. strictus* (Poaceae: Triticeae). Bot. Gaz. 1989;150(1):84-92.
- Jensen K.B., Wang R.R.C. Cytogenetics of *Elymus caucasicus* and *Elymus longearistatus* (Poaceae: Triticeae). Genome. 1991;34:860-867.
- Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Agafonov A.V. Genome composition and assessment of the divergence between Russian boreal species in the genus *Elymus* (Poaceae) detected on the basis of sequencing of the nuclear gene GBSSI. In: Prospects of Development and Challenges of Modern Botany. BIO Web Conf. 2018;11.00023. DOI 10.1051/bioconf/20181100023.
- Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 1993;4(2):403-410.
- Li X.-M., Lee B.S., Mammadov A.C., Koo B.-C., Mott I.W., Wang R.R.C. CAPS markers specific to Eb, Ee, and R genomes in the tribe Triticeae. Genome. 2007;50:400-411.
- Liu C.W., Dewey D.R. The genome constitution of *Elymus fedtschenkoi*. Acta Genet. Sinica. 1983;10:20-27.
- Löve A. Conspectus of the Triticeae. Feddes Repert. 1984;95:425-521.
- Lu B.-R., Bothmer R. von. Interspecific hybridization with *Elymus himalayanus* and *E. schrenkianus*, and other *Elymus* species (Triticeae: Poaceae). Genome. 1992;35:230-237.
- Lu B.-R., Salomon B. Differentiation of the SY genomes in Asiatic *Elymus*. Hereditas. 1992;116:121-126.
- Lu B.-R., Salomon B., Bothmer R. von. Interspecific hybridization with *Elymus confusus* and *E. dolichaterus*, and their genomic relationships (Poaceae: Triticeae). Plant Syst. Evol. 1995;197:1-17.
- Mason-Gamer R.J. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences. Syst. Bot. 2001;26:757-768.
- Mason-Gamer R.J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. PLoS One. 2013;8(11):e78449. DOI 10.1371/journal.pone.0078449.
- Okito P., Mott I.W., Wu Y., Wang R.R. A Y genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae). Genome. 2009;52(4):391-400.
- Zhou Y.-H., Wu B.-H., Fu T.-H., Zheng Y.-L. Morphology, fertility and cytogenetics of intergeneric hybrid between *Roegneria kamoji* Ohwi and *Dasyphyrum villosum* (L.) Candargy (Poaceae: Triticeae). J. Syst. Evol. 1999;37(2):125-130.

#### ORCID ID

A.V. Agafonov orcid.org/0000-0002-1403-5867  
S.V. Asbaganov orcid.org/0000-0002-7482-7495

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами» (№ гос. регистрации AAAA-A17-117012610051-5), государственного задания ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-0039-С-01, а также при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-04-01030). При подготовке публикации использованы материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534.

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

Поступила в редакцию 25.12.2018. После доработки 08.08.2019. Принята к публикации 30.10.2019.

## Динамика генетического разнообразия сортов овса в Тюменской области по авенин-кодирующим локусам

А.В. Любимова<sup>1, 2</sup>✉, Г.В. Тоболова<sup>2</sup>, Д.И. Еремин<sup>2</sup>, И.Г. Лоскутов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северного Зауралья – филиал Федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук, пос. Московский, Тюменский район, Тюменская область, Россия

<sup>2</sup> Государственный аграрный университет Северного Зауралья, Тюмень, Россия

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

✉ e-mail: ostapenkoav88@yandex.ru

**Аннотация.** Для анализа внутривидового генетического разнообразия сельскохозяйственных культур применяют разнообразные молекулярные и биохимические маркеры. Высокой эффективностью при оценке этого показателя обладают проламин-кодирующие локусы. На базе лаборатории сортовой идентификации семян Государственного аграрного университета Северного Зауралья в 2018–2019 гг. методом электрофореза исследованы 18 сортов овса посевного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области с 1930-х гг. до 2019 г. Целью работы было изучить динамику генетического разнообразия сортов по авенин-кодирующим локусам. Для анализа использовали по 100 зерновок каждого сорта. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах 13.2 % полиакриламидного геля при постоянном напряжении 500 В в течение 4.0–4.5 ч. Установлено, что 44.4 % сортов гетерогенны и состоят из двух биотипов. Для трех локусов идентифицировано 20 аллелей, 10 из которых выявлены впервые. Частота встречаемости аллелей авенин-кодирующих локусов изменялась с течением времени. Аллели, характерные для сортов иностранного происхождения, в процессе сортосмены заместились аллелями, присутствующими в отечественных сортах, а затем в сортах местных селекционных учреждений. Наибольшую частоту встречаемости в сортах тюменской селекции имели аллели *Avn A4* (50.0 %), *A2* (25.0 %), *Avn B4* (50.0 %), *Bnewb* (37.5 %), *Avn C1* (37.5 %), *C2* и *C5* (25.0 %). Эти аллели имеют большую ценность как маркеры хозяйственно ценных и адаптивно значимых признаков. Величина генетического разнообразия в сортах овса изменялась с течением времени от 0.33 в 1929–1950 гг. до 0.75 в 2019 г. Высокое значение генетического разнообразия в современных сортах селекции Научно-исследовательского института сельского хозяйства Северного Зауралья, а также увеличение этого показателя на протяжении последних 20 лет связаны с использованием в селекционном процессе генетически разнородного исходного материала. Это позволило получить сорта, обладающие высоким адаптивным потенциалом в природно-климатических условиях данного региона.

Ключевые слова: овес; сорт; электрофорез; запасные белки; авенин; авенин-кодирующие локусы; аллель; генетическое разнообразие.

**Для цитирования:** Любимова А.В., Тоболова Г.В., Еремин Д.И., Лоскутов И.Г. Динамика генетического разнообразия сортов овса в Тюменской области по авенин-кодирующим локусам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):123-130. DOI 10.18699/VJ20.607

## Dynamics of the genetic diversity of oat varieties in the Tyumen region at avenin-coding loci

A.V. Lyubimova<sup>1, 2</sup>✉, G.V. Tobolova<sup>2</sup>, D.I. Eremin<sup>2</sup>, I.G. Loskutov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Scientific Research Institute of Agriculture of the Northern Trans-Ural Region – Branch of the Tyumen Scientific Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Moskowsky village, Tyumen district, Tyumen region, Russia

<sup>2</sup> Northern Trans-Ural State Agricultural University, Tyumen, Russia

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

✉ e-mail: ostapenkoav88@yandex.ru

**Abstract.** Molecular and biochemical markers are used to analyze the intraspecific genetic diversity of crops. Prolamin-coding loci are highly effective for assessing this indicator. On the basis of the Laboratory of Varietal Seed Identification of the State Agrarian University of the Northern Trans-Urals, 18 varieties of common oat included in the State Register of Selection Achievements in the Tyumen Region from the 1930s to 2019 were studied by electrophoresis in 2018–2019. The aim of the work was to study the dynamics of the genetic diversity of oat varieties at avenin-coding loci. For the analysis, 100 grains of each variety were used. Electrophoresis was carried out in vertical plates of 13.2 % polyacrylamide gel at a constant voltage of 500 V for 4.0–4.5 h. It was found that 44.4 % of the varieties are heterogeneous, each consisting of two biotypes. For three loci, 20 alleles were identified, 10 of which were detected for the first time. The allele frequency of avenin-coding loci varied with time. In the process of variety exchange, alleles that are characteristic of varieties of non-Russian origin were replaced by alleles present in domestic varieties and then in the varieties developed by local breeding institutions. The fol-

lowing alleles had the highest frequency in Tyumen varieties: *Avn A4* (50.0 %), *A2* (25.0 %), *Avn B4* (50.0 %), *Bnew6* (37.5 %), *Avn C1* (37.5 %), *C2* and *C5* (25.0 %). These alleles are of great value as markers of agronomically and adaptively important characters for the region in question. The amount of genetic diversity of oats varied with time from 0.33 in 1929–1950 to up to 0.75 in 2019. The high value of genetic diversity in modern breeding varieties of the Scientific Research Institute of Agriculture of the Northern Trans-Urals and an increase in this indicator over the past 20 years are associated with the use of genetically heterogeneous source material in the breeding process. This allowed obtaining varieties with high adaptive potentials in the natural climatic conditions of the region.

Key words: oat; variety; electrophoresis; storage proteins; avenin; avenin-coding loci; alleles; genetic diversity.

**For citation:** Lyubimova A.V., Tobolova G.V., Eremin D.I., Loskutov I.G. Dynamics of genetic diversity of oat varieties in the Tyumen region at avenin-coding loci. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):123-130. DOI 10.18699/VJ20.607

## Введение

Овес посевной (*Avena sativa* L.) – ценная сельскохозяйственная культура, используемая как для производства продуктов питания, так и на корм животным (Barsila, 2018). Важный фактор в увеличении производства овса – создание новых сортов интенсивного типа, характеризующихся высокой урожайностью и экологической устойчивостью (Гончаренко, 2016). В Тюменской области селекционная работа с этой культурой ведется очень активно. С первой половины XX в. до настоящего времени в Государственный реестр селекционных достижений по области было включено 18 сортов ярового овса. В 1993 г. был районирован первый сорт местной селекции – Мегион. С этого момента доля сортов, созданных Научно-исследовательским институтом сельского хозяйства Северного Зауралья (НИИСХ Северного Зауралья), в посевах области постоянно увеличивается. В настоящее время в Государственный реестр селекционных достижений по области входят только сорта местной селекции.

Однако активная селекционная работа может привести к снижению генетического разнообразия вида. Это связано с частым вовлечением в селекционный процесс одних и тех же генотипов для усиления конкретных хозяйственно ценных признаков. Снижение генетического разнообразия отрицательно сказывается на устойчивости популяций к болезням и их способности адаптироваться к изменяющимся природно-климатическим условиям (Новосельская-Драгович и др., 2007; Афанасенко, Новожилов, 2009; Гончаренко, 2016).

Для анализа внутривидового генетического разнообразия применяются разнообразные молекулярные и биохимические маркеры (Конарев и др., 2000; Montilla-Bascón et al., 2013; Shavrukov, 2016; Scheben et al., 2017). Очень эффективны для оценки этого показателя проламины-кодирующие локусы (Che, Li, 2007; Мельникова и др., 2010; Кудрявцев и др., 2014; Лялина и др., 2016; Зобова и др., 2018; Любимова, Еремин, 2018; Utebayev et al., 2019). Проламины овса (авенины) наследуются блоками и контролируются тремя независимыми локусами: *Avn A*, *Avn B* и *Avn C*, расположенными в трех гомеологичных хромосомах группы А. По каждому из авенин-кодирующих локусов выявлен множественный аллелизм (Портянко и др., 1987; Portyanko et al., 1998). Благодаря высокому уровню полиморфизма авенина, практически каждый сорт овса, биотип или линия характеризуются уникальным компонентным составом запасных белков (Лоскутов, 2007; Lyubimova, Eremin, 2018). Это позволяет проанализировать частоту встречаемости отдельных аллелей аве-

нин-кодирующих локусов, динамику изменения их встречаемости во времени и пространстве, а также оценить генетические преобразования, происходящие под влиянием длительного искусственного отбора.

Цель работы – изучить динамику генетического разнообразия по авенин-кодирующим локусам в сортах овса посевного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области с 1930-х гг. до настоящего времени, для оценки эффективности селекционной работы, проводимой в регионе.

## Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории сортовой идентификации семян Агробиотехнологического центра Государственного аграрного университета Северного Зауралья в 2018–2019 гг. Было изучено 18 сортов овса посевного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области с 1929 г. (табл. 1).

Растительный материал предоставлен из коллекций Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова и учреждением-оригинатором сортов – НИИСХ Северного Зауралья – филиалом Федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук.

Для лабораторного анализа использовали по 100 зерновок каждого сорта, отобранных методом случайной выборки. Для одномерного электрофореза авенинов применяли методику (Portyanko et al., 1998), с модификациями. Белки экстрагировали из отдельных измельченных зерновок добавлением 90 мкл 70 % этанола. Полученный экстракт центрифугировали и добавляли к нему по 300 мкл красителя метиленового зеленого. Экстракт белка (22 мкл) вносили в полиакриламидный гель. Состав геля: 13.17 г акриламида, 0.66 г N,N'-метилен-бис-акриламида, 7.17 г мочевины, 2.0 мг железа сернокислого (III), 80.0 мг аскорбиновой кислоты и 0.26 г лактата алюминия; все реактивы растворяли в 100 мл алюминий-лактатного буфера (рН 3.1). Полимеризацию акриламида инициировали добавлением 25 мкл 15 % перекиси водорода к 75 мл раствора геля. Электрофорез проводили в вертикальных электрофоретических камерах с размерами формируемых пластин 17.8 × 17.8 × 0.15 см (VE-20, Helicon, Россия) в течение 4.0–4.5 ч при постоянном напряжении 500 В. Для фиксации и окрашивания геля использовали 10 % раствор трихлоруксусной кислоты с добавлением 0.05 % красителя Кумасси бриллиантового голубого R-250 в этаноле. Идентификацию аллельных вариантов блоков компо-

**Таблица 1.** Сорта овса посевного, включенные в Государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области (1929–2019 гг.)

№ в каталоге ВИР	Сорт	Происхождение	Год районирования	Год снятия с районирования	Всего в районировании (лет)
7965	Победа	Швеция	1929	1963	34
7947	Золотой дождь		1929	1976	47
8494	Орел		1939	1982	43
8256	Ударник 883	Красноярский край	1957	1960	3
2874	Нидар	Норвегия	1957	1963	6
11132	Северянин	Архангельская область	1966	1974	8
11717	Скороспелый	Кировская область	1974	1981	7
11122	Нарымский 943	Томская область	1975	1996	21
12245	Таежник		1977	2001	24
11379	Астор	Нидерланды	1978	2000	22
11584	Сельма	Швеция	1981	1993	12
13478	Перона	Нидерланды	1985	2018	33
14039	Мегион	Тюменская область	1993	–	26
14031	Новосибирский 88	Новосибирская область	1994	2004	10
14784	Тюменский голозерный	Тюменская область	2000	–	19
14785	Талисман		2002	–	17
15380	Отрада		2014	–	5
15451	Фома		2015	–	4

нентов, контролируемых авенин-кодирующими локусами, осуществляли на основании каталога, разработанного В.А. Портянко с коллегами (1987). В качестве стандарта использовали овес посевной сорта Астор (*Avn A2 B4 C2*). В случае, если выявленный блок отсутствовал в каталоге, его обозначали отметкой «new».

Для того чтобы оценить динамику изменения генетического разнообразия сортов овса во времени, все исследованные образцы были объединены в группы. В одну группу входили сорта, возделываемые в один и тот же десятилетний период времени. Генное разнообразие на locus (H) рассчитывали для каждой группы сортов отдельно по формуле:

$$H = \frac{n}{n-1} \times (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2),$$

где  $p_i$  – популяционная частота  $i$ -го аллеля,  $k$  – количество аллелей локуса,  $n$  – объем выборки (Nei, 1987). Для расчета среднего генного разнообразия ( $\bar{H}$ ) усредняли количество аллелей на locus по всем локусам. Вычисления проводили с использованием программы Arlequin Ver 3.5.2.2 (Copyright 2015 L. Excoffier. CPMG, University of Berne).

## Результаты

В результате исследований установлено, что 8 (44.4 %) из 18 проанализированных сортов были гетерогенными по компонентному составу авенина. Сорта Победа, Золотой дождь, Орел, Северянин, Нарымский 943, Таежник, Мегион и Отрада состояли из двух биотипов. Для этих сортов

характерно наличие нескольких аллелей по одному или нескольким авенин-кодирующим локусам. В генетической формуле такие состояния локусов записывали со знаком «+» (табл. 2). При последующих расчетах каждый биотип рассматривался нами как отдельный образец. Всего было исследовано 26 образцов.

Анализ электрофоретических спектров авенина позволил нам описать генетические формулы для каждого из исследованных сортов. Всего было выявлено аллелей по локусам: *Avn A* – 8, *Avn B* – 7, *Avn C* – 5. Необходимо отметить, что часть из обнаруженных сочетаний компонентов авенина отсутствовала в каталоге генетической номенклатуры. Для идентификации новых блоков компонентов необходимы проведение гибридологического анализа и оценка характера наследования компонентов авенина. Однако нами были выделены предполагаемые блоки компонентов, каждому из которых присваивался номер, следующий за ранее описанными блоками в каталоге. Перед номером каждого из предполагаемых блоков добавляли отметку «new».

Для оценки генетического разнообразия в разные промежутки времени нами была рассчитана частота встречаемости аллелей авенин-кодирующих локусов (табл. 3).

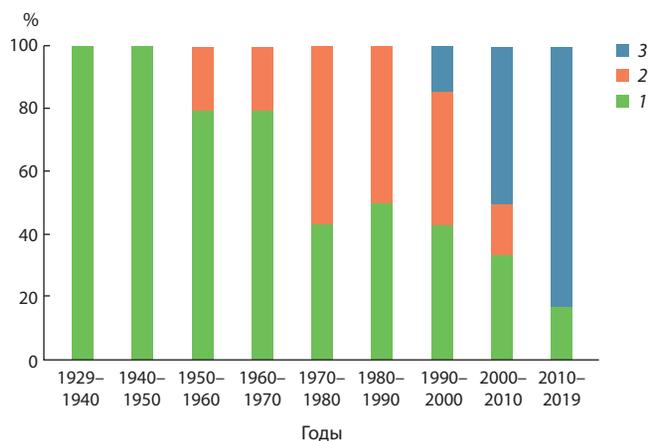
В разных группах сортов преобладают разные аллели. По локусу *Avn A* до 1950 г. встречались только аллели 2 и *new9*. Но частота их встречаемости начала снижаться с появлением в посевах области сортов отечественной, а затем и местной селекции (рис. 1). Аллели 1, 5 и *new12* были характерны для сортов, возделываемых в период

**Таблица 2.** Аллели авенин-кодирующих локусов сортов овса посевного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области (1929–2019 гг.)

Сорт	Кол-во биотипов	Аллели авенин-кодирующего локуса		
		<i>Avn A</i>	<i>Avn B</i>	<i>Avn C</i>
Победа	2	2 + <i>new9</i>	1	<i>new8</i>
Золотой дождь	2	2	1	2 + <i>new8</i>
Орел	2	<i>new9</i>	1	2 + <i>new8</i>
Ударник 883	1	<i>new11</i>	<i>new9</i>	3
Нидар	1	2	1	2
Северянин	2	<i>new11</i> + <i>new12</i>	<i>new9</i> + <i>new10</i>	3
Скороспелый	1	<i>new12</i>	<i>new10</i>	3
Нарымский 943	2	5 + 2	1 + 4	1 + 2
Таежник	2	2 + 1	<i>new8</i>	2
Астор	1	2	4	2
Сельма	1	<i>new9</i>	1	3
Перона	1	4	4	2
Мегион	2	2 + <i>new11</i>	<i>new6</i>	5
Новосибирский 88	1	2	4	2
Тюменский голозерный	1	2	<i>new6</i>	3
Талисман	1	4	4	2
Отрада	2	<i>new10</i> + 4	4	1
Фома	1	4	<i>new7</i>	1

**Таблица 3.** Частота встречаемости аллелей авенин-кодирующих локусов сортов овса посевного, %

Локус	Аллель	Годы									
		1929–1930	1940–1950	1950–1960	1960–1970	1970–1980	1980–1990	1990–2000	2000–2010	2010–2019	
<i>Avn A</i>	1	0	0	0	0	8.3	12.5	10.0	12.5	0	
	2	60.0	60.0	50.0	44.4	41.7	37.5	50.0	50.0	25.0	
	4	0	0	0	0	0	12.5	10.0	25.0	50.0	
	5	0	0	0	0	8.3	12.5	10.0	0	0	
	<i>new9</i>	40.0	40.0	37.5	33.3	16.7	12.5	10.0	0	0	
	<i>new10</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	12.5	
	<i>new11</i>	0	0	12.5	11.1	8.3	0	10.0	12.5	12.5	
	<i>new12</i>	0	0	0	11.1	16.7	12.5	0	0	0	
<i>Avn B</i>	1	100.0	100.0	87.5	77.8	41.7	25.0	20.0	0	0	
	4	0	0	0	0	16.7	37.5	40.0	37.5	50.0	
	<i>new6</i>	0	0	0	0	0	0	20.0	37.5	37.5	
	<i>new7</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	12.5	
	<i>new8</i>	0	0	0	0	16.7	25.0	20.0	25.0	0	
	<i>new9</i>	0	0	12.5	11.1	8.3	0	0	0	0	
	<i>new10</i>	0	0	0	11.1	16.7	12.5	0	0	0	
<i>Avn C</i>	1	0	0	0	0	8.3	12.5	10	0	37.5	
	2	33.3	33.3	37.5	33.3	50.0	62.5	60.0	62.5	25.0	
	3	0	0	12.5	22.2	25.0	25.0	10.0	12.5	12.5	
	5	0	0	0	0	0	0	20.0	25.0	25.0	
	<i>new8</i>	66.7	66.7	50.0	44.4	16.7	0	0	0	0	



**Рис. 1.** Динамика районированного сортимента овса посевного в Тюменской области (1929–2019 гг.).

Сорта: 1 – зарубежной селекции; 2 – отечественной селекции; 3 – местных селекционных учреждений.

с 1960 по 2010 гг. и в настоящее время уже не встречаются; максимально распространен аллель 4 (50.0 %), на долю аллеля 2 приходится 25.0 %; *new11* и *new12* – по 12.5 %.

В локусе *Avn B* современных сортов овса преобладают аллели 4 (50.0 %) и *new6* (37.5 %); с частотой 12.5 % встречается аллель *new7*. Полностью элиминированы аллели 1, *new8*, *new9* и *new10*, характерные для сортов зарубежной и отечественной селекции, но не обнаруженные нами у сортов местной селекции.

Схожая ситуация отмечается и для локуса *Avn C* – аллель *new8*, встречавшийся с частотой 66.7 % в 1929–1950 гг., к настоящему времени замещен аллелями 1 (37.5 %), 5 (25.0 %) и 3 (12.5 %). Необходимо обратить внимание на аллель 2, присутствие которого в сортах наблюдается во все периоды возделывания, начиная с 1929 г. и до сегодняшнего дня. Частота встречаемости этого аллеля

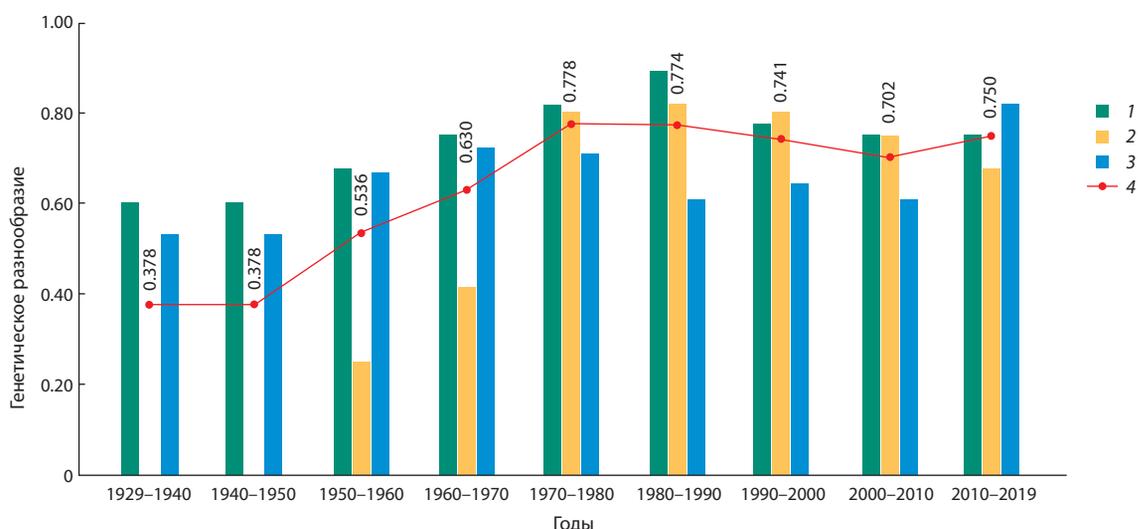
составляла от 25.0 до 62.5 %. В настоящее время наличием этого аллеля характеризуются 25.0 % сортов. Такая же особенность отмечена для аллеля 2 локуса *Avn A*.

Величина генетического разнообразия, рассчитанная на основе данных о частоте встречаемости аллелей, также изменялась с течением времени (рис. 2).

Минимальным этот показатель был в период до 1950 г. (0.38), когда в регионе возделывали лишь три сорта овса: Победа, Золотой дождь и Орел. В дальнейшем с появлением в посевах области новых сортов величина генетического разнообразия увеличивалась, достигая своего максимума в период с 1970 до 1980 г. (0.78). В этот промежуток времени в регионе проводили активную сорто-смену – были сняты с районирования сорта Победа, Ударник 883 и Нидар, а на смену им пришли несущие новые аллели авенин-кодирующих локусов сорта Скороспелый, Нарымский 943, Таежник и Астор. Период 1970–1980 гг. характеризовался самым большим разнообразием аллельных вариантов в сортах – по трем локусам *Avn* встречалось 15 аллелей (см. табл. 3). В процессе замены иностранных сортов отечественными показатель генетического разнообразия снизился до 0.70 к 2010 г. К понижению разнообразия привело исключение из районирования большого количества сортов, несущих аллели, не встречающиеся в сортах местной селекции. Однако к настоящему времени отмечается повышение среднего генного разнообразия до 0.75.

## Обсуждение

В результате проведенного нами анализа с использованием множественных аллелей авенин-кодирующих локусов описаны генетические формулы для 18 сортов овса посевного, включенных в государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области. Установлено, что гетерогенность сортов составляет 44.4 %. Наличие нескольких биотипов повышает адаптивный потенциал сорта (Metakovsky, 1990; Новосельская-Драгович и др., 2013), что крайне важно в природно-климатических усло-



**Рис. 2.** Генетическое разнообразие сортов овса по авенин-кодирующим локусам.

Локусы: 1 – *Avn A*; 2 – *Avn B*; 3 – *Avn C*; 4 – среднее генное разнообразие.

виях Тюменской области, являющейся зоной рискованного земледелия.

У части сортов были обнаружены одинаковые спектры проламина. Так, первый и второй биотипы сорта Золотой дождь идентичны биотипам сортов Победа (первый биотип) (*2.1.new8*) и Нидар (*2.1.2*) соответственно. Второй биотип сорта Победа совпал со вторым биотипом сорта Орел (*new9.1.new8*). Первый и второй биотипы сорта Северянин совпадают с сортами Ударник (*new11.new9.3*) и Скороспелый (*new12.new10.3*). Одинаковые типы спектров характерны также для второго биотипа сорта Нарымский 943 и сортов Астор и Новосибирский 88 (*2.4.2*); совпадают спектры сортов Перона и Талисман (*4.4.2*). Всего в результате анализа установлено, что сортоспецифичны только 10 (38.5 %) из 26 исследованных генотипов. Это достаточно низкий показатель.

Идентичность аллелей проламин-кодирующих локусов у сортов связывают с вовлечением в селекционные программы одних и тех же генотипов (Portyanko et al., 1998; Мельникова и др., 2010; Новосельская-Драгович и др., 2013). Так, например, сорта Победа и Золотой дождь выведены методом отбора из одного сорта овса – Milton (=Propsteier), от него же произошел и сорт Орел. Старый сорт овса Milton появился в северной части Германии и был широко распространен на севере Европы (Portyanko et al., 1998). По-видимому, он обладал выдающимися хозяйственными признаками, что привело к частому включению его в селекционный процесс. Это нашло свое отражение в совпадающем наборе аллелей авенин-кодирующих локусов у его потомков. Наличие сортов с совпадающими генетическими формулами проламинов снижает эффективность использования метода электрофореза для их дифференциации. Ряд исследователей в своих работах пришли к выводу, что использование авенин-кодирующих локусов как единственной маркерной системы для различения большого количества сортов овса является недостаточным, так как аллельное разнообразие локусов проламина овса характеризуется как низкое по сравнению таковыми у пшеницы, ячменя и ржи (Cliff, Cooke, 1984; Souza, Sorrels, 1990; Portyanko et al., 1998). В таких случаях возникает необходимость в дополнительном использовании других маркерных систем (Wight et al., 2010). Однако следует отметить, что современные сорта овса, созданные НИИСХ Северного Зауралья, обладают индивидуальным аллельным составом авенин-кодирующих локусов, что позволяет с высокой точностью дифференцировать их генотипы.

Анализ частот встречаемости аллелей авенин-кодирующих локусов по всем трем локусам позволил отметить связь между частотой встречаемости аллелей и набором возделываемых сортов, особенно их происхождением. В процессе сортосмены совершалось постепенное замещение аллелей, характерных для сортов зарубежной селекции, на аллели, присутствующие в отечественных сортах, а затем и местной селекции. Подобная замена одних аллелей на другие в ходе селекционной работы отмечена многими исследователями при изучении проламин-кодирующих локусов пшеницы и ячменя (Новосельская-Драгович и др., 2007; Лялина и др., 2016). На большом количестве примеров доказан адаптивный ха-

рактер полиморфизма проламинов. Их связь с адаптивными генными комплексами позволяет, основываясь на спектрах запасных белков, выделять генотипы, наиболее приспособленные к конкретным природно-климатическим условиям. А.Ю. Новосельская-Драгович с коллегами (2013) отмечали, что генетические отличия сортов разного географического происхождения определяются действием естественного отбора. При этом причиной достаточно быстрой замены «старых» аллелей «новыми» выступают направленные процессы, связанные с новыми направлениями в селекции и привлечением генетически отличающегося исходного материала (Новосельская-Драгович и др., 2007). Полученные нами данные о частоте встречаемости аллелей авенин-кодирующих локусов хорошо согласуются с этим утверждением.

С началом селекционной работы по овсу в Тюменской области появились сорта, обладающие набором хозяйственно ценных и адаптивно значимых признаков. Это привело к повышению частоты встречаемости определенных аллелей авенин-кодирующих локусов, которые можно считать маркерами таких генотипов или признаков, и в то же время вызвало снижение частоты или даже полное исчезновение аллелей, характерных для инорайонных сортов. Аллели *A2* и *C2*, встречающиеся во всех временных группах сортов, вероятно, маркируют высококонкурентные ассоциации генов, дающие их носителям важные преимущества в природно-климатических условиях рассматриваемого региона.

Контроль изменения величины генетического разнообразия сортов во времени позволяет судить о наличии или отсутствии генетической эрозии. В работах, посвященных оценке генетического разнообразия в сортах других сельскохозяйственных культур, его значения составляли 0.62–0.76 для сортов мягкой пшеницы, созданных в Сербии и Италии (Новосельская-Драгович и др., 2007); 0.5–0.6 – у сортов мягкой пшеницы украинской селекции (Заика и др., 2014); 0.42–0.64 – у групп сортов твердой пшеницы с происхождением из разных стран мира (Кудрявцев и др., 2014). При этом отмечается снижение величины этого показателя в современных сортах (Кудрявцев и др., 2014; Лялина и др., 2016).

Выявленные в результате нашей работы высокие значения генетического разнообразия и увеличение с 2000 г. этого показателя свидетельствуют об отсутствии генетической эрозии. Необходимо отметить, что в разные периоды времени вклад отдельных авенин-кодирующих локусов в величину среднего генного разнообразия в сортах овса в области был неодинаков. Если в период с 1970 до 2010 г. большую роль в формировании генетического разнообразия играли локусы *Avn A* и *Avn B*, то в настоящее время максимальное генетическое разнообразие отмечается по локусу *Avn C*. По нашему мнению, это свидетельствует о том, что аллели этого локуса могут иметь важное значение как маркеры адаптивно значимых признаков.

## Заключение

Частота встречаемости аллелей авенин-кодирующих локусов в сортах овса посевного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области с 1929 до 2019 г. изменялась с течением

времени. На смену аллелям, характерным для сортов зарубежной селекции, пришли «новые», специфичные для сортов местной селекции: *Avn A4* (50.0 %), *A2* (25.0 %), *Avn B4* (50.0 %), *Bnew6* (37.5 %), *Avn C1* (37.5 %), *C2* и *C5* (25.0 %). Эти аллели имеют большую ценность как маркеры хозяйственно ценных и адаптивно значимых для данного региона признаков.

Современные районированные сорта овса характеризуются высоким генетическим разнообразием (0.75), что связано с использованием в селекционном процессе разнородного исходного материала. Это позволяет получать сорта, обладающие высоким адаптивным потенциалом в природно-климатических условиях Западной Сибири.

Высокое значение генетического разнообразия в современных сортах селекции НИИСХ Северного Зауралья, а также увеличение этого показателя на протяжении последних 20 лет свидетельствуют о грамотно организованной и эффективной селекционной работе с этой культурой в Тюменской области.

## Список литературы / References

Афанасенко О.С., Новожилов К.В. Проблемы использования генетических ресурсов устойчивости растений к болезням. Экологическая генетика. 2009;7(2):38-43.  
[Afanasenko O.S., Novozhilov K.V. Problems of rational use of genetic resources of plant resistance to diseases. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2009;7(2):38-43. (in Russian)]

Гончаренко А.А. Экологическая устойчивость сортов зерновых культур и задачи селекции. Зерновое хозяйство России. 2016;3:31-37.  
[Goncharenko A.A. Ecological stability of grain crop varieties and tasks of breeding. *Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2016;3:31-37. (in Russian)]

Заика Е.В., Козуб Н.А., Созинов И.А., Созинов А.А., Стариченко В.Н. Анализ генотипов сортов озимой мягкой пшеницы НИЦ «Институт земледелия НААН» по аллелям локусов запасных белков. Вестн. БГСХА. 2014;4:53-57.  
[Zayka E.V., Kozub N.A., Sozinov I.A., Sozinov A.A., Starichenko V.N. Analysis of genotypes of winter soft wheat varieties of the Institute of Farming of the National Academy of Agricultural Science according to alleles of storage protein loci. *Vestnik Belorusskoy Gosudarstvennoy Selskohozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Belarussian State Agricultural Academy*. 2014;4:53-57. (in Russian)]

Зобова Н.В., Сурин Н.А., Герасимов С.А., Чуслин А.А., Онуфриенко Т.В. Спектры проламинов в агроэкологической оценке коллекционного материала ячменя. Достижения науки и техники АПК. 2018;32(5):45-47. DOI 10.24411/0235-2451-2018-10511.  
[Zobova N.V., Surin N.A., Gerasimov S.A., Chuslin A.A., Onufrienok T.V. Spectra of prolamines in agroecological evaluation of the collection barley. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2018;32(5):45-47. DOI 10.24411/0235-2451-2018-10511. (in Russian)]

Конярев А.В., Конярев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства. Цитология и генетика. 2000;34(2):91-104.  
[Konarev A.V., Konarev V.G., Gubareva N.K., Peneva T.I. Seed proteins as markers in solving problems of plant genetic resources, breeding, and seed production. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 2000;34(2):91-104. (in Russian)]

Кудрявцев А.М., Дедова Л.В., Мельник В.А., Шишкина А.А., Упельник В.П., Новосельская-Драгович А.Ю. Генетическое разнообразие современных российских сортов яровой и озимой

твердой пшеницы по глиадин-кодирующим локусам. *Генетика*. 2014;50(5):554-559. DOI 10.7868/S0016675814050099.  
[Kudryavtsev A.M., Dedova L.V., Melnik V.A., Shishkina A.A., Upelniek V.P., Novoselskaya-Dragovich A.Yu. Genetic diversity of modern Russian durum wheat cultivars at the gliadin-coding loci. *Russ. J. Genet.* 2014;50(5):483-48. DOI 10.1134/S1022795414050093.]

Лоскутов И.Г. Овес (*Avena L.*). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. СПб., 2007.  
[Loscutov I.G. Oat (*Avena L.*). Distribution, Taxonomy, Evolution and Breeding Value. Saint-Petersburg, 2007. (in Russian)]

Любимова А.В., Еремин Д.И. Особенности компонентного состава авенинов овса, возделываемого в Западной Сибири. Тр. по прикл. бот., ген. и сел. 2018;179(2):85-95. DOI 10.30901/2227-8834-2018-2-85-95.  
[Lyubimova A.V., Eremin D.I. Peculiarities of the avenin component composition in oats cultivated in Western Siberia. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2018;179(2):85-95. DOI 10.30901/2227-8834-2018-2-85-95. (in Russian)]

Лялина Е.В., Болдырев С.В., Поморцев А.А. Современное состояние генетического разнообразия ярового ячменя (*Hordeum vulgare L.*) в России по аллелям гордеинкодирующих локусов. *Генетика*. 2016;52(6):650-663. DOI 10.7868/S0016675816060072.  
[Lyalina E.V., Boldyrev S.V., Pomortsev A.A. Current state of the genetic polymorphism in spring barley (*Hordeum vulgare L.*) from Russia assessed by the alleles of hordein-coding loci. *Russ. J. Genet.* 2016;52(6):565-577. DOI 10.1134/S1022795416060077.]

Мельникова Н.В., Митрофанова О.П., Ляпунова О.А., Кудрявцев А.М. Мировое разнообразие твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) по аллелям глиадинкодирующих локусов. *Генетика*. 2010;46(1):51-57.  
[Melnikova N.V., Kudryavtsev A.M., Mitrofanova O.P., Liapunova O.A. Global diversity of durum wheat *Triticum durum* Desf. for alleles of gliadin-coding loci. *Russ. J. Genet.* 2010;46(1):43-49. DOI 10.1134/S1022795410010072.]

Новосельская-Драгович А.Ю., Фисенко А.В., Имашева А.Г., Пухальский В.А. Сравнительный анализ динамики генетического разнообразия по глиадинкодирующим локусам среди сортов озимой мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.*, созданных за 40-летний период научной селекции в Сербии и Италии. *Генетика*. 2007;43(11):1478-1485.  
[Novoselskaya-Dragovich A.Yu., Fisenko A.V., Imasheva A.G., Pukhalskiy V.A. Comparative analysis of the genetic diversity dynamics at gliadin loci in the winter common wheat *Triticum aestivum L.* cultivars developed in Serbia and Italy over 40 years of scientific breeding. *Russ. J. Genet.* 2007;43(11):1236-1242. DOI 10.1134/S1022795407110051.]

Новосельская-Драгович А.Ю., Фисенко А.В., Пухальский В.А. Генетическая дифференциация сортов мягкой пшеницы с использованием множественных аллелей глиадинкодирующих локусов. *Генетика*. 2013;49(5):569-579. DOI 10.7868/S0016675813020082.  
[Novoselskaya-Dragovich A.Y., Fisenko A.V., Puhalskii V.A. Genetic differentiation of common wheat cultivars using multiple alleles of gliadin-coding loci. *Russ. J. Genet.* 2013;49(5):487-496. DOI 10.1134/S1022795413020087.]

Портянок В.А., Поморцев А.А., Калашник Н.А., Богачков В.И., Созинов А.А. Генетический контроль авенинов и принципы их классификации. *Генетика*. 1987;23(5):845-853.  
[Portyanko V.A., Pomortsev A.A., Kalashnik N.A., Bogachkov V.I., Sozinov A.A. The genetic control of avenins and the principles of classification. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1987;23(5):845-853. (in Russian)]

Barsila S.R. The fodder oat (*Avena sativa*) mixed legume forage farming: Nutritional and ecological benefits. *J. Agric. Nat. Resour.* 2018;1(1):206-222. DOI 10.3126/janr.v1i1.22236.

- Che Y.H., Li L.H. Genetic diversity of prolamines in *Agropyron mongolicum* Keng indigenous to northern China. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2007;54(5):1145-1151. DOI 10.1007/s10722-006-9006-7.
- Cliff E.M., Cooke R.J. The characterisation of oat cultivars by electrophoresis. *J. Natl. Inst. Agric. Bot.* 1984;16:415-429.
- Lyubimova A., Eremin D. Variety check as an element of precision farming in the modern agriculture. In: International Scientific and Practical Conference "AgroSMART – Smart Solutions for Agriculture" (AgroSMART 2018). Vol. 151. DOI 10.2991/agrosmart-18.2018.91.
- Metakovsky E.V. The value of gliadin biotypes in commercial cultivars of wheat. In: Proc. 4<sup>th</sup> Int. Workshop on Gluten Proteins. Winnipeg, 1990.
- Montilla-Bascón G., Sánchez-Martín J., Rispail N., Rubiales D., Mur L., Langdon T., Griffiths I., Howarth C., Prats E. Genetic diversity and population structure among oat cultivars and landraces. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2013;31(1305):1305-1314. DOI 10.1007/s11105-013-0598-8.
- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.
- Portyanko V.A., Sharopova N.R., Sozinov A.A. Characterization of European oat germ plasm: allelic variation at complex avenin loci detected by acid polyacrylamide gel electrophoresis. *Euphytica.* 1998;102:15-27. DOI 10.1023/A:1018399919953.
- Scheben A., Batley J., Edwards D. Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15(2):149-161. DOI 10.1111/pbi.12645.
- Shavrukov Y. Comparison of SNP and CAPS markers application in genetic research in wheat and barley. *BMC Plant Biol.* 2016;16:11. DOI 10.1186/s12870-015-0689-9.
- Souza E., Sorrells M. Inheritance and distribution of variation at four avenin loci in North American oat germplasm. *Genome.* 1990;33:416-424. DOI 10.1139/g90-063.
- Utebayev M., Dashkevich S., Bome N., Bulatova K., Shavrukov Y. Genetic diversity of gliadin-coding alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) from Northern Kazakhstan. *PeerJ.* 2019;7:e7082. DOI 10.7717/peerj.7082.
- Wight C.P., Yan W., Fetch J.M., Deyl J., Tinker N.A. A set of new simple sequence repeat and avenin DNA markers suitable for mapping and fingerprinting studies in oat (*Avena* spp.). *Crop Sci.* 2010;50:1207-1218. DOI 10.2135/cropsci2009.09.0474.

---

#### ORCID ID

A.V. Lyubimova [orcid.org/0000-0002-1570-9595](https://orcid.org/0000-0002-1570-9595)

D.I. Eremin [orcid.org/0000-0002-3672-6060](https://orcid.org/0000-0002-3672-6060)

I.G. Loskutov [orcid.org/0000-0002-9250-7225](https://orcid.org/0000-0002-9250-7225)

**Благодарности.** Работа выполнена по госзаданию (приоритетное направление X.10.4, программа X.10.4.148, проект X.10.4.148).

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

Поступила в редакцию 23.06.2019. После доработки 30.10.2019. Принята к публикации 30.10.2019.

## Стеблевая ржавчина в Западной Сибири – расовый состав и эффективные гены устойчивости

В.П. Шаманин<sup>1</sup>, И.В. Потоцкая<sup>1</sup>, С.С. Шепелев<sup>1</sup>, В.Е. Пожерукова<sup>1</sup>, Е.А. Салина<sup>2</sup>, Е.С. Сколотнева<sup>2</sup>, Д. Ходсон<sup>3</sup>, М. Хоумвёллер<sup>4</sup>, М. Патпур<sup>4</sup>, А.И. Моргунов<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

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

<sup>3</sup> CIMMYT, Аддис-Абеба, Эфиопия

<sup>4</sup> Орхусский университет, Слагельсе, Дания

<sup>5</sup> Представительство CIMMYT, Анкара, Турция

✉ e-mail: vp.shamanin@omgau.org

**Аннотация.** Стеблевая ржавчина пшеницы в последние годы приобрела эпифитотийный характер, нанося значительный экономический ущерб производству зерна пшеницы в отдельных областях Западной Сибири. По результатам изучения расового состава популяций стеблевой ржавчины, собранной в 2016–2017 гг. в Омской области и Алтайском крае, выявлено 13 патотипов в омской популяции и 10 – в алтайской. Дифференцирование рас стеблевой ржавчины проводили с помощью тестерного набора 20 североамериканских линий-дифференциаторов *Sr* генов. Гены патотипов стеблевой ржавчины омской популяции авирулентны только к гену устойчивости *Sr31*, алтайские изоляты авирулентны, помимо *Sr31*, к генам *Sr24*, *Sr30*. Низкая частота вирулентности (10–25 %) патотипов омской популяции установлена для *Sr11*, *Sr24*, *Sr30*, а патотипов алтайской – для *Sr7b*, *Sr9b*, *Sr11*, *SrTnp*, которые неэффективны в Омской области. Полевая оценка устойчивости к стеблевой ржавчине проводилась в 2016–2018 гг. в Омской области в динамике в течение вегетационного периода у сортов и линий мягкой пшеницы из трех различных источников. Первый набор включал 58 линий и сортов яровой мягкой пшеницы с идентифицированными генами *Sr*, условно называемыми «питомник-ловушка» (ISRTN – international stem rust trap nursery). Второй набор включал линии яровой пшеницы из коллекции «Арсенал», отобранные ранее по комплексу хозяйственно ценных признаков и несущие пирамиду генов устойчивости к стеблевой ржавчине, в том числе интрогрессированных в геном мягкой пшеницы от дикорастущих видов злаков. Третий набор включал сорта яровой мягкой пшеницы, созданные в Омском аграрном университете по программе челночной селекции, имеющие в родословной синтетическую пшеницу с геномом *Ae. tauschii*. Установлено, что линии с генами *Sr31*, *Sr40*, *Sr2 complex* невосприимчивы к стеблевой ржавчине в условиях Западно-Сибирского региона. Выделены источники с эффективными генами *Sr*: из питомника ISRTN – (Benno)/6\*LMPG-6 DK42 (*Sr31*), Seri 82 (*Sr31*), Cham 10 (*Sr31*), Bacanora (*Sr31*), RL 6087 Dyck (*Sr40*), Amigo (*Sr24*, *1RS-Am*), Siouxland (*Sr24*, *Sr31*), Roughrider (*Sr6*, *Sr36*), Sisson (*Sr6*, *Sr31*, *Sr36*), Fleming (*Sr6*, *Sr24*, *Sr36*, *1RS-Am*), Pavon 76 (*Sr2 complex*); из коллекции «Арсенал» – № 1 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (96 × 113) × 145 × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*), № 14a F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr36*, *Sr44*), № 19 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (96 × 113) × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*), № 20 F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr44*); сорта Омского аграрного университета – Элемент 22 (*Sr31*, *Sr35*), Лютесценс 27-12, Лютесценс 87-12 (*Sr23*, *Sr36*), Лютесценс 70-13, Лютесценс 87-13 (*Sr23*, *Sr31*, *Sr36*). Выделенные источники рекомендуются для включения в селекционный процесс при создании сортов, устойчивых к стеблевой ржавчине в условиях региона.

Ключевые слова: мягкая пшеница; стеблевая ржавчина; патотип; эффективные гены устойчивости; селекция.

**Для цитирования:** Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Шепелев С.С., Пожерукова В.Е., Салина Е.А., Сколотнева Е.С., Ходсон Д., Хоумвёллер М., Патпур М., Моргунов А.И. Стеблевая ржавчина в Западной Сибири – расовый состав и эффективные гены устойчивости. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):131-138. DOI 10.18699/VJ20.608

## Stem rust in Western Siberia – race composition and effective resistance genes

V.P. Shamanin<sup>1</sup>, I.V. Pototskaya<sup>1</sup>, S.S. Shepelev<sup>1</sup>, V.E. Pozherukova<sup>1</sup>, E.A. Salina<sup>2</sup>, E.S. Skolotneva<sup>2</sup>, D. Hodson<sup>3</sup>, M. Hovmøller<sup>4</sup>, M. Patpour<sup>4</sup>, A.I. Morgounov<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

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

<sup>3</sup> CIMMYT, Addis Ababa, Ethiopia

<sup>4</sup> Aarhus University, Slagelse, Denmark

<sup>5</sup> CIMMYT-Turkey, Ankara, Turkey

✉ e-mail: vp.shamanin@omgau.org

**Abstract.** Stem rust in recent years has acquired an epiphytotic character, causing significant economic damage for wheat production in some parts of Western Siberia. On the basis of a race composition study of the stem rust populations collected in 2016–2017 in Omsk region and Altai Krai, 13 pathotypes in Omsk population and 10 in Altai population were iden-

tified. The race differentiation of stem rust using a tester set of 20 North American *Sr* genes differentiator lines was carried out. The genes of stem rust pathotypes of the Omsk population are avirulent only to the resistance gene *Sr31*, Altai isolates are avirulent not only to *Sr31*, but also to *Sr24*, and *Sr30*. A low frequency of virulence (10–25 %) of the Omsk population pathotypes was found for *Sr11*, *Sr24*, *Sr30*, and for Altai population – *Sr7b*, *Sr9b*, *Sr11*, *SrTmp*, which are ineffective in Omsk region. Field evaluations of resistance to stem rust were made in 2016–2018 in Omsk region in the varieties and spring wheat lines from three different sources. The first set included 58 lines and spring bread wheat varieties with identified *Sr* genes – the so-called trap nursery (ISRTN – International Stem Rust Trap Nursery). The second set included spring wheat lines from the Arsenal collection, that were previously selected according to a complex of economically valuable traits, with genes for resistance to stem rust, including genes introgressed into the common wheat genome from wild cereal species. The third set included spring bread wheat varieties created in the Omsk State Agrarian University within the framework of a shuttle breeding program, with a synthetic wheat with the *Ae. tauschii* genome in their pedigrees. It was established that the resistance genes *Sr31*, *Sr40*, *Sr2 complex* are effective against stem rust in the conditions of Western Siberia. The following sources with effective *Sr* genes were selected: (Benno)/6\*LMPG-6 DK42, Seri 82, Cham 10, Bacanora (*Sr31*), RL 6087 Dyck (*Sr40*), Amigo (*Sr24*, *1RS-Am*), Siouxland (*Sr24*, *Sr31*), Roughrider (*Sr6*, *Sr36*), Sisson (*Sr6*, *Sr31*, *Sr36*), and Fleming (*Sr6*, *Sr24*, *Sr36*, *1RS-Am*), Pavon 76 (*Sr2 complex*) from the ISRTN nursery; No. 1 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (96 × 113) × 145 × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*), No. 14a F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr36*, *Sr44*), No. 19 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (96 × 113) × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*), and No. 20 F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr44*) from the Arsenal collection; and the Omsk State Agrarian University varieties Element 22 (*Sr31*, *Sr35*), Lutescens 27-12, Lutescens 87-12 (*Sr23*, *Sr36*), Lutescens 70-13, and Lutescens 87-13 (*Sr23*, *Sr31*, *Sr36*). These sources are recommended for inclusion in the breeding process for developing stem rust resistant varieties in the region.

Key words: bread wheat; stem rust; pathotype; effective resistance genes; breeding.

**For citation:** Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Shepelev S.S., Pozherukova V.E., Salina E.A., Skolotneva E.S., Hodson D., Hovmøller M., Patpour M., Morgounov A.I. Stem rust in Western Siberia – race composition and effective resistance genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):131-138. DOI 10.18699/VJ20.608

## Введение

Стеблевая ржавчина пшеницы (возбудитель *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss.) длительное время имела слабое распространение на территории Западной Сибири и только в последние годы приобрела эпифитотийный характер, нанося значительный экономический ущерб производству зерна пшеницы в регионе. В первую очередь это связано с ухудшением фитосанитарной обстановки в регионе, обусловленным общей тенденцией потепления климата и возделыванием на основной площади посева пшеницы сортов, восприимчивых к стеблевой ржавчине (Шаманин и др., 2015, 2016). Вероятность заноса расы стеблевой ржавчины *Ug99* и появление новых биотипов этой расы, поражающих сорта с генами *Sr24* и *Sr36*, несут серьезную угрозу производству зерна пшеницы в Западно-Сибирском регионе, тогда как генетическое разнообразие возделываемых сортов пшеницы по устойчивости к патотипам расы *Ug99* весьма ограничено (Shamanin et al., 2016).

Повышение генетической устойчивости зернового агроценоза к патогенам может решаться посредством частой сортосмены, а также возделыванием в регионах и хозяйствах сортов с разным уровнем устойчивости к болезням и к разным расам. Эти приемы предназначены для сдерживания эволюции патогенов и появления новых вирулентных рас. Такие программы широко используются в странах Европы и Америки. Продолжительность возделывания сорта в передовых странах составляет 3–4 года, тогда как в России – 7–10 лет (Санин, 2016). В этой связи селекция, направленная на создание сортов яровой пшеницы, имеющих разнообразную генетическую основу по устойчивости к стеблевой ржавчине, весьма актуальна.

Начиная с 1950-х гг. многие интродуцированные в мягкую пшеницу гены устойчивости потеряли свою эффективность (Singh et al., 2008). Наиболее значимыми для

селекционной практики являются гены *Sr2*, *Sr23*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr31*, *Sr33*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr45*, *Sr50*, *SrTmp*, *Sr1RS<sup>Amigo</sup>* (Singh et al., 2015).

Интрогрессия генов устойчивости диких и культурных родичей позволяет расширить генетическое разнообразие сортов и обеспечить их более длительную защиту (Леонова и др., 2014). К настоящему времени идентифицировано около 86 генов *Sr*, из них 26 генов устойчивости к стеблевой ржавчине перенесены в мягкую пшеницу от других видов злаков (McIntosh et al., 2013). Так, *T. turgidum* послужил источником генов устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr2*, *Sr9d*, *Sr9e*, *Sr9g*, *Sr11*, *Sr12*, *Sr13*, *Sr14* и *Sr17*, из которых гены *Sr2*, *Sr13* и *Sr14* эффективны против расы *Ug99*; *T. monococcum* – источником генов *Sr21*, *Sr22* и *Sr35* (Singh et al., 2011).

Гены, обуславливающие устойчивость к стеблевой ржавчине, были интрогрессированы в генофонд пшеницы из генома различных видов *Aegilops* L.: *Ae. speltooides* – *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*; *Ae. comosa* – *Sr34*; *Ae. ventricosa* – *Sr38* (Schneider et al., 2008). От *Ae. tauschii* были привнесены гены *Sr33*, *Sr45*, *Sr46* (Kerber, Dyck, 1979). Путем прямой гибридизации *T. aestivum* и *Ae. tauschii* с последующим беккроссированием в геном мягкой пшеницы привнесены новые гены устойчивости *SrTA1662*, *SrTA1017* и *SrTA10187* (Olson et al., 2013), которые эффективны против расы *Ug99*. Продолжается поиск новых генов устойчивости в генофонде диких сородичей пшеницы; например, G. Yu с коллегами выявили два новых гена *Sr* у *Ae. sharonensis* (Yu et al., 2017).

Одной из задач программы по улучшению пшеницы в Казахстанско-Сибирской сети (КАСИБ) на основе метода члечной селекции под эгидой СИММУТ (Мексика) является расширение генетического полиморфизма создаваемых сортов, в том числе по устойчивости к вредоносным заболеваниям (Gomez-Becerra et al., 2006). Сорта члечной селекции, полученные с участием *Ae. tauschii*

и *T. dicoccum*, а также линии коллекции «Арсенал», имеющие в своей родословной генетический материал чужеродных видов, представляют интерес для селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине в регионе.

Цель исследований – анализ расового состава западносибирской популяции стеблевой ржавчины, оценка устойчивости линий и сортов яровой мягкой пшеницы с идентифицированными генами к локальной популяции и выявление источников с эффективными генами *Sr* для селекции в условиях Западно-Сибирского региона.

## Материалы и методы

Расовый состав популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранной с образцов в 2016–2017 гг. в Омской области (15 образцов питомника КАСИБ-16, Омский государственный аграрный университет (ГАУ)) и Алтайском крае (12 селекционных образцов, ФГБНУ «Алтайский аграрный научный центр»), был определен во Всемирном справочном центре ржавчины (Global Rust Reference Center, GRRC, Дания; <http://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/wheatrust>).

Выделение монопустульных изолятов проводили в соответствии с требованиями протоколов GRRC ([www.wheatrust.org](http://www.wheatrust.org)). Монопустульные изоляты были размножены для идентификации расы *Ug99* с помощью теста PCR-Stage 1. Всего выделено 19 монопустульных изолятов из омской популяции и 20 – из алтайской (табл. 1).

Дифференцирование рас стеблевой ржавчины проводили с помощью тестерного набора 20 североамериканских линий-дифференциаторов, содержащих *Sr* гены: *Sr5* (ISr5-Ra), *Sr21* (CnS *Triticum monoc. Deriv.*), *Sr9e* (Vernstein), *Sr7b* (ISr7b-Ra), *Sr11* (ISr11-Ra), *Sr6* (ISr6a-Ra), *Sr8a* (ISr8a-Ra), *Sr9g* (CnSr9g), *Sr36* (W2691SrTt-1), *Sr9b* (W2691Sr9b), *Sr30* (BtSr30Wst), *Sr17+13* (Combination VII), *Sr9a* (ISr9a-Ra), *Sr9d* (ISr9d-Ra), *Sr10* (W2691Sr10), *SrTmp* (CnsSrTmp), *Sr24* (LcSr24Ag), *Sr31* (Benno Sr31/6\*LMPG), *Sr38* (VPM-1), *SrMcN* (McNair 701). Инфицированные растения оценивали через 14–16 дней после инокуляции с использованием модифицированной шкалы E.C. Stakman (Roelfs, Martens, 1988). Фенотипы вирулентности классифицировали по североамериканской системе (Jin et al., 2008).

На опытном поле Омского ГАУ сорта и линии мягкой пшеницы из трех различных источников в течение вегетационного периода оценивали (в динамике, не менее 4–5 учетов) на восприимчивость к стеблевой ржавчине по шкалам, рекомендуемым СИММУТ (Койшыбаев и др., 2014). Учитывали тип реакции по шкале E.V. Mains, H.S. Jackson (1926) и степень поражения по модифицированной шкале R.F. Peterson (Peterson et al., 1948): 0 – иммунитет, уредопустулы не образуются; R (Resistance – высокая устойчивость), 1 балл, степень поражения 5–10 %; MR (Moderately resistance – средняя устойчивость), 2 балла, степень поражения 10–25 %; M (гетерогенный тип), пустулы различного размера, окруженные хлоротическими и некротическими пятнами или без них; MS (Moderately susceptible – средняя восприимчивость), 3 балла, степень поражения 40–50 %; S (Susceptible – восприимчивость), 4 балла, степень поражения более 60 %.

В 2016–2018 гг. проведена оценка степени устойчивости (восприимчивости) к омской популяции стеблевой ржавчины 58 линий и сортов с идентифицированными генами *Sr*. Эти линии и сорта были переданы из Международного центра по улучшению пшеницы и кукурузы СИММУТ (Мексика) и получили условное название «питомник-ловушка» (ISRTN – International Stem Rust Trap Nursery) (табл. 2). Посев сортов и линий питомника-ловушки был осуществлен вручную. Каждый образец высевали по два рядка длиной 1 м, через каждые 10 номеров размещали стандарт устойчивости к стеблевой ржавчине – сорт Элемент 22 и стандарт восприимчивости – Черныя 13.

В 2015 г. из коллекции «Арсенал», любезно предоставленной для исследований И.Ф. Лапочкиной, по комплексу хозяйственно ценных признаков было выделено 9 линий яровой пшеницы, несущих пирамиду генов устойчивости к стеблевой ржавчине (Lapochkina et al., 2017): № 1 [BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (96 × 113) × 145 × 113]; № 13, 14a [F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145]; № 16, 17, 17a [BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> (96 × 113) × 113]; № 19 [BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (96 × 113) × 113]; № 20, 22a [F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145]. В течение трех лет (2016–2018) эти линии изучали в селекционном питомнике второго года. Площадь делянки 2 м<sup>2</sup>, посев сеялкой ССФК-7 на глубину 5 см. Способ посева – рядовой, норма высева – 500 зерен на 1 м<sup>2</sup>.

**Таблица 1.** Фенотипический состав и вирулентность патотипов *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* в Омской области и Алтайском крае (2016–2017 гг.)

Показатель	Опытное поле Омского ГАУ, 2016 г.	Опытное поле Алтайского аграрного НЦ, 2017 г.
Количество образцов	15	12
Количество монопустульных изолятов	19	20
Количество патотипов	13	10
Индексы патотипов	RRGTF, TKRPF, RKRSP, RFRSF, THRTP, RHRTF, TKRTE, QHHSF, RCRTF, SHHSF, RCRTF, QFRSF, RFRTF	SFRSF, NFMSF, QKCSF, MPMT, LHCSF, LFRSF, LKCSF, LKMSF, LTMSF, QHMSF
Высокая частота вирулентности, ≥25 %	<i>Sr5</i> , <i>Sr6</i> , <i>Sr7b</i> , <i>Sr8a</i> , <i>Sr9a</i> , <i>Sr9b</i> , <i>Sr9d</i> , <i>Sr9e</i> , <i>Sr9g</i> , <i>Sr10</i> , <i>Sr17</i> , <i>Sr21</i> , <i>Sr36</i> , <i>Sr38</i> , <i>SrMcN</i> , <i>SrTmp</i>	<i>Sr5</i> , <i>Sr8a</i> , <i>Sr9a</i> , <i>Sr9d</i> , <i>Sr9e</i> , <i>Sr9g</i> , <i>Sr10</i> , <i>Sr17</i> , <i>Sr21</i> , <i>Sr36</i> , <i>Sr38</i> , <i>SrMcN</i>
Низкая частота вирулентности, 10–25 %	<i>Sr11</i> , <i>Sr24</i> , <i>Sr30</i>	<i>Sr7b</i> , <i>Sr9b</i> , <i>Sr11</i> , <i>SrTmp</i>
Авирулентность	<i>Sr31</i>	<i>Sr24</i> , <i>Sr30</i> , <i>Sr31</i>

**Таблица 2.** Результаты оценки линий и сортов с идентифицированными генами *Sr* по устойчивости/восприимчивости к стеблевой ржавчине, опытное поле Омского ГАУ, 2016–2018 гг.

№ п/п	Сорт, линия	Гены	Поражение стеблевой ржавчиной, %/тип		
			2016 г.	2017 г.	2018 г.
1	Элемент 22	Стандарт устойчивости	R	5MR	5MR
2	Чернява 13	Стандарт восприимчивости	80S	60S	80S
3	Мороссо		40S	45S	40S
4	ISr5-Ra CI 14159	<i>Sr5</i>	70S	50S	40S
5	Na 101/6*Marquis	<i>Sr7a</i>	25S	40MS	30S
6	ISr7b-Ra CI 14165	<i>Sr7b</i>	–	50S	30S
7	CI 14167/9*LMPG-6 DK04	<i>Sr8a</i>	30MS	5M	25MS
8	Barleta Benvenuto (CI 14196)	<i>Sr8b</i>	–	50S	30S
9	ISr9a-Ra CI 14169	<i>Sr9a</i>	10MS	65S	40S
10	Prelude*4/2/Marquis*6/Kenya 117A	<i>Sr9b</i>	30M	10M	20MS
11	Vernstein PI 442914	<i>Sr9e</i>	20S	10M	20MS
12	Chinese Spring*7/Marquis 2B	<i>Sr9g</i>	20S	10M	40S
13	W2691Sr10 CI 17388	<i>Sr10</i>	10S	40MS	60S
14	Lee/6*LMPG-6 DK37	<i>Sr11</i>	10M	5M	20MS
15	Chinese Spring*5/Thatcher 3B	<i>Sr12</i>	10M	5M	40S
16	Preude*4/2/Marquis*6/Khapstein	<i>Sr13</i>	5M	5M	10M
17	W2691*2/Khapstein	<i>Sr14</i>	5M	5M	30MS
18	Preiude*2/Norka	<i>Sr15</i>	30MS	10M	30MS
19	Thatcher/CS (CI14173)	<i>Sr16</i>	20S	5M	30S
20	Prelude/8*Marquis*2/2/Esp518/9	<i>Sr17</i>	60S	60S	50S
21	Little Club/Sr18Mq Marquis "A"	<i>Sr18</i>	20S	70S	40S
22	94A 236-1 Marquis "B"	<i>Sr19</i>	5MR	20MS	10M
23	94A 237-1 Marquis "C"	<i>Sr20</i>	40S	30S	5MS
24	T. monococcum/8*LMPG-6 DK13	<i>Sr21</i>	10M	10MR	20M
25	Einkorn		10MR	3MR	10M
26	Mq*6//Stewart*3/RL 5244	<i>Sr22</i>	20M	40M	50S
27	Exchange CI 12635	<i>Sr23</i>	10MR	5MR	10MR
28	LcSr24Ag + BTSr24Ag	<i>Sr24</i>	10MR	10MR	10M
29	Agatha (CI 14048)/9*LMPG-6 DK16	<i>Sr25</i>	25MR	15M	10M
30	Eagle Sr26 McIntosh	<i>Sr26</i>	15MR	3MR	10M
31	WRT 238-5 (1984) Roelfs	<i>Sr27</i>	–	20MS	10M
32	Kota RL471	<i>Sr28</i>	60S	15MS	10M
33	Prelude/8*Marquis/2/Etiolo de Choisy	<i>Sr29</i>	25M	10M	15S
34	Selection from Webster F3:F4#6	<i>Sr30</i>	5M	10M	10M
35	Sr31 (Benno)/6*LMPG-6 DK42	<i>Sr31</i>	5MR	10MR	10MR
36	Seri 82		R	R	5MR
37	PBW343=Attila with Sr31		5MR	5MR	10MR
38	Cham 10=Kauz//Kauz/star		R	R	5MR
39	Bacanora=Kauz's		R	R	5MR
40	ER5155 S-203 (1995)Roelfs	<i>Sr32</i>	–	10MR	10M
41	RL 5405 (1192) Kerber	<i>Sr33</i>	15MR	10MR	30S
42	RL 6098 (1997) Dyck	<i>Sr34</i>	–	40MS	50S
43	RL 6099 (1995) Dyck	<i>Sr35</i>	20M	40MS	30S
44	W2691SrTt-1 CI 17385	<i>Sr36</i>	–	10M	10M
45	Prelude*4/Line W (W3563)	<i>Sr37</i>	10M	5M	R
46	Trident Sr38	<i>Sr38</i>	5MR	R	R
47	Trident		5MR	R	R
48	RL 5711 Kerber	<i>Sr39</i>	10MR	5M	10M
49	RL 6087 Dyck	<i>Sr40</i>	5MR	10MR	10M
50	Amigo	<i>Sr24 + 1RS-Am</i>	R	R	R
51	Siouxland	<i>Sr24 + Sr31</i>	R	R	R
52	Roughrider	<i>Sr6 + Sr36</i>	R	5MR	R
53	Sisson	<i>Sr6 + Sr31 + Sr36</i>	R	R	R
54	Bt/Wld	<i>SrWld-1</i>	15MR	20M	10M
55	Fleming	<i>Sr6 + Sr24 + Sr36 + 1RS-Am</i>	10MR	5MR	10MR
56	Chris	<i>Sr7a + Sr12 + Sr6</i>	–	10MR	30S
57	CsSrTmp	<i>SrTmp</i>	–	40MS	30S
58	Pavon 76	<i>Sr2 complex</i>	R	R	5M

В питомнике конкурсного сортоиспытания проведена оценка 9 сортов яровой мягкой пшеницы, созданных в Омском ГАУ по программе члночной селекции, имеющих в родословной синтетическую пшеницу с геном *Ae. tauschii*: Лютесценс 24-12 (Касибовская), Лютесценс 27-12, Лютесценс 87-12, Лютесценс 70-13, Лютесценс 87-13, Лютесценс 88-13 (Силантий), Лютесценс 124-13, Лютесценс 53-15, Лютесценс 128-15. Площадь делянки 25 м<sup>2</sup>, повторность четырехкратная, предшественник – чистый пар. Стандарты – Памяти Азиева (среднеранний), Дуэт (среднеспелый) и Элемент 22 (среднепоздний).

Гены *Sr* в сортах Омской селекции были идентифицированы с использованием молекулярных маркеров: Xsts638 – *Sr15*, Xcfa2123 – *Sr22*, Xgwm210 – *Sr23*, Xscs73 – *Sr24*, Xwmc221 – *Sr25*, BE518379 – *Sr26*, Xscm09 – *Sr31*, SCS421 – *Sr34*, Xcfa2170 – *Sr35*, Xstm773-2 – *Sr36*, Ventrup-LN2 – *Sr38*, Lr34plus – *Sr57*, согласно установленному протоколу (<http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/StemRust/index.htm>). В линиях и сортах яровой мягкой пшеницы, входящих в состав питомника-ловушки, и в коллекции «Арсенал» гены *Sr* определены ранее (McIntosh et al., 2013, 2017; Lapochkina et al., 2017).

В 2016 г. в Омской области погодные условия были относительно засушливыми, что способствовало умеренному развитию стеблевой ржавчины. В 2017 г. отмечено интенсивное развитие болезни, степень поражения восприимчивых образцов варьировала в пределах 20S–80S. В 2018 г. отмечено сильное поражение стеблевой ржавчиной, поскольку вегетационный период характеризовался более прохладной погодой и большим количеством осадков, степень поражения восприимчивых образцов составила 30S–80S.

## Результаты

Анализ расового состава популяций стеблевой ржавчины в Омской области и Алтайском крае показал, что в отличие от многих регионов мира, где стеблевая ржавчина десятилетиями является вредоносной болезнью, например Краснодарского края России (Аблова и др., 2016), в Западной Сибири за короткий период со времени ее появления в регионе отмечается существенное количество патотипов: в омской популяции – 13, в алтайской – 10 (см. табл. 1). Большинство патотипов, идентифицированных в популяции стеблевой ржавчины на территории Омской области и Алтайского края, по вирулентности не идентичны патотипам, обнаруженным в последние годы в Азии и Африке (<http://wheatrust.org/fileadmin/www>). Во всех изученных западносибирских популяциях не идентифицированы *Ug99* и сицилийская расы *P. graminis*. Гены патотипов стеблевой ржавчины омской популяции авирулентны только к гену *Sr31*, алтайские изоляты авирулентны к *Sr31*, *Sr24* и *Sr30*.

Низкая частота вирулентности (10–25 %) патотипов омской популяции установлена для генов *Sr11*, *Sr24*, *Sr30*, алтайской популяции – для *Sr7b*, *Sr9b*, *Sr11*, *SrTmp*, которые неэффективны в Омской области. Результаты лабораторной оценки вирулентности патотипов *P. graminis*, собранных в Омской области, подтверждаются полевыми исследованиями по оценке устойчивости/восприимчи-

вости к стеблевой ржавчине линий и сортов питомника-ловушки с идентифицированными генами *Sr* (см. табл. 2).

Генотипы с *Sr31*: *Sr31* (Benno)/6\*LMPG-6 DK42, Seri 82, PBW343=Attila with *Sr31*, Cham 10=Kauz//Kauz/star, Васапога=Kauz's' проявили высокую устойчивость к омской популяции стеблевой ржавчины во все годы исследования (2016–2018). Средней устойчивостью отличалась линия № 28 LcSr24Ag + BTrSr24Ag с геном *Sr24*. Следует отметить, что для некоторых *Sr* генов отмечен устойчивый тип реакции на стадии взрослых растений в условиях эпифитотии и восприимчивый – на ювенильной стадии в лабораторных условиях.

Например, сорт Trident (№ 46 и 47) с геном *Sr38* в полевых условиях имел высокую устойчивость (R–5MR), сорт Einkorn (№ 25) с геном *Sr21* и линия № 44 (W2691SrTt-1 CI 17385) с геном *Sr36* в полевых условиях имели среднюю устойчивость на уровне 10M, а в лабораторных условиях ювенильные растения с указанными генами отнесены к группе восприимчивых. Высокой устойчивостью к стеблевой ржавчине во все годы исследования отличались сорта питомника ISRTN с пирамидой генов: № 50 Amigo (*Sr24* + *IRS-Am*), № 51 Siouland (*Sr24* + *Sr31*), № 52 Roughrider (*Sr6* + *Sr36*), № 53 Sisson (*Sr6* + *Sr31* + *Sr36*), № 55 Fleming (*Sr6* + *Sr24* + *Sr36* + *IRS-Am*).

Результаты оценки устойчивости к стеблевой ржавчине линий из коллекции «Арсенал» и лучших сортов конкурсного сортоиспытания (КСИ), созданных по программе члночной селекции с использованием в гибридизации синтетической пшеницы, представлены в табл. 3.

Линии из коллекции «Арсенал» представляют большой интерес как источники для селекции на устойчивость к патогену, они являются носителями пирамиды генов *Sr2* (*T. turgidum*), *Sr36*, *Sr40* (*T. timopheevii*), *Sr44* (*Th. intermedium*). В родословной выделенных линий присутствует яровая линия пшеницы 13/00/i-4, у которой идентифицировано семь генов устойчивости к стеблевой ржавчине – *Sr2*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47*, *Sr15*, и озимая линия GT 96/90 с генами *Sr15*, *Sr24*, *Sr31*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr47* (Lapochkina et al., 2017).

У сортов селекции Омского ГАУ было идентифицировано три гена устойчивости к стеблевой ржавчине: *Sr23*, *Sr31*, *Sr36*. Пшенично-ржаная транслокация 1BL.1RS с геном *Sr31* выявлена у сорта Элемент 22, имеющего в родословной сорт Аврора (Shamanin et al., 2016). Сочетание эффективных генов устойчивости *Sr31* и *Sr35* обуславливает высокий уровень устойчивости к стеблевой ржавчине данного сорта. Элемент 22 – один из немногих сортов с групповой устойчивостью к стеблевой и бурой ржавчине; он включен в Государственный реестр селекционных достижений по Западно-Сибирскому региону и является стандартом для среднепоздней группы на государственных сортоучастках в Омской области.

Для селекции в регионе представляют интерес сорта Лютесценс 27-12, Лютесценс 70-13, Лютесценс 87-13, Лютесценс 88-13, которые были выделены из одной гибридной популяции (Lutescens 30-94\*2/3/*T. dicoccon* PI 94625/*Ae. squarrosa* (372)/3\*Pastor), созданной от скрещивания казахстанского ярового сорта Лютесценс 30-94 с линией СИММУТ, полученной гибридизацией синтетической пшеницы с сортом Pastor, и сорт Лютесценс 87-12 (Ка-

**Таблица 3.** Устойчивость к стеблевой ржавчине линий и лучших сортов яровой мягкой пшеницы КСИ, опытное поле Омского ГАУ, 2016–2018 гг.

Сорт, линия	%/тип			Гены устойчивости
	2016 г.	2017 г.	2018 г.	
Памяти Азиева, стандарт восприимчивости	80S	40S	70S	–
Элемент 22, стандарт устойчивости	R	5MR	5MR	<i>Sr31, Sr35</i>
Линии из коллекции «Арсенал»				
№ 1 BC <sub>1</sub> F <sub>2</sub> (96 × 113) × 145 × 113	R	R	10MR	<i>Sr2, Sr36, Sr44</i>
№ 14a F <sub>3</sub> (96 × 113) × 145	R	R	R	<i>Sr36, Sr44</i>
№ 19 BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub> (96 × 113) × 113	R	R	–	<i>Sr2, Sr36, Sr44</i>
№ 20 F <sub>3</sub> (96 × 113) × 145	R	R	5MR	<i>Sr2, Sr36, Sr40, Sr44</i>
Сорта Омского ГАУ				
Лютесценс 27-12	R	R	25MR	<i>Sr23, Sr36</i>
Лютесценс 87-12	R	R	40M	<i>Sr23, Sr36</i>
Лютесценс 70-13	5MR	R	5MR	<i>Sr23, Sr31, Sr36</i>
Лютесценс 87-13	5M	5MR	10MR	<i>Sr23, Sr31, Sr36</i>
Лютесценс 88-13	5MR	R	25MR	<i>Sr23</i>

zakhstanskaya 25/2\*Attila/3/*T. dicoccon* PI 94625/*Ae. squarrosa*). В сортах КСИ идентифицированы гены *Sr23*, *Sr31* и *Sr36* в различном сочетании.

### Обсуждение

В современных условиях стеблевая ржавчина представляет наибольшую опасность для зернового хозяйства Западной Сибири. В годы эпифитотий потери урожая пшеницы в регионе составляют около 2 млн т зерна. К сожалению, устойчивые к стеблевой ржавчине сорта, которые включены в Государственный реестр в последние годы, занимают не более 10–15 % в структуре посевов пшеницы в регионе. При оценке в 2015–2016 гг. 57 сортов яровой пшеницы, испытываемых на Москаленском ГСУ Омской области (южная лесостепь), устойчивый тип реакции (5–15MR) выявлен только у сортов Элемент 22 (*Sr31* + *Sr35*), Омская 37, Сигма, Уралосибирская (*Sr31*), Сигма 2 (*Sr31* + *Sr25*), тогда как остальные сорта поражались патогеном в средней и сильной степени, что подразумевает применение средств химической защиты посевов пшеницы в регионе (Larochkina et al., 2017). Ранее была проведена идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине с использованием молекулярных маркеров коллекции сортов, созданных селекционными учреждениями Западной Сибири, и показано, что в представленном материале с наиболее высокой частотой встречаются гены *Sr25*, *Sr31* и сочетание генов *Sr25* + *Sr31* (Shamanin et al., 2016). Высокая изменчивость расового состава популяций патогенов, что продемонстрировано в наших исследованиях, и однообразие генов устойчивости к стеблевой ржавчине у возделываемых сортов ставят под угрозу стабильность производства зерна в условиях Западной Сибири.

Стратегия селекции сортов должна решать задачу опережения развития болезни в регионе. Популяции *P. gra-*

*minis*, формирующиеся на производственных посевах пшеницы в различных областях региона, определяют необходимость ориентироваться на фитопатологические сводки по расовому составу популяций. В омской популяции *P. graminis* нет авирулентных клонов к гену *Sr24*, в Алтайском крае, напротив, не выделено вирулентных клонов к *Sr24*, который сохраняет свою эффективность и в Новосибирской области (Сколотнева и др., 2018). Результаты сравнения расового состава позволяют говорить об омской и алтайской субпопуляциях с независимыми источниками генетического разнообразия и зоной сопряжения. Путем сравнения расового состава образцов популяции из Омской, Новосибирской областей и Алтайского края выявлена сложная структура западносибирской популяции *P. graminis*. Предполагается существование двух субпопуляций: омской и алтайской, с независимыми источниками генетического разнообразия и зоной генотипического обмена на пшеничных посевах Новосибирской области (Сколотнева и др., 2020).

Анализ расового состава омской популяции стеблевой ржавчины показал, что спектр эффективных генов устойчивости в условиях Омской области сужается, что обусловлено потерей эффективности ряда генов к местной популяции *P. graminis*.

На основании оценки устойчивости к местной популяции стеблевой ржавчины выделены высокоустойчивые сорта и линии питомника ISRTN: Sr31 (Benno)/6\*LMPG-6 DK42, Seri 82, Cham 10, Bacanora (*Sr31*), RL 6087 Dyck (*Sr40*), Amigo (*Sr24, IRS-Am*), Siouxlant (*Sr24, Sr31*), Roughrider (*Sr6, Sr36*), Sisson (*Sr6, Sr31, Sr36*), Fleming (*Sr6, Sr24, Sr36, IRS-Am*), Pavon 76 (*Sr2 complex*). Выделенные сорта и линии целесообразно привлекать в селекционные программы в качестве источников устойчивости для создания сортов пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине. Эффективные гены устойчивости *Sr31*, *Sr40*,

*Sr2 complex* и их комбинации с неэффективными генами рекомендованы для использования в селекции с учетом постоянной ротации, подключения генов неспецифической устойчивости, а также возможности заноса инфекции с сопредельных территорий.

Ген возрастной устойчивости *Sr2*, широко привлекаемый в селекцию на устойчивость к вирулентным расам стеблевой ржавчины, распространен в коммерческих сортах в ряде стран мира, в частности в США, Австралии, Индии и Мексике. Данный ген практически отсутствует в реестровых сортах Российской Федерации, однако для эффективной защиты от стеблевой ржавчины рекомендуется его пирамидирование с другими генами устойчивости (Баранова и др., 2015).

Для создания сортов с длительной устойчивостью разработана стратегия объединения в одном генотипе генов, отвечающих за разный тип устойчивости. Пирамидирование генов ювенильной устойчивости (*Sr11*, *Sr24*, *Sr30* и *Sr31*) с геном возрастной устойчивости *Sr2*, обуславливающим замедленное развитие болезни (slow rusting), будет обеспечивать более продолжительную защиту посевов пшеницы от стеблевой ржавчины в Западной Сибири в условиях сложившейся фитосанитарной ситуации.

Линии из коллекции «Арсенал» – № 1 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (96 × 113) × 145 × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*); № 14a F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr36*, *Sr44*); № 19 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (96 × 113) × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*); № 20 F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr44*) – представляют собой перспективный исходный материал в селекции на создание сортов с длительной устойчивостью.

В гибридизацию целесообразно включать источники устойчивости к стеблевой ржавчине с минимальным числом негативных признаков, которые снижают их селекционную ценность. В этой связи устойчивые к стеблевой ржавчине сорта селекции Омского ГАУ с идентифицированными эффективными генами *Sr* Элемент 22 (*Sr31*, *Sr35*), Лютесценс 27-12, Лютесценс 87-12 (*Sr23*, *Sr36*), Лютесценс 70-13, Лютесценс 87-13 (*Sr23*, *Sr31*, *Sr36*), Лютесценс 88-13 (*Sr23*) являются ценным исходным материалом для селекции в регионе.

## Заключение

Таким образом, генетическая однотипность сортов яровой пшеницы, возделываемых на больших площадях в Западной Сибири, по генам устойчивости к стеблевой ржавчине и преобладание сортов с генами расоспецифической устойчивости способствуют распространению и высокой изменчивости патогена. Линии коллекции «Арсенал» – № 1 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (96 × 113) × 145 × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*), № 14a F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr36*, *Sr44*), № 19 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (96 × 113) × 113 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr44*), № 20 F<sub>3</sub> (96 × 113) × 145 (*Sr2*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr44*), сорта Омского аграрного университета – Элемент 22 (*Sr31*, *Sr35*), Лютесценс 27-12, Лютесценс 87-12 (*Sr23*, *Sr36*), Лютесценс 70-13, Лютесценс 87-13 (*Sr23*, *Sr31*, *Sr36*) рекомендуются для включения в селекционный процесс при создании сортов, устойчивых к стеблевой ржавчине в условиях региона. Дальнейший мониторинг вирулентности возбудителя стеблевой ржавчины и скоординированная стратегия селекционных программ в Западной Сибири и сопредельных районах Республики Казахстан по включению разнообразных источников эф-

фективных генов устойчивости, в частности *Sr2* и *Sr40*, позволит улучшить фитосанитарную обстановку и расширить сегмент устойчивых сортов в регионе.

## Список литературы / References

- Аблова И.Б., Беспалова Л.А., Колесников Ф.А., Набоков Г.Д., Ковтуненко В.Я., Филобок В.А., Давоян Р.О., Худокормова Ж.Н., Мохова Л.М., Левченко Ю.Г., Тархов А.С. Принципы и методы селекции пшеницы на устойчивость к болезням в КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Зерновое хозяйство России. 2016;5:32-36. [Ablova I.B., Bepalova L.A., Kolesnikov F.A., Nabokov G.D., Kovtunenkov V.Ya., Filobok V.A., Davoyan R.O., Khudokormova Zh.N., Mokhova L.M., Levchenko Yu.G., Tarkhov A.S. Principles and methods of wheat breeding on tolerance to diseases in KRIA named after P.P. Lukiyanenkov. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2016;5:32-36. (in Russian)]
- Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иорданская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины *Ug99* с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):316-322. [Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race *Ug99* using molecular markers. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2016;6(3):344-350.]
- Койшыбаев М., Шаманин В.П., Моргунов А.И. Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням. Анкара: ФАО-СЕК, 2014. [Koyshybaev M., Shamanin V.P., Morgunov A.I. Screening of Wheat for Resistance to Major Diseases. Ankara: FAO-SEK, 2014. (in Russian)]
- Леонова И.Н., Орловская О.А., Родер М.С., Нестеров М.А., Будашкина Е.Б. Молекулярно-генетическое разнообразие интрогрессивных линий мягкой пшеницы (*T. aestivum*/*T. timopheevii*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4/1):681-690. [Leonova I.N., Orlovskaya O.A., Röder M.S., Nesterov M.A., Budashkina E.B. Molecular diversity of common wheat introgression lines (*T. aestivum*/*T. timopheevii*). Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2015; 5(3):191-197. DOI 10.1134/S2079059715030090.]
- Санин С.С. Проблемы фитосанитарии зернопроизводства. В: Защита зерновых культур от болезней, вредителей, сорняков: достижения и проблемы: Сб. трудов междунар. науч.-практ. конф. Большие Вяземы, 5–9 дек. 2016 г. М., 2016;4-15. [Sanin S.S. Problems of phytosanitary of grain production. In: Protection of Cereal Crops Against Diseases, Pests, and Weeds: Progress and Problems: Proc. of the Int. sci. and pract. conf. Bolshye Vyazemy, 5–9 Dec. 2016. Moscow, 2016;4-15. (in Russian)]
- Сколотнева Е.С., Букатич Е.Ю., Бойко Н.И., Пискарев В.В., Салина Е.А. Оценка пшеничного питомника-ловушки для расы стеблевой ржавчины *Ug99* в условиях лесостепи Приобья в 2017 году. В: Генофонд и селекция растений: Материалы IV междунар. науч.-практ. конф., 4–6 апр. 2018 г. Новосибирск, 2018;313-318. [Skolotneva E.S., Bukatich E.Ju., Bojko N.I., Piskarev V.V., Salina E.A. Screening of an international stem rust nursery trap for *Ug99* in the Priobye forest-steppe in 2017. In: Gene Pool and Plant Breeding: Proc. IV int. sci. and pract. conf., 4–6 April 2018. Novosibirsk, 2018;313-318. (in Russian)]
- Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргунов А.И., Бойко Н.И., Шаманин В.П., Салина Е.А. Расовый состав новосибирской популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Микология и фитопатология. 2020;54(1):49-58. [Skolotneva E.S., Kel'bin V.N., Morgunov A.I., Bojko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races composition of the Novosibirsk population of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2020;54(1):49-58. (in Russian)]

- Шаманин В.П., Моргунув А.И., Петуховский С.Л., Лихенко И.Е., Левшунов М.А., Салина Е.А., Потоцкая И.В., Трущенко А.Ю. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в Западной Сибири. Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, 2015.  
[Shamanin V.P., Morgunov A.I., Petukhovskiy S.L., Likhenko I.E., Levshunov M.A., Salina E.A., Pototskaya I.V., Trushchenko A.Ju. Breeding of spring bread wheat for resistance to stem rust in West Siberia. Omsk: FGOU VPO OmGAU Publ., 2015. (in Russian)]
- Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Клевакина М.В. Оценка сибирской коллекции яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в условиях южной лесостепи Западной Сибири. Вестн. Казан. ГАУ. 2016;2(40):55-59.  
[Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Klevakina M.V. Assessment of the Siberian collection of spring wheat on resistance to stem rust in the southern forest-steppe of Western Siberia. Vestnik Kazanskogo GAU = The Herald of Kazan State Agrarian University. 2016; 2(40):55-59. (in Russian)]
- Gomez-Becerra H., Morgounov A., Abugalieva A. Evaluation of yield grain stability, reliability and cultivar recommendation in spring wheat (*Triticum aestivum*) from Kazakhstan and Siberia. Central Eur. J. Agriculture. 2006;6:649-660.
- Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T., Jr. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Dis. 2008;92:923-926.
- Kerber E.R., Dyck P.L. Resistance to stem and leaf rust in *Aegilops squarrosa* and transfer of a gene for stem rust resistance to hexaploid wheat. In: Ramanujam S. (Ed.). Proceeding of the 5th International Wheat Genetics Symposium. New Delhi: Ind. Soc. of Genetics and Plant Breeding, Ind. Agric. Res. Institute, 1979;358-364.
- Lapochkina I.F., Baranova O.A., Shamanin V.P., Volkova G.V., Gainullin N.R., Anisimova A.V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E.V., Vaganova O.F. The development of the initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including the Ug99 race, in Russia. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2017;7(3):308-317. DOI 10.1134/S207905971703008X.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss. Phytopathology. 1926;16(2): 89-120.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 Supplement. Available at: <http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf>
- McIntosh R.A., Yamayaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2013–2014 Supplement. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2013.pdf>
- Olson E.L., Rous M.N., Pumphrey M.O., Bowden R.L., Gill B.S., Poland J.A. Introgression of stem rust resistance genes *SrTA10187* and *SrTA10171* from *Aegilops tauschii* to wheat. Theor. Appl. Genet. 2013;126:2477-2484. DOI 10.1007/s00122-013-2148-z.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. Can. J. Res. (Sect. C). 1948;26:496-500.
- Roelfs A.P., Martens J.W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 1988;78:526-533.
- Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Utilisation of *Aegilops* (goat-grass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. Euphytica. 2008;163:1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y.
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Yu., Morgounov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. Euphytica. 2016;12:287-296. DOI 10.1007/s10681-016-1769-0.
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Njau P., Wanyera R., Herrera-Foessel S.A., Ward R.W. Will stem rust destroy the world's wheat crop? Adv. Agron. 2008;98:271-309. DOI 10.1016/S0065-2113(08)00205-8.
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Lagudah E.S., Ayliffe M.A., Bhavani S., Rouse M.N., Pretorius Z.A., Szabo L.J., Huerta-Espino J., Basnet B.R., Lan C., Hovmöller M.S. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. Phytopathology. 2015;105:872-884.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Bhavani S., Herrera-Foessel S.A., Singh D., Singh P.K., Velu G., Mason R.E., Jin Y., Njau P., Crossa J. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats: breeding and advances. Euphytica. 2011;179:175-186. DOI 10.1007/s10681-010-0322-9.
- Yu G., Champouret N., Steuernagel B., Olivera P.D., Simmons J., Williams C., Johnson R., Moscou M.J., Hernández-Pinzón I., Green P., Sela H., Millet E., Jones J.D.G., Ward E.R., Steffenson B.J., Wulff B.B.H. Discovery and characterization of two new stem rust resistance genes in *Aegilops sharonensis*. Theor. Appl. Genet. 2017; 130:1207-1222.

#### ORCID ID

V.P. Shamanin [orcid.org/0000-0003-4767-9957](https://orcid.org/0000-0003-4767-9957)  
I.V. Pototskaya [orcid.org/0000-0003-3574-2875](https://orcid.org/0000-0003-3574-2875)  
S.S. Shepelev [orcid.org/0000-0002-4282-8725](https://orcid.org/0000-0002-4282-8725)  
V.E. Pozherukova [orcid.org/0000-0001-8429-2167](https://orcid.org/0000-0001-8429-2167)  
E.A. Salina [orcid.org/0000-0001-8590-847X](https://orcid.org/0000-0001-8590-847X)  
E.S. Skolotneva [orcid.org/0000-0001-8047-5695](https://orcid.org/0000-0001-8047-5695)  
M. Hovmöller [orcid.org/0000-0002-4432-8898](https://orcid.org/0000-0002-4432-8898)  
A.I. Morgounov [orcid.org/0000-0001-7082-5655](https://orcid.org/0000-0001-7082-5655)

**Благодарности.** Идентификация генов устойчивости у пшеницы с использованием ПЦР-маркеров проведена при финансовой поддержке РНФ (проект № 16-16-10005), молекулярно-генетические исследования патогена выполнены в рамках проекта РФФИ № 17-29-08018.

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

Поступила в редакцию 24.03.2019. После доработки 07.12.2019. Принята к публикации 07.12.2019.

## Эпифитотический процесс септориоза на сортах яровой пшеницы

Е.Ю. Торопова<sup>1,2</sup>✉, О.А. Казакова<sup>1,2</sup>, В.В. Пискарев<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, р.п. Большие Вяземы, Одинцовский район, Московская область, Россия

<sup>3</sup> Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

✉ e-mail: 89139148962@yandex.ru

**Аннотация.** Септориоз листьев и колоса яровой пшеницы – одна из наиболее экономически значимых инфекций в Сибирском регионе. В системах контроля септориоза основным экологически безопасным элементом являются устойчивые сорта, которые тормозят или останавливают развитие эпифитотического процесса путем замедления размножения возбудителей септориоза. Цель работы состояла в уточнении видового состава возбудителей септориоза по регионам Западной Сибири и сортам яровой пшеницы, исследовании эпифитотического процесса септориоза дифференцированно на листьях и колосьях сортов, а также в оценке активности семенной передачи *Parastagonospora nodorum*. Исследования проводили в 2016–2018 гг. по общепринятым методикам. В Западной Сибири септориоз листьев и колоса яровой пшеницы широко распространен: 35 % по показателю развития болезни и 90 % по распространенности. Видовой состав возбудителей септориоза представлен *P. nodorum*, *Septoria tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae*, причем соотношение видов изменялось по регионам. В Новосибирской области отмечено полное доминирование *P. nodorum*, *S. tritici* встречался в 13.8 раза реже, а *P. avenae* f. sp. *triticae* единично. В Тюменской области доминирование *P. nodorum* не было таким безусловным и нарушалось в некоторых географических пунктах *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae*. В Алтайском крае во всех точках учета преобладал *P. nodorum*; *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae* встречались повсеместно, но в 5.6 и 8.6 раза реже соответственно. Изучение сортов яровой пшеницы разного происхождения не позволило выявить иммунных к септориозу листьев и колоса форм. Установлено дифференцированное проявление признаков устойчивости к септориозу листьев и колоса, выделены сорта, сочетающие пониженную восприимчивость к септориозу и листьев, и колоса. Инфицированность семян фитопатогеном в регионах Сибири достигала 7 экономических порогов вредоносности и в значительной степени (52.5 %) определялась погодными условиями августа. Изучение коллекций сортов из трех регионов Сибири позволило выявить следующую тенденцию: наиболее активно передача *P. nodorum* с семенами сортов шла в Новосибирской области (7.6 %), в меньшей степени – в Омской (5.7 %); самая благополучная фитосанитарная ситуация была в Курганской области: сорта передавали *P. nodorum* в слабой степени (2.1 %), ниже экологического порога вредоносности.

**Ключевые слова:** септориоз листьев и колоса; яровая пшеница; мониторинг; *Parastagonospora nodorum*; *Septoria tritici*; *P. avenae* f. sp. *triticae*; сорт; устойчивость; семенная передача.

**Для цитирования:** Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Пискарев В.В. Эпифитотический процесс септориоза на сортах яровой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):139-148. DOI 10.18699/VJ20.609

## *Septoria* blotch epidemic process on spring wheat varieties

Е.Ю. Торопова<sup>1,2</sup>✉, О.А. Kazakova<sup>1,2</sup>, V.V. Piskarev<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> All-Russian Research Institute of Phytopathology, r. p. Bolshie Vyazemy, Odintsovo district, Moscow region, Russia

<sup>3</sup> Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: 89139148962@yandex.ru

**Abstract.** The *Septoria* blotch of spring wheat leaves and ears is one of the most economically significant infections in the Siberian region. In the control systems of *Septoria* blotch the main ecologically safe element is resistant varieties, which are designed to slow down the pathogens reproduction rate and slow down or stop the development of the epiphytotic process. The purpose of the work was to clarify the species composition of *Septoria* blotch pathogens for West Siberian regions and spring wheat varieties, to study the epiphytotic process of *Septoria* differentially on the leaves and ears of varieties, and to evaluate the activity of seed transmission of *Parastagonospora nodorum*. Studies were carried out in 2016–2018 according to generally accepted methods. *Septoria* leaf and ear blotch of spring wheat is widespread in West Siberia and the Trans-Urals, causing a decrease in yield by up to 50 % or more with the deterioration in grain quality. The causative agents of the disease are *P. nodorum*, *Septoria tritici*, and *P. avenae* f. sp. *triticae*, and the species ratio varied across the regions and varieties, and within plant organs. In Novosibirsk Region, *P. nodorum* completely

dominated; *S. tritici* was 13.8 times less common; and *P. avenae* f. sp. *triticae* was a singleton. In Tyumen region, the dominance of *P. nodorum* was disrupted in some geographic locations by *S. tritici* and *P. avenae* f. sp. *triticae*. In Altai Krai, *P. nodorum* predominated at all points studied; *S. tritici* and *P. avenae* f. sp. *triticae* were found everywhere, but 5.6 and 8.6 times less often, respectively. The study of spring wheat varieties of different origins has not revealed any samples immune to *Septoria* blotch. A differentiated manifestation of resistance to *Septoria* leaf and ear disease has been established. Some varieties show complex resistance, combining reduced susceptibility to *Septoria* leaf and ear disease. Seed infection with *P. nodorum* in the regions of Siberia reached 7 thresholds and was largely (52.5 %) determined by the August weather conditions. The study of the collection of spring wheat varieties from three Siberian regions has revealed the following trend. Transmission of *P. nodorum* with the seeds of varieties was the most active (7.6 %) in Novosibirsk Region and somewhat weaker in Omsk Region (5.7 %). The most favorable phytosanitary situation was in Kurgan Region, where varieties transmitted *P. nodorum* to a low degree (2.1 %), below the threshold.

Key words: *Septoria* leaf and ear blotch; spring wheat; monitoring; *Parastagonospora nodorum*; *Septoria tritici*; *P. avenae* f. sp. *triticae*; variety; resistance; seed transmission.

**For citation:** Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Piskarev V.V. *Septoria* blotch epidemic process on spring wheat varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):139-148. DOI 10.18699/VJ20.609

## Введение

В течение длительного периода времени одной из наиболее распространенных и вредоносных болезней яровой пшеницы во всех зонах ее возделывания остается септориоз листьев и колоса (Eyal, 1999; Robert et al., 2004; Назарова и др., 2010). При поражении пшеницы септориозом листья преждевременно засыхают, налив зерна идет только за счет зеленых частей стебля и колоса. Зерно формируется шуплое, с низкой натурой и массой 1000 зерен. Зерновая продуктивность яровой пшеницы падает на 25–60 %. Всхожесть и энергия прорастания семян снижаются на 7–12 % (Чулкина, 1991; Parker et al., 2004; Robert et al., 2004; Санин и др., 2015).

Основные возбудители болезни на яровой пшенице – микромицеты *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous (син. *Depazea nodorum* Berk.) и *Septoria tritici* Roberge ex Desm. (син. *Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desm.) Quaedvl. & Crous.). Из этих двух видов грибов на яровой пшенице в Сибири преимущественное распространение имеет *P. nodorum*, отличающийся более быстрым (в 8–10 раз) прорастанием пикноспор и колонизацией ткани растения-хозяина по сравнению с *S. tritici* (Чулкина, 1991). Также отмечено распространение на пшенице *Phaeosphaeria avenaria* f. sp. *triticae* Shoem. & C.E. Vabcs. (син. *S. avenae* f. sp. *triticae*) (Торопова и др., 2019). Эти же виды наносят наибольший вред посевам озимой пшеницы (Коломиец и др., 2018). Каждый из фитопатогенов имеет определенные эпидемиологические особенности и требования к условиям окружающей среды, что обеспечивает высокую экологическую пластичность заболевания и трудность борьбы с ним. Возбудители септориоза могут существовать совместно на растении. *S. tritici* главным образом поражает листья, при этом интенсивнее развивается на молодых, чем на старых тканях. *P. nodorum* одинаково хорошо поражает как листья, так и колосья, способен жить и размножаться на мертвых тканях (Коломиец и др., 2018). Наибольшая восприимчивость к *P. nodorum* отмечена в фазу колошения и цветения (Cooke, Jones, 1970). Фаза наивысшей чувствительности пшеницы к *S. tritici* приходится на период кушения–трубкования, что преимущественно связано с повышенной влажностью воздуха в листовом пологе (Adolf et al., 1993). Представленность основных возбудителей в патогенном комплексе септориоза озимой пшеницы зависит от погоды. *S. tritici*

доминирует в годы с низкими зимними температурами и с более теплыми и дождливыми условиями в первой половине лета. *S. nodorum* преобладает в годы с более влажной погодой осеннего периода, теплыми зимами и большим количеством осадков во вторую половину лета (Санин и др., 2017).

Септориоз листьев и колоса зарегистрирован более чем в пятидесяти странах мира, преимущественно в широтах с умеренным климатом (Европа, Северная Америка, Австралия). На территории бывшего СССР септориоз особенно сильно распространен на Северном Кавказе, Урале, Украине, в Белоруссии (Назарова и др., 2010).

Внедрение ростковых трубок фитопатогенов в ткани листьев восприимчивых хозяев после прорастания пикноспор в большинстве случаев осуществляется через устьичную щель, реже – через эпидермис. Часто в одно устье проникает несколько ростков. После проникновения возбудителей отмечают слабое ветвление и рост грибов в межклетниках мезофильных клеток листа, причем большинство гиф растет вдоль листа между клетками эпидермиса и мезофилла. Этим, видимо, объясняется тот факт, что пятна септориоза часто вытянуты вдоль жилок листа. Постепенно происходит ветвление гиф, разрастание их в разных направлениях, при этом несколько раз пронизывается толща листа, межклетники заполняются мицелием (Robert et al., 2004; Назарова и др., 2010). У возбудителя септориоза листьев *S. tritici* обнаружен фитотоксин охрацин, подавляющий ростовые процессы растений-хозяев, и септорин, ингибирующий процессы окислительного фосфорилирования в растительных клетках (Eyal, 1999).

Заражение растений возбудителями септориозов происходит особенно интенсивно, если период капельного увлажнения при оптимальной температуре составляет не менее 8 ч, а относительная влажность воздуха – 98–100 %. Поэтому септориозы чаще всего развиваются в районах с достаточным увлажнением. Однако известны случаи, когда септориоз представлял опасность и в сухих районах. Это объясняется тем, что патогены могут использовать прерывистый влажный период, в результате регулярного выпадения рос (Торопова и др., 2002).

Инкубационный период септориозов в зависимости от гидротермических условий составляет от 6 до 49 дней. Регрессионный анализ показал, что 45 % изменчивости

латентного периода возбудителя обусловлено влиянием температуры, 12 % – плотностью его популяции, и только 3 % – длительностью увлажнения (Чулкина, 1991). Это свидетельствует о том, что, попав в экологическую нишу, возбудитель уже практически не зависит от увлажнения. Хотя во внешней среде на протяжении всех фаз механизма передачи (отделение от источника возбудителя инфекции, передача пропагул воздушно-капельным путем, прорастание и внедрение в ткани восприимчивых растений) его жизненный цикл в значительной мере зависит от наличия капельно-жидкой влаги (Nolan et al., 1999; Торопова и др., 2002; Назарова и др., 2010; Пахолкова, 2015).

Репродуктивный потенциал возбудителей септориозов довольно высок, до 10–15 тыс. пикноспор в одной пикниде. Между количеством пикнид и пикноспор была установлена тесная корреляционная связь ( $r = 0.901$ ) (Чулкина, 1991).

Для образования пикнид необходима высокая относительная влажность воздуха (более 98 %). Зрелые пикниды *P. nodorum* формируются в течение 8–14 дней, *S. tritici* – 14–20 дней после инокуляции (Пахолкова, 2015). За сезон развивается от 6 до 12 генераций грибов. В конце вегетации растений-хозяев число пикнид достигает максимальной величины; на одних и тех же листьях формируются пикниды и сумки (плодовые тела) разных видов возбудителей септориоза (Коломиец и др., 2018).

Возбудители септориозов зимуют на инфицированных растительных остатках в форме мицелия, плодовых тел и пикнид, а *P. nodorum* также на поверхности или внутри семян – в форме мицелия, пикнид (Торопова и др., 2016; Санин и др., 2018). На инфицированных растительных остатках в поверхностном слое почвы или на ее поверхности возбудители сохраняются 6–18 месяцев, а в почве на глубине пахотного слоя – до конца июня–июля. При этом 1 г растительных остатков в почве содержит 1.5–6 млн спор возбудителя, на поверхности почвы – 52–63 млн спор. Жизнеспособность как пикноспор в пикнидах, так и особенно аскоспор в сумках бывает высокой, достигая 100 % в фазу колошения яровой пшеницы, когда происходит массовое заражение растений (Чулкина, 1991; Торопова и др., 2002; Санин и др., 2018).

Способность пикноспор к распространению после освобождения из пикнид связана с дождем. Ветер без дождя не может переносить споры, так как они покрыты клейкой массой, которая в отсутствие влаги приклеивает их к субстрату. По мере удаления от источника инфекции популяция спор уменьшается. Далее 500 м споры обычно не обнаруживаются. В вертикальном направлении споры в массе поднимаются до 75 см, а на высоте 150 см они отсутствуют (Eyal, 1999; Торопова и др., 2002; Robert et al., 2004; Санин и др., 2018).

Освобождение аскоспор из перитециев возможно только во время дождя, причем этот процесс растянут и может длиться несколько месяцев. Аскоспоры переносятся на несколько (2–3) километров.

Развитие септориоза в значительной степени зависит от гидротермических условий. При низкой влажности воздуха споры не выделяются из пикнид и не распространяются. Поэтому вспышки болезни приходятся на годы со значительным выпадением осадков, при максимальной

температуре воздуха не выше 30 °С, а среднесуточной – в пределах 14–21 °С. Поражение корневыми гнилями даже в слабой степени (3–10 %) усиливает развитие септориоза (Торопова и др., 2002; Торопова, 2005; Назарова и др., 2010; Санин и др., 2015).

Снижение интенсивности обработки почвы и накопление на ее поверхности инфицированных растительных остатков привело к увеличению в 2–2.5 раза частоты эпифитотий септориоза в лесостепи Западной Сибири за последние 10 лет. Поскольку в этот период у яровой и озимой пшеницы интенсифицировалась семенная передача основного возбудителя болезни *P. nodorum*, ежегодно создавались предпосылки для формирования ранних очагов болезни (Торопова и др., 2018). Эпифитотийное развитие очагов септориоза, при котором болезнь на верхних листьях достигает экономического порога вредоносности (ЭПВ = 15–20 %), происходит, когда за декаду выпадает в 3 раза больше осадков по сравнению со среднесуточными данными при температуре 14–22 °С. Болезнь при этом развивается со скоростью до 2–3 % в сутки, что требует применения фунгицидов (Торопова, 2005; Санин и др., 2015).

Передача *P. nodorum* через семена вызывает раннее появление септориоза на coleoptile и прикорневых листьях в фазы всходов–кущения. Между заражением семян и всходов нет линейной зависимости. Заражение семян на 5–10 % уже может привести к развитию эпифитотии септориоза при благоприятных погодных условиях (Чулкина, 1991; Санин и др., 2015; Торопова и др., 2018).

Возбудители септориозов имеют r-стратегию жизненного цикла. Характерные признаки r-стратегии фитопатогенов: многочисленные (6–12) генерации конидиального (пикниды с пикноспорами) спороношения при благоприятных условиях, высокая скорость передачи возбудителей, полициклический, изменчивый тип динамики эпифитотического процесса. Стратегия фитосанитарных мероприятий против септориозов состоит в снижении скорости размножения возбудителей и развития эпифитотического процесса до уровня ниже ЭПВ. Это достигается за счет сортовой и физиологической устойчивости растений и предупреждения вертикальной передачи *P. nodorum* через семена.

Создание устойчивых сортов является наиболее перспективным и экологически безопасным компонентом систем интегрированной защиты яровой пшеницы от септориоза листьев и колоса. Трудность практической селекции пшеницы на устойчивость к септориозу заключается в том, что этот признак нестабилен, варьирует во времени и в пространстве и контролируется множеством механизмов (Коломиец и др., 2018). Редко встречаются генотипы с комплексной устойчивостью: сорта могут быть устойчивы к одному виду патогена и восприимчивы к другому (Jenkins, Jones, 1981). Одно время полагали, что пшеница вообще не обладает устойчивостью к *P. nodorum* (Scharen, Krupinsky, 1970; Broennimann, 1975). Однако дальнейшие исследования показали, что ситуация не столь однозначна (Mullaney et al., 1981; Du et al., 1999).

Стабильный прогресс наблюдается в выведении устойчивых сортов пшеницы к *S. tritici*. Отечественными исследователями выделен ряд сортов, которые рекомендованы

для включения в селекционные программы в качестве источников и доноров устойчивости к возбудителю (Коломиец и др., 2018).

Устойчивость к септориозу может быть как количественной (горизонтальной), так и изолят-специфичной (вертикальной) (Тырышкин, Ершова, 2004; Коломиец и др., 2017). В настоящее время у пшеницы идентифицировано 17 генов устойчивости к *S. tritici* (*Stb1–Stb17*). Благодаря генетическому анализу в патосистеме «пшеница–*M. graminicola*» было доказано взаимодействие «ген-наген» (Коломиец и др., 2017). Недавними исследованиями установлены некоторые биохимические механизмы устойчивости мягкой пшеницы к септориозу (Веселова и др., 2018, 2019). Устойчивые к септориозу формы мягкой пшеницы выделены и за рубежом (Van Ginkel, Rajaram, 1999; Simón et al., 2003; Robert et al., 2004). Одним из аспектов, затрудняющих поиск устойчивых к септориозу форм растений, является недооценка многокомпонентности видового состава возбудителей септориоза и недостаточная изученность региональной представленности видов в патогенном комплексе болезни. Кроме того, нередко при оценке устойчивости растений не проводят дифференцированного учета пораженности листьев и колосьев, хотя она может определяться разными механизмами.

Цель работы состояла в уточнении видового состава возбудителей септориоза по регионам Западной Сибири и сортам яровой пшеницы, исследовании эпифитотического процесса септориоза дифференцированно на листьях и колосьях сортов, а также в оценке активности семенной передачи *P. nodorum*.

## Материалы и методы

Исследования проводили в 2016–2018 гг. в лесостепной зоне Западной Сибири. Учет септориоза листьев и колоса выполняли с использованием международной шкалы (Чулкина и др., 2017) в производственных условиях хозяйств региона. Для уточнения видового состава возбудителей септориоза образцы пораженных растений и растительные остатки пшеницы собирали на полях в конце вегетации пшеницы, отбирая по 10–20 пораженных листьев в каждой точке учета. Для определения видов грибов фрагменты пораженной ткани с плодовыми телами помещали на предметные стекла в каплю воды и через 10–15 мин просматривали при малом увеличении микроскопа. По форме и размеру вышедших из пикнид спор устанавливали вид гриба и его распространенность, в процентах от общего числа исследованных пикнид (Пыжикова и др., 1988). Исследование септориоза листьев и колоса на сортах и сортообразцах яровой пшеницы было проведено на естественном инфекционном фоне с использованием коллекции ФИЦ Институт цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН. Коллекция состояла из 10 сортов из пяти регионов Российской Федерации и 13 зарубежных образцов из восьми стран. Площадь под каждым сортом (сортообразцом) составляла от 3 до 10 м<sup>2</sup> в трехкратной повторности.

По степени поражения сорта разделяли на следующие группы: 0–5 % – высокоустойчивые; 6–20 % – устойчивые; 21–40 % – слабовосприимчивые; 41–65 % – восприимчивые; 66–100 % – высоковосприимчивые (Санин и др., 2015).

Отбор семян для анализа осуществляли в хозяйствах Новосибирской, Томской, Тюменской областей, Алтайского и Красноярского краев. Оценка семян на зараженность *P. nodorum* проводили по авторской методике (Чулкина и др., 2017). За годы исследований проанализировано в общей сложности 258 партий семенного зерна 53 сортов яровой пшеницы.

В северной лесостепи Новосибирской области 2016 г. был засушливым (ГТК = 0.81), 2017 и 2018 гг. влажными (ГТК = 1.26 и 1.33 соответственно), что существенно сказалось на напряженности естественного инфекционного фона.

## Результаты и обсуждение

**Мониторинг септориоза в агроценозах озимой и яровой пшеницы Новосибирской, Томской, Кемеровской, Курганской, Тюменской областей и Алтайского края, проведенный в 2016–2018 гг., установил повсеместное распространение септориоза на яровых сортах пшеницы. Развитие болезни варьировало от 5 до 35 %, а распространенность достигала 90 %. Несмотря на значительное разнообразие погодных условий, сортов и технологий возделывания яровой пшеницы, к фазе колошения в большинстве агроценозов возникала критическая ситуация, требующая принятия оперативных мер защиты яровой пшеницы от септориоза листьев и колоса (Торопова и др., 2019).**

Первые единичные очаги септориоза на нижних листьях яровой пшеницы при передаче возбудителя с инфицированных растительных остатков наблюдались в 2016 и 2017 гг. во второй-третьей декадах июня, в 2018 г., в связи с поздним посевом, в первой-второй декаде июля. При этом сначала появлялся *P. nodorum* (июнь–начало июля), затем *S. tritici* (конец июля–август).

Сравнение погодных условий в годы, контрастные по развитию и распространенности септориоза, показало, что эпифитотии болезни умеренной и значительной интенсивности начинались при выпадении от 76 до 111 мм осадков при средней температуре воздуха 16.7 °С. Благоприятные для септориоза годы отличались увеличением количества осадков в критические для заражения растений периоды в среднем в 6.7 раза и понижением температуры воздуха в среднем на 2.5 °С.

Климатический тренд, характеризующийся потеплением и повышением контрастности погодных условий вегетационного периода, оказался благоприятным для возбудителей инфекции, привел к повышению частоты эпифитотий септориоза яровой пшеницы в регионах его распространения, включая Западную Сибирь (Левитин, 2015; Торопова и др., 2016). Результаты наших исследований совпадают с данными публикаций по росту распространения септориоза пшеницы в европейской части России (Санин и др., 2017; Гуляева и др., 2019).

**Видовой состав возбудителей септориоза листьев и колоса яровой пшеницы был представлен *P. nodorum*, *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae*, причем соотношение видов изменялось по регионам (табл. 1). На инфицированных листьях возделываемых в Сибири сортов яровой пшеницы присутствовали пикниды *P. nodorum*, *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae*. По усредненным данным, в шести точках отбора образцов в Новосибирской области**

**Таблица 1.** Видовой состав возбудителей септориоза на листьях яровой пшеницы по регионам Сибири, 2016–2018 гг., %

Регион	<i>P. nodorum</i>	<i>S. tritici</i>	<i>P. avenae</i> f. sp. <i>triticae</i>
Алтайский край	77.2 ± 6.6	13.8 ± 1.9	9.0 ± 1.1
Новосибирская область	92.5 ± 8.9	6.7 ± 0.9	0.8 ± 0.1
Тюменская область	68.0 ± 7.1	24.0 ± 3.2	8.0 ± 1.2

выявлено безусловное доминирование *P. nodorum*. *S. tritici* встречался в 13.8 раза реже, представленность *P. avenae* f. sp. *triticae* в патогенном комплексе септориоза была единичной.

Исследование видовой состава возбудителей септориоза в Тюменской области показало значительное разнообразие по точкам отбора проб. Так, в двух точках при доминировании *P. nodorum* вторую позицию занял *P. avenae* f. sp. *triticae*, а не *S. tritici*, тогда как на листьях пшеницы из третьей точки, кроме *P. nodorum*, других возбудителей не выявлено. На листьях пшеницы из четвертой точки отбора Тюменской области выявлено доминирование *S. tritici*, причем в трех пунктах из пяти *P. avenae* f. sp. *triticae* вносил существенный вклад в патогенный комплекс возбудителей септориоза на яровой пшенице, чего не отмечалось в Новосибирской области.

В Алтайском крае во всех точках учета доминировал *P. nodorum*. *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae* встречались повсеместно, но в 5.6 и 8.6 раза реже основного возбудителя болезни соответственно. *P. avenae* f. sp. *triticae* встречался на листьях яровой пшеницы в агроценозах Алтая в 11.3 раза чаще, чем в Новосибирской области, т. е. его вклад в патогенный комплекс септориоза был гораздо более существенным.

Таким образом, выявлены существенные различия в видовом составе возбудителей септориоза яровой пшеницы по регионам Западной Сибири, что следует принимать во внимание при создании популяций возбудителей для искусственного заражения растений в ходе практической селекции на устойчивость сортов. Сравнение представленных выше данных с результатами аналогичных исследований в 1980-х гг. (Чулкина, 1991) свидетельствует о некоторых изменениях видовой состава возбудителей септориоза, который стал более разнообразным по регионам. Следует отметить появление в патогенном комплексе септориоза во всех точках отбора проб *P. avenae* f. sp. *triticae*, чего не наблюдалось 40 лет назад. Изменение видовой состава, возможно, связано как с климатическими вариациями, так и с изменением технологий возделывания яровой пшеницы.

Различия видовой состава возбудителей септориоза листьев по сортам коллекции ФИЦ ИЦиГ СО РАН Новосибирского района Новосибирской области показаны в табл. 2. Согласно представленным данным, на сортах коллекции в фазу полной спелости яровой пшеницы встречались три возбудителя септориоза: *P. nodorum*, *S. tritici*, *P. avenae* f. sp. *triticae*. Основным возбудителем септориоза листьев и колоса был *P. nodorum* (в среднем 85.4 % патогенного комплекса). Второе место по распространению на листьях принадлежит пикнидам *S. tritici* (11.8 %) с максимальным показателем 20 % на сортах Кайыр и

КВС Аквилон. Самую ограниченную распространенность имел *P. avenae* f. sp. *triticae*, он выявлен только на восьми сортах, средняя распространенность составила 2.8 %. Полученные данные свидетельствуют о преимущественно региональной приуроченности видовой композиции фитопатогенов. Сорта разного географического происхождения инфицировались фитопатогенами по региональному типу, характерному для Новосибирской области.

**Оценка устойчивости коллекции из 23 сортов яровой пшеницы к септориозу листьев и колоса** в северной лесостепи Приобья показала отсутствие иммунных к возбудителям септориоза форм растений (табл. 3).

Формирование очагов септориоза ежегодно начиналось на злаковых травах – мятлике луговом и еже сборной, где развитие болезни на первую дату учета (5–7 июля) уже достигало 60 %. К этому времени на озимой пшенице симптомы септориоза выявлялись на втором и третьем листе сверху и составляли в среднем 10 %. На яровой пшенице в первой декаде июля признаки септориоза (3 %) были отмечены только на нижних листьях.

Годы исследований были влажными, и погодные факторы благоприятствовали развитию болезни. На фазе начала налива все сорта имели признаки поражения септориозом, однако напряженность эпифитотического процесса существенно различалась как по сортам, так и по учетным органам в оба года. Так, в 2017 г. на флаговых листьях сортов яровой пшеницы развитие болезни колебалось от 0 до 40 %, а пораженность колоса варьировала от 0 до 10 %. В 2018 г. флаговые листья поражались на тех же сортах более равномерно – от 0 до 15 %, а колосья, напротив, более контрастно – от 0 до 30 %. Была выявлена тенденция дифференцированного проявления устойчивости сортов к септориозу листьев и колоса. Коэффициент корреляции развития септориоза листьев и септориоза колоса по сортам составил:  $r = 0.414 \pm 0.280$ .

Наиболее устойчивыми к септориозу листьев, при умеренном поражении колоса, были сорта новосибирской селекции Сибирская 17 и Обская 2. В оба года исследований флаговый лист у них поражался на спорадическом уровне, обеспечивая налив зерна. Однако полученное зерно могло инфицироваться *P. nodorum* и приводить к возникновению ранних очагов септориоза при посеве семян в следующем году.

Устойчивость к септориозу колоса показали сорта Оренбургская 23 (Оренбургская область), Ария (Курганская область), а также зарубежные сорта NIL Thatcher Lr13 (Канада), Кайыр (Казахстан), Mayon 1 (Сирия), КВС Аквилон (Германия), которые имели на фазе налива или непораженные, или спорадически пораженные колосья в оба года исследований. Флаговые листья перечисленных сортов поражались септориозом на уровне 10–20 %.

**Таблица 2.** Видовой состав возбудителей септориоза на сортах яровой пшеницы в фазу полной спелости, %

Происхождение	Сорт, сортообразец	<i>P. nodorum</i>	<i>S. tritici</i>	<i>P. avenae</i> f. sp. <i>triticae</i>
Россия, Новосибирская область	Новосибирская 15	85	10	5
	Новосибирская 31	90	10	0
	Сибирская 17	95	5	0
	Обская 2	85	15	0
Россия, Оренбургская область	Оренбургская 23	90	10	0
Россия, Кировская область	Вятчанка	95	5	0
Россия, Тюменская область	Тюменочка	80	10	10
Россия, Курганская область	Ария	85	10	5
	Фора	80	10	10
	Зауралочка	90	10	0
Канада	NIL Thatcher Lr13	90	10	0
	NIL Thatcher Lr2c	85	10	5
Китай	Long Chun 7 Hao	85	15	0
	Ke Zhuang	90	10	0
США	UI Alta Blanca	80	5	10
	UI Pettit	75	15	10
Казахстан	Кайыр	80	20	0
	Достык	85	15	0
Швейцария	Quarna	90	10	0
Сирия	Mayon 1	85	15	0
Германия	КВС Аквилон	70	20	10
Таджикистан	K65835	90	10	0
	K65834	85	15	0
Среднее		85.4	11.8	2.8

Комплексную устойчивость к септориозу и листьев, и колоса на фазе начала налива продемонстрировали сорта Вятчанка (Кировская область), Тюменочка (Тюменская область), Зауралочка (Курганская область), а также зарубежные сорта NIL Thatcher Lr2c (Канада), Long Chun 7 Hao и Ke Zhuang (Китай), Достык (Казахстан), Quarna (Швейцария). Эта группа сортов поражалась листовой и колосовой формами септориоза в слабой степени, а отечественные сорта Тюменочка и Зауралочка имели на фазе начала налива полностью здоровый колос при слабом поражении флагового листа.

Учеты, проведенные на фазе молочной спелости, показали, что распространенность септориоза достигла 100 % на всех без исключения сортах. Комплексную пониженную восприимчивость на фазе молочной спелости проявили отечественные сорта Оренбургская 23 и Вятчанка, а также Long Chun 7 Hao из Китая. Они имели умеренную, на уровне ЭПВ (20 %), пораженность листьев и колоса в конце вегетации.

Дисперсионный анализ показал, что сила влияния фактора «условия года» на развитие септориоза листьев составила 17.9–25.4 % и была достоверна на 1 % уровне значимости, тогда как сила влияния фактора «сорт» была в 3.5–10 раз ниже и не всегда статистически достоверна.

Учитывая способность одного из возбудителей септориоза, микромицета *P. nodorum*, использовать семена в

качестве фактора передачи во времени и создавать ранние очаги болезни, мы оценили интенсивность инфицирования семян сортов яровой пшеницы по регионам Сибири (табл. 4).

Максимальная инфицированность партий семян септориозом весной 2016 г. (год производства семян 2015) была отмечена в Томской области, где она достигала 36 %, что составляет более 7 ЭПВ (Чулкина и др., 2017). В Красноярском крае инфицированность семян достигала 2.5 ЭПВ, в остальных регионах – около 2 ЭПВ. Исключением стал Алтайский край, где в 2015 г. сложились благоприятные для получения качественных семян условия и максимальная инфицированность составила 7 %.

Весной 2017 г. инфицированность отдельных партий семян яровой пшеницы возбудителем септориоза достигала 4.4 ЭПВ. При этом средняя зараженность семян только из Новосибирской области достигала ЭПВ, остальные регионы предоставили на анализ семена умеренного инфицирования, в среднем ниже ЭПВ.

По весенним исследованиям 2018 г. инфицированность семян яровой пшеницы *P. nodorum* достигала экономического порога вредоносности только в отдельных партиях, при этом средняя зараженность семян из всех обследованных регионов не достигала ЭПВ. Самая высокая инфицированность семян была отмечена в более увлажненной Томской области, самая благополучная ситуация по

**Таблица 3.** Развитие септориоза листьев и колоса на сортах яровой пшеницы в фазу начала налива по годам, %

Происхождение	Сорт, сортообразец	Флаговый лист			Колос		
		2017 г.	2018 г.	Среднее	2017 г.	2018 г.	Среднее
Россия							
Новосибирская область	Новосибирская 15	10.0	1.0	5.5	5.0	30.0	17.5
	Новосибирская 31	10.0	1.0	5.5	0	20.0	10.0
	Сибирская 17	1.0	0	0.5	1.0	20.0	10.5
	Обская 2	1.0	1.0	1.0	0	20.0	10.0
Оренбургская область	Оренбургская 23	15.0	5.0	10.0	0	0	0
Кировская область	Вятчанка	5.0	1.0	3.0	1.0	0	0.5
Тюменская область	Тюменочка	5.0	5.0	5.0	0	0	0
Курганская область	Ария	20.0	5.0	12.5	1.0	0	0.5
	Фора	20.0	5.0	12.5	1.0	10.0	5.5
	Зауралочка	5.0	5.0	5.0	0	0	0
Зарубежные страны							
Канада	NIL Thatcher Lr13	1.0	15.0	8.0	1.0	1.0	1.0
	NIL Thatcher Lr2c	5.0	5.0	5.0	1.0	0	0.5
Китай	Long Chun 7 Hao	5.0	5.0	5.0	1.0	1.0	1.0
	Ke Zhuang	0	5.0	2.5	0	5.0	2.5
США	UI Alta Blanca	20.0	5.0	12.5	1.0	5.0	3.0
	UI Pettit	15.0	5.0	10.0	5.0	0	2.5
Казахстан	Кайыр	10.0	5.0	7.5	1.0	0	0.5
	Достык	5.0	5.0	5.0	1.0	0	0.5
Швейцария	Quarna	0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0
Сирия	Mayon 1	20.0	1.0	10.5	1.0	0	0.5
Германия	KBC Аквилон	0	10.0	5.0	1.0	1.0	1.0
Таджикистан	K65835	20.0	5.0	12.5	10.0	1.0	5.5
	K65834	40.0	10.0	25.0	10.0	5.0	7.5
Среднее		9.9	4.6	7.2	1.9	5.2	3.6

**Таблица 4.** Инфицированность семян яровой пшеницы *P. nodorum* по регионам Сибири и годам производства, %

Регион	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г.	Среднее
Томская область	15.0±2.64	3.3±0.61	4.0±0.53	14.3±2.56	9.2±1.65
Кемеровская область	6.0±0.92	4.6±0.69	1.6±0.22	5.3±0.82	4.4±0.68
Новосибирская область	5.2±0.85	5.2±0.81	1.7±0.20	10.2±2.21	5.6±1.12
Красноярский край	5.0±0.82	3.5±0.52	1.8±0.22	–	–
Тюменская область	4.2±0.71	1.8±0.23	1.8±0.24	12.2±2.40	5.0±0.95
Алтайский край	2.9±0.48	2.7±0.46	0.6±0.13	7.3±1.21	3.4±0.62
Среднее	6.4±1.12	3.5±0.70	1.9±0.21	9.9±1.89	

Примечание. Сила влияния фактора «регион» – 15.1 % (уровень значимости 5 %), фактора «год» – 52.5 % (уровень значимости 1 %). Прочерк – измерения не проводились.

септориозу выявлена в Алтайском крае, где созревание зерна летом и в сентябре 2017 г. в большинстве районов проходило в сухую погоду. В целом инфицированность семян яровой пшеницы под посев в 2018 г. была ниже, чем в предыдущие годы.

На семенах яровой пшеницы производства 2018 г. *P. nodorum* был выявлен в значительных количествах, во

всех регионах среднее инфицирование семенных партий превышало ЭПВ. На семенах из Томской и Тюменской областей распространенность септориоза достигала 7 ЭПВ, что следует считать сильной эпифитотией (Чулкина, 1991; Торопова и др., 2002). Порог вредоносности септориоза был превышен на 70 % партий, причем на 38.5 % он был превышен более чем в 2 раза. В большинстве регионов

**Таблица 5.** Зараженность септориозом семян яровой пшеницы коллекций сортов по регионам производства

Сорт	Зараженность септориозом, %
Селекционный участок ИЦиГ СО РАН, Новосибирская область	
Новосибирская 47	9.0
Новосибирская 16	6.0
Новосибирская 41	6.0
Новосибирская 14	5.0
Новосибирская 31	7.0
Новосибирская 18	12.0
Новосибирская 29	6.0
Новосибирская 15	10.0
Обская 2	10.0
Среднее	7.9
Селекционный участок Курганского НИИСХ, Курганская область	
Зауралочка	3.0
Исеть	2.0
Терция	2.0
Десятка	1.0
Ария	1.0
Радуга	3.0
Арка	3.0
Среднее	2.1
Селекционный участок Омского ГАУ, Омская область	
Уралосибирская	9.0
Омская 36	8.0
Сигма 2	4.0
Элемент 22	3.0
Омская 42	7.0
Сигма 2	5.0
Столыпинская	4.0
Среднее	5.7

Западной Сибири вегетация 2018 г. была достаточно увлажненной, характеризовалась эпифитотийным распространением септориоза листьев и колоса, что обеспечило *P. nodorum* благоприятные условия для инфицирования семян. В целом весенний анализ 2019 г. выявил самую высокую за последние годы инфицированность семян, что создало предпосылки для раннего возникновения эпифитотического процесса септориоза во всех регионах Сибири. Согласно дисперсионному анализу, сила влияния фактора «регион», отражающего климат и технологии возделывания, на инфицированность семян яровой пшеницы *P. nodorum* в 3.4 раза ниже, чем влияние погодных условий года. В более влажной Томской области инфицированность семян яровой пшеницы влаголюбивым фитопатогеном *P. nodorum* была в среднем по годам в 2 раза выше по сравнению с наименее увлажненным Алтайским

краем, где производство зерна яровой пшеницы сосредоточено преимущественно в засушливых теплых зонах. Коэффициенты корреляции между инфицированностью семян *P. nodorum* и суммой осадков в августе составляли по годам и регионам  $(0.746 \pm 0.135) \dots (0.872 \pm 0.126)$  и были достоверны на 5 % уровне значимости. Представленные данные свидетельствуют об актуальности контроля и ограничения вертикальной передачи *P. nodorum* с семенами сортов яровой пшеницы.

Анализ семян яровой пшеницы с селекционных участков Новосибирской, Курганской и Омской областей свидетельствует о некоторых различиях в активности семенной передачи *P. nodorum* в благоприятные для септориоза годы (табл. 5). Все сорта коллекции ИЦиГ СО РАН обеспечили передачу патогенного микромицета на уровне ЭПВ или в 2.4 раза выше; устойчивых к вертикальной передаче сортов выявлено не было. Разница в активности вертикальной передачи *P. nodorum* между сортами достигала 2.4 раза. В Курганской области сорта передавали *P. nodorum* в 3.8 раза слабее, ни на одном из сортов зараженность семян не достигла ЭПВ. По признаку инфицированности семян сорта различались до 3 раз. В Омской области ситуация была промежуточной: передача фитопатогена с семенами происходила в среднем на 25 % менее активно, чем в Новосибирской области, и в 2.7 раза активнее по сравнению с Курганской областью. В коллекции Омского ГАУ были выявлены четыре сорта с передачей возбудителя септориоза на уровне или выше пороговой до 1.8 раза. Межсортовые различия по изучаемому параметру достигали 2.3 раза.

## Заключение

Многолетние исследования показали, что септориоз листьев и колоса яровой пшеницы широко распространен в регионах Сибири (до 35 % по показателю развития болезни и 90 % по распространенности), что свидетельствует об актуальности селекции сортов на устойчивость к болезни. При разработке селекционных программ следует принимать во внимание видовой состав возбудителей септориоза, который представлен *P. nodorum*, *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae* и характеризуется существенными различиями по регионам. В Новосибирской области отмечено полное доминирование *P. nodorum*; *S. tritici* встречался в 13.8 раза реже, а представленность *P. avenae* f. sp. *triticae* была единичной. В Тюменской области наряду с общим доминированием *P. nodorum* в некоторых географических пунктах преобладали *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae*. В Алтайском крае во всех точках учета доминировал *P. nodorum*; *S. tritici* и *P. avenae* f. sp. *triticae* встречались повсеместно, но в 5.6 и 8.6 раза реже соответственно.

Современные сорта яровой пшеницы разного происхождения не имеют полного иммунитета к септориозу, а характеризуются только устойчивостью или слабой восприимчивостью к болезни. Было установлено независимое проявление признаков устойчивости к септориозу листьев и септориозу колоса. Коэффициенты корреляции развития септориоза листьев и колоса составили по годам и сортам:  $r = (0.323 \pm 0.241) \dots (0.414 \pm 0.280)$ . Часть сортов показала относительную устойчивость к септориозу листьев при сильном поражении колоса, другие, на-

против, были устойчивы к септориозу колоса при сильном поражении листового аппарата. На основании этих данных можно сделать осторожное предположение о различной генетике устойчивости к септориозу колоса и листьев. Комплексную пониженную восприимчивость показали сорта Оренбургская 23 (Оренбургская область), Ария (Курганская область) и зарубежные сорта NIL Thatcher Lr13 (Канада), Кайыр (Казахстан), Mayon 1 (Сирия), КВС Аквилон (Германия). Они поражаются листовой и колосовой формами септориоза в слабой степени, а отечественные сорта Тюменочка (Тюменская область) и Зауралочка (Курганская область) имели на фазе начала налива полностью здоровый колос при слабом поражении флагового листа и могут считаться наиболее перспективным источником устойчивости.

В селекционном процессе следует также контролировать активность вертикальной передачи *P. nodorum* с семенами, поскольку семенная передача возбудителя септориоза значительно усиливает инфекционную нагрузку на растения. Инфицированность семян фитопатогеном в регионах Сибири достигала 7 ЭПВ и в значительной степени определялась погодными условиями августа. Изучение коллекций сортов яровой пшеницы из трех регионов Сибири позволило выявить следующую тенденцию: наиболее активно передача *P. nodorum* с семенами сортов шла в Новосибирской области (7.6 %), несколько слабее в Омской области (5.7 %), наиболее благополучная фитосанитарная ситуация была в Курганской области, сорта передавали *P. nodorum* в слабой степени (2.1 %), ниже ЭПВ.

## Список литературы / References

- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль НАДФН-оксидазного сигнального каскада в развитии устойчивости мягкой яровой пшеницы к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum* Berk. Изв. Уфимского научного центра РАН. 2018;3(1):66-74.  
[Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Effect of NADPH oxidases cascade on mechanisms regulating defense common wheat reactions under the disease *Stagonospora nodorum* blotch. Izvestiya Ufimskogo Nauchnogo Tsentra Rossiyskoy Akademii Nauk = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Center. 2018;3(1):66-74. (in Russian)]
- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Румянцев С.Д., Максимов И.В. Влияние хозяин-специфического токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):856-864.  
[Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Rumyantsev S.D., Maksimov I.V. Effect of the host-specific toxin SnTOX3 from *Stagonospora nodorum* on ethylene signaling pathway regulation and redox-state in common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7): 856-864.]
- Гульязева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Левитин М.М., Маслова И.В., Колесникова О.А., Вусатюк М.П. Фитосанитарное состояние зерновых культур на Северо-Западе России в 2018 г. Защита и карантин растений. 2019;5:30-31.  
[Gulyaeva E.I., Shaidayuk E.L., Levitin M.M., Maslova I.V., Kolesnikova O.A., Vusatyuk M.P. Phytosanitary state of grain crops in the North-West of Russia in 2018. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2019;5:30-31. (in Russian)]
- Коломиец Т.М., Панкратова Л.Ф., Пахолкова Е.В. Сорта пшеницы (*Triticum L.*) из коллекции GRIN (США) для использования в селекции на длительную устойчивость к септориозу. С.-х. биология. 2017;52(3):561-569. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.561rus.  
[Kolomiets T.M., Pankratova L.F., Pakholkova E.V. Wheat (*Triticum L.*) cultivars from GRIN collection (USA) selected for durable resistance to *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* Blotch. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017; 52(3):561-569. DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.561eng.]
- Коломиец Т.М., Шаманин В.П., Пахолкова Е.В., Панкратова Л.Ф., Сальникова Н.Н., Шепелев С.С., Потоцкая И.В., Аbugалиева А., Моргунов А.И. Скрининг гексаплоидных синтетических линий и сортов яровой мягкой пшеницы на устойчивость к септориозу. Вестн. Омского ГАУ. 2018;3(31):13-26.  
[Kolomiets T.M., Shamanin V.P., Pakholkova E.V., Pankratova L.F., Salmnikova N.N., Shepelev S.S., Pototskaya I.V., Abugaliev A., Morgunov A.I. Screening of hexaploid synthetic wheat lines and spring bread wheat variety for resistance to *Septoria* blotch. Vestnik Omskogo GAU = Bulletin of the Omsk State Agrarian University. 2018;3(31):13-26. (in Russian)]
- Левитин М.М. Микроорганизмы в условиях глобального изменения климата. С.-х. биология. 2015;50(5):641-647. DOI 10.15389/agrobiology.2015.5.641rus.  
[Levitin M.M. Microorganisms and global climate change. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2015;50(5): 641-647. DOI 10.15389/agrobiology.2015.5.641eng.]
- Назарова Л.Н., Корнева Л.Г., Жохова Т.П., Полякова Т.М., Саннин С.С. Эпидемиологическая ситуация по септориозу на пшенице в 2001–2009 годах. Защита и карантин растений. 2010;10: 18-20.  
[Nazarova L.N., Korneva L.G., Zhokhova T.P., Polyakova T.M., Sanin S.S. Epidemiological situation with *Septoria* disease on wheat in 2001–2009. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2010;10:18-20. (in Russian)]
- Пахолкова Е.В. Скорость развития листостебельных инфекций зерновых культур. Защита и карантин растений. 2015;3:39-40.  
[Pakholkova E.V. The rate of leaf-stem infections development on cereal crops. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2015;3:39-40. (in Russian)]
- Пыжикова Г.В., Санина А.А., Курахтанова Т.И. Септориоз зерновых культур. М., 1988.  
[Pyzhikova G.V., Sanina A.A., Kurakhtanova T.I. Septoria Blotch on Cereal Crops. Moscow, 1988. (in Russian)]
- Саннин С.С., Корнева Л.Г., Поляков Т.М. Прогноз риска развития эпифитотий септориоза листьев и колоса пшеницы. Защита и карантин растений. 2015;3:33-36.  
[Sanin S.S., Korneva L.G., Polyakov T.M. Forecasting the risk of epiphytotic developing of *Septoria* leaf and ear on wheat. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2015;3: 33-36. (in Russian)]
- Саннин С.С., Пахолкова Е.В., Карлова Л.В., Рулева О.М., Франчук Л.И. Влияние погодных факторов на представленность *S. tritici* и *S. nodorum* в популяции возбудителей септориоза озимой пшеницы. В: Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: сб. материалов междунар. конф. Большие Выезмы, 2017;1:81-84.  
[Sanin S.S., Pakholkova E.V., Karlova L.V., Rulyova O.M., Franchuk L.I. Influence of weather factors on *S. tritici* and *S. nodorum* representation in a winter wheat *Septoria* blotch agent population. In: Epidemics of Plant Diseases: Monitoring, Prognosis, Control: Proc. of the Int. conf. Bolshie Vyazemy, 2017;1:81-84. (in Russian)]
- Саннин С.С., Пахолкова Е.В., Санина А.А., Карлова Л.В., Корнева Л.Г. Эпидемиология септориоза пшеницы: формирование инфекционных потенциалов возбудителей. Защита и карантин растений. 2018;5:25-29.  
[Sanin S.S., Pakholkova E.V., Sanina A.A., Karlova L.V., Korneeva L.G. Epidemiology of wheat leaf blotch: formation of infectious potentials of pathogens. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2018;5:25-29. (in Russian)]

- Торопова Е.Ю. Экологические основы защиты растений от болезней в Сибири. Новосибирск, 2005.  
[Toropova E.Yu. Ecological Fundamentals of Plant Protection Against Diseases in Siberia. Novosibirsk, 2005. (in Russian)]
- Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Пискарев В.В., Порсев И.Н., Христов Ю.А. Роль сортов и фунгицидов в контроле септориоза яровой пшеницы. *Агрохимия*. 2019;5:66-75. DOI 10.1134/S0002188119050107.  
[Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Piskarev V.V., Porsev I.N., Khristov Yu.A. The role of varieties and fungicides in the control of spring wheat septorios. *Agrokhimiya = Agrochemistry*. 2019;5:66-75. DOI 10.1134/S0002188119050107. (in Russian)]
- Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Селюк М.П. Мониторинг септориоза яровой пшеницы в лесостепи Западной Сибири. *Достижения науки и техники АПК*. 2016;30(12):33-35.  
[Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Selyuk M.P. Monitoring of *Septoria* blight on spring wheat in the forest-steppe of Western Siberia. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2016;30(12):33-35. (in Russian)]
- Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Селюк М.П., Инсебаева М.К., Кириченко А.А., Филипчук О.Д., Квитко А.В. Инфицированность семян пшеницы возбудителем септориоза *Parastagonospora nodorum* Berk. *Достижения науки и техники АПК*. 2018;32(12):15-19. DOI 10.24411/0235-2451-2018-11204.  
[Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Selyuk M.P., Insebaeva M.K., Kirichenko A.A., Filipchuk O.D., Kvitko A.V. Contamination of wheat seeds with *Parastagonospora nodorum* Berk. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2018;32(12):15-19. DOI 10.24411/0235-2451-2018-11204. (in Russian)]
- Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я., Чулкина В.А. Эпифитотологические основы систем защиты растений. Под ред. В.А. Чулкиной. Новосибирск, 2002.  
[Toropova E.Yu., Stetsov G.Ya., Chulkina V.A. Epiphytological Grounds of Plant Protection Systems. Chulkina V.A. (Ed.). Novosibirsk, 2002. (in Russian)]
- Тырышкин Л.Г., Ершова М.А. Наследование устойчивости образца мягкой пшеницы MN81330 к септориозу. *Генетика*. 2004;40(4):565-568.  
[Tyryshkin L.G., Ershova M.A. Inheritance of resistance to *Septoria* blotch in common wheat sample MN81330. *Russ. J. Genet*. 2004;40(4):454-457.]
- Чулкина В.А. Биологические основы эпифитотологии. М., 1991.  
[Chulkina V.A. Biological Fundamentals of Plant Epidemiology. Moscow, 1991. (in Russian)]
- Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я., Кириченко А.А., Мармулева Е.Ю., Гришин В.М., Казакова О.А., Селюк М.П. Фитосанитарная диагностика агроэкосистем. Под ред. Е.Ю. Тороповой. Барнаул, 2017.  
[Chulkina V.A., Toropova E.Yu., Stetsov G.Ya., Kirichenko A.A., Marmuleva E.Yu., Grishin V.M., Kazakova O.A., Selyuk M.P. Phytosanitary Diagnosis of Agroecosystems. Toropova E.Yu. (Ed.). Barnaul, 2017. (in Russian)]
- Adolf B., Schoff U., Verreet J.A. Effect of infection with *Septoria tritici* of different growth stages of wheat (GS 25 to GS 59) on dry matter production, nitrogen uptake and yield. *Meded. Jc. Landbauw wetensch.* 1993;53(3):1167-1174.
- Broennimann A. Contributions to genetics of tolerance towards *Septoria nodorum* Berk. in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Breed.* 1975;75:138-160.
- Cooke B.M., Jones D.G. The epidemiology of *S. tritici* and *S. nodorum*. II. Comparative studies of head infection by *S. tritici* and *S. nodorum* on spring wheat. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1970;56:121-125.
- Du C.G., Nelson L.R., McDaniel M.E. Diallel analysis of gene effects conditioning resistance to *Stagonospora nodorum* (Berk.) in wheat. *Crop Sci.* 1999;39(3):686-690.
- Eyal Z. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 1999;105(7):629-641.
- Jenkins P.D., Jones D.G. The effect of dual inoculation of wheat cultivars with *S. tritici* and *S. nodorum*. *Phytopathologische Zeitschrift.* 1981;101(3):210-221.
- Mullaney E.J., Martin J.M., Scharen A.L. Generation mean analysis to identify and partition the components of genetic resistance to *Septoria nodorum* in wheat. *Euphytica.* 1981;31:539-545.
- Nolan S., Cooke B.M., Monahan F.J. Studies on the interaction between *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 1999;105(9):917-925.
- Parker S.R., Welham S., Paveley N.D., Foulkes J., Scott R.K. Tolerance of *Septoria* leaf blotch in winter wheat. *Plant Pathol.* 2004;53(1):1-10.
- Robert C., Bancal M.-O., Nicolas P., Lannou Ch., Ney B. Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *J. Exp. Bot.* 2004;55(399):1079-1094.
- Scharen A.L., Krupinsky J.M. Cultural and inoculation studies of *Septoria nodorum*, cause of glume blotch of wheat. *Phytopathology.* 1970;60(10):1480-1485.
- Simón M.R., Cordo C.A., Perelló A.E., Struik P.C. Influence of nitrogen supply on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *J. Phytopathol.* 2003;151(5):283-289.
- Van Ginkel M., Rajaram S. Breeding for resistance to the *Septoria/ Stagonospora* blights of wheat. In: Van Ginkel M., McNab A., Krupinsky J.M. (Eds.). *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: a Compilation of Global Research: Proc. of the Fifth Int. Septorial Workshop.* Mexico, 1999:117-126.

**ORCID ID**

V.V. Piskarev orcid.org/0000-0001-9225-5227

**Благодарности.** Работа поддержана бюджетными проектами Всероссийского НИИ фитопатологии (0598-2015-0001) и ФИЦ ИЦиГ СО РАН (№ 0324-2019-0039).

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

Поступила в редакцию 16.07.2019. После доработки 18.01.2020. Принята к публикации 21.01.2020.

# Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в генной инженерии

А.С. Розанов<sup>1</sup>✉, Е.Г. Першина<sup>1</sup>, Н.В. Богачева<sup>1</sup>, В. Шляхтун<sup>1</sup>, А.А. Сычев<sup>2</sup>, С.Е. Пельтек<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ООО «Инновационный центр «Бирюч-НТ», Белгородская область, Россия

✉ e-mail: sibiryak.n@gmail.com

**Аннотация.** Метилотрофные дрожжи используются в качестве платформы для экспрессии гетерологичных белков с 1980-х гг. Они имеют высокий уровень продукции и позволяют получить белки эукариот с приемлемым уровнем гликозилирования. Первая система для экспрессии рекомбинантного белка на основе *Pichia pastoris* была разработана на основе штамма, выделенного из сокаотечения деревьев на юго-западе США. Система распространялась бесплатно в научных целях и применяется во всем мире. В ходе классификации метилотрофных дрожжей по молекулярно-биологическим маркерам штаммы, используемые для получения рекомбинантного белка, были реклассифицированы как *Komagataella phaffii*. Они находятся в свободном доступе согласно патентному законодательству, однако распространялись на договорной основе. Это делает неопределенным их статус для коммерческого использования и, соответственно, стимулирует поиск альтернативных штаммов для экспрессии рекомбинантного белка. Были адаптированы штаммы других видов метилотрофных дрожжей, среди которых преобладают представители рода *Ogataea*. Несмотря на филогенетическую удаленность представителей рода *Ogataea* и *Komagataella*, во всех случаях оказалось возможным использовать классические векторы и промоторы для экспрессии рекомбинантного белка. Существуют системы экспрессии на основе других штаммов рода *Komagataella*, а также рода *Candida*. Потенциал этих микроорганизмов для генной инженерии далеко не исчерпан. Перспективно как усовершенствование имеющихся систем экспрессии, так и создание новых на основе штаммов, выделенных из природных источников. Исторически до 2009 г. в качестве систем экспрессии использовались штаммы, выделенные на юго-западе США. В настоящее время начали развиваться системы экспрессии на основе штаммов, полученных в Таиланде. Поскольку эта группа микроорганизмов широко представлена по всему миру как в природной, так и в городской среде, можно ожидать появления систем экспрессии рекомбинантных белков, созданных на основе штаммов, выделенных и в других регионах планеты. Ключевые слова: метилотрофные дрожжи; *Pichia pastoris*; *Ogataea*; *Komagataella*; рекомбинантные ферменты.

**Для цитирования:** Розанов А.С., Першина Е.Г., Богачева Н.В., Шляхтун В., Сычев А.А., Пельтек С.Е. Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в генной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):149-157. DOI 10.18699/VJ20.602

## Diversity and occurrence of methylotrophic yeasts used in genetic engineering

A.S. Rozanov<sup>1</sup>✉, E.G. Pershina<sup>1</sup>, N.V. Bogacheva<sup>1</sup>, V. Shlyakhtun<sup>1</sup>, A.A. Sychev<sup>2</sup>, S.E. Peltek<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> Innovation Centre Biruch-NT, Belgorod region, Russia

✉ e-mail: sibiryak.n@gmail.com

**Abstract.** Methylotrophic yeasts have been used as the platform for expression of heterologous proteins since the 1980's. They are highly productive and allow producing eukaryotic proteins with an acceptable glycosylation level. The first *Pichia pastoris*-based system for expression of recombinant protein was developed on the basis of the tree-juice-derived strain obtained in the US southwest. Being distributed free of charge for scientific purposes, this system has become popular around the world. As methylotrophic yeasts were classified in accordance with biomolecular markers, strains used for production of recombinant protein were reclassified as *Komagataella phaffii*. Although patent legislation suggests free access to these yeasts, they have been distributed on a contract basis. Whereas their status for commercial use is undetermined, the search for alternative strains for expression of recombinant protein continues. Strains of other species of methylotrophic yeasts have been adapted, among which the genus *Ogataea* representatives prevail. Despite the phylogenetic gap between the genus *Ogataea* and the genus *Komagataella* representatives, it turned out possible to use classic vectors and promoters for expression of recombinant protein in all cases. There exist expression systems based on other strains of the genus *Komagataella* as well as the genus *Candida*. The potential of these microorganisms for genetic engineering is far from exhausted. Both improvement of existing expression systems and development of new ones on the basis of strains obtained from nature are advantageous. Historically, strains obtained

on the southwest of the USA were used as expression systems up to 2009. Currently, expression systems based on strains obtained in Thailand are gaining popularity. Since this group of microorganisms is widely represented around the world both in nature and in urban environments, it may reasonably be expected that new expression systems for recombinant proteins based on strains obtained in other regions of the globe will appear.

Key words: methylotrophic yeasts; *Pichia pastoris*; *Ogataea*; *Komagataella*; recombinant enzymes.

**For citation:** Rozanov A.S., Pershina E.G., Bogacheva N.V., Shlyakhtun V., Sychev A.A., Peltek S.E. Diversity and occurrence of methylotrophic yeasts used in genetic engineering. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):149-157. DOI 10.18699/VJ20.602

## Введение

Метилотрофы – группа микроорганизмов, способных использовать одноуглеродные производные метана, такие как метанол, метиламин и др., в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом все связи С–С должны ферментативно формироваться клеточным метаболизмом, что является достаточно трудной для клетки задачей. На это способны некоторые грамотрицательные протеобактерии и грамположительные бактерии (Antony, 1986), а также дрожжи (Wegner, Harder, 1987), имеющие метаболические пути окисления метанола для производства энергии и формирования С–С-связей. Как у дрожжевых, так и у бактериальных микроорганизмов формирование С–С-связей идет через формальдегид (Yurimoto et al., 2005), токсичный промежуточный продукт, который затем либо диссимилирует в CO<sub>2</sub>, либо ассимилируется в биомассу.

Метилотрофные дрожжи были открыты в конце 1960-х гг., когда метилотрофные бактерии уже были хорошо известны. Расхождение во времени открытия связано главным образом со сложностью выделения дрожжей и высоким бактериальным загрязнением образцов (Троценко, Торгонская, 2011). Среды обитания метилотрофных дрожжей – все те, где есть разложение растительного материала с образованием метоксильных групп (почва, поваленные деревья, испорченные фрукты и т. д.). В природе метанол образуется в ходе окисления метана (например, метанооксиляющими бактериями в ризосфере растений), а также при разложении пектина и лигнина (MacDonald, Fall, 1993; Nakagawa et al., 2000). Большинство природных изолятов метилотрофных дрожжей были обнаружены в сокотечении (экссудатах) деревьев или гниющей древесине (Kurtzman, Robnett, 1998; Kurtzman, 2005).

Биотехнологический интерес к метилотрофным организмам возник в начале 1970-х гг., когда метанол был дешевым и считался практически неограниченным сырьем на основе ископаемых ресурсов. Но после нефтяного кризиса 1973 г. цены на углеводороды уже не опускались до прежних значений. Вместо кормового белка из одноклеточных метилотрофов разработчики сосредоточились на получении белка растительного происхождения, в первую очередь сои.

Начиная с 80-х гг. прошлого века метилотрофные дрожжи опять нашли широкое применение, но уже в других областях. Они используются в качестве платформы для генной инженерии и получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах и служат удобным объектом для изучения особенностей организации эукариотической клетки. Разрабатываются возможности использования метилотрофных дрожжей в прикладных целях: как мар-

керов загрязнения морского берега, для очистки стоков сульфат-целлюлозного производства и ликеро-водочных заводов, очистки воздуха, загрязненного формальдегидом, и т. д. (Kutty, Philip, 2008; Троценко, Торгонская, 2012; dos Reis et al., 2018).

Наиболее часто в науке и производстве используют метилотрофные дрожжи вида *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*). Они способны усваивать как сахар, так и метанол и дают высокий выход белка. Первоначально в 1970-х гг. компанией Phillips Petroleum было предложено использовать *P. pastoris* в качестве продуцента белка одноклеточных, благодаря их способности расти до высокой плотности как на глюкозе, так и на метаноле (Mishra, Baranwal, 2009). Максимальная плотность клеток, достигаемая в процессе ферментации, превышает 100 г/л сухой массы (Wegner, 1981). В 1980-х на основе *P. pastoris* была разработана система экспрессии гетерологичного белка с использованием сильного и строго регулируемого промотора *AOX1* алкогольоксидазы (Cregg et al., 1985). В сочетании с уже существующими технологиями ферментации для производства кормового белка промотор *AOX1* обеспечивал исключительно высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. Важная особенность промотора *AOX1* при производстве рекомбинантных белков – высокий уровень его экспрессии в присутствии метанола и надежное ингибирование при его отсутствии, что позволяет регулировать процесс наработки целевых белков, включая аутоксичные варианты (Kurtzman, 2009). Одним из первых крупномасштабных процессов промышленного производства, созданным в 1990-х гг., стало производство растительной ферментной гидроксинитрильной лиазы с выходом более 20 г рекомбинантного белка на литр культуры (Hasslacher et al., 1997).

Другое преимущество *P. pastoris*, помимо промотора *AOX1*, – это низкий уровень гликозилирования. Например, *S. cerevisiae* сейчас вытеснены из производства рекомбинантных белков, так как нередко гипергликозилируют белки, вплоть до их инактивации (Darby et al., 2012).

К настоящему времени системы экспрессии на основе *P. pastoris* широко используются в фундаментальных исследованиях. *P. pastoris* были разработаны первыми среди метилотрофных дрожжей и оказались удобными для биотехнологического получения эукариотических белков, не экспрессирующихся должным образом в бактериях. Активному их распространению в качестве платформы для экспрессии рекомбинантного белка особенно способствовало дальновидное решение компании Phillips Petroleum сделать систему экспрессии доступной для научного сообщества в исследовательских целях. К востребованным коммерчески доступным штаммам

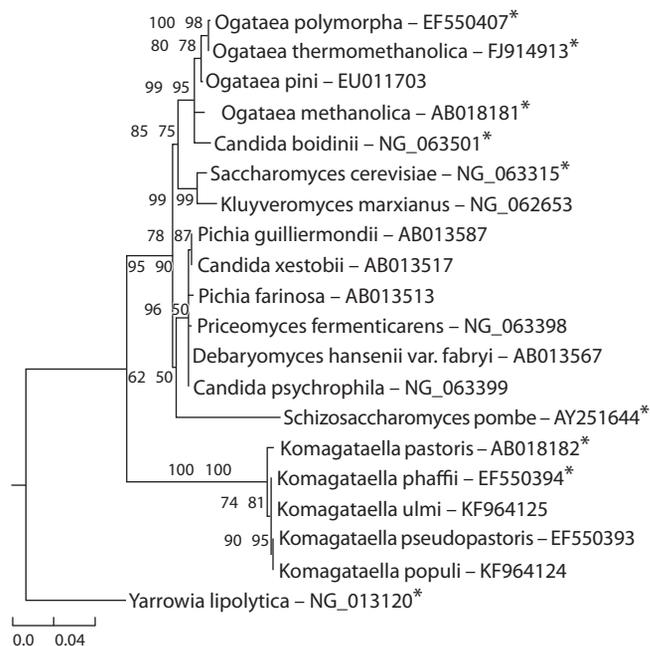
относятся: штамм GS115, ауксотрофный по гистидину; восстановленный прототрофный штамм X-33; нокаутные по *aox1* штаммы KM71 и KM71H, а также дефицитные по протеазам штаммы SMD1168 и SMD1168H и ауксотрофный штамм *ade2* *PichiaPink*<sup>TM</sup>. Однако применение этих штаммов в коммерческих целях ограничено политикой распространения материала. В связи с этим встал вопрос о поиске альтернативных вариантов, которые могли бы прийти на замену запатентованным штаммам *P. pastoris*.

### Филогенетический анализ

С развитием методов молекулярной биологии и накоплением данных о последовательностях генов для разных видов стало возможным разобраться в филогении метилотрофных дрожжей. И здесь был выявлен ряд неожиданных моментов.

Анализ последовательности генов показал, что дрожжи, известные под общим родовым наименованием *Pichia*, не являются монофилетическими, несмотря на фенотипическое сходство большинства видов. Авторы первых работ установили, что ассимилирующие метанол виды *P. pastoris*, *P. angusta* и *Hansenula polymorpha* отдаленно связаны друг с другом и с *P. membranifaciens*, типовым видом рода *Pichia*. Ямада с коллегами (Yamada et al., 1994, 1995) предложили перенести *P. pastoris* в новый род *Komagataella*, а *P. angusta* классифицировать как *Ogataea polymorpha* во вновь описанный род *Ogataea*. Основанием для выделения новых родов послужил анализ дивергенции в частичных последовательностях рибосомальной РНК (рРНК) большой ядерной субъединицы (LSU) и малой ядерной субъединицы (SSU). Поскольку в каждый анализ было включено относительно немного видов, оставалось неясным, насколько тесно связаны *P. pastoris* и *P. angusta* (*H. polymorpha*) с многочисленными неисследованными видами, и предложение о включении в классификацию новых родов не было принято (Kurtzman, 1998). Однако анализ доменов D1/D2 последовательностей генов рРНК LSU для всех известных в настоящее время аскомицетных дрожжей подтвердил разделение на *Komagataella*, *Ogataea* и *Pichia* (Kurtzman, Robnett, 1998), а филогенетическое разделение, продемонстрированное при изучении последовательности одного гена, было подтверждено в ходе анализа мультигенных последовательностей (Kurtzman et al., 2008). Таким образом, *Komagataella*, *Ogataea* и *Pichia* филогенетически представляют собой отдельные роды. С точки зрения таксономии более правильным названием является *Komagataella pastoris*, но исторически и по сей день наиболее распространенным остается название *P. pastoris*.

Позднее было установлено, что под видовым названием *P. pastoris* объединено по меньшей мере два вида дрожжей – *Komagataella phaffii* и *K. pastoris* (Cregg et al., 1993; Kurtzman, 2009). Анализ последовательности генов показал, что это не единственные представители рода *Komagataella*. К роду *Komagataella* были отнесены *P. pseudopastoris* на основе анализа рРНК LSU и SSU (Dlauchy et al., 2003), а также вид *K. phaffii* на основании анализа фрагмента D1/D2 гена рРНК LSU (Kurtzman et al., 2008).



Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 18S рРНК видов семейства Saccharomycetaceae с помощью метода максимального правдоподобия.

Коэффициенты поддержки SH-Like aLRT и UfBoot (%) обозначены в узлах ветвей дерева. Справа от видовых названий приведены идентификационные номера соответствующих последовательностей в базе данных NCBI. Звездочкой помечены виды, на которых созданы системы экспрессии гетерологического белка.

Развитие методов массового параллельного секвенирования привело к накоплению информации о геномных последовательностях большого числа микроорганизмов, в том числе и метилотрофных дрожжей, что позволяет проводить более подробный филогенетический анализ. Наиболее распространенным и консервативным маркером для анализа филогенетических отношений между различными представителями грибов является последовательность гена 18S rRNA. Соответствующие гены были экстрагированы из геномов метилотрофных дрожжей, представленных в базе данных NCBI, и использованы для построения филогенетического дерева (см. рисунок).

Нуклеотидные последовательности были выровнены с помощью алгоритма MAFFT в программе MAFFT v7.312 (Katoh, Standley, 2013). Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия в программе IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Для определения лучшей схемы моделей нуклеотидных замен использовались параметры –auto и +R (FreeRate heterogeneity), основным параметром служило наименьшее значение критерия Акаике (AICc). Для статистической поддержки максимального правдоподобия в программе IQ-TREE применялись два коэффициента: SH-like aLRT (1000 репликаций) и сверхбыстрый бутстреп (UfBoot, 1000 репликаций).

Метилотрофные дрожжи, используемые для производства рекомбинантного белка, разделились на три клады: *Pichia*, *Ogataea* и *Komagataella* (см. рисунок). Можно сделать вывод о том, что род *Ogataea* филогенетически более гетерогенный в сравнении с *Pichia* и *Komagataella*.

## Метилотрофные дрожжи, используемые для производства рекомбинантного белка в качестве альтернативных штаммов, и их распространение в природе

*P. pastoris* (*K. phaffii* и *K. kurtzmanii*). Группа дрожжей *P. pastoris*, большинство представителей которой после ревизии классификации было отнесено к роду *Komagataella*, наиболее изучена среди метилотрофных дрожжей. Типичная среда обитания – сокоотечение деревьев от умеренного до тропического регионов. Впервые *P. pastoris* были выделены из сокоотечения каштана во Франции, в дальнейшем обнаружено их широкое распространение в Венгрии и США (Spencer et al., 1996; Negruta et al., 2010; Kurtzman, 2011a). Кроме того, дрожжи *P. pastoris* найдены в сокоотечении масличной пальмы в Нигерии (Faparusi, 1974), соке белого альгарробо в Аргентине (Spencer et al., 1995) и красного дуба в Канаде (Bowles, Lachance, 2007). Интересно отметить зональность их распространения: в лесах тихоокеанского побережья северо-западной части США это доминирующий вид метилотрофных дрожжей, в Европе, Африке и Южной Америке они встречаются, но не преобладают, а в Японии их вообще не обнаружено (Lachance et al., 1982).

Несмотря на распространенность системы экспрессии, запатентованной Philips Petroleum на основе *P. pastoris*, идет поиск альтернативных штаммов метилотрофных дрожжей с целью разработки платформ для производства рекомбинантного белка, не защищенных патентами от коммерческого использования.

Штамм *P. pastoris* (*K. phaffii*) CBS7435 наиболее близок к предложенным в свое время компанией Philips Petroleum. Полученные на его основе штаммы патентно не защищены (Ahmad et al., 2014). При этом он является предшественником запатентованных штаммов, наиболее используемых в настоящее время в производстве рекомбинантного белка. С одной стороны, это облегчает применение производных штамма CBS7435 ввиду широкой базы знаний, полученных с их помощью, с другой стороны, не все модификации генома для данного штамма можно патентовать из-за их описания в академической литературе и патентах.

Использование штамма *K. kurtzmanii* Y-727/КБП 2878/Starmer 75-208.2/CBS 12817/NRRL Y-63667 в качестве реципиента для конструирования продуцентов целевого белка было запатентовано в Российской Федерации. Этот штамм выделен проф. Стармером из сокоотечения пихты, растущей в горах Аризоны, США (Naumov et al., 2013), и является одним из наиболее близких родственников штамма *P. pastoris* (*K. phaffii*) CBS7435.

*P. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). Источники выделения представителей спорообразующего вида *P. guilliermondii* разнообразны: растения, озерная вода, коровий рубец, загрязненные нефтью почвы. Кроме того, дрожжи были обнаружены в насекомых, живущих на вязах; в незагрязненной почве и воде (Negruta et al., 2010a); в креветках и других беспозвоночных; в морской воде со сниженной концентрацией соли (Kutty, Philip, 2008). Ранее дрожжи этого вида использовались в генной инженерии, но как источник генов, которые в том числе были экспрессированы в *P. pastoris* (Handumrongkul

et al., 1998; Zhang et al., 2009), а не в качестве системы экспрессии.

Поскольку большинство метилотрофных дрожжей имеют сходный метанол-индуцируемый промотор в путях утилизации метанола (Hartner, Glieder, 2006), группа исследователей из Малайзии проверила предположение о возможности использования экспрессирующих конструкций, разработанных на *K. phaffii*, для экспрессии рекомбинантного белка в других метилотрофных дрожжах (Oslan et al., 2015). Они выделили штамм, названный *Pichia sp. strain SO*, из испорченного апельсина; последовательность SSU показала его 100 % сходство с *P. guilliermondii*. Далее авторы установили, что зеоцин может быть использован в качестве селекционного маркера для штамма SO (Oslan et al., 2012), и провели работы по клонированию конструкции, экспрессирующей рекомбинантную липазу. Исследование получило дальнейшее развитие, и в 2017 г. была опубликована статья с описанием оптимизации экспрессии ранее полученного на основе *P. guilliermondii* продуцента липазы T1 из *Geobacillus zalihae*. В работе продемонстрировано трехкратное увеличение продукции липазы (Abu et al., 2017).

*P. (Ogataea) methanolica* была предложена компанией Invitrogen (США) в качестве платформы для продукции рекомбинантных белков несколько позже, чем *P. pastoris*. Впервые ее выделили из пробы почвы в Японии в 1974 г., штаммы этого вида также были выделены в США (Sibirny, 1996; Kurtzman, 2011b). В 2008 г. дрожжи этой группы (гетерогенной, как и *P. pastoris*) были выделены на территории России из галлов ивы (Glushakova et al., 2010). *P. (O.) methanolica* не нашла широкого применения как платформа для получения рекомбинантного белка, хотя есть отдельные сообщения о ее использовании, например, для экспрессии глутаматдекарбоксилазы человека (Raymond et al., 1998). Возможно, низкое распространение *P. (O.) methanolica* с целью получения рекомбинантного белка обусловлено наличием у Invitrogen другой платформы – на основе *P. pastoris* (*K. phaffii*).

*Hansenula (O.) polymorpha* – это широко распространенные в природе термотолерантные метилотрофные дрожжи, способные расти при температуре до 50 °С. Одной из характерных сред обитания *H. polymorpha*, помимо обычных для метилотрофных дрожжей гниющих фруктов и других растений, является организм насекомых, в том числе лабораторных линий *Drosophila melanogaster* (Spencer J., Spencer D., 1997).

В науке *H. polymorpha* использовали как модельный организм для изучения механизмов пероксисомального биогенеза и деградации, регуляции метаболизма метанола, ассимиляции нитратов и реакции на стресс (van der Klei et al., 2006). Дрожжи оказались достаточно эффективны и для продукции рекомбинантных белков (Gellissen, 2005). Наиболее значимым терапевтическим белком, полученным с использованием *H. polymorpha*, является рекомбинантный антиген вируса гепатита В (HBsAg), который был успешно коммерциализирован под торговыми марками HepaVax-Gene и AgB (Seo et al., 2008). На основе *H. polymorpha* разработаны продуценты рекомбинантных белков с высоким потенциалом для фармацевтических целей: гирудин из пиявки *Hirudinaria manillensis*

(Weydemann et al., 1995) и некоторые человеческие белки, включая  $\alpha$ 1-антитрипсин (Kang et al., 1998), IFN $\alpha$ -2a (Degelmann et al., 2002), сывороточный альбумин (Kang et al., 2001), эпидермальный фактор роста (Heo et al., 2002) и паратиреоидный гормон (Sohn et al., 2012). Помимо белков медицинского назначения, были разработаны продуценты пищевых и промышленных ферментов: гекозооксидазы (Cook, Thygesen, 2003), фитазы (Mayer et al., 1999), левансуказы из *Zymomonas mobilis* (Park et al., 2004) и глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* (Kim et al., 2004).

***P. (O.) thermomethanolic***. Одним из наиболее проработанных вариантов метилотрофных дрожжей для продукции рекомбинантного белка, кроме представленных в Invitrogen, в настоящее время можно считать штамм *O. thermomethanolic* BCC16875. Распространение *O. thermomethanolic* практически не изучено, поскольку этот вид дрожжей открыт совсем недавно – в 2005 г. в образцах почвы в Таиланде (Limtong et al., 2005).

Информация о штамме BCC16875 впервые была опубликована группой исследователей из Таиланда в 2012 г. Они описали проверку возможности использования молекулярно-биологических инструментов для наработки рекомбинантного белка в выбранном штамме. Классические промоторы гена метанол-индуцируемой алкогольоксидазы (*AOX1*) и конститутивные гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAP*), используемые для работы с *P. pastoris*, проявили свою активность в новом штамме. Рекомбинантная фитаза и ксиланаза экспрессировались с обоих промоторов в виде секретируемых белков, причем первый демонстрировал различные паттерны N-гликозилирования в зависимости от промотора и культуральной среды. Основным видом олигосахаридов гликопротеинов, продуцируемым *O. thermomethanolic* BCC16875, является Man8-12GlcNAc2, который аналогичен таковому у других метилотрофов. Кроме того, обнаружены также модификации маннозил фосфата и  $\alpha$ -1,6- и  $\alpha$ -1,2-маннозы гетерологичного секретируемого белка. Уровень экспрессии рекомбинантного белка оказался на уровне промышленных штаммов, что делает предложенную платформу хорошей альтернативой штаммам от Invitrogen (Tanapongpipat et al., 2012).

В последние годы были изучены промоторы, характерные для штамма *O. thermomethanolic* BCC16875 (Harnpicharnchai et al., 2014; Promdonkoy et al., 2014), исследовались методы культивирования высокой плотности для экспрессии рекомбинантных белков (Charoenrat et al., 2016). Кроме того, начаты работы по оптимизации метаболизма штамма для увеличения выхода целевых продуктов. Так, с этой целью был увеличен уровень экспрессии вспомогательных белков эндоплазматического ретикула (Roongsawang et al., 2016). Особенно активно штамм стал изучаться после 2016 г.; появилось значительное число работ по доведению его до современного уровня в качестве экспрессирующей системы. В 2018 г. для работы со штаммом была адаптирована система CRISPR-Cas9 (Phithakrotchanakoon et al., 2018b), сконструирована новая система экспрессии, основанная на индукции сахарозой (Puseenam et al., 2018; Woonchoo et al., 2019), были продолжены исследования метаболизма на протеомном и транскриптомном уровне (Phithakrotchanakoon et al., 2018a).

***Candida boidinii*** – первый описанный вид метилотрофных дрожжей и, по-видимому, наиболее распространенный в естественной среде (Ogata et al., 1969). В основном это различные растительные субстраты (сок деревьев, испорченные фрукты, некоторые цветы). Дрожжи обильно представлены также в оливках натуральной ферментации (Coton et al., 2006), обнаружены в кактусах – в их гнилых частях встречается как *C. boidinii*, так и *O. polymorpha*, хотя и не преобладают среди выделенных в этих пробах дрожжей. *C. boidinii* являются важным маркером загрязнения морского берега. Их линии доминируют во многих пробах воды и песка в Бразилии (Kutty, Philip, 2008).

Согласно филогенетическому дереву, построенному по гену 18S rRNA (см. рисунок), *C. boidinii* скорее можно отнести к роду *Ogataea*. Группа исследователей из Японии до 2009 г. разрабатывала *C. boidinii* как платформу для продукции рекомбинантных белков, альтернативную *P. pastoris* (Yurimoto, Sakai, 2009). Система экспрессии рекомбинантного белка на основе *C. boidinii* имеет некоторые характеристики, которые могут быть полезными по сравнению с другими метилотрофными дрожжами. Выбор различных источников углерода приводит к трем различным уровням экспрессии в *C. boidinii*: промотор *AOD1* показывает высокий уровень экспрессии в клетках, выращенных на метаноле или метаноле с глицерином в качестве источника углерода, средний уровень экспрессии в клетках, выращенных на глицерине, и блокирование экспрессии при культивировании на глюкозе или этаноле (Sakai et al., 1995; Yurimoto et al., 2000). Уровень экспрессии у *C. boidinii* значительно выше, чем у *O. polymorpha*. Кроме того, высокий уровень экспрессии у *C. boidinii* может быть получен с использованием среды метанол + глицерин, что позволяет сократить время культивирования для достижения высокой плотности клеток. У *P. pastoris* глицерин подавляет экспрессию генов, индуцируемых метанолом, поэтому требуется контроль полного выедания глицерина в среде до индукции метанолом. Как и для *P. pastoris*, для *C. boidinii* доступен штамм с нокаутированной вакуолярной протеиназой А (PEP4) и протеиназой В (PRB1) (Komeda et al., 2002). В ходе исследований с использованием системы экспрессии генов у *C. boidinii* были разработаны штаммы для производства токсичных белков – мембраносвязанная пероксисома, позволяющая накапливать токсичные белки (Nishikawa et al., 2000; Yurimoto et al., 2001), и эффективная система секреции для продукция активной транскламиназы (Yurimoto et al., 2004).

### Выделение метилотрофных дрожжей из природных источников

Дрожжи выделяют из водных, морских, атмосферных и наземных мест обитания. Они обитают в гниющих овощах и фруктах, плесени, соке и коре деревьев, в насекомых-ксилофагах, пищеварительном тракте свиней, молоке больных маститом коров, в лесных, садовых и заброшенных почвах, особенно орошаемых сточными водами, в водорослях и т. д. (Negruta et al., 2010; Троценко, Торгонская, 2011). Эти экологические предпочтения связаны, по всей видимости, с образованием метоксильных групп при разложении лигнина и пектина (Nakagawa et al.,

2005). Помимо соков фруктов и почвенных образцов, метилотрофные дрожжи обнаруживают в продуктах питания (Mu et al., 2012; Kozhakhmetov et al., 2016; Syromyatnikov et al., 2018).

Многие дрожжи распространены широко, тогда как некоторые имеют ограниченный ареал обитания. Они редко встречаются в природе в отсутствие мицелияриальных грибов и бактерий. Следовательно, для их выделения необходимы селективные методы, которые позволяют дрожжам иметь преимущество в скорости роста. При разработке сред для селективного выделения дрожжей обычно используют низкий pH, поскольку в таких условиях дрожжи имеют преимущество перед бактериями. Среда может также содержать антибиотики для подавления бактерий и фунгистатические агенты для подавления плесени (Kurtzman et al., 2011).

Когда дрожжи присутствуют в большом количестве, они могут быть выделены путем непосредственного нанесения материала или суспензий материала на подкисленную агаризованную среду, которая тоже может содержать антибиотики или иметь другие селективные свойства. Агар в среде с низким pH гидролизует при автоклавировании. Поэтому агар и среду стерилизуют отдельно, охлаждают до температуры ~45 °C, смешивают и разливают в чашки Петри. Большинство видов дрожжей можно культивировать при pH 3.7, но некоторые виды, такие как представители рода *Schizosaccharomyces*, требуют более высокого pH, в диапазоне от 4.5 до 5.0. Если в образце присутствует небольшое количество дрожжей, размер популяции можно увеличить, предварительно инкубируя образец в жидкой среде при pH до 3.8 (Kurtzman et al., 2011).

Для выделения конкретных физиологических групп дрожжей необходимо подбирать дополнительные селективные параметры. Метилотрофные дрожжи могут быть отобраны путем применения метанола в качестве единственного источника углерода и энергии в среде. Так, при выделении метилотрофных дрожжей с листьев винограда в Таиланде для получения накопительной культуры была использована среда YNB с добавлением 0.5 % метанола. Культивирование проводилось при 27 °C в течение четырех-пяти дней, после чего производился рассев накопительных культур на агаризованную среду YNB + 0.5 % метанола. В результате выделено два новых вида, отнесенных к роду *Ogataea* (Limtong et al., 2013).

## Заключение

Метилотрофные дрожжи применяются в качестве платформы для производства рекомбинантного белка. Первоначально они были вовлечены в сферу интересов биотехнологических компаний в качестве продуцентов белка одноклеточных, но в связи с нефтяным кризисом 1973 г. стоимость метанола повысилась и получение кормового белка из него стало неактуальным. В то же время, по мере открытия ключевых для молекулярной биологии белков, таких как термостабильные полимераза, лигазы и рестриктазы, стали развиваться методы модификации микроорганизмов, в том числе для продукции рекомбинантных белков.

Производство белков с использованием микроорганизмов активно развивалось с 1940-х гг. для различных целей, прежде всего для пищевой, кормовой и технологической отраслей. В первую очередь это было связано с использованием природных продуцентов, во многих случаях улучшенных с помощью ненаправленного мутагенеза. С появлением методов молекулярной биологии стало возможным разрабатывать продуценты белков, нетипичных для конкретного организма (гетерологичных или рекомбинантных белков), в том числе с использованием дрожжей.

На этой волне компания Phillips Petroleum разработала свою систему экспрессии рекомбинантных белков на основе *P. pastoris* (позднее переименована в *Komagataella phaffii*). Благодаря своим высоким технологическим качествам, а также принятому в Phillips Petroleum решению о ее свободном распространении для научных исследований, эта система широко применяется в качестве платформы для продукции рекомбинантного белка.

Важным для дальнейшего развития белок-экспрессирующих платформ является понимание ключевых свойств, способствовавших распространению экспрессирующих систем на основе *P. pastoris*. Первое свойство – высокий уровень продукции белка. Он ниже, чем у бактерий и мицелияриальных грибов, но выше, чем у других систем – клеток млекопитающих, растений и насекомых. Второе: дрожжи – это эукариоты. Они имеют все клеточные компартменты, необходимые для синтеза и сборки эукариотических белков, что позволяет им синтезировать белки, которые нельзя получить, используя бактериальные экспрессирующие системы. Третье – способность к синтезу внеклеточного белка, что удешевляет процесс производства. Четвертое – низкий уровень гликозилирования белков в сравнении со многими другими дрожжами.

Помимо *K. phaffii*, в качестве платформы для экспрессии рекомбинантного белка разрабатывались и другие метилотрофные дрожжи. Прежде всего отметим, что как патентно-независимую платформу было предложено использовать исходный для системы Invitrogen штамм *P. pastoris* CBS7435. В России запатентован штамм *Komagataella kurtzmanii* американского происхождения. В США в качестве альтернативных были созданы экспрессирующие платформы на основе рода *Ogataea*: *Hansenula (Ogataea) polymorpha* и *Pichia (Ogataea) methanolica*, последняя принадлежит Invitrogen. В Японии разработана альтернативная платформа на основе *Candida boidinii*; система развивалась до 2009 г., но позже этот организм не упоминался в качестве платформы для производства рекомбинантного белка. Исследователи Малайзии для продукции белка предложили штамм *P. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), а Таиланда – *P. thermomethanolica*.

Интересно отметить, что все штаммы дрожжей, с помощью которых создавали гетерологичные белки до 2009 г., имеют американское происхождение. В связи с этим возникает вопрос, не являются ли свойства, способствующие продукции белка в дрожжах, уникальными для американских изолятов. Более поздние исследования свидетельствуют о том, что это не совсем так. В те годы бурное развитие биологической науки, в том числе открытие новых базовых методов молекулярной биологии, происходило на юго-западе США, а разработка амери-

канскими исследователями первых штаммов велась в одном штате. По-видимому, этот факт стал основной причиной использования штаммов именно этого региона. Российский же патент копирует известные системы, что требует использования наиболее близких видов, которые в большинстве случаев имеют близкие географические ареалы обитания.

В целом альтернативные системы на основе метилотрофных дрожжей пока не получили значительного распространения. Причин для этого может быть множество. Наиболее вероятными представляются отсутствие заинтересованности у основных игроков рынка рекомбинантных белков и неспособность новых участников этого рынка вклиниться в процесс с новой системой. Например, китайские производители активно используют штаммы, полученные на основе штаммов Invitrogen. Тем не менее исследования новых систем экспрессии на основе метилотрофных дрожжей ведутся, возможны также доработки путем геномного редактирования уже имеющихся систем с целью повышения продукции белка и оптимизации его гликозилирования.

## Список литературы / References

- Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Метилотрофные дрожжи. М.: ТР-Принт, 2011.  
[Trotsenko Yu.A., Torgonskaya M.L. Methylotrophic Yeasts. Moscow: TR-Print Publ., 2011. (in Russian)]
- Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии. Журн. СФУ. Биология. 2012;5(3):243-279.  
[Trotsenko Yu.A., Torgonskaya M.L. Aerobic methylotrophs – promising objects of modern biotechnology. J. Siberian Federal University. Biology. 2012;5(3):243-279. (in Russian)]
- Abu M.L., Nooh H.M., Oslan S.N., Salleh A.B. Optimization of physical conditions for the production of thermostable T1 lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology. BMC Biotechnol. 2017;17:78. DOI 10.1186/s12896-017-0397-7.
- Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014;98:5301-5317. DOI 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Anthony C. Bacterial oxidation of methane and methanol. Adv. Microbial Physiol. 1986;27:113-210. DOI 10.1016/S0065-2911(08)60305-7.
- Boonchoo K., Puseenam A., Kocharin K., Tanapongpipat S., Roongsawang N. Sucrose-inducible heterologous expression of phytase in high cell density cultivation of the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. FEMS Microbiol. Lett. 2019;366(5). DOI 10.1093/femsle/fnz052.
- Bowles J.M., Lachance M.-A. Patterns of variation in the yeast flora of exudates in an oak community. Can. J. Bot. 2007;61(12):2984-2995. DOI 10.1139/b83-335.
- Charoenrat T., Antimanon S., Kocharin K., Tanapongpipat S., Roongsawang N. High cell density process for constitutive production of a recombinant phytase in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* using table sugar as carbon source. Appl. Biochem. Biotechnol. 2016;180:1618-1634. DOI 10.1007/s12010-016-2191-8.
- Cook M.W., Thygesen H.V. Safety evaluation of a hexose oxidase expressed in *Hansenula polymorpha*. Food Chem. Toxicol. 2003;41:523-529. DOI 10.1016/S0278-6915(02)00280-6.
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S., Sohier D. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. Int. J. Food Microbiol. 2006;108:130-135. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016.
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., Madden K.R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. Mol. Cell. Biol. 1985;12(12):3376-3385. DOI 10.1128/mcb.5.12.3376.
- Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology (NY). 1993;11:905-910. DOI 10.1038/nbt0893-905.
- Darby R.A.J., Cartwright S.P., Dilworth M.V., Bill R.M. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (Review). In: Bill R.M. (Ed.). Recombinant Protein Production in Yeast: Methods and Protocols. Humana Press, 2012;11-23. DOI 10.1007/978-1-61779-770-5\_2.
- Degelema A., Müller F., Sieber H., Jenzelewski V., Suckow M., Strasser A.W.M., Gellissen G. Strain and process development for the production of human cytokines in *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2002;2:349-361. DOI 10.1016/S1567-1356(02)00096-X.
- Dlauchy D., Tornai-Lehoczki J., Fülöp L., Péter G. *Pichia (Komagataella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. Antonie van Leeuwenhoek. 2003;83:327-332. DOI 10.1023/A:1023318829389.
- dos Reis K.C., Arrizon J., Amaya-Delgado L., Gschaedler A., Schwan R.F., Silva C.F. Volatile compounds flavoring obtained from Brazilian and Mexican spirit wastes by yeasts. World J. Microbiol. Biotechnol. 2018;34(152). DOI 10.1007/s11274-018-2535-3.
- Faparusi S.I. Microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) tap holes. J. Food Sci. 1974;39(4):755-757. DOI 10.1111/j.1365-2621.1974.tb17972.x.
- Gellissen G. (Ed.). Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. John Wiley & Sons, 2005.
- Glushakova A.M., Maximova I.A., Kachalkin A.V., Yurkov A.M. *Ogataea cecidiorum* sp. nov., a methanol-assimilating yeast isolated from galls on willow leaves. Antonie van Leeuwenhoek. 2010;98(1):93-101. DOI 10.1007/s10482-010-9433-5.
- Handumrongkul C., Ma D.P., Silva J.L. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (*xy11*) in *Pichia pastoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998;49:399-404. DOI 10.1007/s002530051189.
- Hampichamchai P., Promdonkoy P., Sae-Tang K., Roongsawang N., Tanapongpipat S. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter from a thermotolerant yeast, *Pichia thermomethanolica*, for heterologous gene expression, especially at elevated temperature. Ann. Microbiol. 2014;64:1457-1462. DOI 10.1007/s13213-013-0765-z.
- Hartner F.S., Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. Microb. Cell Fact. 2006;5(39). DOI 10.1186/1475-2859-5-39.
- Hasslacher M., Schall M., Hayn M., Bona R., Rumbold K., Lückl J., Griengl H., Kohlwein S.D., Schwab H. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. Protein Expr. Purif. 1997;11:61-71. DOI 10.1006/prep.1997.0765.
- Heo J.H., Won H.S., Kang H.A., Rhee S.K., Chung B.H. Purification of recombinant human epidermal growth factor secreted from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Protein Expr. Purif. 2002;24(1):117-122. DOI 10.1006/prep.2001.1527.
- Kang H.A., Kang W., Hong W.K., Kim M.W., Kim J.Y., Sohn J.-H., Choi E.S., Choe K.B., Rhee S.K. Development of expression systems for the production of recombinant human serum albumin using the MOX promoter in *Hansenula polymorpha* DL-1. Biotechnol. Bioeng. 2001;76(2):175-185. DOI 10.1002/bit.1157.
- Kang H.A., Sohn J.-H., Choi E.-S., Chung B.H., Yu M.-H., Rhee S.-K. Glycosylation of human  $\alpha$ 1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. Yeast. 1998;14(4):371-381. DOI 10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<371::AID-YEA231>3.0.CO;2-1.
- Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 2013;30(4):772-780. DOI 10.1093/molbev/mst010.
- Kim M.W., Rhee S.K., Kim J.Y., Shimma Y.I., Chiba Y., Jigami Y., Kang H.A. Characterization of N-linked oligosaccharides assembled

- on secretory recombinant glucose oxidase and cell wall mannoproteins from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Glycobiology*. 2004;14(3):243-251. DOI 10.1093/glycob/cwh030.
- Komeda T., Sakai Y., Kato N., Kondo K. Construction of protease-deficient *Candida boidinii* strains useful for recombinant protein production: cloning and disruption of proteinase A gene (*PEP4*) and proteinase B gene... *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002;66(3):628-631. DOI 10.1271/bbb.66.628.
- Kozhakhmetov S., Tynybayeva I., Baikhanova D., Saduakhasova S., Saduakhasova G., Saduakhasova A., Nurgozhin T., Zhumadilov Z. Metagenomic analysis of koumiss in Kazakhstan. *Cent. Asian J. Glob. Health*. 2016;3(Suppl.). DOI 10.5195/cajgh.2014.163.
- Kurtzman C.P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55:973-976. DOI 10.1099/ijs.0.63491-0.
- Kurtzman C.P. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: Kurtzman C.P., Fell J.W. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. Elsevier, Bv, 1998; 273-352. DOI 10.1016/b978-044481312-1/50046-0.
- Kurtzman C.P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009;36:1435-1438. DOI 10.1007/s10295-009-0638-4.
- Kurtzman C.P. *Komagataella* Y. Yamada, Matsuda, Maeda & Mikata (1995). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. 5th edn. 2011a;491-495. DOI 10.1016/B978-0-444-52149-1.00037-9.
- Kurtzman C.P. *Ogataea* Y. Yamada, K. Maeda & Mikata (1994). In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. 5th edn. 2011b;645-671. DOI 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). *The Yeasts: A Taxonomical Study*. 5th edn. 2011;87-110. DOI 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998;73:331-371. DOI 10.1023/A:1001761008817.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J., Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene phylogenetic analysis and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* 2008;8(6):939-954. DOI 10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x.
- Kutty S.N., Philip R. Marine yeasts – a review. *Yeast*. 2008;25:465-483. DOI 10.1002/yea.1599.
- Lachance M.A., Metcalf B.J., Starmer W.T. Yeasts from exudates of *Quercus*, *Ulmus*, *Populus*, and *Pseudotsuga*: new isolations and elucidation of some factors affecting ecological specificity. *Microb. Ecol.* 1982;8:191-198. DOI 10.1007/BF02010452.
- Limtong S., Kaewwichian R., Groenewald M. *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov. and *Ogataea wangdongensis* sp. nov., two novel methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013;103:551-558. DOI 10.1007/s10482-012-9837-5.
- Limtong S., Srisuk N., Yongmanitchai W., Yurimoto H., Nakase T., Kato N. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55:2225-2229. DOI 10.1099/ijs.0.63712-0.
- MacDonald R.C., Fall R. Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. *Atmos. Environ.* 1993;27(11):1709-1713. DOI 10.1016/0960-1686(93)90233-0.
- Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., Lopez-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser A.W.M., Van Loon A.P.G.M. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for yeast production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 1999;63(3):373-381. DOI 10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<373::AID-BIT14>3.0.CO;2-T.
- Mishra S., Baranwal R. Yeast genetics and biotechnological applications. In: Satyanarayana T., Kunze G. (Eds). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, 2009;323-355. DOI 10.1007/978-1-4020-8292-4\_16.
- Mu Z., Yang X., Yuan H. Detection and identification of wild yeast in koumiss. *Food Microbiol.* 2012;31:301-308. DOI 10.1016/j.fm.2012.04.004.
- Nakagawa T., Miyaji T., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N., Tomizuka N. A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66(10):4253-4257. DOI 10.1128/AEM.66.10.4253-4257.2000.
- Nakagawa T., Yamada K., Fujimura S., Ito T., Miyaji T., Tomizuka N. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology*. 2005;151(6):2047-2052. DOI 10.1099/mic.0.27895-0.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013;104:339-347. DOI 10.1007/s10482-013-9956-7.
- Negruta O., Csutak O., Stoica I., Rusu E., Vassu T. Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Rom. Biotechnol. Lett.* 2010;15(4):5369-5375.
- Nishikawa M., Hagishita T., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y., Hatana-ka T. Primary structure and expression of peroxisomal acetylspemidine oxidase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* 2000;476:150-154. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01708-7.
- Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. A yeast capable of utilizing methanol. *Agr. Biol. Chem.* 1969;33(10):1519-1520. DOI 10.1080/00021369.1969.10859497.
- Oslan S.N., Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., Chor A.L.T. Locally isolated yeasts from Malaysia: identification, phylogenetic study and characterization. *Acta Biochim. Pol.* 2012;59(2):225-229. DOI 10.18388/abp.2012\_2142.
- Oslan S.N., Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C., Sukamat H., Basri M. A newly isolated yeast as an expression host for recombinant lipase. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2015;20(2):279-293. DOI 10.1515/cmb-2015-0015.
- Park B.S., Vladimir A., Kim C.H., Rhee S.K., Kang H.A. Secretory production of *Zymomonas mobilis* levansucrase by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Enzyme Microb. Technol.* 2004;34:132-138. DOI 10.1016/j.enzmictec.2003.09.005.
- Phithakrotchanakoon C., Puseenam A., Phaonakrop N., Roytrakul S., Tanapongpipat S., Roongsawang N. *Hac1* function revealed by the protein expression profile of a *OthAc1* mutant of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *Mol. Biol. Rep.* 2018a;45:1311-1319. DOI 10.1007/s11033-018-4287-4.
- Phithakrotchanakoon C., Puseenam A., Wongwisansri S., Eurwilai-chitr L., Ingsriswang S., Tanapongpipat S., Roongsawang N. CRISPR-Cas9 enabled targeted mutagenesis in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018b;365(11). DOI 10.1093/femsle/fny105.
- Promdonkoy P., Tirasophon W., Roongsawang N., Eurwilai-chitr L., Tanapongpipat S. Methanol-inducible promoter of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* BCC16875 potential for production of heterologous protein at high temperatures. *Curr. Microbiol.* 2014;69:143-148. DOI 10.1007/s00284-014-0568-x.
- Puseenam A., Kocharin K., Tanapongpipat S., Eurwilai-chitr L., Ingsriswang S., Roongsawang N. A novel sucrose-based expression system for heterologous proteins expression in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018;365(20). DOI 10.1093/femsle/fny238.
- Raymond C.K., Bukowski T., Holderman S.D., Ching A.F.T., Vana-ja E., Stamm M.R. Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast*. 1998;14:11-23. DOI 10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<11::AID-YEA196>3.0.CO;2-S.

- Roongsawang N., Pusencam A., Kitikhun S., Sae-Tang K., Hampicharnchai P., Ohashi T., Fujiyama K., Tirasophon W., Tanapongpipat S. A novel potential signal peptide sequence and overexpression of ER-resident chaperones enhance heterologous protein secretion in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016;178:710-724. DOI 10.1007/s12010-015-1904-8.
- Sakai Y., Rogi T., Takeuchi R., Kato N., Tani Y. Expression of *Saccharomyces adenylate kinase* gene in *Candida boidinii* under the regulation of its alcohol oxidase promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995;42:860-864. DOI 10.1007/BF00191182.
- Seo H.S., Park J.S., Han K.Y., Bae K.D., Ahn S.J., Kang H.A., Lee J. Analysis and characterization of hepatitis B vaccine particles synthesized from *Hansenula polymorpha*. *Vaccine.* 2008;26:4138-4144. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.05.070.
- Sibirny A.A. *Pichia methanolica* (*Pichia pinus* MH<sub>4</sub>). In: Wolf K. (Ed.). *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, 1996;277-291. DOI 10.1007/978-3-642-79856-6\_8.
- Sohn M.J., Oh D.B., Kim E.J., Cheon S.A., Kwon O., Kim J.Y., Lee S.Y., Kang H.A.H. *HpYPS1* and *HpYPS7* encode functional aspartyl proteases localized at the cell surface in the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast.* 2012;29:1-16. DOI 10.1002/yea.1912.
- Spencer D.M., Spencer J.F.T., Fengler E., de Figueroa L.I. Yeasts associated with algarrobo trees (*Prosopis* spp.) in northwest Argentina: a preliminary report. *J. Ind. Microbiol.* 1995;14:472-474. DOI 10.1007/BF01573960.
- Spencer D.M., Spencer J.F.T., de Figueroa L.I., Garro O., Fengler E. Yeasts associated with pods and exudates of algarrobo trees (*Prosopis* spp.) and species of columnar cacti in northwest Argentina. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996;44(6):736-739. DOI 10.1007/BF00178611.
- Spencer J.F.T., Spencer D.M. Ecology: where yeasts live. In: Spencer J.F.T., Spencer D.M. (Eds.). *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer, 1997;33-58. DOI 10.1007/978-3-662-03370-8\_4.
- Syromyatnikov M.Y., Kiryanova S.V., Popov V.N. Development and validation of a TaqMan RT-PCR method for identification of mayonnaise spoilage yeast *Pichia kudriavzevii*. *AMB Express.* 2018;8(186). DOI 10.1186/s13568-018-0716-y.
- Tanapongpipat S., Promdonkoy P., Watanabe T., Tirasophon W., Roongsawang N., Chiba Y., Eurwilaichitr L. Heterologous protein expression in *Pichia thermomethanolica* BCC16875, a thermotolerant methylotrophic yeast and characterization of N-linked glycosylation in secreted protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012;334:127-134. DOI 10.1111/j.1574-6968.2012.02628.x.
- Trifinopoulos J., Nguyen L.T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;(44):W232-W235. DOI 10.1093/nar/gkw256.
- van der Klei I.J., Yurimoto H., Sakai Y., Veenhuis M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1763(12):1453-1462. DOI 10.1016/j.bbamcr.2006.07.016.
- Wegner E.H. Biochemical Conversions by Yeast Fermentation at High Cell Densities. U.S. Pat. 4,414,329. Oct. 29, 1981.
- Wegner G.H., Harder W. Methylotrophic Yeasts – 1986. In: van Verseveld H.W., Duine J.A. (Eds.). *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds: Proc. of the 5th Int. Symp. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987;131-138.* DOI 10.1007/978-94-009-3539-6\_17.
- Weydemann U., Keup P., Piontek M., Strasser A.W.M., Schweden J., Gellissen G., Janowicz Z.A. High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* – authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995;4:377-385. DOI 10.1007/BF00169932.
- Yamada Y., Maeda K., Mikata K. The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994;58(7):1245-1257. DOI 10.1271/bbb.58.1245.
- Yamada Y., Matsuda M., Maeda K., Mikata K. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995;59(3):439-444. DOI 10.1271/bbb.59.439.
- Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. Characterization and high-level production of D-amino acid oxidase in *Candida boidinii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65(3):627-633. DOI 10.1271/bbb.65.627.
- Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *Chem. Rec.* 2005;5:367-375. DOI 10.1002/tr.20056.
- Yurimoto H., Komeda T., Lim C.R., Nakagawa T., Kondo K., Kato N., Sakai Y. Regulation and evaluation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1493:56-63. DOI 10.1016/S0167-4781(00)00157-3.
- Yurimoto H., Sakai Y. Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2009;53:85-92. DOI 10.1042/ba20090030.
- Yurimoto H., Yamane M., Kikuchi Y., Matsui H., Kato N., Sakai Y. The pro-peptide of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase functions in *cis* and in *trans* to mediate efficient secretion of active enzyme from methylotrophic yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004;68(10):2058-2069. DOI 10.1271/bbb.68.2058.
- Zhang T., Gong F., Chi Z., Liu G., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X. Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2009;95:13-22. DOI 10.1007/s10482-008-9281-8.

#### ORCID ID

E.G. Pershina orcid.org/0000-0003-2658-7906  
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

**Благодарности.** Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № 0259-2019-0005.

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

Поступила в редакцию 08.10.2019. После доработки 15.11.2019. Принята к публикации 19.12.2019.

## Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi

A.A. Kryukov<sup>1</sup>✉, A.O. Gorbunova<sup>1, 2</sup>, E.M. Machs<sup>3</sup>, Y.V. Mikhaylova<sup>3</sup>, A.V. Rodionov<sup>2, 3</sup>, P.M. Zhurbenko<sup>3</sup>, A.P. Yurkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

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

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

✉ e-mail: rainniar@rambler.ru

**Abstract.** Arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) form one of the most common symbiosis with the majority of land plants. AMF supply the plant with various mineral elements, primarily phosphorus, and improve the water supply. The search for the most effective AMF strains for symbiosis and the creation of microbial preparations on that basis is an important task for modern biology. Owing to the difficulties of cultivation without a host plant and their high genetic polymorphism, identifying AMF is very difficult. A high number of cryptic species often makes morphological identification unreliable. Recent years have seen a growth in the number of AMF biodiversity studies performed by modern NGS-based methods, Illumina MiSeq in particular. Currently, there are still many questions that remain for the identification of AMF. The most important are whether conservative or variable sequences should be used to select a marker for barcoding and whether universal primers or those specific to AMF should be used. In our work, we have successfully used universal primers ITS3 and ITS4 for the sequencing in Illumina MiSeq of the 5.8S rDNA – ITS2 region of the 35S rRNA genes, which contain both a conservative and variable regions. The molecular genetic approach for AMF identification was quite effective and allowed us to reliably identify eight of nine isolates to the species level: five isolates of *Rhizophagus irregularis*, and one isolate of *R. invermaius*, *Paraglomus laccatum*, and *Claroideoglomus etunicatum*, respectively. For all five *R. irregularis* isolates, high variability in the ITS region and the absence of ecotopic-related molecular characters in the ITS2 region were demonstrated. The NCBI data is still insufficient for accurate AMF identification of *Acaulospora* sp. isolates from the genus to the species level.

**Key words:** Glomeromycotina; arbuscular mycorrhiza; Illumina MiSeq; *Rhizophagus irregularis*; *R. invermaius*; *Paraglomus laccatum*; *Claroideoglomus etunicatum*; *Acaulospora*.

**For citation:** Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Machs E.M., Mikhaylova Y.V., Rodionov A.V., Zhurbenko P.M., Yurkov A.P. Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):158-167. DOI 10.18699/VJ19.38-o

## Перспективы использования Illumina MiSeq для идентификации грибов арбускулярной микоризы

A.A. Крюков<sup>1</sup>✉, A.O. Горбунова<sup>1, 2</sup>, Э.М. Мачс<sup>3</sup>, Ю.В. Михайлова<sup>3</sup>, A.B. Родионов<sup>2, 3</sup>, П.М. Журбенко<sup>3</sup>, A.П. Юрков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

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

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

✉ e-mail: rainniar@rambler.ru

**Аннотация.** Грибы арбускулярной микоризы (АМГ) образуют один из наиболее распространенных симбиозов с большинством наземных растений. АМГ снабжают растение различными минеральными элементами, в первую очередь, фосфором, а также улучшают водоснабжение. Поиск наиболее симбиотически эффективных штаммов АМГ и создание на их основе микробных препаратов – важная задача современной биологии. Идентификация АМГ очень сложна. Это связано, прежде всего, с высоким генетическим полиморфизмом АМГ, а также с трудностями их выращивания без растения-хозяина. Морфологическая идентификация АМГ часто ненадежна из-за большого числа криптических видов. В последние годы увеличивается число работ по изучению биологического разнообразия АМГ, проводимых современными методами на основе NGS (Next Generation Sequencing), в частности Illumina MiSeq. В настоящее время остается много вопросов по идентификации АМГ. К наиболее важным из них относятся: выбор маркера для генетического штрих-кодирования АМГ – консервативных или вариабельных последовательностей, а также выбор праймеров – специфичных для АМГ или универсальных. В настоящей работе мы успешно использовали универсальные праймеры ITS3 и ITS4 для секвенирования с Illumina MiSeq региона 5.8S рДНК – ITS2, содержащего как консервативные, так и вариабельные участки. Этот подход для идентификации АМГ оказался достаточно эффективным и позволил достоверно идентифицировать 8 из 9 изолятов до уровня вида: 5 – *Rhizophagus irregularis*, 1 – *R. invermaius*, 1 – *Paraglomus laccatum*, 1 – *Claroideoglomus etunicatum*. Для всех

изолятов *R. irregularis* показаны высокая вариабельность в области ITS и отсутствие связи с экоотопом клад, образуемых ITS на филогенетических деревьях. Для изолята *Acaulospora* sp., определенного до рода, данные NCBI все еще недостаточны для точной идентификации АМГ рода *Acaulospora* до вида.

Ключевые слова: Glomeromycotina; арбускулярная микориза; Illumina MiSeq; *Rhizophagus irregularis*; *R. invermaius*; *Paraglomus laccatum*; *Claroideoglomus etunicatum*; *Acaulospora*.

## Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) belonging to the subdivision Glomeromycotina are a relatively small yet diverse group. Various estimations report from 240 (Stockinger et al., 2014) to 348 species (Öpik et al., 2014). At the same time, AMF form mycorrhizal relationships with more than 200,000 species of land plants (Lee et al., 2013). Identification the AMF strains with the highest symbiosis efficiency is of great value for agricultural applications. To do it, we isolated, identified (Kryukov et al., 2017; Kryukov, Yurkov, 2018; Yurkov et al., 2018b), and evaluated the symbiotic efficiency (Yurkov et al., 2017a, b; Yurkov et al., 2018a) for a number of strains from the collection.

AMF are traditionally identified by more than 20 morphological characters (Schenk, Perez, 1990; Blaszkowski, 2019; INVAM, 2019; Schüßler, 2019). However, in some cases morphological identification fails to discriminate closely related species. A number of AMF species are morphologically indistinguishable. Furthermore, interspecific genetic polymorphism can sometimes be mistakenly treated as intraspecific polymorphism (Savary et al., 2017). Everything mentioned above may result in wrong estimations of AMF species. AMF usually cannot be cultivated on artificial media, thus making the identification very hard. As a result many AMF species are not studied at all, and so have not received the proper morphological description essential to their identification (Bruns et al., 2017). The type genus *Glomus* is a striking example of the taxonomic problems concerning species and genera identification. In the last twenty years, *Glomus* taxon has been revised a number of times, so that many *Glomus* species put under 14 other genera instead: *Ambispora*, *Claroideoglomus*, *Corymbiglomus*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Kamienskia*, *Pacispora*, *Paraglomus*, *Redeckera*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Septoglomus* (Schüßler, 2019). In this key, molecular-genetic identification of Glomeromycotina is very significant as the exponential increase in the number of AMF DNA sequences deposited in databases over the last ten years attests (NCBI, 2018).

The forementioned problems make the choice of the best method to identify Glomeromycotina genera and species very topical (Kryukov et al., 2017; Kryukov, Yurkov, 2018; Yurkov et al., 2018a).

The study of Glomeromycotina by molecular genetic methods is associated with a number of difficulties. One of the main problems is the high degree of genetic polymorphism, including polymorphism at the intraspecific level in the SSU–ITS1–5.8SrRNA–ITS2–LSU region commonly used for molecular-genetic identification (Stockinger et al., 2010; Yurkov et al., 2018a). The reasons for this variability may be: 1) the ability of AMF to form anastomoses and exchange genetic material (Daubois et al., 2016); 2) the formation of a very large number of nuclei – from 576 to 35,000 in one spore (Hosny et al., 1998). Copies of DNA markers independently evolve in different nuclei (Lin et al., 2014).

The ITS region is the main marker for AMF barcoding, it is well represented in different databases, among which are the UNITE (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza) (UNITE, 2017) and MaarjAM (Öpik et al., 2010). It should be noted that the ITS is also often used for the barcoding of vascular plants and the construction of phylogeny (Rodionov et al., 2016). But the main advantage of the ITS region is the possibility of identifying AMF up to the species level. A majority of papers where less variable markers have been used report on identification up to the genus level or even to the order level (Schoch et al., 2012; Tedersoo et al., 2015).

In the case of Illumina MiSeq it is recommended that ITS2 or the full ITS region be used as the fungal barcode (Tedersoo et al., 2015). ITS2 provides a higher taxonomic resolution than SSU or LSU genes, which are suitable for identifying genera and higher-level taxa. ITS1 in fungi is usually shorter than ITS2, also ITS1 is considered as a hypervariable region and thus less suitable for barcoding fungi (Tedersoo et al., 2015). To increase efficiency of molecular-genetic identification, modifications of the universal primers ITS3 and ITS4 specific for various fungal divisions were proposed. In comparison with other primer combinations, the primer pair ITS3tagmix and ITS4ngs gave a significantly larger number of sequencing reads as well as OTUs (Operational Taxonomic Units) (Tedersoo et al., 2015). At the same time, the contribution of AMF in the total OTUs pool was less than 3 %, whereas Agaricomycetes represented half of all OTUs. For AMF we proposed using the slightly modified primer ITS3 – CATC GATGAAGAACG**T**AG (the modification is in bold) as a direct primer and the primer ITS4 without changes as reverse.

Various aspects of using specific primers for the AMF identification were reviewed earlier (Kryukov et al., 2017; Kryukov, Yurkov, 2018; Yurkov et al., 2018a). Identification using universal primers allows us to investigate the maximal broad range of AMF species and genera. But this then introduces the problem of foreign DNA admixture. Another problem with molecular genetic identification of AMF is the generation of chimeric sequences during the sequencing process (Senés-Guerrero et al., 2014). Phusion DNA-polymerase, which generates high accuracy PCR-products, serves to reduce the chances of introducing chimera (Senés-Guerrero et al., 2014). At the same time, special software has been developed for detecting chimeric sequences and excluding them from analysis, USEARCH for example (Edgar, 2010).

Before 2015, the main method of AMF molecular-genetic identification was cloning followed by Sanger sequencing. This method applied to AMF demands careful selection of efficient and highly specific primers, as well as the use of nested PCR. In addition, due to the high variability of marker sequences, only multiple sequence cloning can be used (Krüger et al., 2009), which is very time-consuming and labor-intensive.

NGS has turned into a powerful and attractive method of AM fungi identification since it can overcome the weak points in the Sanger-based identification. One of the earli-

est techniques of NGS was 454 pyrosequencing, which has been employed for AMF identification since 2009. Using the universal fungal primers NS31 and AM1 179,279 sequences were obtained, of which 77.5 % belonged to 47 taxa of AMF isolated from the roots of 10 plant species (Öpik et al., 2009). However, these primers (NS31 and AM1) are not suitable for the analysis of the SSU region in Archaeosporaceae and Paraglomeraceae families (Helgason et al., 1998). Nonetheless, 454 pyrosequencing revealed in the roots of the *Hepatica nobilis* Mill. 1.5 times more fungal taxa than Sanger sequencing (Öpik et al., 2009). This clearly showed the advantage of NGS methods over cloning-Sanger sequencing methods. 454 pyrosequencing following nested PCR was successfully used for AMF identification with a barcode in the LSU region (Senés-Guerrero, Schüßler, 2015). An interesting result of this work is that about 60 % of the studied plants each formed a symbiosis with at least 10 AMF taxa, and 2 % of plants had more than 25 AMF species in their root system. The authors used the LSU-D1f modified primer (Senés-Guerrero, Schüßler, 2015) together with the LSUmBr primer (Krüger et al., 2009) in the second round of nested PCR. This modification allowed us to obtain 698,297 sequences, of which 0.17 % were the target AMF sequences, 41 taxa were detected, of which 15 are unknown, not registered in the databases (Senés-Guerrero, Schüßler, 2015). 454 pyrosequencing has its advantages over cloning-Sanger sequencing, but this technique is more expensive than the Illumina MiSeq technology that replaced pyrosequencing.

With the development of Illumina technology, Illumina MiSeq has been becoming more and more widely used due to its relative low cost. Illumina MiSeq compared to HiSeq 2000 allows for processing sequences of reads 2.5 times longer, and each sequencing in this case is cheaper. The advantage of HiSeq is more deep sequencing, which allows us to obtain reads at a rate of three orders greater than MiSeq. But this is less significant for fungi identification than sequence read length (Razzauti et al., 2015).

A comparative study of the efficiency of 454 pyrosequencing and Illumina MiSeq showed a difference of five times in the diversity of sequences (in favor of the second method), but both approaches revealed the same species composition (Vasar et al., 2017). A comparative study of the Illumina MiSeq and Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) showed that the second method generated a 2–5 fold greater rate of error than Illumina MiSeq (Salipante et al., 2014).

The objectives of this study included the identification of nine strains of AM fungi from the collection of the All Russian Research Institute for Agricultural Microbiology using the Illumina MiSeq approach and universal primers for the ITS2 region, supplemented by the morphological characteristics of the analyzed AMF spores.

## Materials and methods

**AMF isolation.** AMF were isolated in 2015 from samples, collected in various habitats in two different regions (author of the analyzed AMF isolates: A.P. Yurkov). Only isolates with spores with an unambiguously identifiable morphology were used for molecular-genetic identification. Four strains were isolated from samples taken in the Rostov region (1.4 km NW from Zernograd): 46°52'2" N, 40°16'8" E, a tree belt

area with oaks, maples and alders: 1) isolate (strain) 01-053 was isolated from *Ambrosia artemisiifolia* roots, 2) isolate (strain) 01-056a and, 3) isolate 01-056b both were isolated from one ordinary chernozem soil sample, but differentiated via reinoculations of spores with a different morphology, 4) at 46°52'7" N, 40°16'8" E, a maize field, the isolate (strain) 02-060 was isolated from a *Zea mays* 282MB Zelenogradckij hybrid roots. Five isolates were obtained from samples taken in the Moscow region (Lobnya town, academic village in Lugovaya): 1) 56°02'33.80" N, 37°29'13.70" E, natural meadow, the isolate (strain) 03-097 was isolated from *Vicia sepium* roots, 2) 56°02'24.30" N, 37°29'20.00" E, a *Festuca rubra* field, isolate (strain) 04-067 was isolated from *Festuca rubra* roots, 3) isolate (strain) 04-068 was isolated from *Agrostis vulgaris* roots, 4) 56°02'31.40" N, 37°29'17.60" E, *Medicago × varia* field, isolate (strain) 05-077 was isolated from *Trifolium pratense* roots, 5) isolate 05-104 was isolated from a sod-podsol gleyic soil sample.

**AMF cultivation.** AMF collection at the All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology is cultivated in the *Plectranthus australis* R. Br. (taxonomical synonyms *P. verticillatus* (L.f.) Druce, *P. nummularius* Briq.) line of Swedish ivy. For AMF-inoculated plants a soil-sand mix was used, described earlier (Yurkov et al., 2015). The substrate had a low level of plant-available phosphorus (3.0 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g). *Plectranthus* cuttings 12–15 cm length with two leaves were sterilized in 0.1 % sodium hypochlorite, then germinated in water. On the 7<sup>th</sup> day *Plectranthus* plants were inoculated by root fragments, containing AMF vesicles and arbuscules. Root fragments of mycorrhizal *Plectranthus* were selected by visual analysis in stereomicroscope MBS-10 (LZOS, Russia). For further reinoculations (each 6–8 months) sporocarps, or an arrangement of spores in an out-root area, or 5 mm length root fragments with large quantities of observable vesicles were used. Each inoculated plant was cultivated in an individual container with 350 g of sterile substrate at +24–26 °C, 18 h light day. Two luminescent lamp LB-40 (Russia) and OSRAM L36/77 Fluora (Germany) on a 1:1 ratio with output lumen ~4000 were used. Plants were watered every other day by 60 % of soil full water capacity. For the culture purification AMF spores were reinoculated at least three times.

**Morphological identification of AMF.** More than 20 features were used for morphological identification (Schenck, Pérez, 1990; Blaszkowski, 2003; INVAM, 2019): color, transparency, size and shape of extraradical (out-root) spores; shape of the place of attachment of spores to subtending hypha; number, thickness, density, elasticity or fragility, color in Melzer's reagent of layers of spore walls and subtending hypha; presence/absence/disappearance/appearance of spore wall layers and subtending hypha during ontogenesis (from juvenile to mature spore); presence/absence of a septum in the place of attachment of the spores to subtending hypha; structural characteristics of AMF and intraradical spores.

In order to assess mycorrhization parameters and the type of mycorrhiza, the roots were macerated and stained by trypan blue according to the method developed by J.M. Phillips and D.S. Hayman (1970). Mycorrhization parameters were determined by light microscopy (Trouvelot et al., 1986) using a special computer program, developed earlier in our research group (Vorob'ev et al., 2016).

**DNA extraction, PCR and sequencing.** DNA extractions were carried out using the method of J.J. Doyle and J.L. Doyle (1987), with modifications. Micorrhizated roots of *P. australis* were washed twice in distilled water, placed in 2 ml tubes, dried at +45 °C, and mechanically homogenized with glass beads 2–4 mm in the FastPrep24 (MP Biomedicals, USA), followed by CTAB-protocol. The target region ITS2 was amplified with universal primers ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACG CAGC-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Ready-mix ScreenMix (Evrogen, Russia) was used for PCR. Amplicons were sliced from agarose gel and purified by the silica approach. Illumina library preparation was made according to MiSeq Reagent Kit Preparation Guide in the Core Center of “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” at the All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (St. Petersburg, Russia). Libraries were sequenced on the Illumina MiSeq platform with MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle) according to the manufacturer’s instruction (Illumina Inc., USA).

**Bioinformatics and fungal OTUs analysis.** Two pipelines were used for sequencing data analysis. 1. Illumina reads processing were done by USEARCH software (Edgar, 2010). The key steps for USEARCH data treatment are described on <https://www.drive5.com/usearch/>. In further paragraphs we are briefly describing these steps. In the case of paired-end sequencing, Illumina sequencer makes sequences from both ends of a fragment and generates two files with forward and reverse reads. This data is written in FASTQ format, where each nucleotide corresponds with its quality score. For further treatment forward and reverse reads are merging using `fastq_mergepairs` command to give consensus sequences. This step includes resolving any mismatches found in the overlap alignments and calculation the posterior quality scores for the consensus sequences (Edgar, Flyvbjerg, 2014). To discard low-quality reads expected error filtering with `fastq_filter` command is used.

The next step is a dereplication, which means sorting unique sequences in order of decreasing abundance in the dataset. After this, singletons (sequences that are present exactly once) are discarded, since they are likely to have errors. However the remaining reads can still have errors. So the goal of the final step (denoising) is to identify a set of correct biological sequences. The denoising can be made by UPPARSE algorithm which clusters sequences with 97 % or more (Edgar, 2018) similarity and then chooses the most abundance sequence in each cluster. Also chimeric sequences, which occurs by combining parts of two or more biological sequences are detected and deleted at this step.

Raw forward and reverse reads were merged with minimal length parameter (“-fastq\_minmergelen”) 130 bp and maximal difference parameter (“-fastq\_maxdiffs”) 30 bp. Then low-quality read ends including primer sequences were trimmed, reads were filtered based on expected error value ( $E_{max} = 1$ ). Singletons were removed from the dataset. Then data were divided on operational taxonomic units (OTUs) with a 97 % similarity cut-off by UPPARSE algorithm (Edgar, 2013). Chimeric sequences were removed. For further analysis the most represented sequence from each OTU was chosen. Data were checked for cross-talk errors. Sequences of AMF species were selected by BLAST+ (Altschul et al., 1990).

2. The primers we used are universal for a broad range of species; and after amplification in the ITS2 region the extracted plant DNA prevail over fungi DNA. A second pipeline was made for the selection of rare and unique reads with a high homology of AMF sequences. After quality control (FastQC) forward and reverse reads were trimmed and merged with minimal length parameter 230 bp by `trimmomatic` (Bolger et al., 2014) and `fastq-join` software (Aronesty, 2013). Then sequences were demultiplicated and sorted in the descending order of their frequency. AMF sequences were selected via character for AMF motifs, then aligned and checked via BLAST.

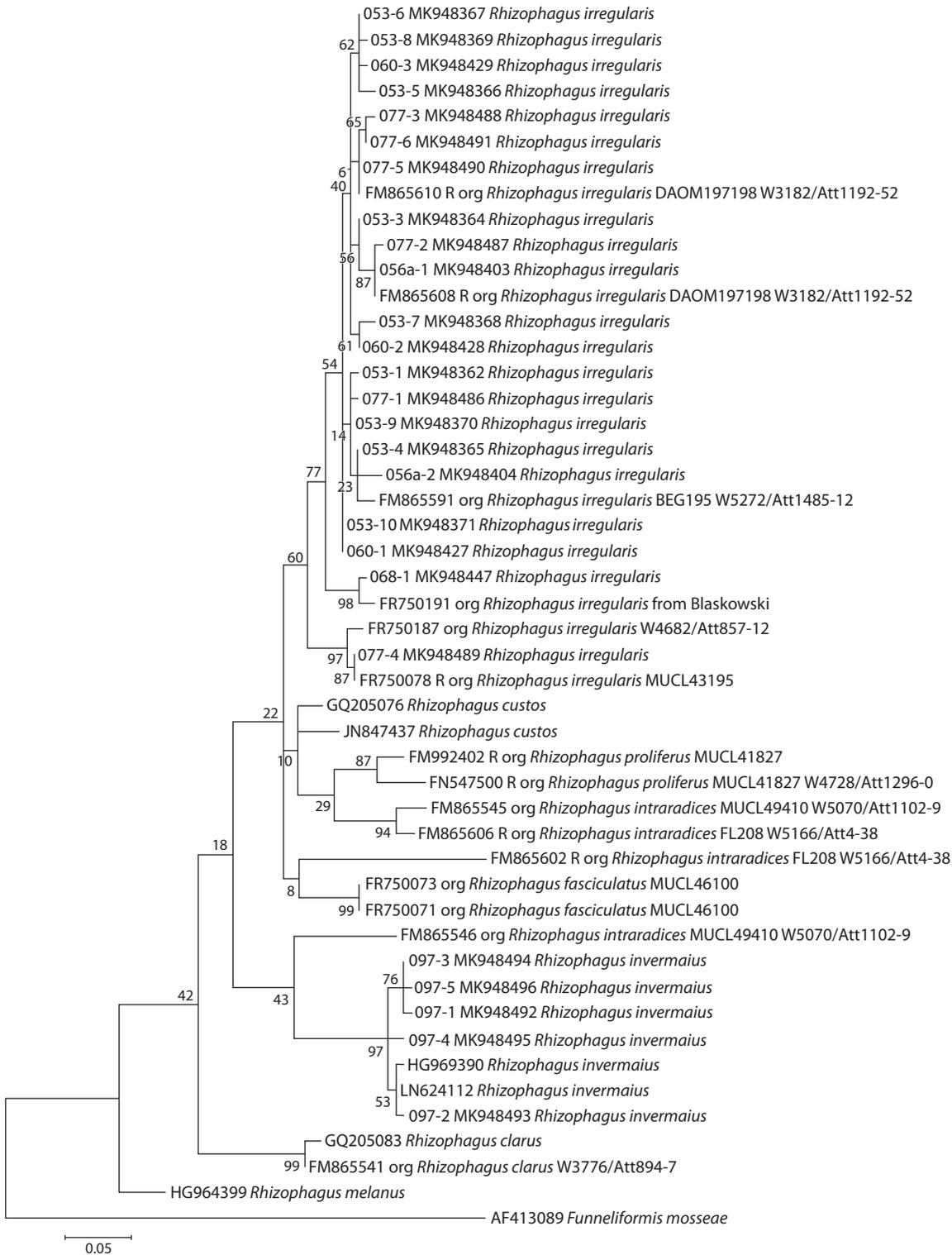
Obtained sequences were submitted to the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Evolutionary analyses were conducted by using the Maximum Likelihood method in MEGA7 software (Kumar et al., 2016) with implementation of the Tamura-Nei model (Tamura, Nei, 1993) and 1,000 bootstrap analyses.

## Results

Sequencing of 9 isolates yielded approximately 381,249 pair of reads, from 19,236 to 81,054 joined sequences for each isolate. The following OTUs of AMF isolates were identified via BLAST at the genera or species level and submitted to NCBI: MK948362-MK948371 (isolate number 01-053), MK948403-MK948404 (01-056a), MK968150 (01-056b), MK948427-MK948429 (02-060), MK948492-MK948496 (03-097), MK948434-MK948436 (04-067), MK948447 (04-068), MK948486-MK948491 (05-077), MK948503-MK948504 (05-104). The length of obtained sequences varied from 340 to 366 bp. Variability in GC content was distinct in different genera: a narrow range was shown in genera *Claroideoglossum* (38–39 %), *Rhizophagus* (36–39 %) and *Paraglossum* (42–46 %), whereas GC content in *Acaulospora* varied from 31 to 46 %. Owing to the significant variability of the ITS region in AM, alignment of sequences belonging to different genera and orders is ineffective, and in some cases impossible. As a result, four separate phylogenetic trees were constructed for the four genera mentioned above (Fig. 1–4).

Unusual deletion was determined by ITS2 sequence alignment. This deletion of 5–6 bp in alignment positions 97–102 was identified in various species of genus *Rhizophagus*, and in all OTUs of genus *Paraglossum*, and in *Racocetra weresubiae* (FR750135) (NCBI, 2019). This fact can serve to indicate the presence of a deletion-specific site related to secondary RNA structure. However, it can also indicate a relationship of sequences in this region, which is of greater interest because it is well known that AM mycelia contain a significant number of nuclei (Hosny et al., 1998), some of which carry this deletion in ITS.

Some samples (01-053, 01-056a, 02-060, 04-068, 05-077, and 03-097) demonstrated a high similarity with *Rhizophagus* (see Fig. 1). OTU isolates 01-053, 01-056a, 02-060, 04-068, 05-077 fell with high accuracy into the clade formed by *Rhizophagus irregularis*, while OTUs of 03-097 were placed in one clade with *R. invermaius* (bootstrap index = 97). This genus includes a small number of species, about 20 according to A. Schüßler (2019), but in the NCBI only 8 species are represented by ITS sequences. Thus one may consider that *Rhizophagus* is a genus that requires further sequencing



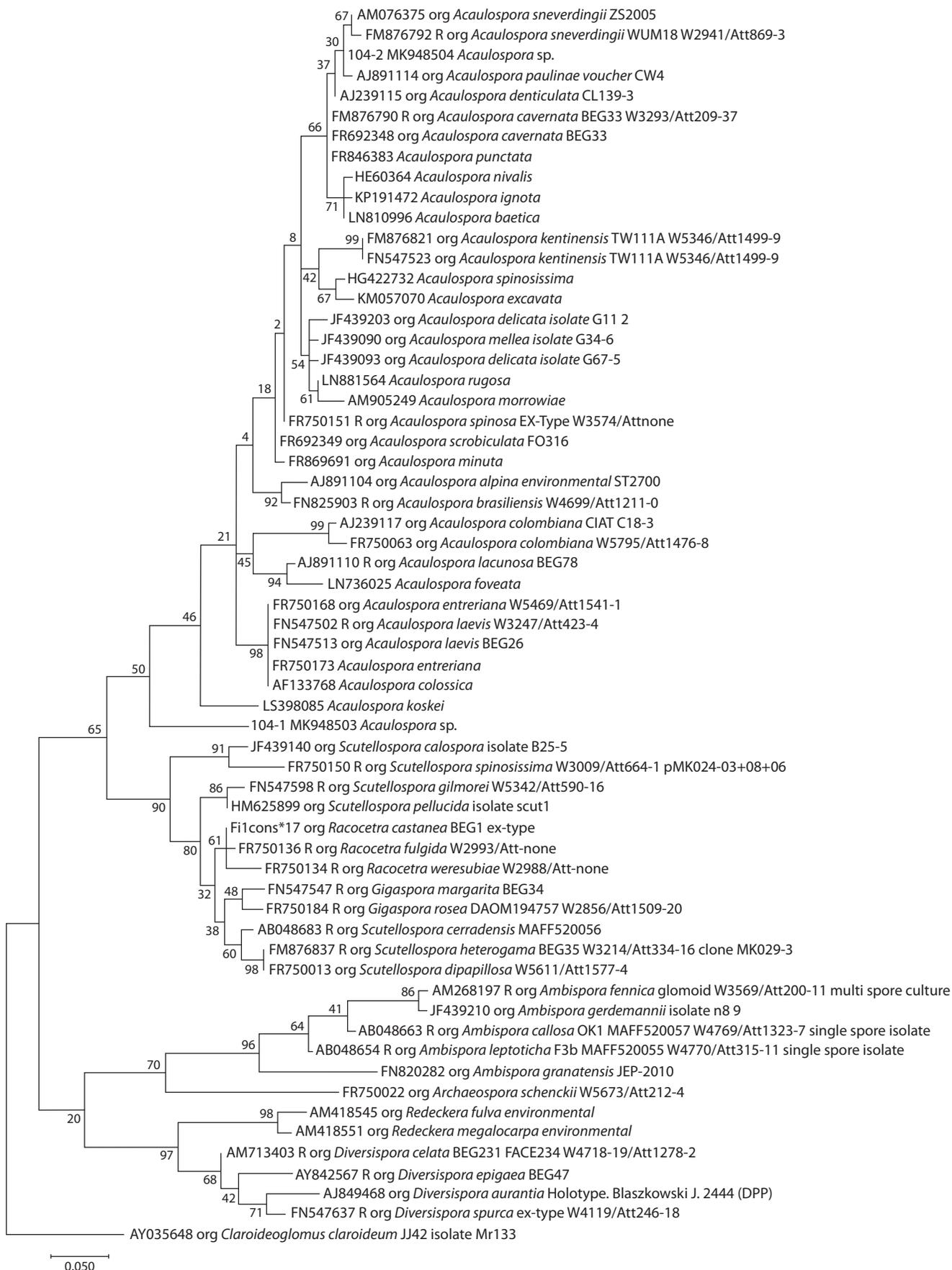
**Fig. 1.** Phylogenetic tree of ITS-sequences from the genus *Rhizophagus*.

research. At the same time, it is beyond doubt that this study provides a molecular genetic identification at the species level of isolates 01-053, 01-056a, 02-060, 04-068, 05-077, 03-097.

Due to the ambiguous position of OTUs of isolate 05-104 on a pre-built phylogenetic tree of the *Acaulospora* genus, as well as due to the possibility that OTUs of this isolate could incorporate other close genera from the Acaulosporaceae

family, species from the *Archaeospora*, *Ambispora*, *Diversispora*, *Gigaspora*, *Racocetra*, *Redeckera* and *Scutellospora* genera were added to the tree. We found that both OTUs of 05-104 isolates were included in the *Acaulospora* clade with high bootstrap support (see Fig. 2).

However, owing to the significant differences from other species of *Acaulospora*, we define the MK948503 sequence



**Fig. 2.** Common phylogenetic tree of ITS-sequences from *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Ambispora*, *Diversispora*, *Gigaspora*, *Racocetra*, *Redeckera* and *Scutellospora* genera.

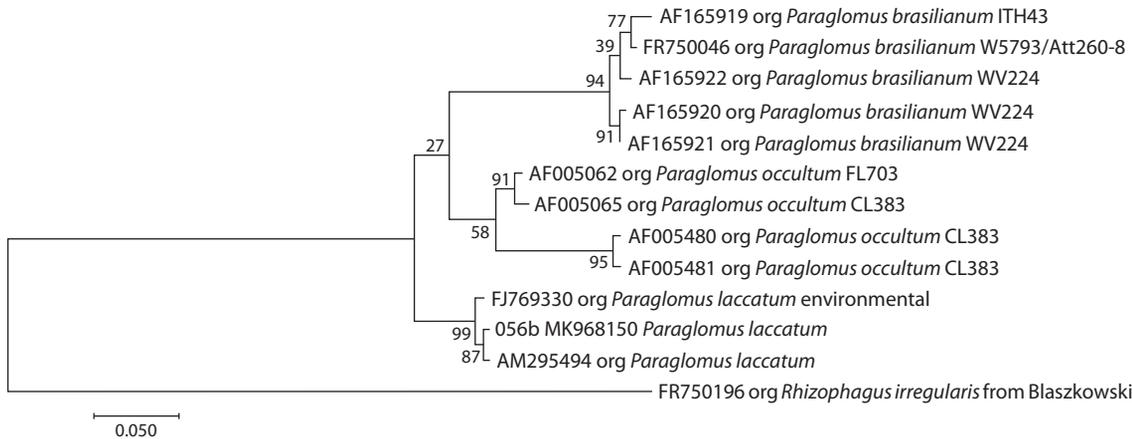


Fig. 3. Phylogenetic tree of ITS-sequences from *Paraglomus* genus.

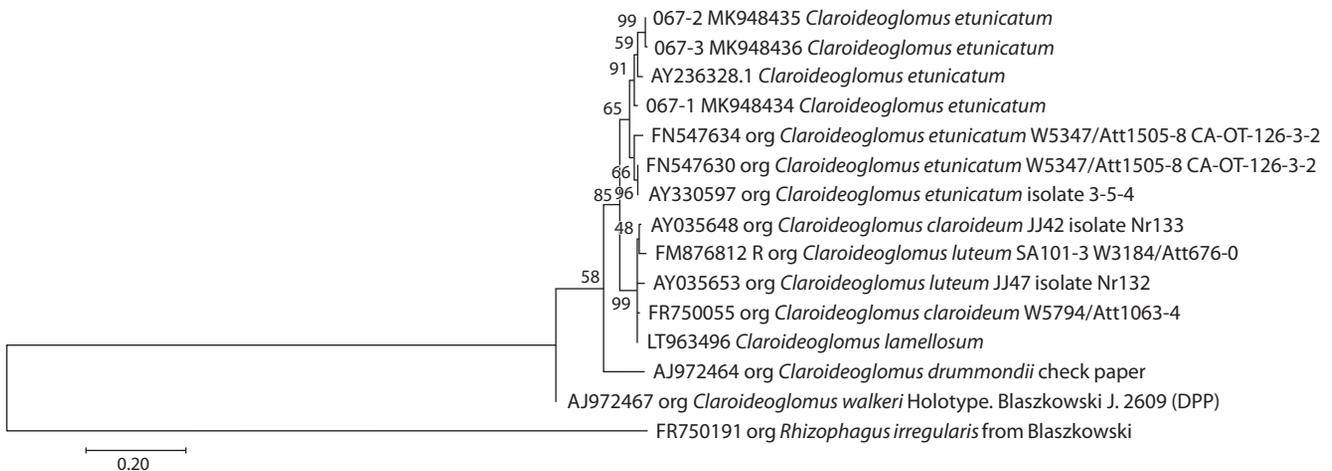


Fig. 4. Phylogenetic tree of ITS-sequences from *Claroideoglomus* genus.

(05-104 isolate) as a virtual taxon. The MK948504 sequence (05-104 isolate), though it has a high similarity with the *A. sieverdingii* and *A. paulinae* species, did not show similarities with the indicated species according to morphological data, therefore it was also identified as a virtual taxon. At the same time, it can be reliably stated that these two OTUs belong to different taxa, since they have significant differences in GC content (31 and 46 %). But differences did not appear in the case of morphological analysis, highlighting the obstacles of distinguishing among *Acaulospora* species.

The OTUs of 01-056b isolate formed a well-supported subclade in the *Paraglomus* genus (bootstrap index = 99) (see Fig. 3). Furthermore, the Paraglomerales order hosts two more genera (*Innospora* and *Pervetustus*) in addition to the *Paraglomus* genus, but the ITS sequences for them are unknown. Thus the outgroup for the phylogenetic tree was taken from another order. The 01-056b isolate was identified as *Paraglomus laccatum*. The sequences of the *P. laccatum* 01-056b isolate turned out to be the shortest in comparison with isolates of other genera and ITS. Only three of eight species of this genera have ITS sequences in NCBI (Schüßler, 2019).

The *Claroideoglomus* genus is the most studied of the above mentioned genera. The ITS data were reported for six out of

eight species (Schüßler, 2019). The OTU of isolate 04-067 with high support belongs to the clade formed by the species *Claroideoglomus etunicatum* (see Fig. 4).

To verify whether the molecular genetic identification of AMF was effective, we conducted a morphological identification of nine isolates (Supplementary)<sup>1</sup>. The principal morphological characteristics for comparison were: size, shape, and color of the spores in air by the CMYK standard; shape, thickness and color of spore layers in Melzer's reagent by the CMYK standard; the shape and thickness of subtending hypha; the wall thickness of subtending hypha; the presence of a septum in subtending hypha, type of mycorrhiza in *P. australis*; mycorrhization parameter (*F* – frequency of mycorrhizal infection in *P. australis* roots).

On the basis of morphological analysis of spores, it was concluded that the AM isolates under examination – supported on *P. australis* culture in the ARRIAM collection – are of the following taxa: 1) 01-053 isolate – *Rhizophagus irregularis*; 2) 01-056a – *R. irregularis*; 3) 01-056b – *Paraglomus laccatum*; 4) 02-060 – *R. irregularis*; 5) 03-097 – *R. invermaius*; 6) 04-067 – *Claroideoglomus etunicatum*; 7) 04-068 – *R. irre-*

<sup>1</sup> Supplementary are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx0.pdf>

*ularis*; 8) 05-077 – *R. irregularis*; 9) 05-104 – *Acaulospora* sp. defined only at the genus level, since it was not possible to clearly determine distinguishing morphological features.

Among the morphological features of the spores formed by various isolates of AMF the following should be highlighted. The spores of all AMF isolates classified as *R. irregularis* (isolates 01-053, 01-056a, 02-060, 04-068 and 05-077) have the cylindrical subtending hypha in oblong spores or slightly flared (expanded) in spherical spore at a distance of more than 10 µm from the spores. The size, shape and color of the spores in air in these isolates were similar. Only spores of isolates 01-053 and 01-056a with a greenish tint, had insignificant differences: color varied from 19-5-54-0 (pistachio) and 23-4-43-0 (very light yellow-green) to 26-17-66-0 (yellow-green) and 29-25-58-0 (dark khaki). It should be noted that the color of the L3 layer in spores of *R. irregularis* isolates had significant polymorphism: from 10-37-99-10 (corn-yellow), 1-45-91-25 (deep yellow), 10-53-98-0 (yellow-orange), 13-54-99-1 (deep orange-yellow) and 26-52-97-2 (deep yellow) to 17-48-99-2 (almost pure orange), 15-62-98-0 (deep orange-yellow), 2-67-82-58 (brown-red), 30-80-99-30, 32-78-99-25 (saturated red-brown). The spore color of the 01-056b isolate, referred to the *Paraglomus laccatum* species, on the contrary varied in a narrow range: from colorless to 4-4-0-0 (ghostly white). The second difference in the *P. laccatum* 01-056b isolate was the absence of a septum in the subtending hypha in the presence of narrowing at the site of attachment of the spore as determined by the greater thickness of the L2 layer. The spores of isolate 04-067, referred to *Claroideoglomus etunicatum*, were more yellow: from 5-5-0-0 (ghostly white) to 2-10-62-5 (orange-yellow Craiol) in air and in Melzer's reagent L2 had a yellow color from 2-15-60-2 (orange-yellow Craiol) to 3-35-92-5 (saturated yellow). The darkest spores were observed in the isolate 03-097, referred to the *Rhizophagus invermaius* species: from 30-52-88-51 (deep yellow-brown) to 59-67-63-72 (brown-olive) in air. The spore morphology of isolate 05-104 was significantly different from the other AMF. The spore color of isolate 05-104 attributed to the *Acaulospora* genus, ranged from colorless (transparent) to 3-15-70-4 (yellow ivory), spores cycatrix (the scarring is a remnant of the connection between the spore wall and the wall of the spore of the saccule during spore synthesis is 5.5–7.1 µm. Since this isolate is poorly maintained in *P. australis* culture, the morphology of the spores could not be studied in detail. According to molecular genetic analysis data, it may be approximately the same probability as *A. paulinae*, *A. denticulata* or *A. sieverdingii*.

All isolates of the *Rhizophagus* genus (01-053, 01-056a, 02-060, 03-097, 04-068 and 05-077), collected both in the forest belt and arable land, had a higher activity in *P. australis* roots ( $F > 80\%$ ) than isolates of other AMF genera (see Supplementary). All the AMF isolates under examination formed mycorrhiza of the Arum-type, but only seven of nine isolates were able to be isolated into culture: 01-053, 01-056a, 02-060, 03-097, 04-067, 04-068, 05-077 isolates should be considered as AMF strains.

Because their mycorrhization activity in *P. australis* is low (see Supplementary), sustained maintenance of the *P. laccatum* 01-056b isolate and the *Acaulospora* sp. 05-104 isolate will depend on the selection of optimal conditions for their growth (substrate composition and type of host plant).

## Discussion

The Illumina MiSeq approach allowed us to determine eight out of nine AMF isolates from the All Russian Research Institute for Agricultural Microbiology collection. It is very powerful method, which enables the identification of a large number of AMF taxa in fungal communities, especially if the proportion of targeted marker sequences in a sample is small. There are other effective methods of NGS, but several comparative studies indicate that MiSeq in some cases is more efficient as it can provide longer reads and fewer errors in comparison to HiSeq and IonTorrent techniques, respectively (Salipante et al., 2014; Razzauti et al., 2015).

These comparisons show the clear advantage of the sequence-targeted NGS approach as contrasted with the alternative cloning-sequencing method for AMF species identification. However, the main disadvantage of the Illumina MiSeq are relatively short reads (250 bp × 2), which do not allow the use of long markers, such as the entire cloned SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU region that was most often used for AMF barcoding from 2009 to 2012 (Krüger et al., 2009; De Castro et al., 2018). A prerequisite for the correct AMF identification by the MiSeq method is the employment of a short marker region for sequencing (400–500 bp). The most commonly used length-appropriate marker is ITS2. The advantage of this region is that it provides sufficient variability for identification at the species level. Other less variable regions such as D1–D2 of the LSU allow identification only at the genus level (Krüger et al., 2009).

The use of universal primers for ITS2 region is the optimal choice for the identification of poorly studied taxa, which in recent years has helped to identify a significant number of virtual taxa of AMF (Öpik et al., 2014). These taxa can subsequently receive species names in the presence of individual morphological features and stable maintenance of isolates/strains in culture. For example, we studied the 05-104 sample in which there are two OTUs that belong to two different virtual *Acaulospora* sp. taxa. Another advantage of using the ITS2 region for identification is that a substantially representative sequence database has been stored in NCBI in comparison to other marker regions, for example, for the SSU region (NCBI, 2018).

It is important to note that OTUs related to one *R. irregularis* species and collected in different ecotopes (isolates 01-053, 01-056a, 02-060, 04-068 and 05-077) did not cluster separately on the phylogenetic tree (see Fig. 1). This suggests that all studied *R. irregularis* isolates shared one ribotype. Thus, it was not possible to identify the ecotype-related features of *R. irregularis* isolates, perhaps they are objectively missing.

Also, it should be noted that NGS methods produce huge data arrays. We paid special attention to choose the correct tools for data treatment. Several pipelines have been developed to process rDNA sequences that are generated using Illumina's MiSeq platform. Among them mothur (Schloss et al., 2016), QIIME (Caporaso et al., 2010), USEARCH and VSEARCH (Rognes et al., 2016) are the most popular. Generally, all of them have similar steps in sequences treatment. We used USEARCH since it has a large set of tools and detailed documentation. However, two approaches were used to search for AMF OTUs among a great pool of sequences. Both approaches were equally effective since they allowed us to identify the

same set of taxa. At the same time the use of the USEARCH software has significantly reduced the time spent on data processing, which makes it possible to recommend it as the main tool to identify AMF from NGS data.

Combining the results of molecular genetics and morphological identification, we assert that the effectiveness of the Illumina MiSeq method as applied to AMF identification is not inferior to morphological methods that are significantly more labor intensive. However, the NCBI database is still insufficient for identification of some AMF species. The reason for this is that more than half of the known AMF taxa are still absent in the database. For example, according to A. Schüßler (2019), there are up to 56 species in the genus *Acaulospora*. The NCBI contains 37 species just for *Acaulospora* sp., and ITS sequences are presented for only 28 species. Thus, the obtained OTUs of the 05-104 isolate may belong to one of *Acaulospora* species that has yet to be studied.

## Conclusion

We have determined that the most effective method for AMF identification is Illumina MiSeq supplemented by application of universal primers for the ITS2 region. Considerable efforts of morphologists in collaboration with molecular geneticists are required to establish a reliable taxonomy of the Glomeromycotina subdivision and to improve the efficiency of the molecular genetic AMF identification as a key method in the future.

## References

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215:403-410. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Aronesty E. Comparison of sequencing utility programs. *TOBIOJ.* 2013;7:1-8. DOI 10.2174/1875036201307010001.
- Blaszkowski J. Definitions of morphological characters of spores of arbuscular fungi. 2003. Available at <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/Definitions%20of%20spore%20characters.htm>
- Blaszkowski J. Species descriptions and illustrations. 2019. Available at <http://www.zor.zut.edu.pl/>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bruns T.D., Corradi N., Redecker D., Taylor J.W., Öpik M. Glomeromycotina: what is a species and why should we care? *New Phytol.* 2017. DOI 10.1111/nph.14913. Available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.14913/full>
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010; 7(5):335-336. DOI 10.1038/nmeth.f.303.
- Daubois L., Beaudet D., Hijri M., de la Providencia I. Independent mitochondrial and nuclear exchanges arising in *Rhizophagus irregularis* crossed-isolates support the presence of a mitochondrial segregation mechanism. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):1-12. DOI 10.1186/s12866-016-0627-5.
- De Castro O., Avino M., Di Maio A., Menale B., Guida M. Sanger and next generation sequencing in the characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Pancreatium maritimum* L. (Amaryllidaceae), a representative plant species of Mediterranean sand dunes. *Planta.* 2018;248(6):1443-1453. DOI 10.1007/s00425-018-2981-z.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19:11-15.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2010;26(19):2460-2461. DOI 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edgar R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods.* 2013;10:996-998. DOI 10.1038/nmeth.2604.
- Edgar R.C. Updating the 97 % identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics.* 2018;34(14):2371-2375. DOI 10.1093/bioinformatics/bty113.
- Edgar R.C., Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics.* 2015; 31(21):3476-3482. DOI 10.1093/bioinformatics/btv401.
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W. Ploughing up the wood-wide web? *Nature.* 1998;394(6692):431-431. DOI 10.1038/28764.
- Hosny M., Gianinazzi-Pearson V., Dulieu H. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome.* 1998;41(3):422-428. DOI 10.1139/g98-038.
- INVAM. Species descriptions from reference cultures. 2019. Available at <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions.html>
- Krüger M., Stockinger H., Krüger C., Schüßler A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2009;183(1):212-223. DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x.
- Kryukov A.A., Yurkov A.P. Optimization procedures for molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi in symbiotic phase on the example of two closely kindred strains. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 2018;52(1):38-48. (in Russian)
- Kryukov A.A., Yurkov A.P., Shishova M.F. Features of the molecular phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi based on the analysis of the SSU – ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2 – LSU marker region. *Estestvennye i Tekhnicheskie Nauki = Natural and Technical Sciences.* 2017; 2:15-21. (in Russian)
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33:1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Lee E.H., Eo J.K., Ka K.H., Eom A.H. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. *Mycobiology.* 2013; 41(3):121-125. DOI 10.5941/MYCO.2013.41.3.121.
- Lin K., Limpens E., Zhang Z., Ivanov S., Saunders D.G.O., Mu D., Pang E., Cao H., Cha H., Tao Lin T., Qian Zhou Q., Yi Shang Y., Ying Li Y., Trupti Sharma T., van Velzen R., de Ruijter N., Aanen D.K., Win J., Sophien Kamoun S., Ton Bisseling T., Geurts R., Huang S. Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genet.* 2014;10(1):e1004078. DOI 10.1371/journal.pgen.1004078.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2018. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Öpik M., Davison J., Moora M., Zobel M. DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany.* 2014;92(2):135-147. DOI 10.1139/cjb-2013-0110.
- Öpik M., Metsis M., Daniell T.J., Zobel M., Moora M. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol.* 2009;184(2):424-437. DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x.
- Öpik M., Vanatoa A., Vanatoa E., Moora M., Davison J., Kalwij J.M., Reier Ü., Zobel M. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol.* 2010;188(1):223-241. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.
- Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 1970;55: 158-161. DOI 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.

- Razzauti M., Galan M., Bernard M., Maman S., Klopp C., Charbonnel N., Vayssier-Taussat M., Eloit M., Cosson J.-F. A comparison between transcriptome sequencing and 16S metagenomics for detection of bacterial pathogens in wildlife. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(8):e0003929. DOI 10.1371/journal.pntd.0003929.
- Rodionov A.V., Gnutikov A.A., Kotsinyan A.R. ITS1–5.8S rDNA–ITS2 sequence in the 35S rRNA genes as a marker in the reconstruction of cereal (Poaceae) phylogeny. *Uspekhi Sovremennoy Biologii = Advances in Current Biology.* 2016;136(5):416. (in Russian)
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016;4:e2584. DOI 10.7717/peerj.2584.
- Salipante S.J., Kawashima T., Rosenthal C., Hoogstraal D.R., Cummings L.A., Sengupta D.J., Harkins T.T., Cookson B.T., Hoffman N.G. Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80(24):7583–7591. DOI 10.1128/aem.02206-14.
- Savary R., Masclaux F.G., Wyss T., Droh G., Corella J.C., Machado A.P., Morton J.B., Sanders I.R. A population genomics approach shows widespread geographical distribution of cryptic genomic forms of the symbiotic fungus *Rhizophagus irregularis*. *ISME J.* 2017;12(1):17–30. DOI 10.1038/ismej.2017.153.
- Schenck N.C., Pérez Y. Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. 3rd ed. Gainesville, FL: Synergistic Publ., 1990.
- Schloss P.D. Application of a database-independent approach to assess the quality of operational taxonomic unit picking methods. *mSystems.* 2016;1(2):e00027-16.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Bolchacova E., Voigt K., Crous P.W., Miller A.N. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:6241–6246. DOI 10.1073/pnas.1117018109.
- Schüßler A. Glomeromycota species list. 2019. Available at [http://www.amf-phylogeny.com/amphylo\\_species.html](http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html)
- Senés-Guerrero C., Schüßler A. A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. *Fungal Divers.* 2015;77(1):317–333. DOI 10.1007/s13225-015-0328-7.
- Senés-Guerrero C., Torres-Cortés G., Pfeiffer S., Rojas M., Schüßler A. Potato-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities in the Peruvian Andes. *Mycorrhiza.* 2014;24(6):405–417. DOI 10.1007/s00572-013-0549-0.
- Stockinger H., Krüger M., Schüssler A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2010;187(2):461–474. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x.
- Stockinger H., Peyret-Guzzon M., Koegel S., Bouffaud M.-L., Reeder D. The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS One.* 2014;9(10):e107783. DOI 10.1371/journal.pone.0107783.
- Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993;10:512–526. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- Tedersoo L., Anslan S., Bahram M., Pöhlme S., Riit T., Liiv I., Kõljalg U., Kisand V., Nilsson H., Hildebrand F., Bork P., Abarenkov K. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys.* 2015;10:1–43. DOI 10.3897/mycokeys.10.4852.
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (Eds.). *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.* Paris: INRA-Press, 1986. (in French)
- UNITE. Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification Ver. 7.2. 2017. Available at <https://unite.ut.ee>
- Vasar M., Andreson R., Davison J., Jairus T., Moora M., Remm M., Young J.P.W., Zobel M., Öpik M. Increased sequencing depth does not increase captured diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 2017;27(8):761–773. DOI 10.1007/s00572-017-0791-y.
- Vorob'ev N.I., Yurkov A.P., Provorov N.A. Programma Vychisleniya Indeksov Mikorizatsii Kornei Rastenii = The Program for Calculation of Indexes of Plant Root Mycorrhization. Registration certificate of computer software Svid-vo No. 2016612112 ot 12.02.16 o gos. reg. programmy EVM. FGBNU VNIISKHM (RF). Zayavl. 21.12.2015. Opubl. 20.03.16 No. 2016612112, 12.02.16. FSBSI ARRIAM (RU). Appl. December 21, 2015. Publ. March 20, 2016. (in Russian)
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* San Diego: Academic Press, 1990.
- Yurkov A.P., Jacobi L.M., Gapeeva N.E., Stepanova G.V., Shishova M.F. Development of arbuscular mycorrhiza in highly responsive and mycotrophic host plant – black medick (*Medicago lupulina* L.). *Russian Journal of Developmental Biology.* 2015;46(5):263–275. DOI 10.1134/S1062360415050082.
- Yurkov A.P., Kozhemyakov A.P., Stepanova G.V. The effectiveness of some microbial bioproducts based on bacteria and fungi arbuscular mycorrhiza. Multifunctional Adaptive Fodder Production: Collection of Proceedings (Mnogofunktsional'noe Adaptivnoe Kormoproizvodstvo: Sbornik Trudov). 2018a;19:20–28. (in Russian)
- Yurkov A.P., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kozhemyakov A.P., Stepanova G.V., Machs E.M., Rodionov A.V., Shishova M.F. Molecular genetic identification of arbuscular mycorrhiza fungi. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics.* 2018b;16(2)11–23. DOI 10.17816/ecogen16211-23. (in Russian)
- Yurkov A.P., Kryukov A.A., Jacobi L.M., Kozhemyakov A.P., Shishova M.F. The relationship between the activity indicators and the effectiveness of arbuscular mycorrhiza fungi strains of various origin. *Tavricheskiy Vestnik Agrarnoy Nauki = Tavricheskiy Bulletin of Agrarian Science.* 2017a;4(12):31–41. (in Russian)
- Yurkov A.P., Laktionov Yu.V., Kozhemyakov A.P., Stepanova G.V. Analysis of the symbiotic efficiency of bacterial and fungal preparations on feed crops according to seed yield. *Kormoproizvodstvo = Fodder Production.* 2017b;3:16–21. (in Russian)

#### ORCID ID

A.A. Kryukov [orcid.org/0000-0002-8715-6723](https://orcid.org/0000-0002-8715-6723)  
E.M. Machs [orcid.org/0000-0001-9347-5379](https://orcid.org/0000-0001-9347-5379)  
Y.V. Mikhaylova [orcid.org/0000-0001-9278-0937](https://orcid.org/0000-0001-9278-0937)  
A.V. Rodionov [orcid.org/0000-0003-1146-1622](https://orcid.org/0000-0003-1146-1622)  
P.M. Zhurbenko [orcid.org/0000-0002-2102-4568](https://orcid.org/0000-0002-2102-4568)  
A.P. Yurkov [orcid.org/0000-0002-1072-5166](https://orcid.org/0000-0002-1072-5166)

**Acknowledgements.** The work was performed using the material and technical base of the Center for Collective Use of Scientific Equipment “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” of the All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology and was supported by Russian Foundation for Basic Research grants (18-016-00220, 19-29-05275, and a portion of 17-00-00340, 17-00-00337; molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi). Part of this work was performed in the framework of the state task No. 0664-2019-0026 (morphological identification of arbuscular mycorrhizal fungi).

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

Received June 17, 2019. Revised November 15, 2019. Accepted November 17, 2019. Published online December 27, 2019.

## Изменение кишечного микробиома пациентов с язвенным колитом после трансплантации кишечной микробиоты

А.Ю. Тикунов<sup>1</sup>, В.В. Морозов<sup>1</sup>, А.Н. Швалов<sup>2</sup>, А.В. Бардашева<sup>1</sup>, Е.В. Шрайнер<sup>1</sup>, О.А. Максимова<sup>3</sup>, И.О. Волошина<sup>3</sup>, В.В. Морозова<sup>1</sup>, В.В. Власов<sup>1</sup>, Н.В. Тикунова<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Российской Федерации, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>3</sup> ООО «Центр персонализированной медицины», Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

**Аннотация.** Микробиота кишечника человека – это динамическая система, находящаяся под воздействием организма хозяина и внешних факторов. Возникающие нарушения кишечной микробиоты могут привести к патологическим состояниям, включая воспалительные и онкологические заболевания желудочно-кишечного тракта. Одним из возможных способов воздействия на микробиоту кишечника является фекалтрансплантация (ФТ) – введение кишечной микробиоты от здорового донора в кишечный тракт пациента. В настоящее время в ряде стран этот метод используется для нормализации микробиоты кишечника, в основном при хронических воспалительных заболеваниях кишечника. В России (Новосибирск) уже несколько лет ведутся пилотные исследования эффективности ФТ при язвенном колите. Цель данной работы – оценить изменение микробиома кишечника 20 пациентов с язвенным колитом после однократного проведения ФТ. Основной метод – сравнительный анализ библиотек последовательностей 16S рибосомальной РНК, созданных на основе образцов, полученных от пациентов с язвенным колитом до и после ФТ и секвенированных на платформе Illumina MiSeq. Результаты исследования показали, что ФТ привела к увеличению среднего биоразнообразия последовательностей в образцах, полученных после ФТ, по сравнению с образцами, собранными до ФТ, хотя разница не была статистически достоверной. Доля последовательностей Firmicutes, являющихся доминирующей компонентой кишечной микробиоты здоровых людей, уменьшилась (~32 % vs. >70 %), а доля последовательностей Proteobacteria увеличилась (>9 % vs. <5 %). В некоторых образцах, собранных до ФТ, были обнаружены последовательности патогенных представителей Firmicutes и Proteobacteria, включая *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus* spp. В большинстве случаев после ФТ доля таких последовательностей резко сократилась. Исключение составили последовательности *Clostridium difficile*, содержание которых в образцах почти половины пациентов составляло менее 0.5 %; после ФТ доля последовательностей *C. difficile* значительно уменьшилась лишь у трех пациентов. Следует отметить, что после ФТ повысилось на порядок содержание *Lactobacillus* spp. и существенно расширился их видовой состав. По результатам исследования можно сделать предварительное заключение о том, что даже однократная процедура ФТ приводит к повышению биоразнообразия микробиоты пациентов и оптимизации ее таксономического состава.

Ключевые слова: микробиом; язвенный колит; 16S рРНК профилирование; трансплантация кишечной микробиоты.

**Для цитирования:** Тикунов А.Ю., Морозов В.В., Швалов А.Н., Бардашева А.В., Шрайнер Е.В., Максимова О.А., Волошина И.О., Морозова В.В., Власов В.В., Тикунова Н.В. Изменение кишечного микробиома пациентов с язвенным колитом после трансплантации кишечной микробиоты. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020; 24(2):168-175. DOI 10.18699/VJ20.610

## Fecal microbiome change in patients with ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation

A.Y. Tikunov<sup>1</sup>, V.V. Morozov<sup>1</sup>, A.N. Shvalov<sup>2</sup>, A.V. Bardasheva<sup>1</sup>, E.V. Shrayner<sup>1</sup>, O.A. Maksimova<sup>3</sup>, I.O. Voloshina<sup>3</sup>, V.V. Morozova<sup>1</sup>, V.V. Vlasov<sup>1</sup>, N.V. Tikunova<sup>1</sup>✉

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

<sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

<sup>3</sup> Limited liability company "Personalized Medicine Center", Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

**Abstract.** Intestinal human microbiota is a dynamic system that is under the pressures of its host organism and external factors. Microbiota disruption caused by these factors can lead to severe diseases including inflammatory and oncological diseases of the gastrointestinal tract. One of the possible approaches in managing the intestinal microbiota is fecal microbiota transplantation (FT) – transfer of the microbiota from the stool of a healthy donor to the intestinal tract of a recipient patient. Currently, this procedure is recognized as an efficacious method to normalize the

intestinal microbiota mainly in inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. In Russia, pilot studies of the effectiveness of FT in patients with ulcerative colitis have been conducted for several years, and these studies were started in Novosibirsk. The aim of this study was to assess the change of intestinal microbiome in 20 patients with ulcerative colitis after a single FT procedure. The main method is a comparative analysis of 16S ribosomal RNA sequence libraries constructed using fecal samples obtained from patients with ulcerative colitis before and after FT and sequenced on the Illumina MiSeq platform. The obtained results showed that FT led to an increase in average biodiversity in samples after FT compared to samples before FT; however, the difference was not significant. In the samples studied, the proportion of Firmicutes sequences, the major gastrointestinal microbiota of healthy people, was decreased (~32 % vs. >70 %), while the proportion of Proteobacteria sequences was increased (>9 % vs. <5 %). In some samples collected before FT, sequences of pathogenic Firmicutes and Proteobacteria were detected, including *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus* spp. In most cases, the proportion of such sequences after FT substantially decreased in appropriate samples. The exception was the *Clostridium difficile* sequences, which accounted for <0.5 % of the sequences in samples from almost half of the patients and after FT, the share of such *C. difficile* sequences was significantly reduced only in samples from three patients. It should be noted that the proportion of *Lactobacillus* spp. increased ten-fold and their species composition significantly expanded. According to the obtained results, a preliminary conclusion can be made that even a single FT procedure can lead to an increase in the biodiversity of the gastrointestinal microbiota in patients and to the optimization of the taxonomic composition of the microbiota.

Key words: microbiome; ulcerative colitis; 16S rRNA profiling; fecal microbiota transplantation.

**For citation:** Tikunov A.Y., Morozov V.V., Shvalov A.N., Bardasheva A.V., Shrayner E.V., Maksimova O.A., Voloshina I.O., Morozova V.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V. Fecal microbiome change in patients with ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):168-175. DOI 10.18699/VJ20.610 (in Russian)

## Введение

Широкое применение технологий NGS (next generation sequencing) обеспечило детальную характеристику микробных сообществ, преимущественно бактериальных, ассоциированных с организмом человека. В настоящее время микробиота кишечника человека рассматривается как динамическая система, находящаяся под воздействием организма хозяина и внешних факторов (Fujimura et al., 2010; Qin et al., 2010). Известно, что основными компонентами нормальной кишечной микробиоты человека являются представители Firmicutes и Bacteroidetes, хотя коровая группа конкретных видов бактерий не совпадает у разных здоровых индивидуумов (Donaldson et al., 2016), и различные по составу варианты нормальной микробиоты способны обеспечить стабильное функционирование этого сложного микробного сообщества (Lozupone et al., 2012).

Дисбаланс кишечной микробиоты, возникающий под действием внешних или внутренних факторов, может привести к патологическим состояниям, включая не только воспалительные и онкологические заболевания желудочно-кишечного тракта, но и нарушения иммунной системы, диабет второго типа, сосудистые заболевания и даже нарушения функций головного мозга (O'Hara, Shanahan, 2006). Одним из возможных способов воздействия на микробиоту кишечника, наряду с использованием антибиотиков, пробиотиков и пребиотиков, является феко-трансплантация (ФТ) – введение кишечной микробиоты от здорового донора в кишечный тракт пациента. Считается, что до нашей эры применение ФТ практиковали в Китае, а в наше время эту процедуру впервые провели в 1958 г. при лечении пациента с энтероколитом (Eiseman et al., 1958). Однако лишь недавно метод стал успешно использоваться для нормализации микробиоты кишечника при различных заболеваниях, включая хронические воспалительные заболевания кишечника (Aas et al., 2003; Khoruts et al., 2010; Angelberger et al., 2013; Pigneur, Sokol,

2016; Vaughn et al., 2016; Kang et al., 2017; Paramsothy et al., 2017; Staley et al., 2017).

Наибольшая результативность применения ФТ показана при псевдомембранозном колите, ассоциированном с *Clostridium (Clostridioides) difficile* (Drekonja et al., 2015; Khoruts, Sadowsky, 2016; Cheng, Fisher, 2017; Staley et al., 2017; Goldenberg et al., 2018). Быстрое улучшение состояния пациентов и высокая эффективность ФТ (более 80 %) при этих инфекциях была подтверждена в многоцентровых рандомизированных клинических испытаниях (van Nood et al., 2013; Cammarota et al., 2015), и сейчас в США и в европейских странах рекомендуется применять ФТ уже после второго или третьего эпизода *C. difficile*-ассоциированного колита (Debast et al., 2014).

Имеются свидетельства того, что ФТ может быть полезной и при язвенном колите (ЯК). Эффективность применения ФТ для лечения пациентов с ЯК в различных исследованиях существенно варьировала – от 20 до 92 % (Angelberger et al., 2013; Kellermayer et al., 2015). В рандомизированных клинических испытаниях ремиссия зарегистрирована на уровне 25–27 %, что, впрочем, статистически значимо превышало эффект плацебо (Moayyedi et al., 2015; Rossen et al., 2015; Paramsothy et al., 2017). Патогенез ЯК не вполне ясен; полагают, что он имеет сложную природу и опосредован нарушениями кишечной микробиоты, генетической предрасположенностью и экологическими факторами (Shen et al., 2018). Как и при *C. difficile*-ассоциированном колите, биоразнообразие микробиоты кишечника при ЯК существенно снижено, уменьшено количество представителей Bacteroidetes и Firmicutes. При этом в микробиоте пациентов с ЯК увеличивается количество представителей Proteobacteria и Actinomycetes, выявляются *C. difficile*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. и энтероинвазивные *Escherichia coli* (Okhusa et al., 2003; Saebo et al., 2005; Gradel et al., 2009; Sonnenberg, Genta, 2012; Deshpande et al., 2013; Reddy, Brandt, 2013; Shen et al., 2018). До сих пор не ясно,

является ли ЯК результатом нарушенного иммунного ответа на нормальную микробиоту, или это нормальный иммунный ответ на дисбаланс в микрофлоре кишечника (Cheng, Fisher, 2017).

Несмотря на кажущуюся очевидность, механизмы положительного действия ФТ при ЯК не вполне ясны. Полагают, что эффективность ФТ связана с увеличением разнообразия микробиоты кишечника, что приводит к повышению обилия «полезных» бактерий и препятствует колонизации кишечника патогенными бактериями (Broecker et al., 2016; Chehoud et al., 2016; Khoruts, Sadowsky, 2016). Однако неизвестно, вовлечены ли в этот процесс другие механизмы, включая возможное влияние вириобиоты, действие иммунной системы пациента, привнесение регуляторных высоко- и низкомолекулярных соединений при ФТ; также до сих пор не определен список видов бактерий, обуславливающих нормализацию микробиоты. Цель данного исследования – оценить изменение микробиома кишечника пациентов с ЯК после проведения ФТ на основе профилирования 16S рибосомальной РНК в образцах, полученных до и после лечения.

## Материалы и методы

В работе использовали образцы фекалий, полученные от 20 пациентов (27–57 лет) с диагнозом ЯК. Диагноз подтверждали на основании результатов изучения уровня фекального кальпротектина, данных фиброколоноскопии и гистологического исследования биоптатов, взятых из разных отделов толстой и подвздошной кишок. Образцы пациентов, в которых рутинными методами были обнаружены *C. difficile*, в исследование не вовлекались. Все пациенты предоставили информированное согласие с проводимым исследованием и анонимной обработкой данных. Образцы собирали за один-два дня до ФТ и через 7–12 дней после ФТ. Донорами были молодые здоровые добровольцы (20–39 лет) без хронических заболеваний, не перенесшие инфекции и не подвергавшиеся госпитализации по крайней мере последние два месяца. Все доноры прошли обследование, включающее в себя общий и биохимический анализы крови, а также ИФА крови на наличие лямблий, токсокар, описторхов, аскарид, трихинелл. Кроме того, с использованием стандартных тест-систем подтверждали отсутствие у доноров возбудителя сифилиса, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусов гепатита В и С. Также рутинными методами проводили анализ фекалий на дисбиоз и на отсутствие патогенной микрофлоры (*C. difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., энтероинвазивная *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp., *Giardia* spp., *Isoospora* spp.), ротавирусов А, норовирусов I и II и аденовирусов F, а также гельминтов и их яиц. Пилотное исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Автономной некоммерческой организации «Центр новых медицинских технологий в Академгородке».

По 50 мг каждого образца от пациентов суспендировали в 300 мкл 0.9 % NaCl и центрифугировали при 2 тыс. об. в течение 10 мин. Суммарную ДНК очищали из 100 мкл осветленной клеточной суспензии с помощью набора для выделения ДНК из клеток тканей и крови («БиоЛаб-Микс», Россия) с добавлением лизоцима для повышения

эффективности извлечения ДНК из грамположительных бактерий. С использованием полученной ДНК в качестве матрицы, фьюжн-праймеров (NEB-FF 5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTACGGGAGGCA GCAG-3', NEB-FR 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT GCTCTTCCGATCTGGACTACCGGGGTATCT-3') и высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, США) проводили амплификации фрагмента гена 16S рРНК, содержащего вариабельные участки V3–V4. Продукты амплификации очищали электрофоретически в геле из легкоплавкой SeaKem GTG-агарозы (Lonza, США). Обогащение полученных ампликонов, введение баркодов и служебных последовательностей для дальнейшего секвенирования на платформе MiSeq выполняли, используя полимеразу Q5 и набор олигонуклеотидов Dual index set (New England Biolabs), согласно инструкции производителя. Полученные библиотеки очищали на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США); концентрацию ДНК измеряли с помощью набора Qubit dsDNA HS (Life Technologies, США). По результатам измерений библиотеки объединяли в пул таким образом, чтобы соотношение ДНК библиотек в пуле было приблизительно равным. Секвенировали на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq с набором реагентов MiSeq reagent kit v2 2×250-cycles (Illumina, США).

Результаты секвенирования анализировали с использованием пакета программного обеспечения UGENE v.1.32 (Unipro UGENE, Россия). Полученные риды картировали на базу данных 16S рРНК, размещенную на Национальном сервере NSBI (США), с использованием пакета Clark. Предварительно из последовательности ридов удаляли последовательности адаптеров и проводили фильтрацию ридов по качеству. Риды анализировали двумя методами: с помощью генерации операционных таксономических единиц (OTU) с последующим картированием последовательностей на полученные OTU в пакете программ Usearch-9.2 и путем классификации ридов алгоритмом Kraken по базе данных известных последовательностей 16S рРНК Silva v.132 (full). В первом случае OTU генерировали алгоритмом unoise2 с отбраковкой химерных последовательностей и учетом ошибок чтения. Таблицы полученных частот встречаемости OTU были обработаны в среде R3.3.3. Во втором случае риды картировали на базу данных 16S рРНК Silva с помощью алгоритма seed-kraken с использованием разреженного *k*-мера со специальной решеткой, позволяющей увеличить специфичность классификации. Индекс Шеннона рассчитывали в пакете программ R; достоверность различий между индексами Шеннона определяли с помощью *t*-теста Хатчесона. Визуализацию результатов анализа библиотек последовательностей методом главных координат PCoA проводили на основе матриц дистанций с использованием пакета программ vegan.

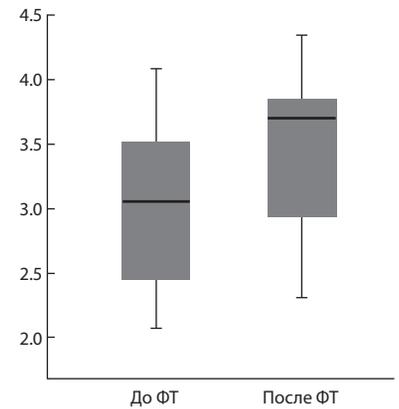
## Результаты и обсуждение

На основе ДНК, выделенной из образцов фекалий от 20 пациентов с ЯК до и после ФТ, было сконструировано 40 библиотек фрагментов гена 16S рРНК. Фрагменты гена включали вариабельные участки V3 и V4, используемые обычно для таксономической классификации бактерий

(Chakravorty et al., 2007; Wang, Qian, 2009). В результате секвенирования библиотек, которые были созданы на основе образцов, собранных до ФТ, получено от 106411 до 1751663 ридов (в среднем 141010). Библиотеки из образцов, собранных после ФТ, содержали от 107042 до 173855 ридов (в среднем 142060). По результатам классификации в библиотеках из первой и второй групп к определенному типу прокариот были таксономически отнесены в среднем 99.7 и 99.6 % ридов соответственно. Лишь незначительная часть последовательностей осталась неклассифицированной. Всего выявлены последовательности 13 типов бактерий, основными из которых были Firmicutes, Bacteroidetes и Proteobacteria. В трех образцах выявлены последовательности архей, принадлежащих к роду *Methanobrevibacter* (тип Euryarchaeota), однако доля таких последовательностей в соответствующих библиотеках не превышала 0.1 %.

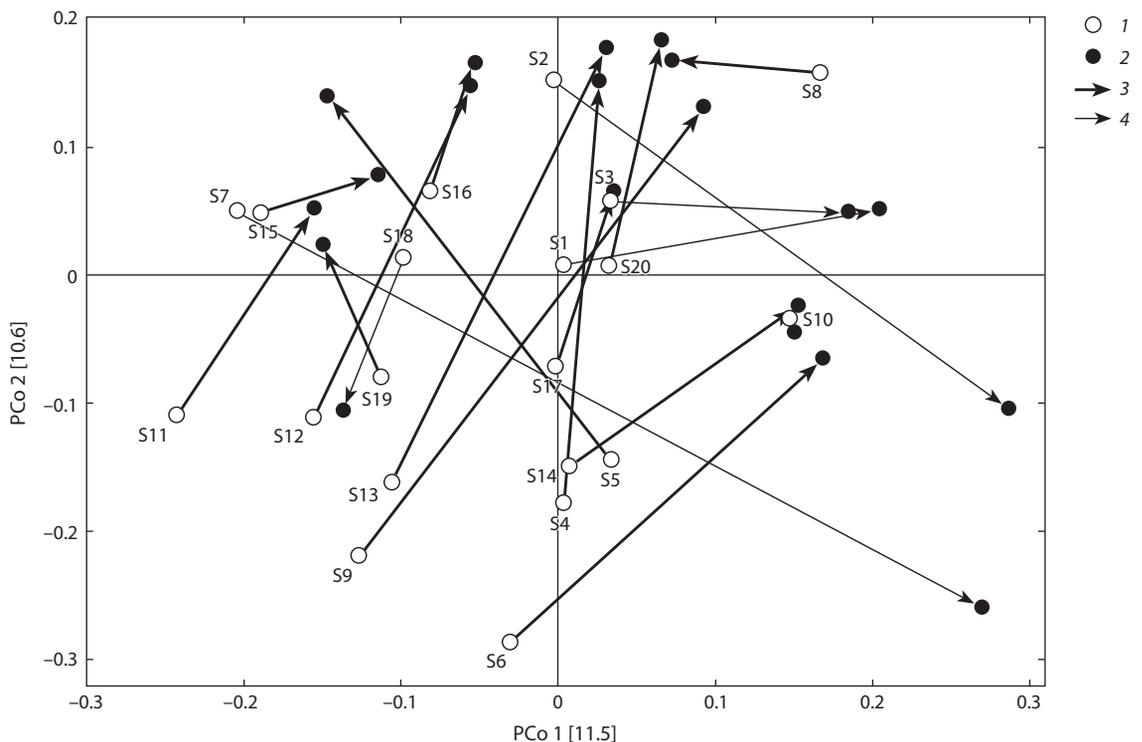
Анализ полученных данных показал, что биоразнообразие бактериальных сообществ в образцах от пациентов до и после ФТ различается. Так, индекс Шеннона для выборки образцов от пациентов после лечения ( $3.43 \pm 0.71$ ) был выше, чем для образцов, взятых до лечения ( $3.05 \pm 0.67$ ), хотя разница статистически недостоверна (рис. 1). Однако при попарном сравнении индексов Шеннона для образцов, полученных от одного пациента до и после ФТ, различия были во всех случаях статистически достоверными (SD, 0.011–0.019); при этом у 15 пациентов биоразнообразие микробных сообществ значительно увеличилось и лишь у 5 пациентов – уменьшилось.

Большее биоразнообразие сообществ в образцах, полученных после ФТ, подтвердилось при анализе данных методом главных координат (рис. 2). Видно, что 60 % образцов, собранных до лечения, находятся в области отрицательных значений первой главной координаты, тогда как 65 % образцов, взятых после лечения, находятся в области положительных значений. Аналогично в области положительных значений второй главной координаты находится



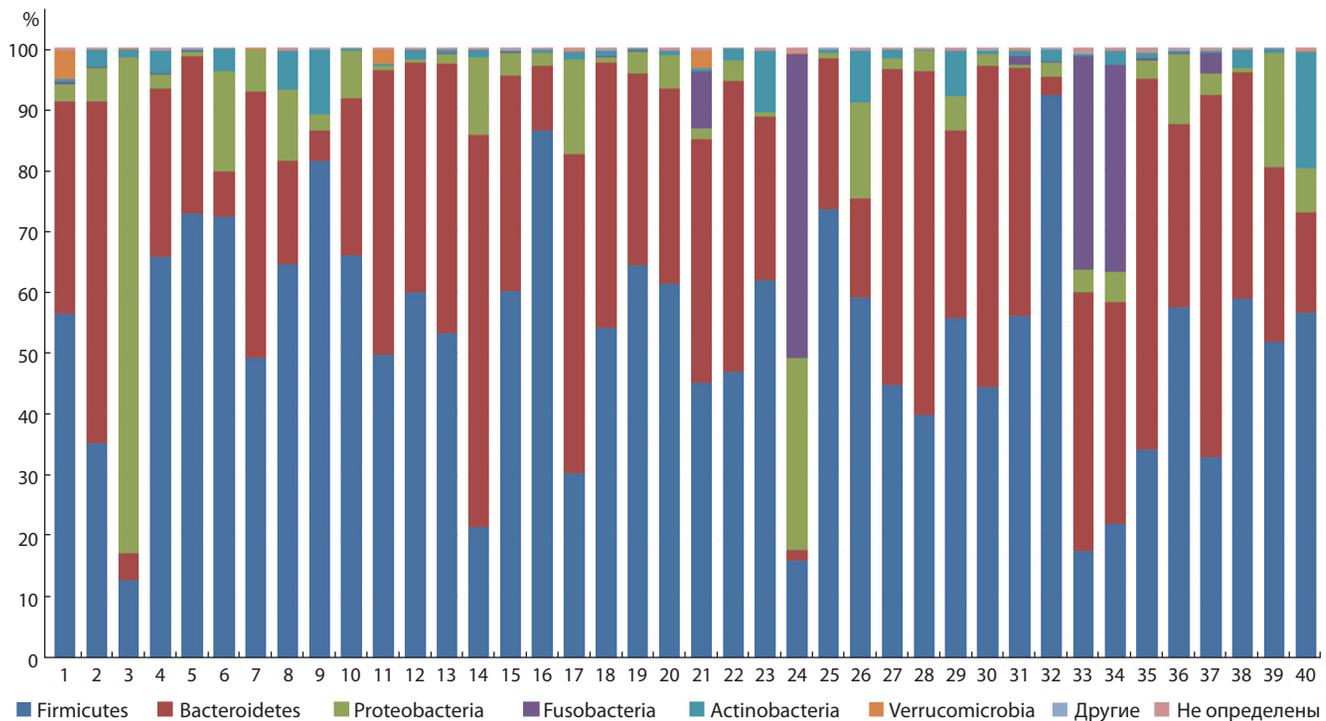
**Рис. 1.** Индекс Шеннона, отражающий биоразнообразие выборки последовательностей в образцах, полученных от пациентов до и после ФТ.

лишь 45 % образцов, полученных до лечения, и 70 % образцов после ФТ. Отметим, что в образцах от 15 пациентов (75 %) после проведения ФТ значение увеличилось в области и первой, и второй главных координат; еще у четырех пациентов значение увеличилось в области хотя бы одной



**Рис. 2.** Визуализация результатов анализа библиотек последовательностей методом главных координат PCoA на основе матриц дистанций.

1 – данные для библиотек последовательностей из образцов, полученных до ФТ; 2 – данные образцов, полученных после ФТ; 3, 4 – линии, соединяющие пару образцов от одного пациента, для которой отмечено увеличение (3) или уменьшение (4) биоразнообразия после ФТ. S1–S20 соответствуют номерам образцов до ФТ. По осям OX и OY приведены значения первой и второй главных координат.



**Рис. 3.** Таксономическая классификация операционных таксономических единиц (OTU) на уровне типов, проведенная на основе базы данных Silva v.132 (full).

Здесь и на рис. 4: образцы 1–20 получены от пациентов до ФТ (нумерация соответствует представленной на рис. 2); образцы 21–40 собраны после ФТ. Пары образцов 1 и 21, 2 и 22 и т.д. получены от первого, второго и т.д. пациентов соответственно. Показаны типы, представленность которых в среднем превышает 0.1 %.

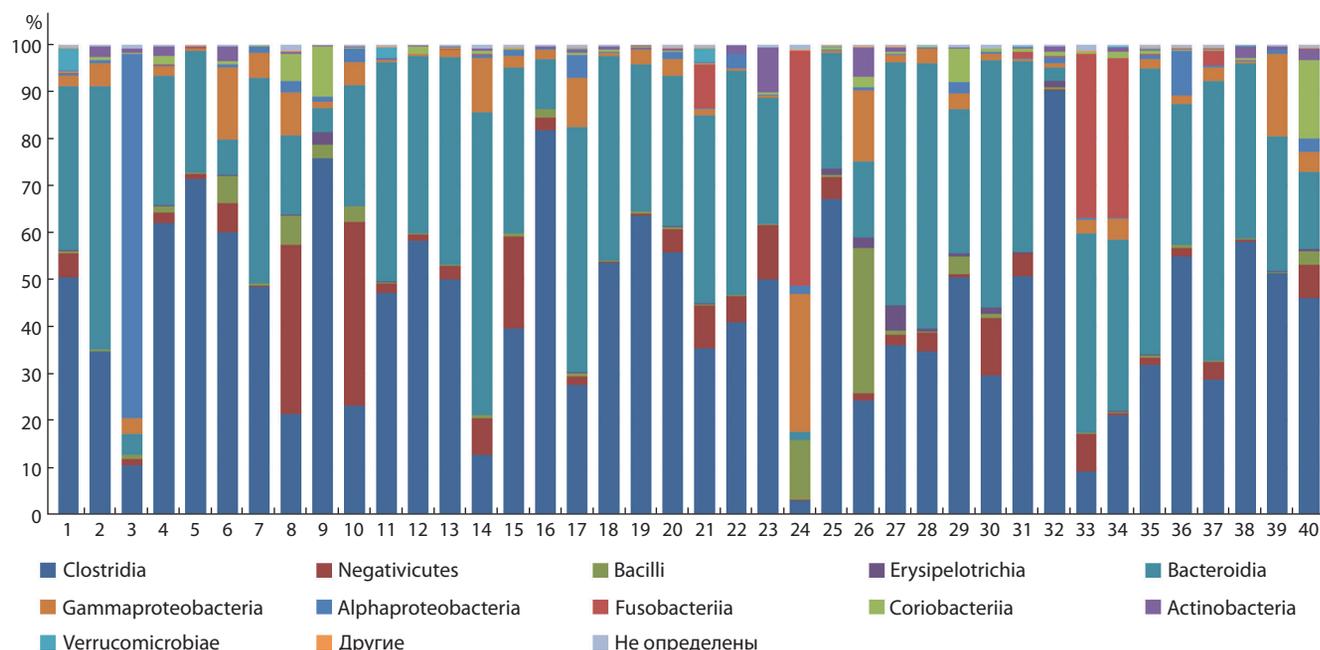
из главных координат; только для пары образцов от одного пациента (№ 18) биоразнообразие уменьшилось после ФТ в области значений обеих главных координат (см. рис. 2). Тем не менее при уменьшении значений в области хотя бы одной главной координаты после ФТ индекс Шеннона для этой же пары образцов статистически значимо уменьшался.

Полученные данные подтверждают возможность повышения биоразнообразия бактериального сообщества кишечника после проведения ФТ. Следует подчеркнуть, что в настоящем исследовании мы сравнивали исходный микробиом пациентов и микробиом после первой процедуры ФТ. Согласно опубликованным сведениям зарубежных авторов, даже после нескольких процедур ФТ статистически значимое повышение биоразнообразия микробиоты регистрируется не у всех пациентов (Angelberger et al., 2013).

Анализ таксономического состава показал, что в образцах до и после ФТ в среднем 55.7 % (от 12.7 до 72.8 %) и 48.3 % (от 15.9 до 92.3 %) выявленных последовательностей соответственно принадлежали к типу Firmicutes (рис. 3), 32.3 % (от 4.4 до 64.4 %) и 33.7 % (от 1.7 до 60.7 %) – к типу Bacteroidetes, а 9.2 % (от 0.4 до 81.3 %) и 6.2 % (от 0.7 до 31.5 %) – к типу Proteobacteria. Четвертыми по встречаемости были последовательности Fusobacteria, в среднем 3.4 % по всем библиотекам, однако их доля значительно увеличилась после ФТ: от <0.1 (0–0.3 %) до 6.7 % (0.1–9.4 %). После ФТ увеличилась также доля последовательностей Actinobacteria, хотя и не так значительно – от 1.9 (0.1–10.7 %) до 3.1 % (0.2–19.4 %). После-

довательности Verrucomicrobia присутствовали в каждом образце в небольших количествах, а их встречаемость после ФТ уменьшилась в среднем с 0.4 до 0.2 %. Остальные последовательности встречались лишь в отдельных образцах, не превышая 0.1 % от всех последовательностей в этом образце.

Известно, что микробиота здоровых людей состоит из постоянных и транзиторных видов, относящихся более чем к 17 типам, включая Firmicutes (>70 %), Bacteroidetes (>30 %), протеобактерии (<5 %), актинобактерии (<2 %), Fusobacteria и Verrucomicrobia (<1 %) (Belizário et al., 2018). Полученные нами результаты коррелируют с данными других исследователей, свидетельствующими о пониженном биоразнообразии микробиоты кишечника при ЯК (Manichanh et al., 2012; Machiels et al., 2014; Bajer et al., 2017). Так, в исследуемых образцах от пациентов в среднем присутствовало существенно меньше последовательностей Firmicutes, что хорошо согласуется с наблюдениями других авторов (Machiels et al., 2014). В основном Firmicutes были представлены последовательностями классов Clostridia (рис. 4), в среднем 47.4 и 40.6 % в библиотеках из образцов, полученных до и после ФТ соответственно. Из них доминировали *Faecalibacterium prausnitzii* (15.7 и 11.3 % соответственно) и *Roseburia hominis* (2.3 и 0.5 %), ответственные за расщепление широкого спектра углеводов, включая крахмал и инулин, с образованием бутиратов (Duncan et al., 2007; Machiels et al., 2014). Также были представлены последовательности классов Negativicutes (6.8 и 4.0 %) и Bacilli (1.3 и 2.8 %). Следует отметить, что, несмотря на относительно невы-



**Рис. 4.** Таксономическая классификация OTU на уровне классов, проведенная на основе базы данных Silva v.132 (full).

Показаны классы, представленность которых в среднем превышает 0.1 %.

сокую встречаемость *Bacillus* spp. и *Lactobacillus* spp., их доля после ФТ повысилась в 3.5 и 11 раз соответственно. При этом существенно расширился видовой состав лактобацилл, которые, как известно, не только участвуют в расщеплении лактозы и других углеводов, но и являются антагонистами по отношению к патогенным микроорганизмам, вытесняя их из микробного сообщества кишечника человека.

Доля последовательностей, принадлежащих к типу Bacteroidetes, в исследуемых образцах от пациентов с ЯК не была снижена (см. рис. 3 и 4) и составила около трети от всех последовательностей, что отличается от наблюдений других исследователей (Machiels et al., 2014). В основном этот тип был представлен последовательностями *Bacteroides* spp. и *Prevotella* spp., причем после ФТ доля последовательностей бактероидов уменьшилась в среднем с 19.7 до 9.6 %, а последовательностей, принадлежащих к роду *Prevotella*, существенно увеличилась, с 3.7 до 14.6 %. Известно, что большинство бактероидов, обитающих в кишечнике человека, способны разлагать разнообразные растительные полисахариды (Flint et al., 2012), причем в кишечной микробиоте жителей западных стран преобладают *Bacteroides* spp., а в микробиоте населения из стран с преимущественно растительной диетой – *Prevotella* spp. (Ley, 2016).

Отметим, что доля последовательностей Proteobacteria (см. рис. 3) в образцах, собранных до ФТ (в среднем 9.2 %), превышала таковую, обычно регистрируемую у здоровых людей (<5 %) (Belizário et al., 2018). Это объясняется повышенным содержанием *Salmonella* spp. в микробных сообществах пациентов с ЯК и наличием в отдельных образцах в большом количестве последовательностей патогенных бактерий, способных вызвать желудочно-кишечные заболевания (более 9 % *Acinetobacter* spp.,

0.5–1 % *Klebsiella pneumoniae*), что установлено и в других исследованиях (Gradel et al., 2009; Shen et al., 2018). В единичных образцах были обнаружены также *Proteus mirabilis* и *Stenotrophomonas maltophilia*, доля которых не превышала 0.1 %. Надо сказать, что после проведения ФТ содержание перечисленных последовательностей патогенных Proteobacteria в образцах существенно уменьшилось, порой до 0.02 % и менее.

Кроме последовательностей патогенных Proteobacteria, в некоторых образцах, полученных от пациентов до ФТ, были обнаружены последовательности патогенных представителей Firmicutes. Так, в девяти образцах найдены последовательности *C. difficile*, доля которых превышала 0.5 %. Повышенная встречаемость *C. difficile* в кишечной микробиоте пациентов с ЯК отмечалась и ранее (Deshpande et al., 2013; Reddy, Brandt, 2013). Помимо последовательностей *C. difficile*, в некоторых образцах обнаружены последовательности *Staphylococcus aureus* (0.1–0.9 %), *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. (~0.1 %). Как и в случае с патогенными Proteobacteria, доля этих последовательностей после ФТ в соответствующих образцах резко уменьшилась. Исключение составили образцы с *C. difficile*: доля их последовательностей уменьшилась после ФТ только в трех образцах из девяти, составив <0.2 %.

### Заключение

Таким образом, исследованы биоразнообразие и таксономический состав последовательностей фрагмента гена 16S рРНК, ассоциированных с кишечной микробиотой у 20 пациентов с ЯК до и после ФТ. Результаты показали, что однократное проведение процедуры ФТ привело к увеличению среднего биоразнообразия последовательностей в образцах, полученных после ФТ, по сравнению с образцами, собранными до ФТ, хотя разница не была

статистически достоверной. Доля последовательностей Firmicutes, являющихся доминирующей компонентой кишечной микробиоты здоровых людей, была снижена (~32 % vs. >70 %), а доля последовательностей Proteobacteria увеличена (>9 % vs. <5 %). В некоторых образцах, собранных до ФТ, обнаружены значимые содержания последовательностей патогенных представителей Firmicutes и Proteobacteria, включая *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *St. maltophilia*, *Streptococcus* spp. В большинстве случаев после однократной процедуры ФТ доля таких последовательностей резко сократилась. Исключение составили последовательности *C. difficile*, которые были обнаружены (около 0.5 % и выше) в образцах почти половины пациентов с ЯК; после ФТ доля последовательностей *C. difficile* значительно уменьшилась лишь у трех пациентов. Следует отметить, что после ФТ содержание *Lactobacillus* spp. повысилось на порядок и существенно расширился видовой состав лактобацилл.

Результаты исследования позволяют сделать предварительный вывод, что даже однократная процедура ФТ может привести к повышению биоразнообразия микробиоты и оптимизации ее таксономического состава. Однако для того чтобы сделать заключение об эффективности такого лечения, длительности ремиссии и стабильности изменений микробиоты кишечника у пациентов с ЯК, требуются дальнейшие наблюдения за этими пациентами и анализ кишечного микробиома после последующих процедур ФТ.

## Список литературы / References

- Aas J., Gessert C.E., Bakken J.S. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. Clin. Infect. Dis. 2003;36(5):580-585.
- Angelberger S., Reinisch W., Makristathis A., Lichtenberger C., Dejaco C., Papay P., Novacek G., Trauner M., Loy A., Berry D. Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation. Am. J. Gastroenterol. 2013;108(10):1620-1630. DOI 10.1038/ajg.2013.257.
- Bajer L., Kverka M., Kostovcik M., Macinga P., Dvorak J., Stehlikova Z., Brezina J., Wohl P., Spicak J., Drastich P. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. World J. Gastroenterol. 2017;23(25):4548-4558. DOI 10.3748/wjg.v23.i25.4548.
- Belizario J.E., Faintuch J., Garay-Malpartida M. Gut microbiome dysbiosis and immunometabolism: new frontiers for treatment of metabolic diseases. Mediators Inflamm. 2018;2018:1-12. DOI 10.1155/2018/2037838.
- Broecker F., Klumpp J., Moelling K. Long-term microbiota and virome in a Zürich patient after fecal transplantation against *Clostridium difficile* infection. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2016;1372(1):29-41. DOI 10.1111/nyas.13100.
- Cammarota G., Masucci L., Ianiro G., Bibbò S., Dinoi G., Costamagna G., Sanguinetti M., Gasbarrini A. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. Aliment. Pharmacol. Ther. 2015;41(9):835-843. DOI 10.1111/apt.13144.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J. Microbiol. Methods. 2007;69(2):330-339.
- Chehoud C., Dryga A., Hwang Y., Nagy-Szakal D., Hollister E.B., Luna R.A., Versalovic J., Kellermayer R., Bushman F.D. Transfer of viral communities between human individuals during fecal microbiota transplantation. MBio. 2016;7(2):e00322. DOI 10.1128/mBio.00322-16.
- Cheng Y.W., Fischer M. The present status of fecal microbiota transplantation and its value in the elderly. Curr. Treat. Options Gastroenterol. 2017;15(3):349-362. DOI 10.1007/s11938-017-0143-1.
- Debast S.B., Bauer M.P., Kuijper E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin. Microbiol. Infect. 2014;20(Suppl.2):1-26. DOI 10.1111/1469-0691.12418.
- Deshpande A., Pasupuleti V., Pant C., Rolston D.D., Sferra T.J. Diagnostic testing for *Clostridium difficile* infection in patients with inflammatory bowel disease. J. Clin. Gastroenterol. 2013;47(8):737-738. DOI 10.1097/MCG.0b013e318295d4ec.
- Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 2016;14(1):20-32. DOI 10.1038/nrmicro3552.
- Drekonja D., Reich J., Gezahegn S., Greer N., Shaikat A., MacDonald R., Rutks L., Wilt T.J. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: a systematic review. Ann. Intern. Med. 2015;162(9):630-638. DOI 10.7326/M14-2693.
- Duncan S.H., Louis P., Flint H.J. Cultivable bacterial diversity from the human colon. Lett. Appl. Microbiol. 2007;44(4):343-350.
- Eiseman B., Silen W., Bascom G.S., Kauvar A.J. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. Surgery. 1958;44(5):854-859.
- Flint H.J., Scott K.P., Duncan S.H., Louis P., Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes. 2012;3(4):289-306.
- Fujimura K.E., Slusher N.A., Cabana M.D., Lynch S.V. Role of the gut microbiota in defining human health. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2010;8(4):435-454. DOI 10.1586/eri.10.14.
- Goldenberg S.D., Batra R., Beales I., Digby-Bell J.L., Irving P.M., Kellingray L., Narbad A., Franslem-Elumogo N. Comparison of different strategies for providing fecal microbiota transplantation to treat patients with recurrent *Clostridium difficile* infection in two English hospitals: a review. Infect. Dis. Ther. 2018;7(1):71-86. DOI 10.1007/s40121-018-0189-y.
- Gradel K.O., Nielsen H.L., Schönheyder H.C., Ejlersen T., Kristensen B., Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. Gastroenterology. 2009;137(2):495-501. DOI 10.1053/j.gastro.2009.04.001.
- Kang D.W., Adams J.B., Gregory A.C., Borody T., Chittick L., Fasano A., Khoruts A., Geis E., Maldonado J., McDonough-Means S., Pollard E.L., Roux S., Sadowsky M.J., Lipson K.S., Sullivan M.B., Caporaso J.G., Krajmalnik-Brown R. Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. Microbiome. 2017;5(1):10. DOI 10.1186/s40168-016-0225-7.
- Kellermayer R., Nagy-Szakal D., Harris R.A., Luna R.A., Pitashny M., Schady D., Mir S.A., Lopez M.E., Gilger M.A., Belmont J., Hollister E.B., Versalovic J. Serial fecal microbiota transplantation alters mucosal gene expression in pediatric ulcerative colitis. Am. J. Gastroenterol. 2015;110(4):604-606. DOI 10.1038/ajg.2015.19.
- Khoruts A., Dicksved J., Jansson J.K., Sadowsky M.J. Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J. Clin. Gastroenterol. 2010;44(5):354-360. DOI 10.1097/MCG.0b013e3181c87e02.
- Khoruts A., Sadowsky M.J. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2016;13(9):508-516. DOI 10.1038/nrgastro.2016.98.
- Ley R.E. *Prevotella* in the gut: choose carefully. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2016;13(2):69-70. DOI 10.1038/nrgastro.2016.4.
- Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489(7415):220-230. DOI 10.1038/nature11550.
- Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis I., Eeckhaut V., Ballet V., Claes K., Van Immerseel F., Verbeke K., Ferrante M., Ver-

- haegen J., Rutgeerts P., Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(8):1275-1283. DOI 10.1136/gutjnl-2013-304833.
- Manichanh C., Borrueal N., Casellas F., Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;9(10):599-608. DOI 10.1038/nrgastro.2012.152.
- Moayyedi P., Surette M.G., Kim P.T., Libertucci J., Wolfe M., Onishi C., Armstrong D., Marshall J.K., Kassam Z., Reinisch W., Lee C.H. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2015;149(1):102-109. DOI 10.1053/j.gastro.2015.04.001.
- O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688-693.
- Ohkusa T., Okayasu I., Ogihara T., Morita K., Ogawa M., Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2003;52(1):79-83.
- Paramsothy S., Kamm M.A., Kaakoush N.O., Walsh A.J., van den Bogaerde J., Samuel D., Leong R.W.L., Connor S., Ng W., Paramsothy R., Xuan W., Lin E., Mitchell H.M., Borody T.J. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10075):1218-1228. DOI 10.1016/S0140-6736(17)30182-30184.
- Pigneur B., Sokol H. Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease: the quest for the holy grail. *Mucosal Immunol.* 2016;9(6):1360-1365. DOI 10.1038/mi.2016.67.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65. DOI 10.1038/nature08821.
- Reddy S.S., Brandt L.J. *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2013;47(8):666-671. DOI 10.1097/MCG.0b013e31828b288a.
- Rossen N.G., Fuentes S., van der Spek M.J., Tijssen J.G., Hartman J.H., Duflo A., Löwenberg M., van den Brink G.R., Mathus-Vliegen E.M., de Vos W.M., Zoetendal E.G., D'Haens G.R., Ponsioen C.Y. Findings from a randomized controlled trial of fecal transplantation for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2015;149(1):110-118. DOI 10.1053/j.gastro.2015.03.045.
- Saebo A., Vik E., Lange O.J., Matuszkiewicz L. Inflammatory bowel disease associated with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection. *Eur. J. Intern. Med.* 2005;16(3):176-182.
- Shen Z.H., Zhu C.X., Quan Y.S., Yang Z.Y., Wu S., Luo W.W., Tan B., Wang X.Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 2018;24(1):5-14. DOI 10.3748/wjg.v24.i1.5.
- Sonnenberg A., Genta R.M. Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012;35(4):469-476. DOI 10.1111/j.1365-2036.2011.04969.x.
- Staley C., Hamilton M.J., Vaughn B.P., Graiziger C.T., Newman K.M., Kabage A.J., Sadowsky M.J., Khoruts A. Successful resolution of recurrent *Clostridium difficile* infection using freeze-dried, encapsulated fecal microbiota; pragmatic cohort study. *Am. J. Gastroenterol.* 2017;112(6):940-947. DOI 10.1038/ajg.2017.6.
- van Nood E., Vrieze A., Nieuwdorp M., Fuentes S., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Visser C.E., Kuisper E.J., Bartelsman J.F., Tijssen J.G., Speelman P., Dijkgraaf M.G., Keller J.J. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(5):407-415. DOI 10.1056/NEJMoa1205037.
- Vaughn B.P., Vatanen T., Allegretti J.R., Bai A., Xavier R.J., Korzenik J., Gevers D., Ting A., Robson S.C., Moss A.C. Increased intestinal microbial diversity following fecal microbiota transplant for active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2016;22(9):2182-2190. DOI 10.1097/MIB.0000000000000893.
- Wang Y., Qian P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009;4:e7401. DOI 10.1371/journal.pone.0007401.

#### ORCID ID

A.Y. Tikunov orcid.org/0000-0001-5613-5447  
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00082) и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № AAAA-A17-117020210026-2.

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

Поступила в редакцию 22.04.2019. После доработки 10.06.2019. Принята к публикации 23.06.2019.

## Современное состояние проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц *in vitro*

Ю.Л. Силюкова, О.И. Станишевская , Н.В. Дементьева

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия  
 e-mail: olgastan@list.ru

**Аннотация.** Настоящий обзор представляет современные достижения и подходы по сохранению репродуктивных клеток животных *in vitro*, такие как криоконсервация и лиофилизация, а также эпигенетические предпосылки для получения жизнеспособных сперматозоидов и женских гамет после реконсервации. Криоконсервация – эффективный путь сохранения репродуктивных клеток различных видов сельскохозяйственных животных, включая птиц. Метод сохранения генофонда *in vitro* через поддержание в криогенных условиях клеток или тканей в основном направлен на восстановление исчезнувших пород/популяций, на поддержание генетического разнообразия в популяциях, подверженных генетическому дрейфу. Именно сочетание методов *ex situ in vivo* и *ex situ in vitro* может сформировать основу эффективной стратегии сохранения генетического разнообразия животных. Кроме того, использование криоконсервированного семени лучших представителей линии или породы позволяет ускорить прогресс селекции в промышленном птицеводстве. Несмотря на многочисленные достижения в области криобиологии половых клеток, продолжается поиск методов, обеспечивающих более эффективное восстановление жизнеспособности спермиев после криоконсервации. Механизмы, лежащие в основе влияния процедуры криоконсервации на параметры семени сельскохозяйственных птиц, полностью не изучены. В обзоре отражены результаты современных исследований в области проблематики криоконсервации женских и мужских половых клеток, эмбриональных клеток, поиска новых путей решения в области сохранения генетического разнообразия *in vitro* (разработка новых криопротекторных сред и новых технологий сохранения). Освещены молекулярно-генетические аспекты криоконсервации и механизмы влияния криоконсервации на эпигенетическое состояние клеток. Представлены данные по результатам исследований в области лиофильной сушки репродуктивных клеток самцов. Интерес к технологии лиофилизации семени как возможности более дешевого способа сохранения и транспортировки генетического материала диких и домашних животных, по сравнению с криоконсервацией, в мире стремительно растет; исследования ведутся в Японии, Израиле, Египте, Испании, Франции. Растет и интерес к использованию лиофилизированного семени в технологиях геномной инженерии. Методы лиофильной сушки разрабатываются с учетом видовой принадлежности. В обзоре предложены также организационно-правовые пути решения проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных, включая птиц, *in vitro*.

Ключевые слова: семя; сперматозоид; маркерные белки; криоконсервация; лиофилизация; птицеводство; сохранение генетических ресурсов; криобанк; криорезистентность.

**Для цитирования:** Силюкова Ю.Л., Станишевская О.И., Дементьева Н.В. Современное состояние проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):176-184. DOI 10.18699/VJ20.611

## The current state of the problem of *in vitro* gene pool preservation in poultry

Y.L. Silyukova, O.I. Stanishevskaya , N.V. Dementieva

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia  
 e-mail: olgastan@list.ru

**Abstract.** This review presents the current progress in and approaches to *in vitro* conservation of reproductive cells of animals, including birds, such as cryopreservation and freeze-drying, as well as epigenetic conditions for restoring viable spermatozoa and female gametes after conservation. Cryopreservation is an effective way to preserve reproductive cells of various species of animals and birds. *In vitro* gene pool conservation is aimed primarily to the restoration of extinct breeds and populations and to the support of genetic diversity in populations prone to genetic drift. It is the combination of *ex situ in vivo* and *ex situ in vitro* methods that can form the basic principles of the strategy of animal genetic diversity preservation. Also, use of cryopreserved semen allows faster breeding in industrial poultry farming. Despite numerous advances in semen cryobiology, new methods that can more efficiently restore viable semen after cryopreservation are being sought. The mechanisms underlying the effect of

cryopreservation on the semen parameters of cocks are insufficiently understood. The review reflects the results of recent research in the field of cryopreservation of female and male germ cells, embryonic cells, the search for new ways in the field of genetic diversity *in vitro* (the development of new cryoprotective media and new conservation technologies: freeze-drying). Molecular aspects of cryopreservation and the mechanisms of cryopreservation influence on the epigenetic state of cells are highlighted. Data on the results of studies in the field of male reproductive cell lyophilization are presented. The freeze-drying of reproductive cells, as a technology for cheaper access to the genetic material of wild and domestic animals, compared to cryopreservation, attracts the attention of scientists in Japan, Israel, Egypt, Spain, and France. There is growing interest in the use of lyophilized semen in genetic engineering technologies. Freeze-drying methods are developed for particular species. Organizational and legal ways of solving the problems of *in vitro* conservation of genetic resources of farm animals, including birds, are proposed. Key words: semen; spermatozoa; marker proteins; cryopreservation; freeze-drying; poultry; gene pool preservation; cryobank; cryoresistance.

**For citation:** Silyukova Y.L., Stanishevskaya O.I., Dementieva N.V. The current state of the problem of *in vitro* gene pool preservation in poultry. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020; 24(2):176-184. DOI 10.18699/VJ20.611

## Введение

Проблема сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных (ГРЖ) является глобальной, и на ее решение направлены усилия мирового сообщества. Координирующую роль в области сохранения ГРЖ выполняет FAO – Продовольственная и сельскохозяйственная организация при ООН, и ее профильные подразделения (FAO, 2015).

Программы сохранения для ГРЖ решают следующие задачи: экономические (поддержание сектора животноводства, способность реагировать на экологические изменения, меняющиеся потребности рынка, меняющиеся нормативные требования, изменения в доступности импорта–экспорта); социальные и культурные; сохранение биоразнообразия; поддержание ресурсов для исследовательских или образовательных целей, генетики, геномики и адаптации к климатическим и другим изменениям окружающей среды.

Метод сохранения генофонда *ex situ in vitro* через поддержание в криогенных условиях (криобанк) клеток или тканей, которые могут быть использованы для восстановления породы/популяции, признан необходимым дополнением к методу *in vivo* (FAO, 2015). Именно сочетание методов *ex situ in vivo* и *ex situ in vitro* может сформировать основу эффективной стратегии сохранения генетического разнообразия животных.

Разработанные для сельскохозяйственных птиц методы по замораживанию репродуктивных клеток самцов можно с успехом применять для диких видов с целью сохранения генетического разнообразия: например, красная джунглевая курица (Rakhaa et al., 2016), глухарь (Kowalczyk et al., 2012), фазан (*Galliformes*) (Saint Jalme et al., 2003). В промышленных линиях птицы наблюдается значительное снижение генетического разнообразия (Muir et al., 2008), и использование криоконсервированного семени лучших представителей линии или породы в искусственном осеменении в условиях промышленного птицеводства позволяет расширить размах изменчивости и ускорить прогресс селекции.

## Низкотемпературное хранение семени

Криоконсервация репродуктивных клеток самцов – важнейший и практически единственный на сегодня метод сохранения генофонда сельскохозяйственных птиц

*in vitro*. Для консервации семени сельскохозяйственных птиц разработаны различные протоколы, результативность которых зависит от многих условий (Целютин, Тур, 2013; Th  lie et al., 2019). До сих пор не решена проблема снижения функциональной способности семени после цикла замораживания–оттаивания и недостаточно высок уровень оплодотворяющей способности деконсервированного семени. По данным разных авторов, в зависимости от методов замораживания, индивидуальных и породных особенностей кур, оплодотворяемость яиц колеблется от 2 до 85 % (Blesbois et al., 2007; Long et al., 2010; Seigneurin, Blesbois, 2010;   ftci, Aygün, 2018), средний же уровень показателя оплодотворенности при использовании криоконсервированного семени низок, как правило, не превышает 30 % (Fulton, 2006). В некоторых из последних публикаций говорится о средней фертильности заморожено–оттаянного семени на уровне 65 % (Silyukova et al., 2019). Снижение жизнеспособности эмбрионов, полученных от использования криоконсервированного семени за счет фрагментации ДНК (Watson, 2000; Liptói, Hidas, 2006; Morris et al., 2012), ставит под сомнение экономическую целесообразность его применения для практической селекционной работы. Поэтому продолжают исследования по совершенствованию состава разбавителей для криоконсервации, подбору криопротекторов и способов замораживания (в пайетах, в гранулах), совершенствованию протоколов заморозки (low-fast) и т. д. (Thieu Ngoc Lan Phuong et al., 2014; Svoradová et al., 2017).

Большинство исследований по криоконсервации семени птиц проводится с использованием смешанных эякулятов нескольких самцов, хотя известно, что генетический вклад каждого самца неодинаков в связи с эффектом избирательности оплодотворения (Сахарова, Попов, 2001) и самцы имеют различные показатели сохранности сперматозоидов после криоконсервации (Pleshonov et al., 2018, 2019). Поэтому остаются опасения, что использование криоконсервированного семени от смешанных эякулятов из криобанков может приводить к увеличению степени инбридинга в популяции. Во избежание подобной проблемы при сохранении редких и исчезающих пород кур необходимо складывать в криобанк семя от индивидуальных эякулятов.

В России исследования в данном направлении ведутся в ФГБНУ «Федеральный научный центр животновод-

ства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста» и его филиале, Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных (Иолчиев и др., 2018; Mavrodina et al., 2018a, b; Pleshanov, Stanishevskaya, 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018a–c).

**Используемые технологии.** Во многих научных публикациях описаны различные протоколы криоконсервации семени птиц одомашненных и диких видов. Технологии различаются по типу криопротектора, по способу упаковки (пайеты, гранулы и др.), по скоростям замораживания и оттаивания (fast/slow) и по температурным режимам. Эффективность протоколов может быть оценена с помощью анализа функционального состояния семени *in vitro* (определение концентрации и подвижности сперматозоидов, морфологии, соотношения живые/мертвые) и оценки оплодотворяющей способности спермы *in vivo* при искусственном осеменении (Varadi et al., 2013; Thieu Ngoc Lan Phuong et al., 2014). Установлено, что высокие скорости замораживания–оттаивания семени птиц более предпочтительны с точки зрения повышения его выживаемости в отличие от протокола для семени млекопитающих (Shahverdi et al., 2015; Madeddu et al., 2016). Существует значительная индивидуальная, межпородная и межвидовая изменчивость по криоустойчивости семени птиц, из чего следует необходимость разработки различных стратегий криоконсервации для разных видов и пород (Blesbois et al., 2007).

**Методы оценки качества семени.** Криоконсервация семени очень важна для управления генетическим разнообразием птиц *ex situ*, но применение данного метода ограничено высокой вариабельностью показателей успеха. Для расчета количества сперматозоидов при формировании криобанка необходимо прогнозирование оплодотворяющей способности криоконсервированного семени. К сожалению, при определении эффективности своих разработок многие исследователи ограничиваются только оценкой подвижности сперматозоидов. Этот тест недостаточно информативен в плане прогноза оплодотворяющей способности спермы.

Более эффективный прогноз по оплодотворяющей способности семени дают методы оценки морфологических нарушений с использованием флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток, проточной цитометрии, оценки параметров подвижности спермы при помощи компьютерного анализа (CASA). Использование системы CASA позволяет оценить количество жизнеспособных и морфологически нормальных клеток (PVN), массовую подвижность (MMOT) и различные параметры движения, включая процентное содержание подвижных сперматозоидов (PMOT), и биофизические тесты – устойчивость к осмотическому стрессу (OSM), проницаемость мембран (FLUID) (Blesbois et al., 2008; Svoradová et al., 2018). Тем не менее комплекс этих тестов не отражает в полной мере функциональную полноценность спермы.

Функциональная способность оттаянного семени может быть достоверно определена *in vitro* путем анализа взаимодействия сперматозоида с внутренним слоем вителлиновой мембраны желтка куриных яиц (Robertson et al., 1997; Long et al., 2010). Оценка проводится в лабораторных условиях по количеству точек гидролиза (про-

никновения сперматозоидов) на единицу площади внутреннего перивителлинового слоя (Robertson et al., 1997). По сравнению с традиционной оценкой качества этот метод более информативен для прогнозирования оплодотворяющей способности сперматозоидов.

**Сохранение женских гамет.** В настоящее время не разработан способ сохранения половых клеток самок птиц. Наличие большого количества желтка в яйцеклетках птиц не позволяет применять существующие методы криоконсервации (Fulton, 2006). Это представляет серьезную проблему при сохранении породы/популяции, поскольку она не может быть полноценно сохранена без генетического вклада особей обоих полов, происходит потеря материнской наследственности, включая митохондриальный геном. Существующие на сегодняшний день методы сохранения репродуктивных клеток птиц (спермиев) позволяют восстанавливать исчезающие породы/популяции только за счет поглотительного скрещивания.

Относительно инновационная технология – трансплантация криоконсервированных клеток гонад неонатальных цыплят взрослым особям-реципиентам для репродукции донорского потомства. Метод трансплантации может способствовать сохранению исчезающих видов птиц и поддержанию их генетической изменчивости (Venesova, Trefil, 2016). Криоконсервация ткани яичника является фактически единственным эффективным способом сохранения *in vitro* женской зародышевой плазмы у птиц. Предложен метод витрификации тканей донорских яичников в пайете. Фрагменты ткани яичника от самок недельного возраста переносят на металлический стержень, затем витрифицируют в жидком азоте при использовании специальных сред. Данный метод позволяет хранить и транспортировать ткани яичника птиц. В опыте была показана успешная приживаемость трансплантата (Liu et al., 2012). Кроме того, трансплантацию яичника можно применять для исследований в области генетики и биологии развития (Song, Silversides, 2007; Liptoi et al., 2013). Поскольку этот метод включает в себя значительное хирургическое вмешательство и подразумевает использование иммунодепрессантов, то в каждодневной реализации он представляется затратным и технологически сложным.

**Сохранение эмбриональных клеток.** Первичные зародышевые клетки (PGC) кур могут быть выделены и культивированы *in vitro*. PGC являются ценным исходным материалом для клеточной генной инженерии, получения зародышевой плазмы и генетического сохранения видов и популяций (Kino et al., 1997). Действительно, PGC птиц могут размножаться в культуре и быть законсервированы без необратимого изменения их биологических свойств (van der Lavoie et al., 2006; Nandi et al., 2016; Tonus et al., 2016). Для криоконсервации PGC птиц применяют два основных метода: медленное замораживание (SLF) и ультрабыстрое замораживание (Vitriif) (Tonus et al., 2017). Эти клетки могут быть использованы для восстановления гонадных тканей с зародышевыми клетками донорской линии. Данная методика неприменима в настоящее время для сохранения всего эмбриона (Fulton, 2006). Оба метода требуют дальнейших исследований, но можно уже сейчас определенно сказать, что сохранение

клеток *in vitro* в будущем обеспечит основу для разработки практического банка генов и систематизированного геномного банка для птиц.

### Генетика криоустойчивости репродуктивных клеток

Криоустойчивость семени является генетически обусловленным признаком (Pleshanov et al., 2019), но механизмы влияния криоконсервации на эпигенетическое состояние клеток еще не полностью исследованы. Процесс замораживания–оттаивания сперматозоидов может влиять на повреждения в генах, например, связанных с рождаемостью *SNORD116/PWSAS* и *UBE3A* (Valcarce et al., 2013).

При изучении изменений сперматозоидов кабана после криоконсервации были выявлены различия по 41 белку (Chen et al., 2014). В качестве маркерных белков, влияющих на устойчивость семени к замораживанию, были предложены SOD1, TPI1, ODF2 и АКАР3. У *Gallus gallus domesticus* для SOD1, TPI1 и ODF2 найдены гены-ортологи. Рассмотрим их подробнее. Белок, кодируемый геном SOD1 (superoxide dismutase 1), связывает ионы меди и цинка и способствует разрушению супероксидных радикалов в молекулярный кислород и перекись водорода (Bogle et al., 2017; Wu, 2019). Другой изотим этого белка находится в митохондриях, и функции его пока не изучены. Фермент TPI1 (triosephosphate isomerase 1), который состоит из двух идентичных белков, катализирует изомеризацию глицеральдегидов 3-фосфата (G3P) и дигидроксиацетонфосфата (DHAP) в гликолизе и глюконеогенезе (Chen et al., 2014).

Обнаружено, что белки HSP90 (heat shock protein 90) связаны с подвижностью сперматозоидов, количество их значительно уменьшается после замораживания–оттаивания (Huang et al., 2009).

Значительные белковые изменения в сперматозоидах человека до и после криоконсервации были выявлены Wang с коллегами (Wang et al., 2014). Белки митохондриального матрикса ACO2 (aconitase 2) и OXCT1 (3-oxoacid CoA-transferase 1), нитевидный белок ТЕКТ1 (tektin 1), который необходим для образования цилиарных и жгутиковых микротрубочек, гликолитический фермент ENO1 (enolase 1), белок промежуточных филаментов виментин и аминокислота тирозин связаны подвижностью сперматозоидов, жизнеспособностью и целостностью акросомы (Wang et al., 2014).

В результате замораживания–оттаивания было показано снижение количества антиоксидантных белков, таких как SOD1, PRDX6 (peroxiredoxin 6), TXNDC2 (thioredoxin domain containing 2), GSTM3 (glutathione S-transferase mu 3), мембранных белков CYP5R2 (cytochrome b5 reductase 2), белков зоны пеллюцида ZPBP1 и ZPBP2 (zona pellucida binding protein), акросомальных белков ACRBP (acrosin binding protein) и SPACA3 (sperm acrosome associated 3). В то же время увеличивалось количество других белков, накопление которых наблюдается при стрессовом состоянии клетки: ANX1, ANX3 и ANX4 (annexin A); кластерин (CLU clusterin), импортин-1b (KPNB1) karyopherin subunit beta 1, HIST1H4A (histone cluster 1 H4 family member a), TUBA1A (tubulin alpha 1a) и SPAG17 (sperm associated antigen 17) (Bogle et al., 2017).

Изучение влияния криоконсервации на сперматозоиды *Gallus gallus domesticus* показало увеличение на 36 белков и сокращение на 19 белков после оттаивания. Эти белки были связаны с метаболизмом сперматозоидов (Cheng et al., 2015). Такие белки, как ACRBP, FN1 (fibronectin 1), HSP90AA1 (heat shock protein 90) и VDAC2 (voltage dependent anion channel 2), служат биомаркерами, предсказывающими устойчивость спермы хряков к криоконсервации (Vilagran et al., 2015, 2016).

Во время оплодотворения сперматозоиды доставляют отцовскую мРНК в яйцеклетку и, таким образом, играют важную роль в начале развития эмбриона. В процессе замораживания транскрипты и взаимодействие мРНК–белок в сперматозоидах могут быть потеряны, что может влиять на развитие эмбриона (Valcarce et al., 2013). Ранее были выявлены корреляции между мРНК спермы и развитием эмбриона на ранних стадиях у человека и некоторых животных (Hezavehei et al., 2018). Исследования Valcarce et al. (2013) показали уменьшение экспрессии генов PRM1, PRM2, PEG1/MEST и ADD1, связанных с фертильностью спермы человека после криоконсервации. В ряде исследований наблюдали изменение транскриптов некоторых белков и микроРНК. Предпринимаются попытки объяснить некоторые эпигенетические модификации, которые могут возникнуть в сперматозоиде во время процесса замораживания (Hezavehei et al., 2018).

Криоконсервация семени – очень важный метод вспомогательной репродукции, но сам процесс замораживания–оттаивания вреден, поскольку приводит к снижению подвижности и жизнеспособности сперматозоидов, к преждевременной капацитации и, как следствие, к снижению эффективности искусственного оплодотворения. Поэтому добавление некоторых белков нормализует процесс конденсирования и ускоряет процесс оплодотворения *in vitro*. Использование, например, TrxA-FNIIx4-His6 является многообещающим биотехнологическим подходом для криоконсервации сперматозоидов барана и поддержания жизнеспособности сперматозоидов (Ledesma et al., 2019).

Кроме сохранения генетического материала в спермобанке, возможно создание криобанка эмбрионов. У крупного рогатого скота оценивали влияние ресвератрола на эмбрионы после криоконсервации. Изучено его влияние на сохранность функций митохондрий, целостность ДНК, экспрессию SIRT1 (sirtuin 1) и способность эмбрионов к развитию. Выживаемость эмбрионов значительно улучшалась, когда после оттаивания их инкубировали в среде, содержащей 0.5 мкМ ресвератрола. Кроме того, экспрессия SIRT1 и содержание бесклеточной мтДНК в среде были выше в случае эмбрионов, обработанных ресвератролом. Следует отметить, что медленное замораживание влияет на целостность и функцию митохондрий в бластоцистах (Hayashi et al., 2019). Важно улучшить условия созревания *in vitro* (IVM) для незрелых ооцитов после криоконсервации, особенно если ограниченное количество ооцитов собрано у конкретных доноров. Системы культивации со свежими ооцитами значительно ускоряют мейотическое развитие витрифицированных ооцитов и существенно увеличивают скорость образования бластоцист после партеногенетической активации и переноса ядер соматических клеток (Jia et al., 2019).

Понимание молекулярно-генетических механизмов, обуславливающих эпигенетические процессы, которые происходят в репродуктивных клетках при замораживании–оттаивании, позволит повысить результативность используемых технологий по сохранению видов/пород/популяций редких и исчезающих животных и птиц.

### Лиофилизация

Сохранение спермы путем лиофилизации является инновационным методом. Преимущества лиофилизированных сперматозоидов состоят в том, что они могут храниться при температуре 4 °С в течение длительного времени, а также храниться и транспортироваться при комнатной температуре без использования жидкого азота или сухого льда в качестве охлаждающих агентов.

Ожидается, что именно лиофилизация спермы, а не криоконсервация, может стать новым простым методом сохранения генетических ресурсов и использоваться в том числе для получения трансгенных животных (Kaneko, 2012). Состояние исследований в области сублимационной сушки семени диких и домашних животных свидетельствует о возрастающем интересе к этому способу сохранения генетических ресурсов. Методы лиофилизации применительно к микроорганизмам и растительным клеткам разработаны и успешно применяются. Интерес к лиофилизации репродуктивных клеток как возможности более дешевого способа сохранения и транспортировки (в том числе в космос) генетического материала диких и домашних животных, по сравнению с криоконсервацией, в мире стремительно растет; исследования ведутся в Японии, Израиле, Египте, Испании, Франции. Методы лиофильной сушки разрабатываются с учетом видовой принадлежности. Достигнуты положительные результаты на мышах, крысах, хомяках, крупном рогатом скоте, баранах, кроликах, шимпанзе, жирафах, ягуарах и др., но говорить о решении проблемы пока преждевременно, поскольку функциональные характеристики сперматозоидов сохраняются не в полном объеме (Hopshi et al., 1994; Foote, 2002; Liu et al., 2004; Kawase et al., 2005; Li et al., 2009; Gil et al., 2014; Kaneko et al., 2014; Shahba et al., 2016; Wakayama et al., 2017; Arav et al., 2018). Основные трудности связаны с повреждениями двигательного аппарата сперматозоидов, мембран и ДНК. Что касается птиц, в том числе сельскохозяйственных, то исследования по лиофильной сушке их семени не проводились, во всяком случае не опубликованы.

### Проблемы криоконсервации

Криоконсервация запускает не только процессы повреждения на механическом уровне повреждений мембран, но и химико-физические процессы денатурации белков и липидов бислоев мембран, что приводит к сублетальному замерзанию и запуску процессов криокапацитации, образования активных форм кислорода и изменения белков сперматозоидов, липидов и сахаров (Pini et al., 2018).

Общеизвестно, что устойчивость к холодному шоку и криоустойчивость сперматозоидов различных видов сельскохозяйственных животных, в том числе сельскохозяйственных птиц, сильно различаются. Криоконсервированное семя любого вида животных имеет пониженную фертиль-

ность по сравнению со свежей спермой. Причины потери фертильности различны: восприимчивость к холодному шоку, скорость охлаждения, состав разбавителя и осмотический стресс. Существуют также факторы, влияющие на функциональное состояние заморожено–оттаянных сперматозоидов: стабильность мембран, окислительные повреждения, целостность мембранного рецептора, структура ядра (Watson, 2000; Иолчиев и др., 2018). В процессе криоконсервации и деконсервации сперматозоиды могут получать как необратимые повреждения, выражающиеся в отсутствии подвижности и различных морфологических нарушениях, так и обратимые, связанные в основном с временным нарушением структуры и проницаемости мембран.

Есть мнение, что высокое содержание внутриклеточного протейна вместе с осмотической «усадкой» мембраны сперматозоида, вызванной образованием внеклеточного льда, приводит к внутриклеточной витрификации сперматозоидов во время охлаждения. При высоких скоростях охлаждения повреждение сперматозоидов является результатом осмотического дисбаланса, возникающего во время оттаивания, а не внутриклеточного образования льда во время замораживания. Осмотический дисбаланс возникает при высоких скоростях охлаждения из-за ограниченной диффузии кристаллизации льда во внеклеточной жидкости, т.е. количество льда, образующегося во время охлаждения, меньше, чем ожидалось от диаграммы фазового равновесия (Morris et al., 2012).

В криоустойчивости семени петухов существует значительная межпородная изменчивость, оцененная по показателю активности деконсервированных сперматозоидов; коэффициент вариации ( $C_v$ ) может достигать 23–25 % (Pleshanov et al., 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018a). В исследованиях показана большая индивидуальная изменчивость активности спермы петухов в цикле замораживания–оттаивания (Плешанов и др., 2017; Pleshanov, Stanishevskaya, 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018a, b). Коэффициент вариации ( $C_v$ ) активности нативной спермы составил 6.1 %, а деконсервированной – 19.5 %, что свидетельствует о широкой норме реакции сперматозоидов на влияние низких температур.

Общепринятыми параметрами отбора эякулятов для целей криоконсервации являются: объем эякулята, концентрация и подвижность сперматозоидов. Эти критерии не дают полного прогноза степени криотолерантности репродуктивных клеток, которая во многом обусловлена состоянием мембран (именно мембраны в первую очередь повреждаются в процессе замораживания–оттаивания).

Одним из способов оценки степени криоповреждения клеточных мембран спермиев является метод окрашивания с помощью красителя Sperm VitalStain (Nidaccon International AB, Швеция), который позволяет оценить криоповреждения за счет изменения окраски поврежденных клеток (Pleshnov, Stanishevskaya, 2018). Изучаются такие липидные фракции мембран, как гликолипиды, фосфолипиды, стерин; холестерин и соотношение холестерин/фосфолипиды и др., влияющие на состояние клеточных мембран, их проницаемость, микровязкость, текучесть и молекулярную подвижность липидов в мембране, на процесс капацитации, взаимодействие мембран яйцеклетки

и сперматозоида и на результат оплодотворения (Blesbois et al., 2005; Ahmed et al., 2014; Eubaid et al., 2015; Partyka et al., 2016; Плешанов и др., 2017).

В последних исследованиях в области криоустойчивости сперматозоидов было установлено влияние аминокислотного профиля семенной плазмы у разных пород кур на фрагментацию ДНК (Santiago-Moreno et al., 2019) и связь состава внутриклеточного протеина сперматозоида с показателями осмотического дисбаланса после размораживания (Morris et al., 2012). Результаты этих исследований раскрывают новые аспекты криобиологии сперматозоидов, что является предпосылкой к разработке новых технологий сохранения сперматозоидов, включая витрификацию и лиофилизацию.

**Проблемы ранней эмбриональной смертности.** Общеизвестно, что при использовании заморожено-оттаянных сперматозоидов снижается не только показатель их фертильности, но и жизнеспособность эмбрионов. Смертность эмбрионов на ранних стадиях развития может достигать 8–17% (Stanishevskaya, Pleshonov, 2018c). Данная область недостаточно изучена, так как технически трудно исследовать причины замершего развития, поскольку признаки ранней эмбриональной смерти не определяемы. Вероятно, одной из основных причин ранней эмбриональной смертности является повреждение ДНК, вызвавшее функциональные повреждения ядерных структур сперматозоида (Watson, 2000; Liptó, Hidas, 2006). Кроме того, не следует исключать влияния используемых при замораживании сперматозоидов токсичных криопротекторов эндо/экзоцеллюлярного действия и их концентрации, которые также могут быть причиной гибели эмбриона на ранней стадии развития (Mosca et al., 2019).

Таким образом, генетическое разнообразие сохраняемого материала снижается на различных стадиях постсингамии по причине выбытия особи с пониженной криорезистентностью репродуктивных клеток.

**Криопротекторы.** Необходимым условием успешной криоконсервации репродуктивных клеток является использование криопротекторов. Криопротекторы эндоцеллюлярного действия проникают в клетки и предупреждают образование внутриклеточного льда, но при высоких концентрациях могут оказывать повреждающее действие. Экзоцеллюлярные криопротекторы действуют вне сперматозоидов во внеклеточном пространстве и защищают клетки, обезвоживая внутриклеточное пространство и ограничивая действие осмотического шока во время оттаивания.

Глицерин, один из самых известных криопротекторов, наиболее эффективен и наименее токсичен для сперматозоидов петухов. К сожалению, он оказывает контрацептивное действие после осеменения кур и требует удаления перед осеменением. Наиболее широко используемые проникающие криопротекторы – диметилсульфоксид, диметилацетамид, диметилформамид и этиленгликоль. Образцы семени можно разморозить без дальнейшей обработки, и с этими веществами были получены высокие уровни фертильности в зависимости от скорости охлаждения и типа упаковки семени (Santiago-Moreno et al., 2011). Непроницающие криопротекторы, известные также как осмопротекторы, представляют собой низкомолекулярные гидрофильные нетоксичные молекулы, которые

помогают стабилизировать внутренние растворенные вещества при осмотическом стрессе в клетках. Эти криопротекторы часто используют в сочетании с проникающими (Benesova, Trefil, 2016; Mosca et al., 2016; Svoradová et al., 2017).

Последние исследования в области разработок криопротекторов принципиально иного действия основаны на антифризных гликопротеинах (АФГП) и антифризных протеинах (АФП), обнаруженных в крови и тканях пойкилотермических организмов, живущих в морозных средах (насекомые, морские рыбы). Полученные вещества ингибируют рост ледяных кристаллов неколлагативным образом. Использование АФП открывает перспективное направление для криоконсервации живых тканей и клеток. Сообщалось об эффективности некоторых АФП или АФГП рыб против гипотермического повреждения при сохранении ооцитов свиней и крупного рогатого скота, цельной печени крысы и модельных мембран. Для сохранения спермы были предприняты попытки разработать методы криоконсервации с добавлением АФП рыб у разных видов с различной эффективностью. Недавно обнаружено, что АФП и АФГП морских рыб улучшают результаты криоконсервации сперматозоидов буйволов (Qadeer et al., 2016).

Проводятся исследования по использованию рекомбинантных АФП на основе АФП личинок *Dendroides canadensis* (DAFP) для криоконсервации. Добавление DAFP в разбавитель защищает семя быка буйвола (*Bubalus bubalis*) на стадиях замораживания–оттаивания и повышает фертильность криоконсервированного семени (Qadeer et al., 2016).

### **Криобанки и их вклад в сохранение генетических ресурсов**

Коллекции генетических банков имеют неоценимое значение для предотвращения исчезновения пород из-за экстремального генетического состояния, такого как малая численность породы/популяции, высокая частота встречаемости генетических дефектов в результате интенсивной селекции и генетического дрейфа. Хранящийся материал от животных, не несущих нежелательных и летальных мутаций, может быть использован для снижения частоты дефектов до приемлемого уровня.

Биобанки служат готовым источником генетически разнообразной и специализированной ДНК. Сохраняемые материалы используются для исследований генетического разнообразия, изучения геномных ассоциаций, функций генов и др. Важно, что со временем генетические банки могут предоставлять образцы от разных поколений, тем самым способствуя повышению точности геномной селекции. Это последнее преимущество будет легче реализовать, если каталогизировать информацию с учетом фенотипа и генотипа и провести геномную паспортизацию закладываемых образцов (Wildt, 2000; Comizzoli, 2015).

Проблемой сохранения генетического разнообразия *in vitro* в том числе сельскохозяйственных птиц, занимаются во многих странах мира. Одним из преимуществ сохранения генетического разнообразия *in vitro* в криобанках является экономическая составляющая (Woelders,

2006; Santiago-Moreno et al., 2011; Silversides et al., 2013; FAO, 2015).

В последнее время развивается новый подход к взаимодействию между организациями, сохраняющими генофонд *ex situ in vivo* и *ex situ in vitro*. Деятельность генетического банка заключается не только в получении и сохранении резервного биологического материала, но и в активном сотрудничестве с коллекциями в живом разведении для расширения генетического разнообразия при сохранении *ex situ in vivo*.

Генетические банки по сохранению сельскохозяйственных птиц могли бы привлечь внимание опыт Европейского союза, Европейской ассоциации животноводства (ЕААР) и FAO, которыми созданы европейские и международные консультативные форумы для обсуждения и принятия конкретных мер по сохранению генетических ресурсов во всем мире. Однако претворение этой идеи в жизнь – сложный процесс, требующий междисциплинарного сотрудничества и разработки четко определенных целей (Maga et al., 2013).

Законодательством Российской Федерации предусмотрена нормативно-правовая база (Стратегия) для сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов (Распоряжение Правительства РФ от 17.02.2014 № 212-р), предполагающая сохранение в том числе *in vitro*. Что касается проблемы сохранения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных и птиц, то Федеральный закон «О племенном животноводстве» от 03.08.1995 № 123-ФЗ не предусматривает регулирование этой формы. Необходимо разработка и принятие закона и подзаконных актов, определяющих правовой статус генетических криобанков в общей системе сохранения генетических ресурсов.

## Список литературы / References

Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Жилинский М.А., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. Изменение биологических параметров семени сельскохозяйственной птицы при криоконсервации. С.-х. биология. 2018;6(53):1230-1237. DOI 10.15389/agrobiology.2018.6.1230rus.  
[Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Zhilinsky M.A., Volkova N.A., Zinovieva N.A. Change of biological parameters of poultry semen at cryopreservation. Sel'skohozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2018;6(53):1230-1237. DOI 10.15389/agrobiology.2018.6.1230eng.]  
Плешанов Н., Станишевская О., Силукова Ю. Оплодотворяющая способность криоконсервированной спермы петухов в зависимости от уровня холестерина в ней и его влияния на степень повреждения мембранных структур спермиев. Генетика и разведение животных. 2017;3:34-40.  
[Pleshonov N., Stanishevskaya O., Silyukova Y. Fertilizing ability of the cryopreserved cock sperm depending on cholesterol levels and cholesterol impact on the degree of damaging of the membrane structures in spermatozoa. Genetika i Razvedenie Zhivotnyh = Genetics and Breeding of Animals. 2017;3:34-40. (in Russian)]  
Сахарова С.А., Попов И.И. Удосконалення методів збереження генофонду курей. Птахівництво. 2001;51:135-141.  
[Sakharova S.A., Popov I.I. Improvement of chicken gene pool conservation methods. Ptahivnictvo = Poultry Farming. 2001;51:135-141. (in Ukrainian)]  
Целютин К.В., Тур Б.К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы (петухи, индюки, гусаки, селезни). СПб., 2013.

[Tselyutin K.V., Tour B.K. Artificial Insemination and Cryopreservation of Sperm (Roosters, Turkeys, Gander, Drakes). St. Petersburg, 2013. (in Russian)]  
Ahmed M., Sattar A., Iqbal S., Shahzad Q., Zahid Tahir M., Hammad Fayyaz M., Ahmad M. Cholesterol loaded cyclodextrin improves sperm survival in tris-based extender with less egg yolk used in buffalo bulls semen. Thai J. Vet. Med. Suppl. 2014;44:129-130.  
Arav A., Idda A., Nieddu S., Natan Y., Ledda S. High post-thaw survival of ram sperm after partial freeze-drying. J. Assist. Reprod. Genet. 2018;35(7):1149-1155. DOI 10.1007/s10815-018-1145-1.  
Benesova B., Trefil P. Possibilities for preserving genetic resources in birds. World's Poult. Sci. J. 2016;72(3):628-641. DOI 10.1017/S0043933916000489.  
Blesbois E., Grasseau I., Segneurin F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction. 2005;129(3):371-378. DOI 10.1530/rep.1.00454.  
Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F., Mignon-Grasteau S., Saint Jalme M., Mialon-Richard M.M. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. Theriogenology. 2008;69(2):252-261. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.09.019.  
Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D., Coquerelle G., Rault P., Tixier-Boichard M. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. Poult. Sci. 2007;86(3):555-564. DOI 10.1093/ps/86.3.555-564.  
Bogle O.A., Kumar K., Attardo-Parrinello C., Lewis S.E., Estanyol J.M., Ballescà J.L., Oliva R. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. Andrology. 2017;5:10-22. DOI 10.1111/andr.12279.  
Chen X., Zhu H., Hu C., Hao H., Zhang J., Li K., Zhao X., Qin T., Zhao K., Zhu H., Wang D. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. Reproduction. 2014;147(3):321-330. DOI 10.1530/REP-13-0313.  
Cheng C.Y., Chen P.R., Chen C.J., Wang S.H., Chen C.F., Lee Y.P., Huang S.Y. Differential protein expression in chicken spermatozoa before and after freezing-thawing treatment. Anim. Reprod. Sci. 2015;152:99-107. DOI 10.1016/anireprosci.2014.11.011.  
Çiftci Y., Aygün A. Poultry semen cryopreservation technologies. World's Poult. Sci. J. 2018;74(4):699-710. DOI 10.1017/s0043933918000673.  
Comizzoli P. Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. Asian J. Androl. 2015;17:640-645. DOI 10.4103/1008-682X.153849.  
Eubaid H.J., Al-Haidary B.A., Tawfiq L.J. Possible role for cholesterol in human seminal fluidin relations to other semen parameters & fertility. J. Babylon Univ./Pure Appl. Sci. 2015;23(2):654-659.  
FAO. 2015. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Ed. by B.D. Scherf, D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome, 2015. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>  
Foote R. The history of artificial insemination; selected notes and notes. J. Anim. Sci. 2002;80:1-10.  
Fulton J.E. Avian genetic stock preservation: an industry perspective. Poult. Sci. 2006;85:227-231.  
Gil L., Olaciregui M., Luno V., Malo C., González N., Martínez F. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. Reprod. Domest. Anim. 2014;49(4):72-81. DOI 10.1111/rda.12396.  
Hayashi T., Kansaku K., Abe T., Ueda S., Iwata H. Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. Anim. Sci. J. 2019;90(7):849-856. DOI 10.1111/asj.13219.  
Hezavehei M., Sharafi M., Kouchehfahani H.M., Henkel R., Agarwal A., Esmaeili V., Shahverdi A. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Re-

- prod. BioMed. Online. 2018;37(3):327-339. DOI 10.1016/j.rbmo.2018.05.012.
- Hopshi K., Yanagida K., Katayose H., Yazawa H. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zigote*. 1994;2:237-242. DOI 10.1017/S0967199400002033.
- Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 2009;112:136-149. DOI 10.1016/j.anireprosci.2008.04.016.
- Jia B.Y., Xiang D.C., Zhang B., Quan G.B., Shao Q.Y., Hong Q.H., Wu G.Q. Quality of vitrified porcine immature oocytes is improved by coculture with fresh oocytes during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2019;86:1615-1627. DOI 10.1002/mrd.23249.
- Kaneko T. New possibilities of sperm freeze-drying. *J. Fert. in Vitro*. 2012;2:5. DOI 10.4172/2165-7491.1000e119.
- Kaneko T., Ito H., Sakamoto H., Onuma M., Inoue-Murayama M. Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS One*. 2014;9(11):e113381. DOI 10.1371/journal.pone.0113381.g001.
- Kawase Y., Araya H., Kamada N., Jishage K., Suzuki H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2005;72(3):568-573. DOI 10.1095/biolreprod.104.035279.
- Kino K., Pain B., Leibo S.P., Cochran M., Clark M.E., Etches R.J. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.* 1997;76(5):753-760. DOI 10.1093/ps/76.5.753.
- Kowalczyk A., Lukaszewicz E.T., Rzońca Z. Successful preservation of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) semen in liquid and frozen states. *Theriogenology*. 2012;77:899-907. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.09.015.
- Ledesma A., Zalazar L., Buchelly Imbachi F., Pastore J.I., Brown P., Eddy E.M., Hozbor F., Cesari A. Recombinant peptide reverses cryo-capacitation in ram sperm and improves in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 2019;207:61-72. DOI 10.1016/j.anireprosci.2019.05.016.
- Li M.-W., Willis B.J., Griffey S.M., Spearow J.L., Lloyd K.C. Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. *Zygote*. 2009;17(03):239-251. DOI 10.1017/S09671994090005292.
- Liptói K., Hidas A. Investigation of possible genetic background of early embryonic mortality in poultry. *World's Poult. Sci. J.* 2006; 62(02):326-337. DOI 10.1079/wps2005101.
- Liptói K., Horvath G., Gal J., Varadi E., Barna J. Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation. *Anim. Reprod. Sci.* 2013;141(1-2): 86-89. DOI 10.1016/j.anireprosci.2013.06.016.
- Liu J., Cheng K.M., Silversides F.G. Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anim. Reprod. Sci.* 2012;134(3-4):197-202. DOI 10.1016/j.anireprosci.2012.08.002.
- Liu J.-L., Kusakabe H., Chang C.-C., Suzuki H., Schmidt D.W., Julian M., Pfeffer R., Bormann C.L., Tian X.C., Yanagimachi R., Yang X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol. Reprod.* 2004;70(6):1776-1781. DOI 10.1095/biolreprod.103.025957.
- Long J.A., Bongalardo D.C., Pelaez J., Saxena S., Settar P., O'Sullivan N.P., Fulton J.E. Rooster semen cryopreservation: effect of pedigree line and male age on post-thaw sperm function. *Poult. Sci.* 2010;89(5):966-973. DOI 10.3382/ps.2009-00227.
- Madeddu M., Mosca F., Abdel Sayed A., Zaniboni L., Mangiagal-li M.G., Colombo E., Cerolini S. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;171:58-64. DOI 10.1016/j.anireprosci.2016.05.014.
- Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim. Reprod. Sci.* 2013;38(1-2):25-38. DOI 10.1016/j.anireprosci.2013.02.006.
- Mavrodina T., Stanishevskaya O., Cherepanov S., Silyukova Y. Influence of sperm quality (cryopreserved and native) on the duration of spermatozoa storage in reproductive tracts of turkeys. *Anim. Reprod. Sci.* 2018a;194:e13. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.034.
- Mavrodina T., Stanishevskaya O., Cherepanov S., Silyukova Y. Influence of osmolality of the media for dilution and cryopreservation of turkey toms' sperm on fertilization ability of thawed sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2018b;53(2):164.
- Morris G.J., Acton E., Murray B.J., Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 2012;64:71-80. DOI 10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.
- Mosca F., Madeddu M., Abdel Sayed A., Zaniboni L., Iaffaldano N., Cerolini S. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology*. 2016;73(3):343-347. DOI 10.1016/j.cryobiol.2016.10.001.
- Mosca F., Zaniboni L., Abdel Sayed A., Madeddu M., Iaffaldano N., Cerolini S. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poult. Sci.* 2019;98(11):6071-6077. DOI 10.3382/ps/pez303.
- Muir W., Wong G.-K., Zhang Y., Wang J., Groenen M., Crooijmans R., Megens H.-J., Zhang H., Okimoto R., Vereijken A., Jungerius A., Albers G., Lawley C., Delany M., MacEachern S., Cheng H. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(45):17312-17317. DOI 10.1073/pnas.0806569105.
- Nandi S., Whyte J., Taylor L., Sherman A., Nair V., Kaiser P., McGrew M.J. Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult. Sci.* 2016;95:1905-1911.
- Partyka A., Bonarska-Kujawa D., Sporniak M., Strojcecki M., Nizański W. Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics. *Zygote*. 2016;24(5): 714-723.
- Pini T., Leahy T., Graaf S. Sublethal sperm freezing damage: manifestations and solutions. *Theriogenology*. 2018;118:172-181. DOI 10.1016/j.theriogenology.2018.06.006.
- Pleshanov N., Cherepanov S., Stanishevskaya O. Chicken sperm cryopreservation as a tool of maintenance genetic diversity in small scale populations (Proc. of the XVth Eur. Poultry Conf. Dubrovnik). *World's Poult. Sci. J.* 2018;445.
- Pleshanov N., Stanishevskaya O. Evaluation of the cocks spermatozoa membranes' damaging during cryopreservation with use of Sperm VitalStain colorant. *Reprod. Domest. Anim.* 2018;53(S2):183.
- Pleshanov N., Stanishevskaya O., Silyukova Y. Inheritance of cock's sperm cryostability. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(3):133.
- Qadeer S., Khan M., Shahzad Q., Azam A., Ansari M., Rakha B., Ejaz R., Husna A., Duman J., Akhter S. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility. *Theriogenology*. 2016;86(7):1662-1669. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.05.028.
- Rakha B., Ansari M., Akhter S., Hussaina I., Blesbois E. Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;174:45-55. DOI 10.1016/j.anireprosci.2016.09.004.
- Robertson L., Brown H., Staines H., Wishart G. Characterization and application of an avian *in vitro* spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *J. Reprod. Fertility*. 1997;110(2):205-211.
- Saint Jalme M., Lecoq R., Seigneurin F., Blesbois E., Plouzeau E. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*. 2003;59(3-4):875-888. DOI 10.1016/S0093-691X(02)01153-6.

- Santiago-Moreno J., Bernal B., Pérez-Cerezales S., Castaño C., Toledano-Díaz A., Esteso M.C., Gutiérrez-Adán A., López-Sebastián A., Gil M.G., Woelders H., Blesbois E. Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLoS One*. 2019;14(1):e0209910. DOI 10.1371/journal.pone.0209910.
- Santiago-Moreno J., Castaño C., Toledano-Díaz A., Coloma M.A., López-Sebastián A., Prieto M.T., Campo J.L. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult. Sci.* 2011; 90(9):2047-2053.
- Seigneurin F., Blesbois E. Update on semen cryopreservation methods in poultry species. In: Proc. of the XIIIth Eur. Poultry Conf. 2010;172. Available at: [https://www.visitvalencia.com/sites/default/files/pdfs/valencia\\_convention\\_bureau/candidaturas/epc2022valenciabiad.pdf](https://www.visitvalencia.com/sites/default/files/pdfs/valencia_convention_bureau/candidaturas/epc2022valenciabiad.pdf)
- Shahba M., El-Sheshtawy R., El-Azab A., Abdel-Ghaffar A., Ziada M., Zaky A. The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. *Asian Pac. J. Reprod.* 2016;5(6):524-535. DOI 10.1016/j.apjr.2016.11.002.
- Shahverdi A., Sharafi V., Gourabi H., Yekta A.A., Esmaeili V., Sharbatoghli M., Janzamin E., Hajnasrollahi M., Mostafayi F. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*. 2015;83:78-85. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.07.044.
- Silversides F.G., Robertson M., Liu J. Cryoconservation of avian gonads in Canada. *Poult. Sci.* 2013;92(10):2613-2617.
- Silyukova Y., Pleshanov N., Stanishevskaya O. The influence membranes damage and activity of roosters' sperm on the fertilization of eggs when using cured cryopreserved sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(3):101.
- Song X.Y., Silversides F. Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries. *Poult. Sci.* 2007;86:107-111. DOI 10.1093/ps/86.1.107.
- Stanishevskaya O., Pleshanov N. Cryotolerance of cocks' sperm depending on their breed and individual properties. *Anim. Reprod. Sci.* 2018a;194:e1-e27. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.031.
- Stanishevskaya O., Pleshanov N. Evaluation of the cocks spermatozoa membranes' damaging during cryopreservation with use of Sperm VitalStain colorant. *Reprod. Domest. Anim.* 2018b;53(2):183.
- Stanishevskaya O., Pleshanov N. Livability of chicken embryos, obtained after insemination by frozen/thawed sperm, depending on storage duration of incubation eggs. *Reprod. Domest. Anim.* 2018c; 53(2):199.
- Svoradová A., Kuželová L., Vašíček J., Baláži A., Hanusová E., Chrenek P. *In vitro* effect of various cryoprotectants on the semen quality of endangered Oravka chicken. *Zygote*. 2017;26(01):33-39. DOI 10.1017/s0967199417000685.
- Svoradová A., Kuželová L., Vašíček J., Olexíková L., Baláži A., Kulíková B., Hrnčár C., Ostro A., Bednarczyk M., Chrenek P. The assessment of cryopreservation on the quality of endangered Oravka rooster spermatozoa using casa and cytometry. *CryoLetters*. 2018; 39(6):359-365.
- Thélie A., Bailliard A., Seigneurin F., Zerjal T., Tixier-Boichard M., Blesbois E. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poult. Sci.* 2019;98(1):447-455. DOI 10.3382/ps/pey360.
- Thieu Ngoc Lan Phuong, Váradí E., Vegi B., Liptói K., Barna J. Comparison between low/programmable freezing and fast freezing protocols of Hungarian guinea fowl semen. *Athens J. Nat. Formal Sci.* 2014;1(3):175-183. DOI 10.13140/2.1.2727.2322.
- Tonus C., Cloquette K., Ectors F., Piret J., Gillet L., Antoine N., Desmecht D., Vanderplasschen A., Waroux O., Grobet L. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod. Fertil. Dev.* 2016;28:628-639.
- Tonus C., Connan D., Waroux O., Vandenhove B., Wayet J., Gillet L., Desmecht D., Antoine N., Ectors F.J., Grobet L. Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: a comparative study. *Theriogenology*. 2017;88:197-206. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.09.022.
- Valcarce D.G., Carton-García F., Riesco M.F., Herraiz M.P., Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology*. 2013;1:723-730. DOI 10.1111/j.2047-2927.2013.00116.x.
- van der Lavoie M., Diamond J., Leighton P., Mather-Love C., Heyer B., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L., Gessaro T., Swanberg S., Delany M., Etches R. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*. 2006;441(7094):766-769.
- Varadi E., Vegi B., Liptói K., Barna J. Methods for cryopreservation of Guinea fowl sperm. *PLoS One*. 2013;8(4):e62759. DOI 10.1371/journal.pone.0062759.
- Vilagrán I., Castillo-Martín M., Prieto-Martínez N., Bonet S., Yeste M. Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;165:22-30. DOI 10.1016/j.anireprosci.2015.12.001.
- Vilagrán I., Yeste M., Sancho S., Castillo J., Oliva R., Bonet S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*. 2015;3(2):345-356. DOI 10.1111/andr.12009.
- Wakayama S., Kamada Y., Yamanaka K., Kohda T., Suzuki H., Shimazu T., Tada M.N., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H., Mizutani E., Ishino F., Yano S., Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 14(23):5988-5993. DOI 10.1073/pnas.1701425114.
- Wang S., Wang W., Xu Y., Tang M., Fang J., Sun H., Sun Y., Gu M., Liu Z., Zhang Z., Lin F., Wu T., Song N., Wang Z., Zhang W., Yin C. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *Proteomics*. 2014;14:298-310. DOI 10.1002/pmic.201300225.
- Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;60-61:481-492.
- Wildt D. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. *ILAR J.* 2000;41(4):228-234. DOI 10.1093/ilar.41.4.228.
- Woelders H. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poult. Sci.* 2006;85:216-222.
- Wu Y., Guo L., Liu Z., Wei H., Zhou Y., Tan J., Peng J. Microelements in seminal and serum plasma are associated with fresh semen quality in Yorkshire boars. *Theriogenology*. 2019;132:88-94. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.04.002.

#### ORCID ID

Y.L. Silyukova [orcid.org/0000-0003-1905-6373](https://orcid.org/0000-0003-1905-6373)  
O.I. Stanishevskaya [orcid.org/0000-0001-9504-3916](https://orcid.org/0000-0001-9504-3916)  
N.V. Dementieva [orcid.org/0000-0003-0210-9344](https://orcid.org/0000-0003-0210-9344)

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00009).

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

Поступила в редакцию 10.10.2019. После доработки 13.11.2019. Принята к публикации 04.12.2019.

# Полногеномные ассоциативные исследования распространения пороков развития и других селекционно значимых качественных признаков у потомства хряков крупной белой породы российской селекции

А.А. Траспов , О.В. Костюнина, А.А. Белоус, Т.В. Карпушкина, Н.А. Свеженцева, Н.А. Зиновьева

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, Подольский городской округ, Московская область, Россия

 e-mail: traspovalex@gmail.com

**Аннотация.** Выявление областей генома, прямо или опосредованно связанных с признаками пороков развития у домашних свиней, может способствовать идентификации генетических мишеней, используемых в качестве биомаркеров индивидуальных особенностей формирования экстерьера, их метаболического статуса, а также подверженности генетическим заболеваниям. Такие исследования напрямую связаны с повышением экономической эффективности, поскольку позволяют выявлять и исключать из селекционного процесса животных-носителей нежелательных генов, фенотип которых может не проявляться. В данной работе проведен поиск подобных целевых генов и геномных регионов с помощью полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) с использованием ДНК-чипов PorcineSNP60K BeadChips (Illumina, San Diego, USA). Проанализировано 48 хряков свиней крупной белой породы селекционно-гибридного центра «Знаменский» Орловской области по 21 недостатку экстерьера и дефектам развития у 39 153 их потомков. Расчеты производили по линейной модели смешанного типа в программном пакете GEMMA. Из изначального сета в 61 000 SNP были отобраны 36 704 полиморфных SNP, в которых найдены 24 полиморфизма, входящих в 11 генов ( $P < 0.1$ ), статистически значимо коррелирующих с признаками аномалий развития в геноме свиней, такими как атрезия анального отверстия (*ARMC7*, *FANCC*, *RND3*, *ENSSSCG00000017216*), проблемы с конечностями (*PAWR*, *NTM*, *OPCML*, *ENSSSCG00000040250*, *ENSSSCG00000017018*) и тремор поросят (*RIC3*, *ENSSSCG00000032665*). Также была выявлена коэкспрессия генов *NTM*, *OPCML* и *RND3*, участвующих в регуляции клеточной адгезии. Проведенная работа подтвердила актуальность применения подобного подхода в полногеномно-ассоциативных исследованиях для детектирования единичных SNP, связанных с отдельными признаками, даже для небольших выборок. Ключевые слова: маркер-зависимая селекция; количественные признаки; SNP-чипы; полногеномные ассоциативные исследования; пороки развития свиней.

**Для цитирования:** Траспов А.А., Костюнина О.В., Белоус А.А., Карпушкина Т.В., Свеженцева Н.А., Зиновьева Н.А. Полногеномные ассоциативные исследования распространения пороков развития и других селекционно значимых качественных признаков у потомства хряков крупной белой породы российской селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):185-190. DOI 10.18699/VJ20.612

## Whole-genome association studies of distribution of developmental abnormalities and other breeding-valuable qualitative traits in offspring of the Russian large-white boars

А.А. Траспов , О.В. Костюнина, А.А. Белоус, Т.В. Карпушкина, Н.А. Свеженцева, Н.А. Зиновьева

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitzky, Podolsk municipal district, Moscow region, Russia

 e-mail: traspovalex@gmail.com

**Abstract.** Identifying genome regions that are directly or indirectly associated with developmental defects and malformations in domesticated pigs can help identify genomic traits used as biomarkers of the structural and functional composition of the body, their metabolic status and genetic diseases as well. Such studies are directly related to the improvement of the economic efficiency, as they allow identification and exclusion of defect animals, who may carry target genes not appearing phenotypically, from the breeding process. In the current work, we have searched for these kind of target genes and genome regions with conducting the genome-wide association studies using PorcineSNP60K BeadChips (Illumina, San Diego, USA). A total of 48 boars of a large white breed of the nucleus farm "Znamenskoe" were analyzed for 21 traits of indicated shortcomings of the exterior and defects of development in 39,153 their offspring. Calculations were made using a mixed type linear model in package GEMMA. In this study, we selected only 36,704 polymorphic SNPs from an initial 61,000-strong SNP set. After GWAS, we obtained 24 alleles in 11 corresponding genes ( $P < 0.1$ ) in the genome of pigs, which are significantly correlated with traits of developmental abnormalities such as

anal atresia (*ARMC7*, *FANCC*, *RND3*, *ENSSSCG00000017216*), limb problems (*PAWR*, *NTM*, *OPCML*, *ENSSSCG00000040250*, *ENSSSCG00000017018*) and tremor of piglets (*RIC3*, *ENSSSCG00000032665*). Also, co-expression of the *NTM*, *OPCML* and *RND3* genes was revealed. This study confirms the relevance of using the single SNP detection according to the single trait approach in associative studies, even for small sample numbers.

Key words: marker assign selection; quantitative trait loci; SNP-chips; genome-wide association studies; malformations.

**For citation:** Traspov A.A., Kostyunina O.V., Belous A.A., Karpushkina T.V., Svejenceva N.A., Zinovieva N.A. Whole-genome association studies of distribution of developmental abnormalities and other breeding-valuable qualitative traits in offspring of the Russian large-white boars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):185-190. DOI 10.18699/VJ20.612 (in Russian)

## Введение

В свиноводстве болезни приводят к большим экономическим потерям не только из-за затрат на медикаментозное лечение, но и вследствие снижения продуктивных показателей больных животных. На данный момент у домашних свиней насчитывается более 130 болезней как наследственной, так и инфекционной этимологии ([https:// thepigsite.com/disease-guide](https://thepigsite.com/disease-guide)). Расширение знаний о причинах болезней позволит нивелировать их влияние на организм благодаря более совершенным программам разведения (Boddicker et al., 2012). Отклонения от нормального развития могут затрагивать различные органы и системы, ухудшая физическое состояние животного или даже приводя к смерти. Анатомические аномалии или дефекты, вызванные генетическими или экологическими факторами, встречаются по крайней мере у 1 % новорожденных поросят. В отдельных стадах такие аномалии могут встречаться с достаточно высокой частотой, приводя к значительным экономическим потерям (See et al., 2006).

Одна из стратегий снижения экономических потерь, обусловленных наследственными болезнями, – это выявление и исключение из разведения животных, генетически чувствительных к таким заболеваниям. Например, уже с начала 1990-х гг. селекционеры используют технологию маркерной селекции для выявления нежелательных аллелей гена *HAL*, вызывающего синдром стресса свиней, и гена *RN*, обуславливающего дефект «кислого мяса» (Salas, Mingala, 2017). Дополнение индексов племенной ценности (EBV) информацией, полученной на основании анализа непосредственно генотипа животного, делает возможным создание нового типа индекса – GEBV (genetic evaluation breeding value), характеризующегося более высокой точностью. Таким образом, дополнение традиционных методов оценки молекулярно-генетическими данными стало шагом вперед в направлении повышения интенсивности искусственного отбора (Племяшов, 2014). Выявление молекулярных маркеров, ответственных за желательные фенотипические эффекты, облегчает селекционный процесс и ускоряет получение прибыли в производстве (Ernst, Steibel, 2013). Исследования ассоциаций ДНК-маркеров в свиноводстве привлекают внимание ученых как в нашей стране (Долматова, Сквородин, 2010), так и за рубежом (Bruun et al., 2006; Ciobanu et al., 2011). Понимание генетических механизмов, ответственных за конкретные генетические аномалии, поможет производителям племенной продукции в разработке методов отбора, поскольку разные типы маркеров в геноме отвечают за разные фенотипические признаки. Так, с помощью MAS

(маркер-зависимая селекция) можно проводить не только выбраковку, но и целевой отбор животных, устойчивых к заболеваниям. К примеру, отбор индивидуумов с отсутствием рецепторов адгезии *E. coli* на поверхности кишечника (*K88*) позволяет получить от них потомство, устойчивое к колибактериозу (Nyachoti et al., 2012). Раскрытие механизмов появления генетических аномалий поможет производителям в разработке методик отбора животных с «желательными» генотипами.

Современные методы полногеномных исследований (детекция SNP, полногеномное секвенирование) находят применение в выявлении генетических факторов и, как следствие, в понимании биологических процессов, лежащих в основе развития экстерьера у свиней. С учетом возможного сцепленного наследования и коэкспрессии соседних генов, детекции отдельных SNP может быть недостаточно для детального изучения комплексных признаков заболеваний или резистентности к ним. Включение в селекционные программы ДНК-маркеров QTL в качестве дополнительного критерия позволяет повысить точность оценки племенной ценности животных в аспекте их продуктивности, с учетом потенциального носительства генетических дефектов или наличия резистентности к ряду заболеваний (Sermyagin et al., 2016, 2018).

## Материалы и методы

Исследования проводили на хряках крупной белой породы и их потомках, разводимых в ООО «Знаменский селекционно-гибридный центр» Орловской области. Было произведено полногеномное генотипирование хряков ( $n = 48$ ) с использованием ДНК-чипа средней плотности Porcine SNP60BeadChip (Illumina Inc., США). Контроль качества геномных данных выполняли в программном пакете Plink 1.9. Использовались параметры качества генотипирования 90 % для одного SNP (geno 0.1), для одного образца (mind 0.1), а также для частот минорных аллелей не более 0.5 % (maf 0.05) (Purcell et al., 2007). Всего фильтрацию прошли 36 704 полиморфных SNP.

База фенотипов потомков хряков была получена из ООО «Знаменский селекционно-гибридный центр». База данных содержала 31 нежелательный показатель для каждого животного. У потомков хряков ( $n = 39\,153$ ) рассчитывали частоту встречаемости изучаемых признаков путем деления числа носителей фенотипического показателя на общее число потомков. Для проверки гипотезы о нормальном распределении использовали критерий согласия Пирсона ( $\chi^2$  для уровня значимости 0.05) с последующей нормализацией данных в пакете bestNormalize для языка R

(Peterson, 2017). В итоге мы получили 21 нормализованный показатель, характеризующий пороки экстерьера и другие нежелательные качественные показатели: крипторхизм (CR), недоношенность (AF), атрезия ануса (AA), черные и серые пятна на шкуре (BD, GD), недвес при рождении (LW), несоответствие породе (WB), общий вес при рождении (CW), проблемы с пищеварением (DP), гермафродитизм (HM), наличие пупочной и паховой грыж (CH, UH), низкий материнский индекс (LSI), пониженное либидо у хряков (LL), несовершенный эпителиогенез (SL), низкая интенсивность роста (SG), некачественное семя у хряков-производителей (LSQ), синдром спастического тремора поросят (TP), уродства (UP), искривление конечностей (CL) и аномалии копыт (HA).

Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS) выполняли в программном пакете GEMMA, используя линейную модель смешанного типа для частот встречаемости:

$$y = W\alpha + x\beta + u + \epsilon;$$

$$u \sim MVN_n(0, \lambda\tau^{-1}K), \epsilon \sim MVN_n(0, \tau^{-1}I_n),$$

где  $y$  – ковариантный признак (наличие/отсутствие заболевания или другого изучаемого качественного признака в виде бинарных значений 0 или 1);  $W = (w_1, \dots, w_c)$  – матрица коварианс (фиксированные эффекты),  $\alpha$  – перехватывающий коэффициент,  $x$  – маркерные генотипы;  $\beta$  – эффект маркера,  $u$  – случайные эффекты;  $\epsilon$  – ошибки;  $\tau^{-1}$  – дисперсия остаточных ошибок;  $\lambda$  – отношение между двумя компонентами дисперсии;  $K$  – матрица родства, соотношенная с идентификационной матрицей  $I_n$ ;  $MVN_n$  – многомерное нормальное распределение.

Матрица родства рассчитывалась по формуле (в данном случае  $X$  – матрица  $n \times P$  генотипов)

$$G_c = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p (x_i - 1_n \bar{x}_i)(x_i - 1_n \bar{x}_i)^T,$$

$$G_c = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p \frac{1}{v_{x_i}} (x_i - 1_n \bar{x}_i)(x_i - 1_n \bar{x}_i)^T,$$

где  $x_i$  – каждая  $i$ -я колонка с генотипами каждого  $i$ -го SNP;  $\bar{x}_i$  – среднее для образца;  $v_{x_i}$  – вариация для каждого образца  $i$ -го SNP;  $1_n$  – вектор для каждого ( $n \times 1$ ) первого образца.

В частности, SNP с меньшей малой частотой аллелей имеют тенденцию оказывать больший эффект (который обратно пропорционален его вариации в генотипе), и в подобном случае выбирается первая модель матрицы (Zhou, Stephens, 2012). Проверка альтернативной гипотезы  $H_1: \beta \neq 0$  и  $H_0: \beta = 0$  для каждого SNP, в свою очередь, проводилась по трем наиболее распространенным статистическим тестам (Wald, likelihood ratio test или score). В данной работе пакетом GEMMA была автоматически получена оценка максимального правдоподобия параметров  $\lambda$  и  $\beta$  (Maximum Likelihood Estimate) для дальнейшего вычисления соответствующего значения  $P$  (Zhou, Stephens, 2012). Фильтрация дисперсионных компонент  $\lambda$  была проведена с пороговым значением  $P < 1e-10$ . Для подтверждения достоверного влияния SNP и определения значимых регионов в геноме животных были применены тесты Бонферрони (BFR) с пороговым значением  $P \leq 0.1$  ( $P < 2.86 \times 10^{-6}$ ) и ожидаемой долей ложных отклонений В. Efron по количеству SNP отдельно для каждого

признака (Benjamini, Hochberg, 1995). При вычислении скорректированных индексов  $Q$  использовался список  $P$ -значений, полученных в результате одновременного тестирования многих гипотез (Wald, likelihood ratio или Score) (Benjamini, Hochberg, 1995).  $Q$ -значения измеряли долей ложно-позитивных индексов  $P$  в случае прохождения порогового интервала (Storey et al., 2017). В данном исследовании основным критерием был установлен пороговый интервал  $P < 0.1$ .

Для поиска генов, ассоциированных с изучаемыми признаками, использовали данные VEP (variant effect predictor) (McLaren et al., 2016). Для визуализации значений  $P$  и геномного контроля  $\lambda$  были построены Manhattan и QQ графики в пакете qqman с помощью языка программирования R (Storey et al., 2017; Turner, 2017). Идентификацию генов и их функциональную аннотацию осуществляли по базе взаимосвязей STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>). Матрицы гаплотипов были построены посредством программного пакета Haploview (Barrett et al., 2005).

## Результаты

По результатам исследования были установлены значимые (согласно критериям BFR, с пороговым значением  $P < 0.1$ ) ассоциативные связи для трех из 21 проанализированного качественного показателя хряков-производителей: атрезия ануса, AA; синдром спастического тремора поросят, TP; аномалии копыт, HA. Пять SNP с высокими значениями достоверности обнаружены для признака AA ( $P = 1.16e-06 \dots 3.68e-09$ ), пять – для TP ( $P = 1.721e-06 \dots 1.24e-08$ ) и четырнадцать – для HA ( $P = 1.766e-06 \dots 1.737e-09$ ) (см. таблицу).

Для AA и TP ( $\lambda \sim 1$ ) уровень инфляции статистики был на номинальном уровне, а для всех признаков коэффициент геномного контроля был близок к единице, как показано на графиках квантиль–квантиль (QQ-график, рис. 1). Однако у HA выявлено наличие близкорасположенных SNP, входящих в одинаковые группы генов со значительными превышениями  $P$  порога (ASGA0104521,  $P = 1.737e-09$ ). Значимые нуклеотидные полиморфизмы были локализованы внутри отдельных генов. В ходе расчета LD между SNP с самыми высокими значениями  $P$  были отобраны полиморфизмы со значениями  $r^2$ , наиболее близкими к 1 по отношению к ALGA0053356 ( $P = 3.115e-07$ , Pos 9:64845247). В результате в один блок с ним вошли ALGA0053410, MARC0024097, MARC0051180, DRGA0009397, что подтверждает ожидаемое функциональное родство отобранных SNP и генов, их включающих (рис. 2).

Анализ SNP, статистически значимо связанных с пороками развития поросят крупной белой породы, выявил несколько генов, имеющих отношение к различным биологическим процессам. Так, гены *ARMC7*, *FANCC* участвуют в репарации ДНК и клеточном цикле. *FANCC* принимает участие в передаче анемии Фанкони, *RND3* выступает как регулятор цитоскелетных структур клетки, препятствующих адгезии. *UBAP2* функционирует в процессе убиквитинирования и может проявлять повышенную экспрессию в надпочечниках и лимфатических узлах. Ген *PAWR* является опухолевым супрессором, который

Достоверные ассоциации единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), сопряженных с оцениваемыми признаками у поросят, и их локализация в геноме *Sus scrofa*

Признак	SNP	RS	Ch	Pos	P	A	a	$\beta$	AF	Gene
AA	ALGA0051997	rs81407818	9	27603177	2.666e-06	A	C	2.001394e-03	0.056	-
	ASGA0106167	rs81306460	10	31302650	1.158e-06	A	G	2.081251e-03	0.056	FANCC
	MARC0082230	rs81265837	12	6136945	1.419e-07	G	A	2.193750e-03	0.056	ARMC7
	ASGA0052617	rs81435284	12	6229056	1.419e-07	G	A	2.193750e-03	0.056	ENSSSCG00000017216
	ASGA0068580	rs80936660	15	1015164	3.681e-09	G	A	2.383802e-03	0.056	RND3
TP	H3GA0025901	rs81415828	9	1626616	1.24e-08	A	G	6.081343e-03	0.056	ENSSSCG00000032665
	ASGA0099429	-	9	4656663	1.24e-08	C	A	6.081343e-03	0.056	-
	ASGA0040658	rs81413027	9	1417890	3.107e-07	G	A	4.690571e-03	0.083	-
	MARC0013008	rs81275805	9	1438136	1.721e-06	G	A	3.828089e-03	0.097	RIC3
	ASGA0054790	rs81435622	12	45034446	9.638e-07	G	A	3.975254e-03	0.083	-
HA	ASGA0104521	rs81304512	2	141925578	1.737e-09	C	A	2.346000e-03	0.056	ENSSSCG00000040250
	ALGA0014069	rs81360100	2	85105474	1.755e-06	G	A	1.872074e-03	0.083	PAWR
	ASGA0027165	rs81386880	5	106682107	1.266e-07	A	G	2.036564e-03	0.069	-
	ASGA0090791	rs81309195	6	34358134	1.953e-06	A	G	1.764154e-03	0.1	-
	ALGA0053356	rs81412069	9	64845247	3.115e-07	A	C	2.010894e-03	0.083	NTM
	ALGA0053410	rs81412202	9	65286501	3.115e-07	A	C	2.010894e-03	0.083	NTM
	MARC0024097	rs81292427	9	65379314	3.115e-07	A	G	2.010894e-03	0.083	OPCML
	MARC0051180	rs81242341	9	65591835	3.115e-07	A	C	2.010894e-03	0.083	OPCML
	DRGA0009397	rs81294295	9	65650293	3.115e-07	A	G	2.010894e-03	0.083	-
	M1GA0012732	rs81415754	9	12012638	1.766e-06	A	C	1.807143e-03	0.083	-
	ALGA0053344	rs81412038	9	64410416	2.514e-06	G	A	1.799440e-03	0.1	ENSSSCG00000017018
	MARC0041414	rs81235185	16	60218765	1.766e-06	G	A	1.807143e-03	0.083	ENSSSCG00000017018
	MARC0112574	rs81283873	16	60220801	1.766e-06	G	A	1.807143e-03	0.083	-
	H3GA0055670	-	17	52247420	1.766e-06	G	A	1.807143e-03	0.083	-

Примечание. SNP – однонуклеотидный полиморфизм; RS – обозначение SNP в базе NIH dbSNP; Ch – хромосома; Pos – позиция; P – достоверность; A – эффекторный аллель; a – референсный аллель;  $\beta$  – эффект аллеля; AF – частота эффекторного аллеля; Gene – наименование гена, включающего в себя исследуемый SNP. Прочерк – отсутствие значения.

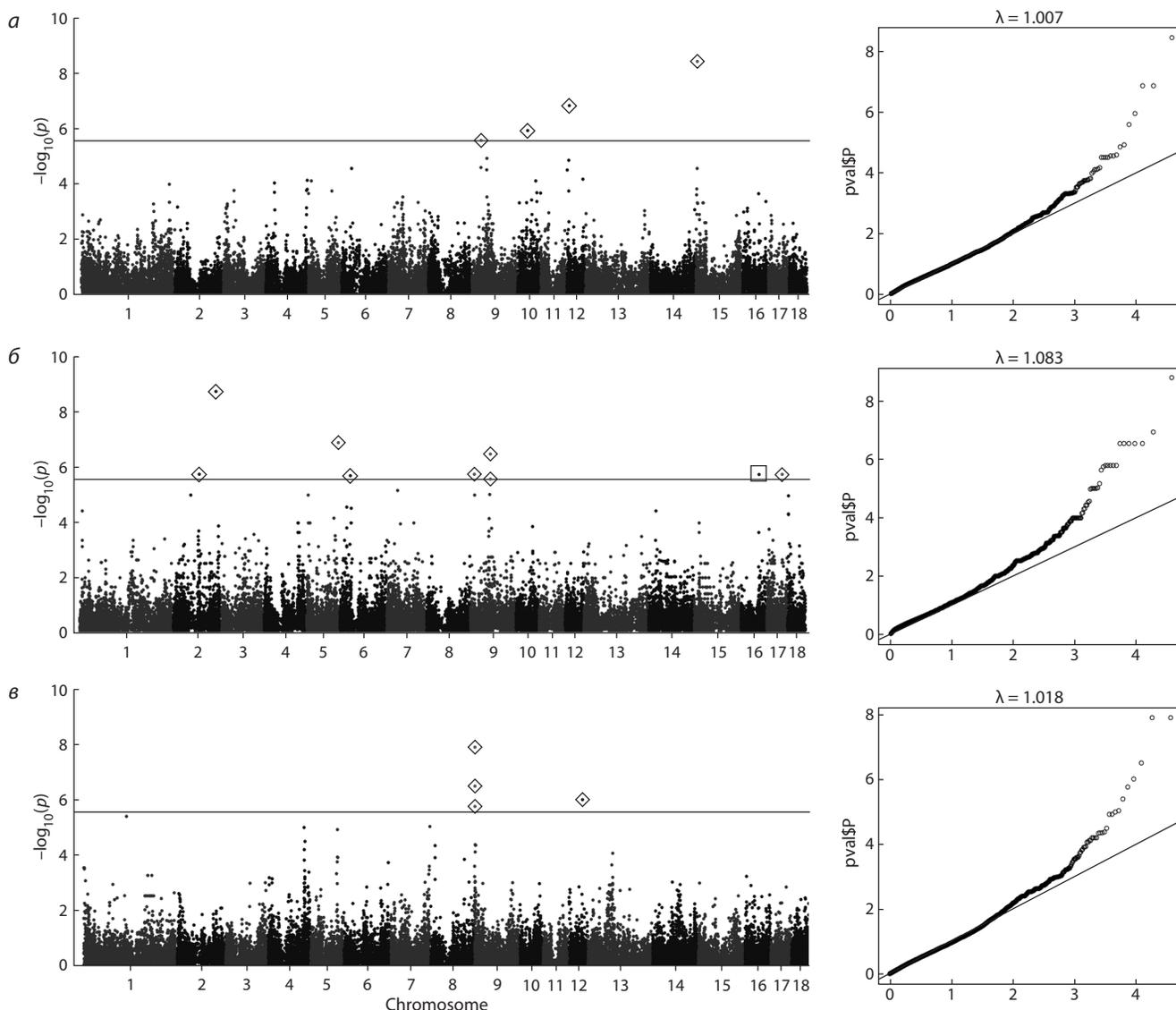
селективно индуцирует апоптоз в раковых клетках через внутриклеточные и внеклеточные механизмы. *RIC3* влияет на свертывание и сборку рецепторных субъединиц в эндоплазматическом ретикулуме и адгезию на поверхности клетки.

Гены *NTM* и *OPCML* экспрессируются совместно и находятся на соседних участках 9-й хромосомы: 58700168–58967505 и 59037716–59271936 п. н. соответственно ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100519556](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100519556), [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100738337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100738337)) (рис. 3). *NTM* способствует росту и адгезии на поверхности нейронов и тесно связан с родственным членом семейства, опиоидным связывающим белком-активатором клеточной адгезии *OPCML*.

### Заключение

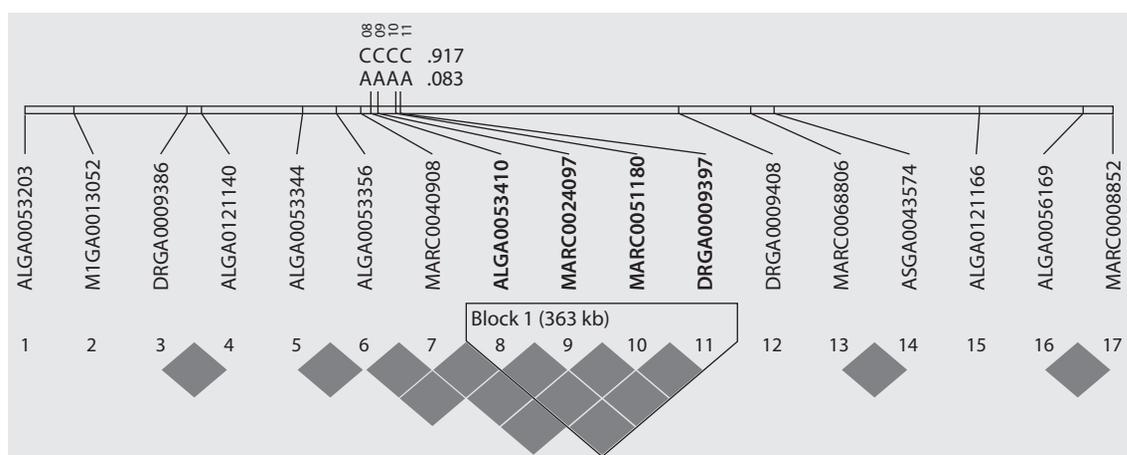
Полученные нами данные могут быть использованы при разработке селекционных программ, направленных на элиминацию пороков развития и других нежелательных

количественных и качественных признаков свиней, в том числе являющихся сложными признаками. Увеличение степени разрешения сканирования от 100000 SNP и выше, а также увеличение размера выборки от нескольких сотен животных и более сделает возможным выявление значительно большего количества SNP-кандидатов с высоким уровнем достоверности ( $P < 0.01$ ), а также уменьшение «генетического шума» (false positive components). В итоге такой метод детекции позволит не только выявлять животных-носителей генов-кандидатов нежелательных признаков, но и создать дешевые тест-системы для их идентификации. Хряков-производителей, имеющих подобные генетические особенности, необходимо оценивать с помощью комплексных моделей расчета племенной ценности с учетом выявленных маркеров (GEBV) и выбраковывать в случае крайне низких показателей продуктивности, а их потомство исключать из воспроизводства.

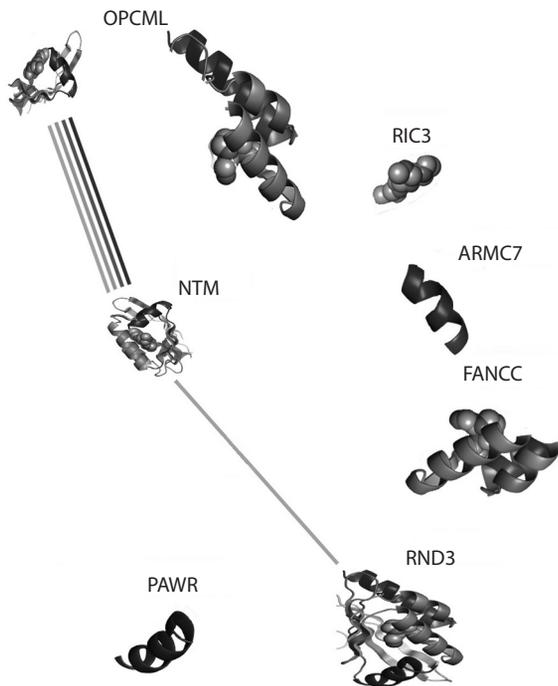


**Рис. 1.** График Manhattan plot, иллюстрирующий GWAS (левая колонка) и соответствующие вероятности распределения достоверностей P (правая колонка) в исследованных популяциях свиней породы крупная белая (Знаменский СГЦ).

*a* – животные с атрезией анального отверстия (АА); *б* – с аномалиями копыт (НА); *в* – со спастическим тремором поросят (ТР). Сплошная линия – уровень Бонферрони (0.05); ромбами отмечены достоверные значения P, для которых нулевая гипотеза принимается.



**Рис. 2.** LD диаграмма, иллюстрирующая 17 SNP с наибольшими значениями сцепления  $r^2$  между ALGA0053356 и четырьмя полиморфными вариантами (ALGA0053410, MARC0024097, MARC0051180, DRGA0009397) с образованием гапблока размером 363 kb в группе НА.



**Рис. 3.** Диаграмма STRING (<https://string-db.org>), иллюстрирующая сильное взаимодействие коэкспрессируемых генов *OPCML* и *NTM* через белки и их опосредованное влияние на *RND3*.

Проделанная работа иллюстрирует необходимость проведения дополнительных исследований с использованием методов GWAS в аспекте характеристики популяций сельскохозяйственных животных по ДНК-маркерам и идентификации комплексных генотипов, ассоциированных с селекционно значимыми признаками как пороков развития, так и продуктивных качеств. Данное направление крайне необходимо в современных условиях высокоэффективного воспроизводства сельскохозяйственных животных.

## Список литературы / References

Долматова А.В., Сквородин Е.Н. Использование ДНК-полиморфизма в селекции свиней. В: Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Современные проблемы интенсификации производства свинины в странах СНГ», посвященной 75-летию юбилею заслуженного деятеля науки РФ, профессора В.Е. Улитко, 7–10 июля 2010 г. Ульяновск, 2010;138-143.  
[Dolmatova A., Skovorodin E. The use of DNA polymorphism in the selection of pigs. In: Proc. of the Int. Sci. and Pract. Conf. “Modern Problems of Intensification of Pork Production in the CIS Countries”, dedicated to the 75th anniversary of the Honored scientist of the Russian Federation, professor V.E. Ulitko, July 7–10, 2010. Ulyanovsk, 2010;138-143. (in Russian)]

Племьяшов К.В. Геномная селекция – будущее животноводства. Животноводство России. 2014;5:2-4.  
[Plemyashov K. Genomic selection – the future of animal husbandry. Zhivotnovodstvo Rossii = Animal Husbandry of Russia. 2014;5:2-4. (in Russian)]

Barrett J., Fry B., Maller J., Daly M. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265. DOI 10.1093/bioinformatics/bth457.

Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B*. 1995;57(1):289-300. DOI 10.2307/2346101.

Boddicker N., Waide E.H., Rowland R.R.R., Lunney J.K., Garrick D.J., Reedy J.M., Dekkers J.C.M. Evidence for a major QTL associated with host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge. *J. Anim. Sci.* 2012;90(6):1733-1746.

Bruun C.S., Jorgensen C.B., Nielsen V.H., Andersson L., Fredholm M. Evaluation of the porcine *melanocortin 4 receptor (MC4R)* gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. *Anim. Genet.* 2006;37(4):359-362. DOI 10.1111/j.1365-2052.2006.01488.x.

Ciobanu D.C., Lonergan S.M., Huff-Lonergan E.J. Genetics of meat quality and carcass traits. In: Rothschild M.F., Ruvinsky A. (Eds.). *The Genetics of the Pig*. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2011;355-389.

Ernst C.W., Steibel J.P. Molecular advances in QTL discovery and application in pig breeding. *Trends Genet.* 2013;29(4):215-224. DOI 10.1016/j.tig.2013.02.002.

McLaren W., Gil L., Hunt S., Riat H., Ritchie G., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016;17(1):122. DOI 10.1186/s13059-016-0974-4.

Nyachoti C., Kiarie E., Bhandari S., Zhang G., Krause D. Weaned pig responses to *Escherichia coli* K88 oral challenge when receiving a lysozyme supplement. *J. Anim. Sci.* 2012;90(1):252-260. DOI 10.2527/jas.2010-3596.

Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M., Bender D., Maller J., Sklar P., Bakker P., Daly M., Sham P. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:559-575. DOI 10.1086/519795.

Peterson R.A. Estimating normalization transformations with bestNormalize. 2017. Available at: <https://github.com/petersonR/bestNormalize>

Salas R., Mingala C. Genetic factors affecting pork quality: halothane and rendement napole genes. *Anim. Biotechnol.* 2017;28(2):148-155. DOI 10.1080/10495398.2016.1243550. Epub 2016 Nov. 17.

See T., Max F., Rothschild C., Christians J. Swine Genetic Abnormalities. *Pork Information Gateway*. 2006; PIG 06-06-01.

Sermyagin A., Gladyr E., Plemyashov K., Kudinov A., Dotsev A., Deniskova T., Zinovieva N. Genome-wide association studies for milk production traits in Russian population of Holstein and black-and-white cattle. In: Anisimov K.V. et al. (Eds.). *Proc. of the Sci.-Pract. Conf. “Research and Development – 2016”*, 14–15 Dec. 2016, Moscow, Russia. Springer Open, 2018;591-599. DOI 10.1007/978-3-319-62870-7\_62.

Sermyagin A., Kovalyuk N., Ermilov A., Yanchukov I., Satsuk V., Dotsev A., Deniskova T., Brem G., Zinovieva N.A. Associations of *Bola-drb3* genotypes with breeding values for milk production traits in Russian dairy cattle population. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2016;51(6):775-781. DOI 10.15389/agrobiol.2016.6.775eng.

Storey J., Bass A., Dabney A., Robinson D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R package version 2.10.1. 2017. <http://github.com/StoreyLab/qvalue>

Turner S. qqman: Q-Q and Manhattan Plots for GWAS Data. R package version 0.1.4. 2017. <https://CRAN.R-project.org/package=qqman>

Zhou X., Stephens M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat. Genet.* 2012;44:821-824. DOI 10.1038/ng.2310.

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 18-76-00034.

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

Поступила в редакцию 24.04.2019. После доработки 05.11.2019. Принята к публикации 06.11.2019.

# Коэкспрессия глутаматергических генов и генов аутистического спектра в гиппокампе у самцов мышей с нарушением социального поведения

И.Л. Коваленко , А.Г. Галямина, Д.А. Смагин, Н.Н. Кудрявцева

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

 e-mail: koir@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** В настоящее время существует представление о вовлеченности глутаматергической системы (ГГ) в механизмы развития аутизма. В предыдущих исследованиях нами было показано, что негативный социальный опыт, приобретенный в ежедневных межсамцовых конфронтациях, приводит к нарушениям в социальном поведении: снижению коммуникативности, нарушению социализации, появлению стереотипных форм поведения, которые могут рассматриваться как симптомы аутистического спектра. В связи с этим целью нашей работы было изучение с помощью транскриптомного анализа изменений экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в функционирование глутаматергической системы, и генов, связанных с патологией аутизма (ГА), в гиппокампе. В эксперименте использовали животных с нарушениями социального поведения, вызванными повторным опытом социальных побед или поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях. Для формирования групп животных с контрастными типами поведения использовали модель сенсорного контакта (хронического социального стресса). Полученные образцы мозга были секвенированы в ЗАО «Геноаналитика» (<http://genoanalytica.ru/>, Россия, Москва). Транскриптомный анализ показал, что у агрессивных животных снижается экспрессия генов *Shank3*, *Auts2*, *Ctnnd2*, *Nrxn2*, для которых показано участие в развитии аутизма, а также глутаматергического гена *Grm4*. В то же время у животных с негативным социальным опытом экспрессия ГА *Shank2*, *Nlgn2*, *Ptdch10*, *Reln*, *Arx* возрастает. При этом ГГ (*Grik3*, *Grm2*, *Grm4*, *Slc17a7*, *Slc1a4*, *Slc25a22*), за исключением гена *Grin2a*, повышают свою экспрессию. Корреляционный анализ выявил статистически значимую взаимосвязь измененной экспрессии ГГ и ГА. Полученные результаты, с одной стороны, могут служить подтверждением участия ГГ в патофизиологии развития симптомов аутистического спектра, с другой – свидетельствовать о коэкспрессии ГГ и ГА в гиппокампе, развивающейся под влиянием социальной среды. Так как большинство ГА, изменивших экспрессию в настоящем исследовании, являются генами, связанными с клеточным скелетом и внеклеточным матриксом, в частности участвующими в формировании синапсов, а ГГ, изменившие свою экспрессию, – генами, кодирующими субъединицы рецепторов, то можно предположить, что вовлечение ГГ в патофизиологию аутизма происходит на уровне рецепторов.

Ключевые слова: RNA-seq; аутизм; гиппокамп; гены аутизма; глутаматергические гены; социальный опыт.

**Для цитирования:** Коваленко И.Л., Галямина А.Г., Смагин Д.А., Кудрявцева Н.Н. Коэкспрессия глутаматергических генов и генов аутистического спектра в гиппокампе у самцов мышей с нарушением социального поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):191-199. DOI 10.18699/VJ20.42-o

## Co-expression of glutamatergic and autism-related genes in the hippocampus of male mice with disturbances of social behavior

I.L. Kovalenko , A.G. Galyamina, D.A. Smagin, N.N. Kudryavtseva

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

 e-mail: koir@bionet.nsc.ru

**Abstract.** There is a hypothesis of the involvement of the glutamatergic system in the development of autism. It has been shown that the chronic experience in daily intermale confrontations leads to disturbances in social behavior: a decrease in communicativeness, disturbances of socialization, emergence of stereotypical behaviors that can be considered as symptoms of the autistic spectrum disorders. So, the aim of this study was to investigate changes in the expression of glutamatergic (GG) and autism-related (GA) genes in the hippocampus of animals with impaired social behavior caused by repeated experience of social defeat or aggression in daily agonistic confrontations. To form groups of animals with contrasting behaviors, a model of sensory contact (chronic social stress) was used. The collected brain samples were sequenced at JSC Genoanalytica (<http://genoanalytica.ru/>, Moscow, Russia). Transcriptomic analysis re-

vealed a down-regulation of autism-related (*Shank3*, *Auts2*, *Ctnnd2*, *Nrxn2*) and glutamatergic (*Grm4*) genes in aggressive mice. At the same time, the expression of GA-related genes (*Shank2*, *Nlgn2*, *Ptcdh10*, *Reln*, *Arx*) and GG genes (*Grik3*, *Grm2*, *Grm4*, *Slc17a7*, *Slc1a4*, *Slc25a22*) excluding *Grin2a* was increased in defeated mice. Correlative analysis revealed a statistically significant association between GG and GA expression. These results can serve as a confirmation of the participation of the glutamatergic system in the pathophysiology of the autistic spectrum disorder.

Key words: RNA-seq; autism; hippocampus; glutamatergic genes; autism-related genes; social experience.

**For citation:** Kovalenko I.L., Galyamina A.G., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. Co-expression of glutamatergic and autism-related genes in the hippocampus of male mice with disturbances of social behavior. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):191-199. DOI 10.18699/VJ20.42-o (in Russian)

## Введение

Полагают, что выраженные нарушения в социальном поведении могут свидетельствовать об аутизме, который проявляется в детском возрасте и представляет собой нарушения развития нервной системы (Bauman, Kemper, 2005; Zablotsky et al., 2015). Согласно DSM-IV (American Psychiatric Association..., 1993), диагностические критерии аутизма включают триаду основных признаков: ухудшение социализации, под которой можно понимать способность индивида адекватно встраиваться в социум в новой обстановке, низкий уровень общительности и повторяющееся/стереотипное поведение. Хотя изучение близнецов свидетельствует о высокой наследуемости аутизма (Hallmayer et al., 2011), ни один ген не определен как единственная причина развития этого заболевания. Недавние геномные и генетические исследования показали, что сотни генетических вариантов, включающие общие и редкие взаимодействия генов, способствуют возникновению аутизма (Miles, 2011). Согласно различным базам данных (<http://omim.org/>, <http://www.genecards.org/>, <http://autism.mindspec.org/autdb/Welcome.do> <http://www.malacards.org/>), в базе генов аутизма насчитывается около 1500 генов, которые в той или иной мере вовлечены в механизмы аутизма. Многие гены, связанные с развитием головного мозга, – потенциальные гены-кандидаты аутизма, к ним относятся гены и семейства генов *Shank* (1–3), *Nlgn*, *Reln*, *Arx*, *Pcdh*, *Mecp2*, *Auts2* (Kleijer et al., 2014; Liu et al., 2015).

Литературные данные свидетельствуют об участии различных нейромедиаторных систем (например, серотонергической, дофаминергической) в развитии аутизма (Pavál, 2017). В последнее время большое внимание уделяется глутаматергической гипотезе аутизма (Rojas, 2014). В пользу этой теории говорит то, что глутамат является одним из наиболее распространенных нейротрансмиттеров в мозге млекопитающих, его рецепторы сосредоточены в областях мозга (мозжечок, гиппокамп, префронтальная кора), в которых обнаружены нейропатологические изменения при аутизме. Во взрослом мозге глутаматные рецепторы участвуют в обучении и памяти (Riedel et al., 2003; Simonui, 2010). Глутамат-опосредованные межнейронные взаимодействия также играют роль в формировании эмоционального поведения (Morgane et al., 2005; Faure et al., 2010). Показано, что для больных аутизмом характерен повышенный уровень глутамата в плазме крови, который может даже служить одним из биомаркеров этого заболевания (Zheng et al., 2016). У пациентов с аутизмом обнаруживаются и молекулярно-генетические повреждения глутаматергической системы (ГГ). Так, например, есть

сообщения о мутациях в генах глутаматного рецептора *GluR6* (Jamain et al., 2002), а также митохондриального переносчика глутамата (AGC1, ген *Slc25a12*) (Ramos et al., 2004). Изменения наблюдаются на уровне м-РНК, белков-транспортеров и рецепторов ГГ в посмертных образцах мозга больных аутизмом (Purcell et al., 2001). В целом некоторые исследователи связывают аутизм с дефицитом глутаматергической системы в мозге (Carlsson, 2015).

Ранее нами было показано, что в условиях хронического социального конфликта, вызванного повторным опытом побед или поражений в ежедневных межсамцовых конфронтациях (Kudryavtseva, 1991), у самцов мышей формируются не только повышенная тревожность, агрессивность или депрессивноподобное поведение, но и нарушения коммуникативного поведения и социального взаимодействия. Такие животные демонстрировали сниженную коммуникативность, а также стереотипные формы поведения (аутогруминг, вставание на задние лапы, кружение, разрывание и разбрасывание подстилки, повороты в прыжке и др.), что позволяет рассматривать данную модель как модель, воспроизводящую некоторые черты аутистического поведения (Коваленко, Кудрявцева, 2010), формирующиеся под влиянием социальной среды. При этом наши предыдущие исследования показали, что в этот процесс были вовлечены гены аутистического спектра, экспрессия которых изменялась под влиянием агонистических взаимодействий (Kudryavtseva et al., 2017).

В связи с этим целью настоящей работы было изучить у животных с альтернативным опытом социального поведения, позитивным и негативным, взаимосвязь изменения экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в функционирование ГГ, и генов, связанных с патологией аутизма (ГА) в гиппокампе. Выбор этой структуры головного мозга основан на многочисленных литературных данных о том, что гиппокамп непосредственно участвует в патогенетических процессах аутизма (DeLong, 1992), в развитии тревожных расстройств (Irle et al., 2010) и депрессии (Savitz, Drevets, 2009). Гиппокамп отвечает за эмоциональную саморегуляцию, обучаемость и память. А, как известно, нарушение именно этих функций часто наблюдается у людей, демонстрирующих симптомы аутистического спектра.

## Материалы и методы

**Животные.** Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 2.5 мес. и массой тела 26–28 г. Животные были привезены из питомника лабораторных животных Института биоорганической химии Российской академии наук (Пушино, Московская область). Экспе-

римент проводили в виварии конвенциональных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Воду и корм (гранулы) животные получали в достаточном количестве. Световой режим был 12С:12Т. Все процедуры осуществляли в соответствии с международными правилами проведения экспериментов с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes). Применяемые методики для изучения поведения у мышей были одобрены Научной комиссией (№ 9) Института цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 613 от 24.03.2010).

**Поведенческие исследования.** Для формирования альтернативного опыта социального поведения у самцов мышей использовали модель сенсорного контакта (Kudryavtseva et al., 2014). Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (15:00–17:00) убирали перегородку, что приводило к агонистическим взаимодействиям. В течение первых двух-трех дней тестов выявляли победителей (агрессоров/агрессивных животных) и особей, терпящих поражения (жертв) при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились более трех минут, устанавливая между ними перегородку. В исследовании были взяты агрессивные животные с 20-дневным опытом побед (агрессоры) и с 20-дневным опытом поражений (жертвы). В качестве контроля использовали самцов, не имевших последовательного опыта агонистических взаимодействий. В каждой группе было по 14–16 животных.

Количественную оценку реакции экспериментальных животных на незнакомого партнера на нейтральной территории проводили при помощи теста «социальные взаимодействия» (Kudryavtseva et al., 2017). Как параметры социального поведения мы рассматривали *избегание* незнакомого партнера или же замирание при его подходе и *приближение* к партнеру: подходы, обнюхивания, следование за партнером; как параметры индивидуального поведения выделяли *стойки* – вставания на задние лапы, являющиеся показателем исследовательской активности, *аутогруминг*, служащий показателем смещенной активности и неадекватного стереотипного поведения, и *двигательную активность*, оценивающую интенсивность передвижений по клетке.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакета программ STATISTICA (ver. 8.0; StatSoft, Inc., 2001). Проверка нормальности распределения количественных признаков была проведена с использованием критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Поскольку выборки исследованных параметров поведения удовлетворяли гипотезе о нормальном распределении, были использованы методы параметриче-

ской статистики: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с фактором «группа» (контроль, агрессивные самцы, жертвы); последующее попарное сравнение показателей осуществляли с помощью LSD-теста Фишера.

При помощи корреляционного анализа по методу Пирсона мы исследовали взаимосвязь экспрессии ГТ и ГА. В экспериментальных поведенческих группах было по 10–12 животных.

**RNA-Seq-анализ** проводили с помощью ЗАО «Геноаналитика» (<http://genoanalytica.ru>, Москва). Методика анализа подробно описана ранее (Галямина и др., 2017).

Мы провели проверку результатов, сравнив их с данными В.М. Kadakkuzha (Kadakkuzha et al., 2015), представившими полный транскриптомный анализ генов в гиппокампе интактных мышей. Обнаружен высокий уровень корреляции (0.74 по Спирмену) между экспрессией генов аутизма и ГТ у контрольных особей в нашем эксперименте и у интактных животных в работе (Kadakkuzha et al., 2015), что может быть дополнительным доказательством адекватности применяемого метода. Кроме того, осуществляли кросс-верификацию результатов (Babenko et al., 2017) с данными, полученными в Стэнфордском университете (Zhang et al., 2014), и обнаружили значительную корреляцию между ними. Это доказывает, что метод транскриптомного анализа позволяет выявить происходящие в мозге молекулярные процессы.

В качестве верификации данных настоящего эксперимента использовали результаты, полученные нами ранее при помощи RT-PCR (Smagin et al., 2013), экспрессия которых, по методу RNA-Seq, была изменена. Было показано совпадение направленности и выраженности изменений экспрессии для генов, кодирующих белки серотонергической системы в ядрах шва среднего мозга, полученных при применении этих методов, что позволяет говорить о высокой надежности результатов этого исследования и о стабильности примененного метода.

Декапитацию всех трех групп экспериментальных животных проводили одновременно на следующий день после последней конфронтации. Гиппокамп извлекался одним исследователем в соответствии с анатомическим атласом мозга (Allen Mouse Brain Atlas; <http://mouse.brainmap.org/static/atlas>). Все образцы помещали в раствор RNAlater (LifeTechnologies, США) и хранили при температуре –70 °С до секвенирования. Проводили два типа сравнения: контроль–агрессоры и контроль–жертвы.

Для изучения изменений глутаматергической системы в гиппокампе животных с нарушенным социальным поведением были исследованы: гены переносчиков глутамата: *Slc17a6*, *Slc17a7* и *Slc17a8*; гены, кодирующие 1–4-ю субъединицы ионотропного AMPA-рецептора: *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Gria4*; гены, кодирующие 1–5-ю субъединицы ионотропного каинатного глутаматного рецептора: *Grik1*, *Grik2*, *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*; гены, кодирующие 1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3a, 3b субъединицы ионотропного NMDA-рецептора: *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Grin2d*, *Grin3a*, *Grin3b*; гены, кодирующие метаботропные рецепторы 1–8-го подтипов: *Grm1*, *Grm2*, *Grm3*, *Grm4*, *Grm5*, *Grm6*, *Grm7*, *Grm8*; гены, кодирующие 1 и 2-ю субъединицы глутаматного ионотропного рецептора дельта *Grid1* и *Grid2*; GRID2IP – белок, взаимодействующий с *Grid2*; гены

фермента глутаматдекарбоксилазы, метаболизирующей глутамат в ГАМК: *Gad1* и *Gad2*.

По генетическим базам данных OMIM (<http://omim.org/>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>), MalaCards (<http://www.malacards.org/>) из 1.5 тыс. аннотированных генов было выбрано около 80 основных генов-кандидатов аутизма, которые в дальнейшем были рассмотрены в гиппокампе у контрольных особей и животных с нарушенным социальным поведением. При анализе сравнивали по три пробы от каждой группы животных.

## Результаты

**Исследование нарушений социального поведения у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса.** ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» (контроль, агрессоры, жертвы) на избегание партнера ( $F(2.29) = 52.30, p < 0.001$ ), приближение ( $F(2.28) = 1097.4, p < 0.001$ ), время стоек ( $F(2.29) = 661.7, p < 0.001$ ), время двигательной активности ( $F(2.29) = 2549, p < 0.001$ ). Сравнение групп LSD-тестом Фишера (рис. 1) выявило увеличение времени избегания у жертв, по сравнению с контролем и агрессивными животными ( $p < 0.001$  для обеих групп). По сравнению с контролем у агрессоров и жертв также было показано снижение времени стоек ( $p < 0.001$  для обеих групп) и времени приближения к партнеру ( $p < 0.001$  для обеих групп). Кроме того, у жертв время приближения к партнеру было снижено и по сравнению с агрессивными животными ( $p < 0.006$ ). Выявлены увеличение времени двигательной активности у агрессоров ( $p < 0.001$ ) и снижение времени у жертв ( $p < 0.042$ ), по сравнению с контрольными животными. Время двигательной активности было значительно ниже у жертв, по сравнению с агрессорами ( $p < 0.001$ ). Кроме того, у жертв были увеличены число и время аутогруминга, по сравнению с контролем ( $p < 0.041, p < 0.034$  соответственно).

Таким образом, мы видим, что в тесте «социальные взаимодействия» жертвы активно избегали незнакомого партнера (тестера) на нейтральной территории. Они редко первыми подходили и проявляли интерес к незнакомому партнеру, в отличие от контроля. Контрольные животные целенаправленно следовали за партнером, обнюхивали его. У жертв также было снижено время стоек, рассмат-

риваемое нами как показатель исследовательской активности. Кроме того, у них было увеличено время демонстрации аутогруминга, который может оцениваться как признак стереотипного поведения. При этом отмечено, что у агрессивных животных были снижены параметры коммуникативности, что может свидетельствовать о нарушениях социального поведения. Большую часть 10-минутного теста (около 5–6 мин) агрессоры хаотично перемещались по клетке, не обращая внимания на партнера: общее время двигательной активности было значительно больше, чем у жертв, что может отражать развитие гиперактивности и, по-видимому, дефицит внимания. Ранее нами было показано, что в агонистических взаимодействиях агрессоры часто демонстрируют быстрые повороты в прыжке или же повторяющиеся повороты вокруг оси тела в тесте «перегородка» (Kudryavtseva, 2006), т. е. стереотипии у агрессивных мышей этой линии могут проявляться в другом тесте и другой форме. Таким образом, и у агрессоров, и у жертв в результате 20-дневных агонистических взаимодействий развиваются симптомы аутистического спектра.

**Исследование экспрессии ГГ и ГА у самцов мышей с контрастными типами социального поведения.** В результате анализа данных RNA-Seq в гиппокампе обнаружено изменение экспрессии девяти генов-кандидатов аутизма (рис. 2, табл. 1). Так, у жертв выявлено увеличение экспрессии генов *Shank2* ( $p < 0.040$ ), *Nlgn2* ( $p < 0.047$ ), *Pcdh10* ( $p < 0.011$ ), *Reln* ( $p < 0.026$ ) и *Arx* ( $p < 0.0002$ ), по сравнению с уровнем экспрессии у контрольных животных. У агрессивных мышей в гиппокампе под влиянием повторного опыта агрессии в межсамцовых конфронтациях обнаружено снижение экспрессии генов *Shank3* ( $p < 0.010$ ), *Auts2* ( $p < 0.023$ ), *Ctnd2* ( $p < 0.020$ ), *Nrxn2* ( $p < 0.010$ ).

Были проанализированы изменения уровня экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в функционирование ГГ в гиппокампе мышей (см. табл. 1, рис. 3). Показано, что у мышей в гиппокампе под влиянием повторного опыта агрессии в межсамцовых конфронтациях снижена экспрессия гена *Grm4* ( $p < 0.023$ ), кодирующего метаболитный рецептор 4-го подтипа. У жертв было обнаружено снижение экспрессии гена *Grin2a* ( $p < 0.01$ ), кодирующего субъединицу 2а ионотропного NMDA-ре-

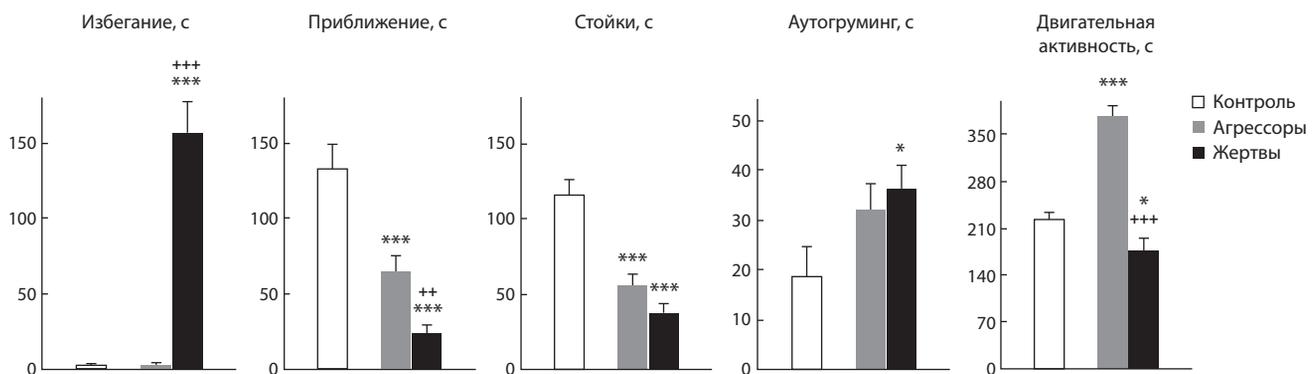
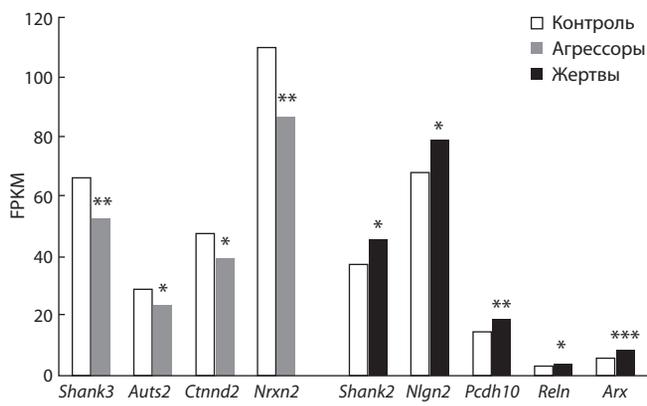
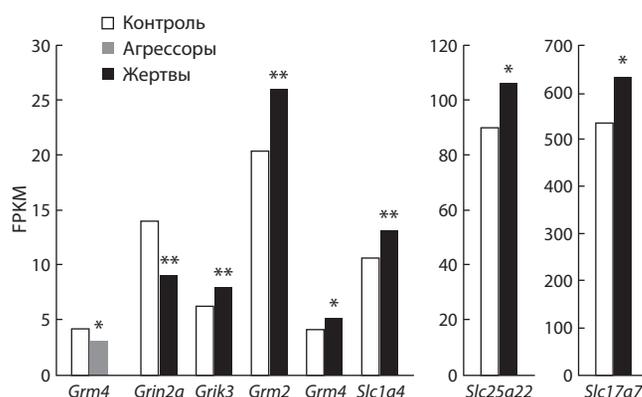


Рис. 1. Поведение агрессоров и жертв в тесте «социальные взаимодействия».

\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$  – жертвы по сравнению с агрессорами.



**Рис. 2.** Изменение экспрессии ГА в гиппокампе у агрессоров и жертв.  
\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  – по сравнению с контролем.



**Рис. 3.** Изменение экспрессии ГГ в гиппокампе у животных с нарушением социального поведения.  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  – по сравнению с контролем.

**Таблица 1.** Дифференциально экспрессирующиеся ГГ и ГА в гиппокампе агрессоров и жертв

Гены	Агрессоры	Жертвы
Связанные с патологией аутизма		
<i>Shank3</i> , SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains 3	▽▽	
<i>Auts2</i> , Activator of Transcription and Developmental Regulator	▽	
<i>Ctnnd2</i> , Catenin Delta 2	▽	
<i>Nrnx2</i> , Neurexin 2	▽	
<i>Shank2</i> , SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains 2		△
<i>Nlgn2</i> , Neuroligin 2		△
<i>Pcdh10</i> , Protocadherin 10		△△
<i>Reln</i> , Reelin		△
<i>Arx</i> , Aristaless Related Homeobox		△△△
Вовлеченные в функционирование глутаматергической системы		
<i>Grm4</i> , Glutamate Metabotropic Receptor 4	▽	△
<i>Grin2a</i> , Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 4		▽▽
<i>Grik3</i> , Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 3		△△
<i>Grm2</i> , Glutamate Metabotropic Receptor 2		△△
<i>Slc17a7</i> , Solute Carrier Family 17 Member 7		△
<i>Slc1a4</i> , Solute Carrier Family 1 Member 4		△△
<i>Slc25a22</i> , Solute Carrier Family 25 Member 22		△

Примечание. Снижение экспрессии: ▽ –  $p < 0.05$ ; ▽▽ –  $p < 0.01$ . Увеличение экспрессии: △ –  $p < 0.05$ ; △△ –  $p < 0.01$ ; △△△ –  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

цептора, при этом повышалась экспрессия генов *Grm2* ( $p < 0.004$ ) и *Grm4* ( $p < 0.02$ ), кодирующих метаботропные рецепторы 2 и 4-го подтипов, гена *Grik3* ( $p < 0.003$ ), кодирующего субъединицу 3 ионотропного каинатного глутаматного рецептора, генов переносчиков глутамата *Slc17a7* ( $p < 0.051$ ), *Slc1a4* ( $p < 0.01$ ), *Slc25a22* ( $p < 0.028$ ).

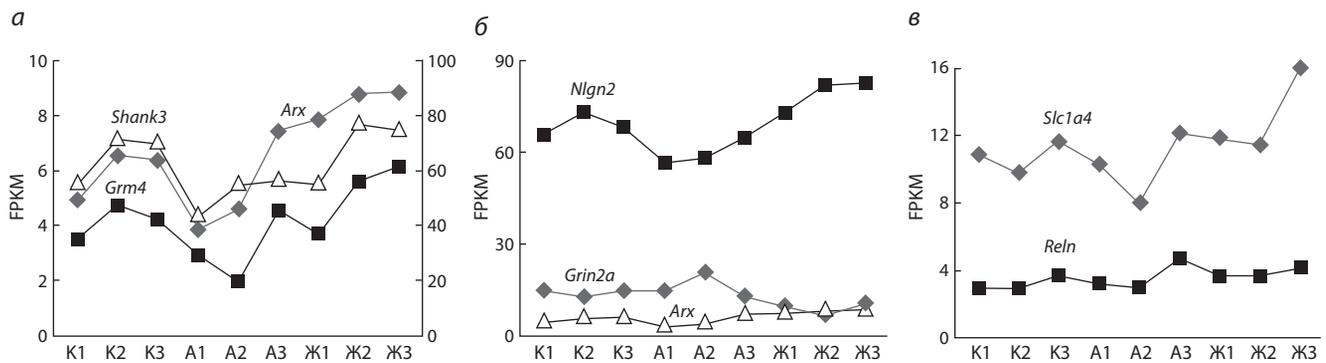
Результаты корреляционного анализа продемонстрировали высокий уровень корреляционной взаимосвязи между экспрессией ГГ и ГА у животных исследуемых групп (см. табл. 1 и 2). Корреляция между уровнями экс-

прессии ГА и ГГ показывает возможное участие глутаматергической системы в механизмах этого заболевания. Из ГА наибольшее число корреляций обнаружено для генов *Nlgn2*, *Pcdh10*, *Arx*, *Ctnnd2*, *Nrnx2*. В то же время уровень экспрессии гена *Reln* коррелирует только с уровнем экспрессии гена *Slc1a4*.

Значения экспрессии некоторых ГГ и ГА в единицах FPKM, между которыми установлена статистически значимая коррелятивная взаимосвязь, показаны на рис. 4. Большая часть генов демонстрирует положительную кор-

**Таблица 2.** Коэкспрессия ГГ и ГА (значение коэффициента Пирсона)

Ген	<i>Nlgn2</i>	<i>Pcdh10</i>	<i>Reln</i>	<i>Shank2</i>	<i>Shank3</i>	<i>Arx</i>	<i>Auts2</i>	<i>Ctndd2</i>	<i>Nrxn2</i>
<i>Grm2</i>	<b>0.761</b>	0.581	0.138	0.644	0.657	0.538	0.547	<b>0.692</b>	<b>0.668</b>
<i>Grm4</i>	<b>0.894</b>	<b>0.915</b>	0.537	<b>0.827</b>	<b>0.810</b>	<b>0.862</b>	0.602	<b>0.868</b>	<b>0.823</b>
<i>Grin2a</i>	<b>-0.825</b>	<b>-0.870</b>	-0.397	-0.643	-0.521	<b>-0.823</b>	-0.581	<b>-0.733</b>	<b>-0.867</b>
<i>Grik3</i>	<b>0.847</b>	<b>0.946</b>	0.597	<b>0.851</b>	<b>0.708</b>	<b>0.956</b>	<b>0.693</b>	<b>0.854</b>	<b>0.862</b>
<i>Slc1a4</i>	<b>0.677</b>	0.640	<b>0.696</b>	0.515	0.437	<b>0.714</b>	0.178	0.632	0.561
<i>Slc17a7</i>	<b>0.878</b>	<b>0.696</b>	0.231	<b>0.738</b>	<b>0.691</b>	<b>0.727</b>	<b>0.679</b>	<b>0.864</b>	<b>0.875</b>
<i>Slc25a22</i>	<b>0.922</b>	<b>0.918</b>	0.457	<b>0.906</b>	<b>0.792</b>	<b>0.940</b>	<b>0.802</b>	<b>0.933</b>	<b>0.935</b>



**Рис. 4.** Коррелирующие ГГ и ГА.

K1-3 – контрольные животные; A1-3 – агрессоры; Ж1-3 – жертвы. а – правая ось ординат – для гена *Shank3*, левая – для *Arx* и *Grm4*.

реляцию друг с другом. Например, экспрессия *Grm4*, единственного гена, который изменил экспрессию и у жертв, и у агрессоров, положительно коррелирует с экспрессией ГА: *Shank3* ( $r = 0.810, p < 0.01$ ) и *Arx* ( $r = 0.862, p < 0.01$ ) (см. рис. 4, а). Экспрессия гена *Grin2a* демонстрирует отрицательную корреляцию с экспрессией ГА, например генов *Nlgn2* ( $r = -0.823, p < 0.01$ ) и *Arx* ( $r = -0.823, p < 0.01$ ) (см. рис. 4, б). Единственный ген, с которым коррелирует уровень экспрессии гена *Reln*, – это *Slc1a4* ( $r = 0.696, p < 0.05$ ) (см. рис. 4, в).

### Обсуждение

В наших предыдущих работах было обнаружено, что после 20 дней агонистических взаимодействий и проживания в условиях хронического социального конфликта у экспериментальных самцов нарушаются многие параметры социального поведения (Коваленко, Кудрявцева, 2010), схожие по симптоматике с заболеваниями аутистического спектра. Мы считаем, что в данном случае коморбидные аутистические симптомы развиваются на фоне других заболеваний. Это может быть тревожно-депрессивное состояние, возникающее вследствие хронического социального стресса у самцов мышей C57Bl/6 (Berton et al., 2006; Kudryavtseva et al., 2006) или каталепсии, развивающейся у животных СВА/Лас (Kudryavtseva et al., 2006), или же патологической агрессии (Kudryavtseva, 2006), формирующейся под влиянием повторного опыта агрессии. В литературе существуют данные, свидетельствующие, что коморбидность аутистических симптомов и расстройств настроения может быть следствием работы

одних и тех же генов, продукты которых вовлекаются в патофизиологические механизмы развития этих заболеваний (Ragunath et al., 2011).

В связи с этим помимо генов, для которых показано участие в развитии симптомов аутизма, мы исследовали также изменения экспрессии ГГ (транспортёров, рецепторов, ферментов катаболизма), так как известно, что эта нейромедиаторная система вовлечена в развитие данной патологии (Carlsson, 2015).

Мы выявили в гиппокампе изменение экспрессии семи ГГ: ген *Grin2a* кодирует NR2<sub>A</sub>-субъединицу NMDA-рецептора; *Grm2* и *Grm4* – метаболитные глутаматные рецепторы, mGluR2 и mGluR4 соответственно; *Grik3* – субъединицу каинатного рецептора, *Slc1a4* и *Slc17a7* – транспортёры глутамата Vglut1; *Slc25a22* – белок митохондриального переносчика глутамата. Изменили свою экспрессию 9 генов, ассоциированных с заболеваниями аутистического спектра: *Shank2*, *Shank3*, *Nlgn2*, *Reln*, *Arx*, *Nrxn2*, *Auts2*, *Ctndd2*, *Pcdh10*.

Белки семейства SHANK, известные также как ProSAP, являются строительными белками на возбуждающих глутаматергических синапсах. Так, ген *Shank2* кодирует белок, взаимодействующий на постсинаптической мембране с NMDA-рецептором, участвуя в синаптической глутаматергической передаче (Carlsson, 2015). Вовлечение в процесс развития аутизма генов *Shank* было впервые описано для *Shank3*. Например, было отмечено, что мыши, гетерозиготные по белку *Shank3* (*Shank3*<sup>+/-delta-C</sup>), демонстрировали низкий уровень социального распознавания и коммуникативности (Wang et al., 2011). В литературе было

показано, что для аутистических симптомов характерно снижение функции *Shank2* (Won et al., 2012). Нарушения в социальном поведении характерны как для пониженного (Peça et al., 2011), так и для повышенного (Moessner et al., 2007) уровня белка SHANK3. В нашей работе также обнаружены повышенный уровень экспрессии гена *Shank2* и сниженный уровень гена *Shank3*. Вероятно, нарушения в социальном поведении могут быть связаны с любыми изменениями в функционировании этих белков. Известно, что ProSAP2/Shank3 влияет на работу глутаматергических синапсов, взаимодействуя с внеклеточным С-концом нейролигинов (Meyer et al., 2004). Мутации в этом гене ухудшают синаптическую передачу (Arons et al., 2012). Следовательно, можно предположить, что влияние белков SHANK на развитие аутистических симптомов осуществляется через изменение функционирования глутаматергической системы.

Значительную часть ГА, изменивших свой уровень экспрессии в нашей работе, составляют гены клеточной адгезии: *Nlgn2* – нейролигин 2-го типа; *Pcdh10* – протокадерин; *Ctnd2* – δ-катенин; *Nrxn3* – нейрексин 3. Для всех этих белков многократными исследованиями было показано участие в формировании социального поведения и расстройств аутистического спектра. Известно, что изменение уровня белка NLGN2 может влиять на социальное и эмоциональное поведение (Maćkowiak et al., 2014). У аутистических больных обнаружены мутации в генах *Pcdh10* (Anitha et al., 2013), *Ctnd2* (Turner et al., 2015), *Nrxn3* (Vaags et al., 2012). Кроме того, продукты этих генов взаимодействуют с глутаматергической системой. Так, например, нейролигины вызывают кластеризацию Vglut-положительных синаптических пузырьков (Graf et al., 2004), без чего невозможно созревание и функционирование синапса. Правда, там же отмечено, что это характерно для нейролигина 1, а нейролигин 2 не располагается на одном синапсе с транспортером глутамата. Обнаружено, что в отсутствие нейролигинов снижается число Vglut1-положительных терминалей (Chih et al., 2005). Можно предположить, что на самом деле нейролигин взаимодействует непосредственно с NMDA-рецепторами, а переносчик Vglut1 выступает только в качестве маркера этих рецепторов. Что касается продукта гена *Pcdh10*, то установлено, что протокадерин локализуется на нейронах, формирующих глутаматергические AMPA и каинатные рецепторы (Puller, Naverkamp, 2011). Кроме того, показано, что у мышей, нокаутных по генам протокадерина, снижено число глутаматных транспортеров Vglut 1–2 (Chen et al., 2012), что также свидетельствует о взаимосвязи между протокадеринами и глутаматергической системой.

Продукты генов *Arx* и *Reln* (белок рилин) играют важную роль в механизмах пре- и постнатального нейрогенеза. Участие этих генов в патофизиологии аутизма является спорным: часть авторов приводят данные в пользу этого факта (Wall et al., 2009), в то время как другие опровергают его (Persico et al., 2001). В то же время обнаружена связь этих генов с функционированием глутаматергической системы. Так, известно, что мутации в гене *Arx* связаны с изменениями в глутаматергической системе у больных эпилепсией (Beguin et al., 2013), а белок рилин способен повышать мобильность рецепторов, содержащих NR2<sub>B</sub>-

субъединицу, снижая время ее пребывания в синапсе, таким образом, изменяя состав рецепторов в сторону преобладания NR2<sub>A</sub>-субъединицы (Groc et al., 2007).

Ген *Auts2* кодирует экспрессирующийся в головном мозге белок с неизвестной функцией, хотя предполагают, что он вовлечен в механизмы развития нервной системы (Oksenberg et al., 2013). Мутации в этом гене обнаружены у пациентов с аутистическими расстройствами (Liu et al., 2015). Показано, что *Auts2* экспрессируется на глутаматергических нейронах гиппокампа (Hori et al., 2014).

Так как большинство ГА, изменивших экспрессию в нашем исследовании, – гены, связанные с клеточным скелетом и внеклеточным матриксом, в частности участвующие в формировании синапсов, а ГГ – гены, кодирующие субъединицы рецепторов, то можно полагать, что изменение активности глутаматергической системы проявляется в аутистических симптомах.

Корреляционный анализ наших экспериментальных данных в целом выявил высокий уровень корреляции между экспрессией ГГ и ГА. Исключение составил ген *Reln*, коррелирующий только с геном *Slc1a4*. Характерно также, что везде обнаруживается положительная корреляция между генами, в то время как ген *Grin2a* отрицательно коррелирует с ГА. Однако снижение экспрессии *Grin2a*, продукт которого является субъединицей NMDA-рецептора, хорошо согласуется с литературными данными, связывающими развитие аутистических симптомов с дефицитом этих рецепторов (Lee et al., 2015). Экспрессия гена *Nlgn2* коррелирует с экспрессией всех ГГ, экспрессия генов *Pcdh10*, *Arx*, *Ctnd2*, *Nrxn2* – с экспрессией практически всех генов. Это позволяет предположить, что именно при помощи данных генов ГГ вовлекается в механизмы развития аутистического поведения. Можно видеть, что все наиболее коррелирующие гены, кроме *Arx*, – гены клеточной адгезии. Мы предполагаем, что продукты этих генов участвуют в соединении синапсов, в том числе глутаматергических, с клеточной мембраной. Таким образом, они вовлекаются в функционирование глутаматергической системы. Следовательно, изменение экспрессии этих генов изменяет уровень активности ГГ, что, в свою очередь, приводит к изменениям в социальном поведении, хотя нельзя исключить и обратный вариант взаимодействия.

## Заключение

Проведенное исследование подтвердило полученные ранее результаты, свидетельствующие о том, что под влиянием хронического социального конфликта у самцов мышей могут развиваться нарушения социального поведения, причем в этом процессе участвуют как гены, кодирующие белки, вовлеченные в функционирование глутаматергической системы, так и гены, связанные с патологией аутизма. Коэкспрессия этих генов позволяет говорить о вовлечении глутаматергической системы головного мозга в развитие патологии социального поведения. Полученные результаты могут служить доказательством того, что аутистические симптомы могут не только быть следствием генетических нарушений, но и развиваться в течение жизни индивидуума под влиянием стрессорных воздействий.

## Список литературы / References

- Гальямина А.Г., Коваленко И.Л., Смагин Д.А., Кудрявцева Н.Н. Изменение экспрессии генов нейромедиаторных систем в вентральной тегментальной области депрессивных мышей: данные RNA-Seq. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2017; 67(1):113-128. DOI 10.7868/S0044467717010063.  
[Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. Altered expression of neurotransmitters systems' genes in the ventral tegmental area of depressive male mice: data of RNA-Seq. Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti imeni I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 2017;67(1):113-128. DOI 10.7868/S0044467717010063. (in Russian)]
- Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н. Развитие симптомов аутистического спектра под влиянием хронического социального стресса у тревожных самцов мышей: эффекты диазепама. Психофармакол. биол. наркология. 2010;10(1-2):2624-2635.  
[Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N. Development of autistic spectrum symptoms under chronic social defeat stress in anxious male mice: effects of diazepam. Psikhofarmakologiya and Biologicheskaya Narkologiya = Psychopharmacology and Biological Narcology. 2010;10(1-2):2624-2635.]
- American Psychiatric Association. DSM-IV Draft Criteria. Washington, DC, American Psychiatric Press, 1993.
- Anitha A., Thanseem I., Nakamura K., Yamada K., Iwayama Y., Toyota T., Iwata Y., Suzuki K., Sugiyama T., Tsujii M., Yoshikawa T., Mori N. Protocadherin  $\alpha$  (PCDHA) as a novel susceptibility gene for autism. J. Psychiatry Neurosci. 2013;38(3):192-198. DOI 10.1503/jpn.120058.
- Arons M.H., Thynne C.J., Grabrucker A.M., Li D., Schoen M., Cheyne J.E., Boeckers T.M., Montgomery J.M., Garner C.C.J. Autism-associated mutations in ProSAP2/Shank3 impair synaptic transmission and neuroligin-mediated transsynaptic signaling. J. Neurosci. 2012;32(43):14966-14978. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2215-12.2012.
- Babenko V.N., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. RNA-Seq mouse brain regions expression data analysis: Focus on *ApoE* functional network. J. Integr. Bioinform. 2017;14(3):20170024. DOI 10.1515/jib-2017-0024.
- Bauman M.L., Kemper T.L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. Int. J. Dev. Neurosci. 2005; 23(2-3):183-187. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2004.09.006.
- Beguín S., Crépel V., Aniksztejn L., Becq H., Pelosi B., Pallesi-Pocachard E., Bouamrane L., Pasqualetti M., Kitamura K., Cardoso C., Represa A. An epilepsy-related ARX polyalanine expansion modifies glutamatergic neurons excitability and morphology without affecting GABAergic neurons development. Cereb. Cortex. 2013; 23(6):1484-1494. DOI 10.1093/cercor/bhs138.
- Berton O., McClung C.A., Dileone R.J., Krishnan V., Renthal W., Russo S.J., Graham D., Tsankova N.M., Bolanos C.A., Rios M., Monteggia L.M., Self D.W., Nestler E.J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science. 2006;311:864-886. DOI 10.1126/science.1120972.
- Carlsson M. Autism and glutamate. In: Fatemi S.H. (Ed.) The Molecular Basis of Autism. New York: Springer, 2015;243-256.
- Chen W.V., Alvarez F.J., Lefebvre J.L., Friedman B., Nwakeze C., Geiman E., Smith C., Thu C.A., Tapia J.C., Tasic B., Sanes J.R., Maniatis T. Functional significance of isoform diversification in the protocadherin-gamma gene cluster. Neuron. 2012;75(3):402-409. DOI 10.1016/j.neuron.2012.06.039.
- Chih B., Engelman H., Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. Science. 2005;307:1324-1328. DOI 10.1126/science.1107470.
- DeLong G.R. Autism, amnesia, hippocampus, and learning. Neurosci. Biobehav. Rev. 1992;16:63-70.
- Faure A., Richard J.M., Berridge K.C. Desire and dread from the nucleus accumbens: cortical glutamate and subcortical GABA differentially generate motivation and hedonic impact in the rat. PLoS One. 2010;5(6):e11223. DOI 10.1371/journal.pone.0011223.
- Graf E.R., Zhang X., Jin S.X., Linhoff M.W., Craig A.M. Neuroligins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. Cell. 2004;119(7):1013-1026. DOI 10.1016/j.cell.2004.11.035.
- Groc L., Choquet D., Stephenson F.A., Verrier D., Manzoni O.J., Chavis P. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein reelin. J. Neurosci. 2007;27(38):10165-10175. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1772-07.2007.
- Hallmayer J., Cleveland S., Torres A., Phillips J., Cohen B., Torigoe T., Miller J., Fedede A., Collins J., Smith K., Lotspeich L., Croen L.A., Ozonoff S., Lajonchere C., Grether J.K., Risch N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. Arch. Gen. Psychiatry. 2011;68(11):1095-1102. DOI 10.1001/archgenpsychiatry.2011.76.
- Hori K., Nagai T., Shan W., Sakamoto A., Taya S., Hashimoto R., Hayashi T., Abe M., Yamazaki M., Nakao K., Nishioka T., Sakimura K., Yamada K., Kaibuchi K., Hoshino M. Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neurogenesis. Cell Rep. 2014;9(6):2166-2179. DOI 10.1016/j.celrep.2014.11.045.
- Irle E., Rühleder M., Lange C., Seidler-Brandler U., Salzer S., Dechent P., Weniger G., Leibing E., Leichsenring F. Reduced amygdala and hippocampal size in adults with generalized social phobia. J. Psychiatry Neurosci. 2010;35:126-131.
- Jamain S., Betancur C., Quash H. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. Paris autism research international sibpair [PARIS] study. Mol. Psychiatry. 2002;7(3):302-310.
- Kadakkuzha B.M., Liu X.A., McCrate J., Shankar G., Rizzo V., Afinogenova A., Young B., Fallahi M., Carvalloza A.C., Raveendra B., Puthanveetil S.V. Transcriptome analyses of adult mouse brain reveal enrichment of lncRNAs in specific brain regions and neuronal populations. Front. Cell. Neurosci. 2015;9:63. DOI 10.3389/fncel.2015.00063.
- Kleijer K.T., Schmeisser M.J., Krueger D.D., Boeckers T.M., Scheiffele P., Bourgeron T., Brose N., Burbach J.P. Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets. Psychopharmacology (Berl.). 2014;231(6):1037-1062. DOI 10.1007/s00213-013-3403-3.
- Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice. Aggress. Behav. 1991; 17(5):285-291. DOI 10.1007/s00210-018-1580-7.
- Kudryavtseva N.N. The psychopathology of repeated aggression: a neurobiological aspect. In: Morgan J.P. (Ed.) Perspectives on the Psychology of Aggression. New York: Nova Science Publishers, 2006;35-64.
- Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F., Bakshantovskaya I.V., Koryakina L.A., Alekseyenko O.V., Lipina T.V., Bondar N.P. Experimental studies of hereditary predisposition to the development of depression. In: Kalueff A. (Ed.) Animal Models of Biological Psychiatry. New York: Nova Science Publishers, 2006;75-95.
- Kudryavtseva N.N., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Galyamina A.G., Babenko V.N. Abnormality of social behavior and dysfunction of autism related gene expression developing under chronic social defeat stress in male mice. Eur. Neuropsychopharm. 2017;27(4):S678-S679.
- Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B. Protocol for repeated positive fighting experience in male mice: the tool for the study of movement disorders. Nature Protoc. 2014;9(11): 2705-2717.
- Lee E.J., Choi S.Y., Kim E. NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. Curr. Opin. Pharmacol. 2015;20:8-13. DOI 10.1016/j.coph.2014.10.007.
- Liu Y., Zhao D., Dong R., Yang X., Zhang Y., Tammimies K., Uddin M., Scherer S.W., Gai Z. De novo exon1 deletion of *AUTS2* gene in a patient with autism spectrum disorder and developmental delay: a case report and a brief literature review. Am. J. Med. Genet. A. 2015;167(6):1381-1385. DOI 10.1002/ajmg.a.37050.

- Maćkowiak M., Mordalska P., Wędzony K. Neuroligins, synapse balance and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rep.* 2014;66: 830-835. DOI 10.1016/j.pharep.2014.04.011.
- Meyer G., Varoquaux F., Neeb A., Oschlies M., Brose N. The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology.* 2004;47:724-733. DOI 10.1016/j.neuropharm.2004.06.023.
- Miles J.H. Autism spectrum disorders, a genetics review. *Genet. Med.* 2011;13(4):278-294. DOI 10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba.
- Moessner R., Marshall C.R., Sutcliffe J.S., Skaug J., Pinto D., Vincent J., Zwaigenbaum L., Fernandez B., Roberts W., Szatmari P., Scherer S.W. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:1289-1297. DOI 10.1086/522590.
- Morgane P.J., Galler J.R., Mokler D.J. A review of systems and networks of the limbicforebrain/limbicmidbrain. *Prog. Neurobiol.* 2005;75(2):143-160. DOI 10.1016/j.pneurobio.2005.01.001.
- Oksenberg N., Stevison L., Wall J.D., Ahituv N. Function and regulation of *AUTS2*, a gene implicated in autism and human evolution. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003221. DOI 10.1371/journal.pgen.1003221.
- Pavál D.A. Dopamine hypothesis of autism spectrum disorder. *Dev. Neurosci.* 2017;39(5):355-360. DOI 10.1159/000478725.
- Peça J., Feliciano C., Ting J.T., Wang W., Wells M.F., Venkatraman T.N., Lascola C.D., Fu Z., Feng G. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature.* 2011; 472(7344):437-442. DOI 10.1038/nature09965.
- Persico A.M., D'Agruma L., Maiorano N., Totaro A., Militerni R., Bravaccio C., Wassink T.H., Schneider C., Melmed R., Trillo S., Montecchi F., Palermo M., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Reichelt K.L., Conciatori M., Marino R., Quattrocchi C.C., Baldi A., Zelante L., Gasparini P., Keller F.; Collaborative Linkage Study of Autism. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor or predisposing to autistic disorder. *Mol. Psychiatry.* 2001;6(2):150-159. DOI 10.1038/sj.mp.4000850.
- Puller C., Haverkamp S. Cell-type-specific localization of protocadherin  $\beta 16$  at AMPA and AMPA/Kainate receptor-containing synapses in the primate retina. *J. Comp. Neurol.* 2011;519(3):467-479. DOI 10.3233/DMA-2012-0917.
- Purcell A.E., Jeon O.H., Pevsner J. The abnormal regulation of gene expression in autistic brain tissue. *J. Autism Dev. Disord.* 2001;31(6): 545-549.
- Ragunath P.K., Chitra R., Mohammad S., Abhinand P.A. A systems biological study on the comorbidity of autism spectrum disorders and bipolar disorder. *Bioinformatics.* 2011;7(3):102-106.
- Ramos N., Reichert J.G., Smith C.J., Silverman J.M., Bespalova I.N., Davis K.L., Buxbaum J.D. Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene with autism. *Am. J. Psychiatry.* 2004;161(4):662-669. DOI 10.1176/appi.ajp.161.4.662.
- Riedel G., Platt B., Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 2003;140(1-2):1-47.
- Røjas D.C. The role of glutamate and its receptors in autism and the use of glutamate receptor antagonists in treatment. *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2014;121(8):891-905. DOI 10.1007/s00702-014-1216-0.
- Savitz J.B., Drevets W.C. Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience.* 2009;164:300-330. DOI 10.1016/j.neuroscience.2009.03.082.
- Simonyi A., Schachtman T.R., Christoffersen G.R. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonism in learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;639(1-3):17-25. DOI 10.1016/j.ejphar.2009.12.039.
- Smagin D.A., Boyarskikh U.A., Bondar N.P., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Reduction of serotonergic gene expression in the mid-brain raphe nuclei under positive fighting experience. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013;4(10B):36-44. DOI 10.4236/abb.2013.410A3005.
- Turner T.N., Sharma K., Oh E.C., Liu Y.P., Collins R.L., Sosa M.X., Auer D.R., Brand H., Sanders S.J., Moreno-De-Luca D., Pihur V., Plona T., Pike K., Soppet D.R., Smith M.W., Cheung S.W., Martin C.L., State M.W., Talkowski M.E., Cook E., Huganir R., Katsanis N., Chakravarti A. Loss of  $\delta$ -catenin function in severe autism. *Nature.* 2015;520(7545):51-56. DOI 10.1038/nature14186.
- Vaags A.K., Lionel A.C., Sato D., Goodenberger M., Stein Q.P., Curran S., Ogilvie C., Ahn J.W., Drmic I., Senman L., Chrysler C., Thompson A., Russell C., Prasad A., Walker S., Pinto D., Marshall C.R., Stavropoulos D.J., Zwaigenbaum L., Fernandez B.A., Fombonne E., Bolton P.F., Collier D.A., Hodge J., Roberts W., Szatmari P., Scherer S.W. Rare deletions at the neurexin 3 locus in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(1):133-141. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.11.025.
- Wall D.P., Esteban F.J., Deluca T.F., Huyck M., Monaghan T., Velez de Mendizabal N., Goñi J., Kohane I.S. Comparative analysis of neurological disorders focuses genome-wide search for autism genes. *Genomics.* 2009;93(2):120-129. DOI 10.1016/j.ygeno.2008.09.015.
- Wang X., McCoy P.A., Rodriguiz R.M., Pan Y., Je H.S., Roberts A.C., Kim C.J., Berrios J., Colvin J.S., Bousquet-Moore D., Lorenzo I., Wu G., Weinberg R.J., Ehlers M.D., Philpot B.D., Beaudet A.L., Wetsel W.C., Jiang Y.H. Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20:3093-3108. DOI 10.1093/hmg/ddr212.
- Won H., Lee H.R., Gee H.Y., Mah W., Kim J.I., Lee J., Ha S., Chung C., Jung E.S., Cho Y.S., Park S.G., Lee J.S., Lee K., Kim D., Bae Y.C., Kaang B.K., Lee M.G., Kim E. Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature.* 2012;486:261-265. DOI 10.1038/nature11208.
- Zablotsky B., Black L.I., Maenner M.J., Schieve L.A., Blumberg S.J. Estimated prevalence of autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 national health interview survey. *Natl. Health Stat. Report.* 2015;87:1-20.
- Zhang Y., Chen K., Sloan S.A., Bennett M.L., Scholze A.R., O'Keefe S., Phatnani H.P., Guarnieri P., Caneda C., Ruderisch N., Deng S., Liddelow S.A., Zhang C., Daneman R., Maniatis T., Barres B.A., Wu J.Q. An RNA-sequence and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 2014;34(36): 11929-11947. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- Zheng C., Zhu Q., Liu X., Huang X., He C., Jiang L., Quan D., Zhou X., Zhu Z. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on proliferation, neurotrophic function and migration of Schwann cells *in vitro*. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2016;10(5):428-436. DOI 10.1002/term.175.

#### ORCID ID

I.L. Kovalenko orcid.org/0000-0002-6672-1287  
A.G. Galyamina orcid.org/0000-0001-6101-2521  
D.A. Smagin orcid.org/0000-0002-4017-7287  
N.N. Kudryavtseva orcid.org/0000-0003-2418-1750

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-04-00140) и бюджетных проектов (№ 0324-2019-0041 и 0324-2019-0041-C-01).

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

Поступила в редакцию 05.07.2019. После доработки 17.10.2019. Принята к публикации 08.11.2019. Опубликована онлайн 19.02.2020.

# Pharmacological effects of fibroblast growth factor 21 are sex-specific in mice with the *lethal yellow* ( $A^Y$ ) mutation

E.N. Makarova<sup>1</sup>✉, T.V. Yakovleva<sup>1</sup>, N.Yu. Balyibina<sup>2</sup>, K.O. Baranov<sup>3</sup>, E.I. Denisova<sup>1</sup>, A.D. Dubinina<sup>1</sup>, N.A. Feofanova<sup>4</sup>, N.M. Bazhan<sup>1, 2</sup>

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

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

<sup>3</sup> The Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: enmakarova@gmail.com

**Abstract.** Hypothalamic melanocortin 4 receptors (MC4R) regulate energy balance. Mutations in the *MC4R* gene are the most common cause of monogenic obesity in humans. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a promising anti-obesity agent, but its effects on melanocortin obesity are unknown. Sex is an important biological variable that must be considered when conducting preclinical studies; however, in laboratory animal models, the pharmacological effects of FGF21 are well documented only for male mice. We aimed at investigating whether FGF21 affects metabolism in male and female mice with the *lethal yellow* ( $A^Y$ ) mutation, which results in MC4R blockage and obesity development. Obese C57Bl- $A^Y$  male and female mice were administered subcutaneously for 10 days with vehicle or FGF21 (1 mg per 1 kg). Food intake (FI), body weight (BW), blood parameters, and gene expression in the liver, muscles, brown adipose tissue, subcutaneous and visceral white adipose tissues, and hypothalamus were measured. FGF21 action strongly depended on the sex of the animals. In the males, FGF21 decreased BW and insulin blood levels without affecting FI. In the females, FGF21 increased FI and liver weight, but did not affect BW. In control  $A^Y$ -mice, expression of genes involved in lipid and glucose metabolism (*Ppargc1a*, *Cpt1*, *Pck1*, *G6p*, *Slc2a2*) in the liver and genes involved in lipogenesis (*Pparg*, *Lpl*, *Slc2a4*) in visceral adipose tissue was higher in females than in males, and FGF21 administration inhibited the expression of these genes in females. FGF21 administration decreased hypothalamic POMC mRNA only in males. Thus, the pharmacological effect of FGF21 were significantly different in male and female  $A^Y$ -mice; unlike males, females were resistant to catabolic effects of FGF21.

Key words: FGF21;  $A^Y$ -mice; melanocortin obesity; sex differences; liver; hypothalamus.

**For citation:** Makarova E.N., Yakovleva T.V., Balyibina N.Yu., Baranov K.O., Denisova E.I., Dubinina A.D., Feofanova N.A., Bazhan N.M. Pharmacological effects of fibroblast growth factor 21 are sex-specific in mice with the *lethal yellow* ( $A^Y$ ) mutation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):200-208. DOI 10.18699/VJ20.40-o

## У мышей с мутацией *lethal yellow* ( $A^Y$ ) фармакологические эффекты фактора роста фибробластов 21 зависят от пола

E.N. Makarova<sup>1</sup>✉, T.V. Yakovleva<sup>1</sup>, N.Yu. Balyibina<sup>2</sup>, K.O. Baranov<sup>3</sup>, E.I. Denisova<sup>1</sup>, A.D. Dubinina<sup>1</sup>, N.A. Feofanova<sup>4</sup>, N.M. Bazhan<sup>1, 2</sup>

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

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

<sup>3</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: enmakarova@gmail.com

**Аннотация.** Гипоталамические меланокортиновые рецепторы 4-го типа (МК4Р) принимают участие в поддержании баланса энергии. Мутации в гене, кодирующем МК4Р, – наиболее распространенная причина монокусного ожирения у людей. Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) рассматривают в качестве перспективного кандидата для медикаментозного лечения ожирения, однако неизвестно, влияет ли он на меланокортиновое ожирение. Пол особей необходимо учитывать при проведении доклинических исследований, но у лабораторных животных фармакологические эффекты FGF21 изучали только на самцах. В настоящей работе исследовано влияние FGF21 на метаболизм у самцов и самок мышей с мутацией *lethal yellow* ( $A^Y$ ), которая приводит к блокаде МК4Р в гипоталамусе и развитию ожирения. Самцам и самкам мышей  $A^Y$  линии C57Bl с развитым ожирением вводили подкожно в течение 10 дней физиологический раствор или FGF21 (1 мг/кг). Измеряли потребление пищи (ПП), массу тела (МТ), показатели крови и экспрессию генов в печени, мышцах, бурой жировой ткани, подкожной и висцеральной белой жировой ткани и гипоталамусе. Эффекты FGF21 зависели от пола животных. У самцов FGF21 снижал МТ и уровень инсулина в крови и не влиял на ПП. У самок FGF21 увеличивал ПП и массу печени, но не влиял на МТ. У контрольных самок  $A^Y$  экспрессия генов углеводно-жирового обмена (*Ppargc1a*, *Cpt1*, *Pck1*, *G6p*, *Slc2a2*) в печени и генов липогенеза (*Pparg*, *Lpl*, *Slc2a4*) в висцеральной жировой ткани была выше, чем у самцов,

и введение FGF21 снижало экспрессию этих генов только у самок. Введение FGF21 уменьшало уровень мРНК ПОМК в гипоталамусе только у самцов. Полученные результаты демонстрируют, что фармакологический эффект FGF21 значительно различается у самцов и самок мышей с мутацией  $A^y$ : в отличие от самцов, самки проявляют устойчивость к катаболическому действию FGF21.

Ключевые слова: FGF21; мыши  $A^y$ ; меланокортиновое ожирение; половые различия; печень; гипоталамус.

## Introduction

Obesity is a serious problem in modern society, this being the reason why various methods of combating obesity (medicinal, non-medicinal, preventive, etc.) are under intensive investigation. Hypothalamus plays a critical role in coordination of energy homeostasis, and mutations in various hypothalamic genes responsible for controlling appetite and metabolism lead to obesity (Singh et al., 2017). Melanocortin (MC) obesity, caused by mutations in the melanocortin system of the brain, is the most common genetic form of obesity in humans (Farooqi et al., 2003; Girardet, Butler, 2014). Melanocortin system regulates energy intake and expenditure. Activation of type 4 melanocortin receptors (MC4R) in the hypothalamic neurons reduces food consumption and increases energy expenditure, while their blockade or loss (knockout) is associated with hyperphagia, gradual development of obesity, and insulin resistance (Tao, 2010). In humans, the loss of MC4R functions causes severe obesity (Farooqi et al., 2003), but intensive search for therapeutic options of MC obesity correction has yet not identified an efficient drug (Fani et al., 2014).

Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) is assumed to be one of the most promising candidates for obesity treatment, because administration of FGF21 or its analogs was shown to reduce body weight in laboratory rodents, monkeys, and humans (Jackson et al., 2015). In rodents, it is efficient against both diet-induced and genetic forms of obesity (leptin *ob/ob* or its receptor *db/db* deficiency) (Kharitonov et al., 2005; Coskun et al., 2008). FGF21 is an atypical member of the fibroblast growth factor family; it possesses a hormone-like activity and is involved in maintaining energy homeostasis, regulation of carbohydrate and lipid metabolism, and adaptation to various stresses, including metabolic, such as nutritional deficiencies and calorie overload (Xie, Leung, 2017). FGF21 induces weight loss through its effects on the central nervous system (Lan et al., 2017). It is not known whether melanocortin system is involved in signal transmission from FGF21 to the CNS. If melanocortin signaling pathways are involved in the central action of FGF21, loss of function of the melanocortin system could reduce or eliminate the beneficial effect of FGF21 on metabolism and body weight. However, the pharmacological effects of FGF21 have not been studied in melanocortin obesity models.

Most animal studies of physiological and pharmacological effects of FGF21 have been made on males (Kharitonov et al., 2005; Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009; Camporez et al., 2013; Markan et al., 2014). However, sex steroids have such a significant effect on the regulation of metabolic processes that National Institutes of Health (NIH) recognized sex as an important biological variable that must be considered when conducting preclinical studies (Mauvais-Jarvis et al., 2017; Clayton, 2018). In a few studies performed on rats and mice of both sexes, sex differences in the expression of FGF21 in liver (Lee et al., 2016; Chukijrungrat et al., 2017) and other tissues (Gasparin et al., 2018) were observed, exhibiting differential

manifestation in obesity and starvation (Bazhan et al., 2019). These data suggest that the physiological and pharmacological effects of FGF21 may vary in individuals of different sexes.

The objective of this study was to investigate the pharmacological effects of FGF21 in male and female mice with melanocortin obesity. As a model of melanocortin obesity, we used mice with the *lethal yellow* mutation at the *agouti* locus ( $A^y$ ). In mice,  $A^y$  mutation causes ectopic overexpression of the *agouti* gene (Bultman et al., 1992).  $A^y$ -mice have yellow coat color and develop obesity and non-insulin-dependent diabetes with age (Wolff et al., 1999), due to ectopic expression of *agouti* gene in the hypothalamus, which evokes chronic blockage of MC4Rs by the agouti protein (Michaud et al., 1997).

We found that therapeutic effects of FGF21 in  $A^y$ -mice strongly depended on the sex. In male  $A^y$ -mice, the blockage of MC4Rs did not prevent anti-obesity effect of FGF21, and its administration resulted in weight loss and decreased blood insulin levels. In females, FGF21 administration increased food intake without reducing body weight and glucose and insulin concentrations in blood, but inhibited the expression of genes related to glucose and lipid turnover in liver and increased liver weight. Thus, female  $A^y$ -mice were resistant to anti-obesity effects of FGF21.

## Materials and methods

**Ethical approval.** All experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) and the Russian National Instructions for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocols were approved by the Independent Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences).

**Animals.** C57Bl and C57Bl- $A^y$  mice were bred in the vivarium of the Institute of Cytology and Genetics in reciprocal crosses. The mice were separated from their mothers at the age of 4 weeks and housed in groups of 5–6 per cage. At the age of 30 weeks, each mouse was placed into a separate cage and housed individually until the beginning of the experiment. The mice were housed under a 12/12-h light-dark regime (light from 07:30 to 19:30) at an ambient temperature of 22–24 °C. The mice were provided *ad libitum* access to commercial mouse chow (Assortiment Agro, Turakovo Village, Moscow region, Russia) and water.

FGF21 (1 mg per 1 kg) or PBS were administered subcutaneously at the end of the light period (17:00–17:30) for 10 days. We have chosen this dose based on literature data. T. Coskun et al. (2008) showed that daily FGF21 administration at this dose reduced body weight and blood glucose concentrations in male mice. To reveal the effect of FGF21 on glycaemia, fasted blood glucose was measured before and during the experiment. The mice were fasted overnight for two days before the first injection and at the seventh day of the experiment (after seven injections of FGF21 or PBS), and blood glucose was measured at the end of fasting. Glucose

concentrations were measured using a Lifescan One Touch Basic Plus glucometer. Body weight and food intake were measured daily for 6 days prior to fasting and within 24 h of refeeding after fasting.

On the last day, the animals were sacrificed by decapitation (an hour after the injection), and samples of trunk blood were collected; liver, brown adipose tissue (BAT), and subcutaneous and abdominal white adipose tissues (WAT) were weighed, and the tissues were collected and snap-frozen in liquid nitrogen to evaluate gene expression. Seven male and six female mice received PBS (control); six male and five female mice received FGF21.

**Plasma assays.** Concentrations of insulin, leptin, and adiponectin were measured, respectively, using Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Mouse Leptin ELISA Kit (EMD Millipore, St. Charles, Missouri, USA), and Mouse Adiponectin ELISA Kit (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Concentrations of glucose, triglycerides and cholesterol were measured colorimetrically using, respectively, Fluitest GLU, Fluitest TG, and Fluitest CHOL (Analyticon® Biotechnologies AG Am Mühlenberg 10, 35104 Lichtenfels, Germany). Concentrations of free fatty acids were measured using NEFA FS DiaSys kits (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany).

**Expression and purification of mouse FGF21.** Mouse FGF21 coding sequence (aa 29 to 210) was optimized for *Escherichia coli* expression and synthesized by Genewiz (South Plainfield, NJ, USA). This DNA sequence was subcloned into the expression vector pE-SUMOpro (LifeSensors Inc., USA). This construct was used for induction of fusion 6xHis-SUMO-fgf21 protein in *E. coli* BL21 (DE3) cells. The purified 6xHis-SUMO-fgf21 was cleaved using SUMO protease 1 and loaded onto a column with Ni-NTA resin. The FGF21 protein (aa 29 to 210) was in the flow-through fractions. Size exclusion chromatography on a Superdex 200 10/300 GL column was used as a final purification step. The absence of bacterial endotoxins in FGF21 protein sample was confirmed by LAL-test ( $< 0.2$  U/ $\mu$ g protein).

**Relative quantitation real-time PCR.** Total RNA was isolated from tissue samples using ExtractRNA kit (Evrogen, Moscow, Russia) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Evrogen) and oligo(dT) as a primer. TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) listed in Table 1 were used for relative quantitation real-time PCR with  $\beta$ -actin as an endogenous control according to manufacturer's manual. Sequence amplification and fluorescence detection were performed on an Applied Biosystems ViiA 7 Real-Time PCR System. Relative quantification was performed by the comparative threshold cycle ( $\Delta\Delta$ CT) method.

**Statistical analysis.** Each result is presented as an arithmetic mean  $\pm$  SE for a sample size (i. e., number of mice) indicated. Three-way ANOVA with factors "sex" (male, female), "experimental group" (PBS, FGF21 administration), and "day of experiment" (1–6) was used to analyze FGF21 effects on food intake and body weight; with factors "sex", "experimental group", and "eating" (daily FI before and after fasting), to analyze FGF21 effect on FI after fasting. Two-way ANOVA with factors "sex" and "experimental group" was used to analyze FGF21 effects on blood parameters and gene expression

with multiple comparisons using the post hoc Duncan test. Significance was determined as  $p \leq 0.05$ . The STATISTICA 6 software package (StatSoft) was used for analysis.

## Results

**Biochemical characteristics of blood and plasma.** No differences between male and female *A<sup>y</sup>*-mice were observed in concentrations of blood glucose, either before or during the experiment. Only the plasma level of adiponectin was higher in females than in males. FGF21 administration significantly decreased plasma insulin specifically in male mice. Both male and female mice tended to respond to FGF21 administration by decreased plasma levels of free fatty acids (FFA) (Table 2).

**Body weight (BW), weights of fat and liver, and food intake (FI).** FGF21 administration exerted differential effects on BW in male and female mice ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,118} \pm 12.2$ , "sex"  $\times$  "experimental group", three-way ANOVA, Fig. 1). In males, FGF21 contributed to weight loss, and significant differences in BW between male mice treated with PBS and FGF21 were observed from day 5 of the experiment (see Fig. 1). In females, FGF21 administration did not affect BW.

The weights of both subcutaneous and abdominal WAT were higher in female mice, whereas no such differences could be detected in the case of BAT, FGF21 administration did not affect fat weights in either males or females (Fig. 2). Liver weight was lower in females, and FGF21 administration increased this parameter in females, without affecting it in males (see Fig. 2).

The effect of FGF21 on FI was also sex-dependent ( $p < 0.0001$ ,  $F_{1,113} \pm 20.7$ , "sex"  $\times$  "experimental group", three-way ANOVA, Fig. 3, a). FGF21 administration did not affect FI in males, but significantly increased it in females from the first day of the experiment (see Fig. 3, a).

We also assessed the effect of FGF21 on FI during the 24-h period of refeeding after overnight fasting. Fasting taken alone stimulated FI, and FGF21 administration further increased it during refeeding in both males and females ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,39} \pm 14.3$ , "experimental group", three-way ANOVA, see Fig. 3, b).

**Gene expression.** In mice that received PBS, liver expression of most of the genes studied was sex-dependent (Fig. 4).

Higher levels of mRNA of genes involved in beta-oxidation (*Ppara*, *Pgc1*, *Cpt1*), glucose metabolism (*Insr*, *Slc2a2*), glycolysis (*G6pc*, *Pklr*), and gluconeogenesis (*Gck*, *Pck1*), as well as lipolysis (*Pnpla2*) and lipogenesis (*Lpl*, *Acaca*, *Acacb*) were observed in females, as compared to males. FGF21 administration inhibited liver expression of the genes, and this inhibition was more pronounced in females than in males. Thus, FGF21 administration effectively eliminated sex differences in liver expression of the genes, observed in the control (see Fig. 4). Liver expression of *Fgf21*, exhibiting no differences between males and females, was reduced in response to exogenous FGF21. Sex differences in gene expression were also observed in abdominal fat. In mice treated with PBS, mRNA levels of genes encoding PPAR $\alpha$ , LPL, and GLUT4 were higher in females than in males (Fig. 5). FGF21 administration reduced the expression of these genes in females to a greater extent than in males, thereby eliminating the sex-dependent differences observed in the control (see Fig. 5).

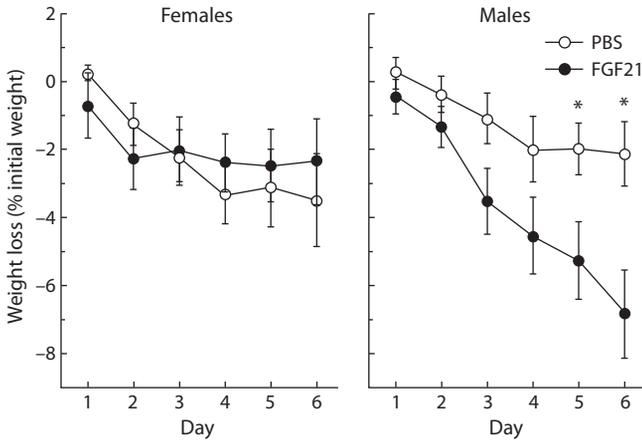
**Table 1.** Gene expression assays used for relative quantitation real-time PCR

Protein	Gene	Gene expression assay
Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	<i>Acaca</i>	Mm01304285_m1
Acetyl-coenzyme A carboxylase beta	<i>Acacb</i>	Mm01204683_m1
Agouti related neuropeptide	<i>Agrp</i>	Mm00475829_g1
Carnitine palmitoyltransferase 1a	<i>Cpt1a</i>	Mm01231183_m1
Carnitine palmitoyltransferase 1b	<i>Cpt1b</i>	Mm00487191_g1
Deiodinase, iodothyronine, type II	<i>Dio2</i>	Mm00515664_m1
Fatty acid synthase	<i>Fasn</i>	Mm00662319_m1
Fibroblast growth factor 21	<i>Fgf21</i>	Mm00840165_g1
Glucose-6-phosphatase, catalytic	<i>G6pc</i>	Mm00839363_m1
Glucokinase	<i>Gck</i>	Mm00439129_m1
Insulin receptor	<i>Insr</i>	Mm01211875_m1
Klotho beta	<i>Klb</i>	Mm00473122_m1
Leptin receptor	<i>Lepr</i>	Mm00440181_m1
Lipase, hormone sensitive	<i>Lipe</i>	Mm00495359_m1
Lipoprotein lipase	<i>Lpl</i>	Mm00434764_m1
Neuropeptide Y	<i>Npy</i>	Mm01410146_m1
Patatin-like phospholipase domain containing 2 (adipocyte triglyceride lipase (ATGL))	<i>Pnpla2</i>	Mm00503040_m1
Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	<i>Ppargc1a</i>	Mm01208835_m1
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	<i>Ppara</i>	Mm0040939_m1
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>Pparg</i>	Mm00440940_m1
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	<i>Pck1</i>	Mm01247058_m1
Pro-opiomelanocortin	<i>Pomc</i>	Mm00435874_m1
Pyruvate kinase liver and red blood cell	<i>Pklr</i>	Mm00443090_m1
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (GLUT1)	<i>Slc2a1</i>	Mm00441480_m1
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (GLUT2)	<i>Slc2a2</i>	Mm00446229_m1
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (GLUT4)	<i>Slc2a4</i>	Mm00436615_m1
Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	<i>Ucp1</i>	Mm01244861_m1
Uncoupling protein 3	<i>Ucp3</i>	Mm01163394_m1
Beta-actin	<i>Actb</i>	Mm00607939_s1

**Table 2.** Effects of FGF21 administration on biochemical parameters of blood

Biochemical parameter	Males		Females		p (ANOVA)
	PBS n = 7	FGF21 n = 6	PBS n = 6	FGF21 n = 5	
Glucose fasted initial, mM	8.17 ± 0.51	8.08 ± 0.75	7.90 ± 1.28	8.30 ± 1.02	NS
Glucose fasted day 7, mM	7.73 ± 1.51	6.68 ± 0.70	5.73 ± 1.11	8.30 ± 0.93	NS
Glucose, mM	9.64 ± 0.71	8.64 ± 0.30	9.27 ± 0.50	10.48 ± 0.49	NS
FFA, mM	0.19 ± 0.09	0.05 ± 0.04	0.27 ± 0.13	0.05 ± 0.05	0.07, E
Triglycerides, mM	1.04 ± 0.10	0.99 ± 0.07	0.99 ± 0.07	0.79 ± 0.11	NS
Cholesterol, mM	3.06 ± 0.12	3.25 ± 0.41	2.70 ± 0.22	2.83 ± 0.17	NS
Insulin, ng/ml	12.06 ± 0.89	7.56 ± 1.29*	8.60 ± 1.48	7.42 ± 1.45	< 0.05, E
Adiponectin, µg/ml	3.90 ± 0.37	4.12 ± 0.46	5.44 ± 0.54	5.67 ± 0.67	< 0.01, S
Leptin, ng/ml	21.75 ± 3.13	22.28 ± 6.86	21.15 ± 5.85	23.08 ± 4.72	NS

Male and female *A<sup>y</sup>*-mice were administered with FGF21 (1 mg per 1 kg) or PBS for 10 days, and blood samples to measure plasma parameters were collected 1 h after the last injection. Fasted glucose was measured in blood before (initial) and on day 7 of the experiment using a glucometer. \**p* < 0.05, males, FGF21 vs. PBS, post hoc Duncan test. NS – non-significant; S – “sex”; E – “experimental group”.



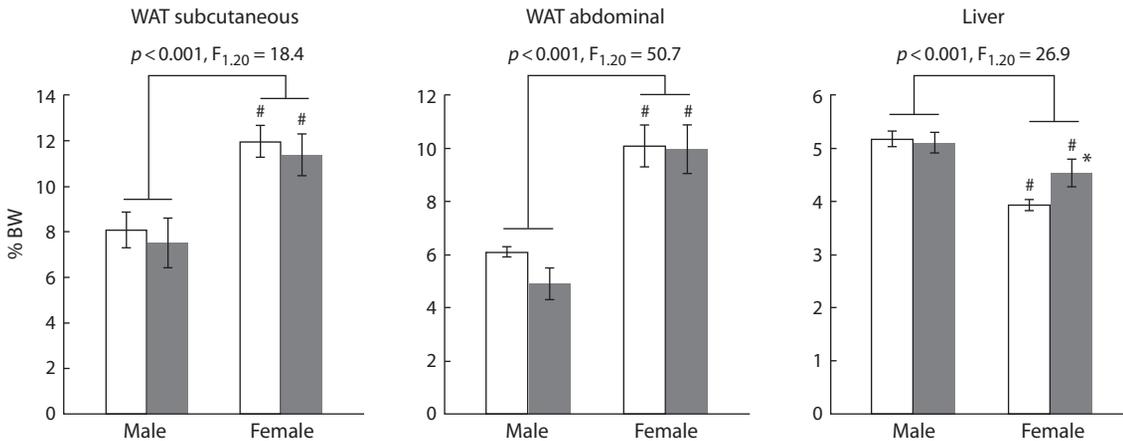
**Fig. 1.** Effect of FGF21 administration on BW in male and female *A<sup>y</sup>*-mice. Weight loss was calculated as the difference between the weight on the day of injection and the initial weight, related to the initial weight (%). \* $p < 0.05$ , post hoc Duncan test.

For the majority of the genes studied, the inhibitory effects of FGF21 administration on the expression were more pronounced in females. This was confirmed for genes involved in lipogenesis (*Pparg*, *Lpl*, *Acacb*), lipolysis (*Pnpla2*), and transcription coactivation (*Ppargc1a*). In a single case of *Acaca* gene, the pattern was reversed: FGF21 administration decreased the level of mRNA in males while increasing it in females. The expression of *Insr* and *Lipe* was higher in females, and FGF21 administration did not affect their mRNA levels (see Fig. 5).

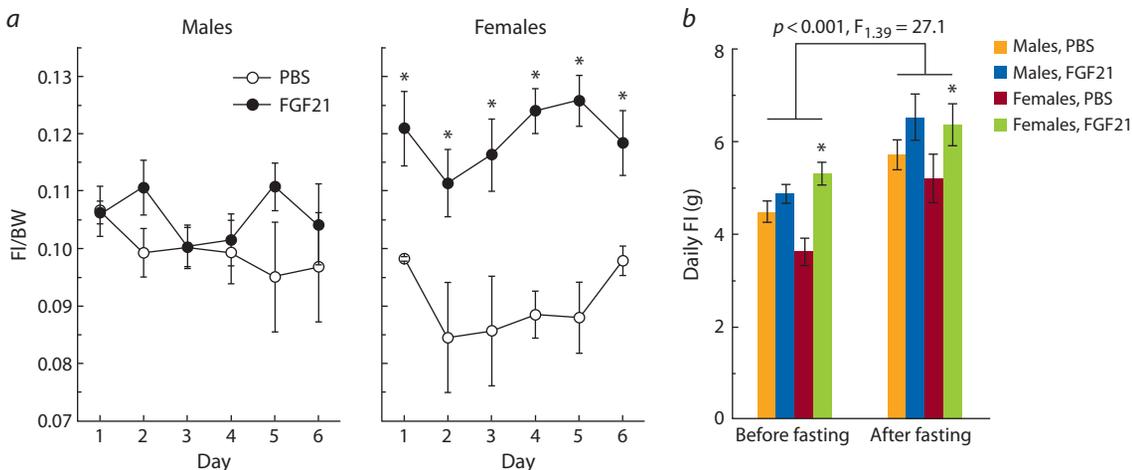
In subcutaneous fat of the controls, there were no sex-dependent expression differences for any of the genes studied. FGF21 administration affected only *Cpt1b*, decreasing its expression both in males and females.

In brown fat of the controls, there were no sex-dependent expression differences for any of the genes studied, and FGF21 administration did not affect the expression.

In muscle tissue of the controls, there were no sex-dependent expression differences for any of the genes studied.

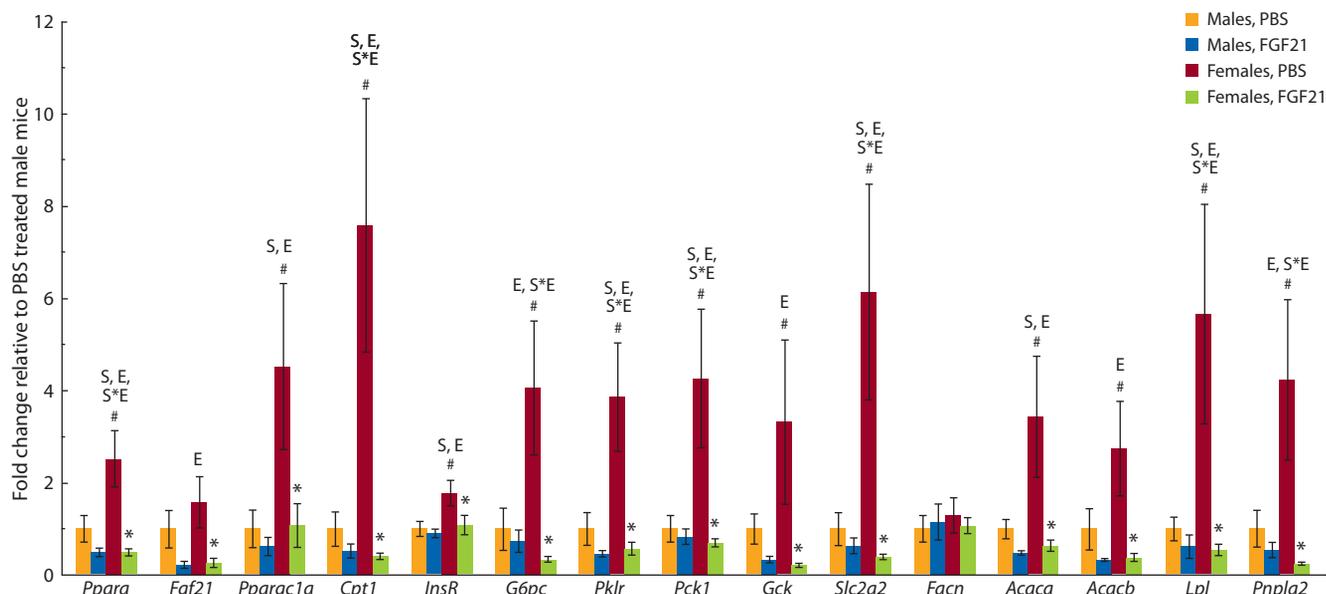


**Fig. 2.** FGF21 influence on weights of fat tissues and liver in male and female *A<sup>y</sup>*-mice. Organ weights were calculated as percentages of BW. Sex dependence (two-way ANOVA) is indicated in the graph. # $p < 0.05$  for males vs. females; \* $p < 0.05$  for FGF21 vs. PBS in females, post hoc Duncan test.



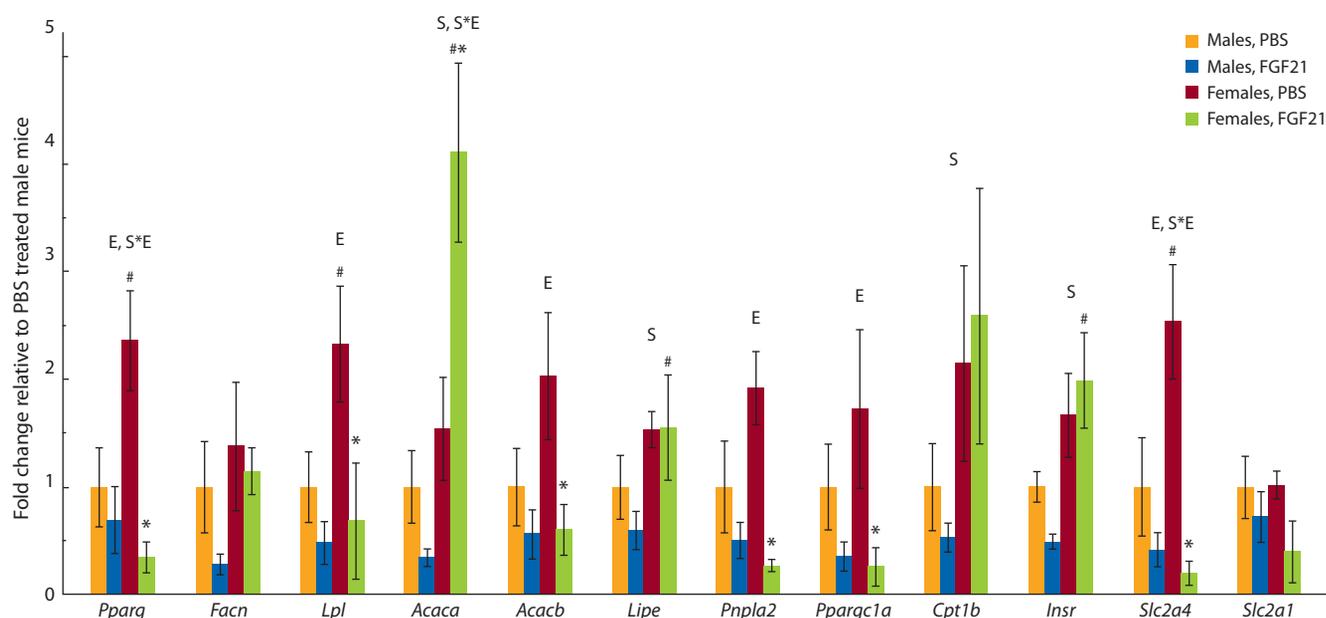
**Fig. 3.** FGF21 influence on FI *ad libitum* (a) and after fasting (b) in male and female *A<sup>y</sup>*-mice.

a – FI/BW ratio; b – mice were fasted overnight after seven injections of FGF21 or PBS. FI “before fasting” was calculated as an arithmetic mean of six daily FIs measured for 6 days prior to fasting. FI “after fasting” represents the amount of food consumed during 24 h of refeeding. The effect of fasting on FI (three-way ANOVA) is indicated in the graph. \* $p \leq 0.05$  for FGF21 vs. PBS in females, post hoc Duncan test.



**Fig. 4.** FGF21 influence on gene expression in the liver of male and female  $A^Y$ -mice.

Effects of factors "S" (sex) or "E" (experimental group), or interactions thereof ("S\*E") at the level of significance  $p < 0.05$  (two-way ANOVA) are indicated in the graph; # $p < 0.05$  for males vs. females; \* $p < 0.05$  for FGF21 vs. PBS in females; post hoc Duncan test.



**Fig. 5.** FGF21 influence on gene expression in the abdominal WAT of male and female  $A^Y$ -mice.

Effects of factors "S" (sex) or "E" (experimental group), or interactions thereof ("S\*E") at the level of significance  $p < 0.05$  (two-way ANOVA) are indicated in the graph. # $p < 0.05$  for males vs. females; \* $p < 0.05$  for FGF21 vs. PBS in females, post hoc Duncan test.

FGF21 did not affect the expression significantly, although the level of *Cpt1b* mRNA tended to increase after FGF21 administration ( $p \pm 0.06$ , two-way ANOVA).

Mice treated with PBS exhibited no differences between males and females in the hypothalamic mRNA levels of the genes studied. After FGF21 administration, the expression of *Klb* was decreased in mice of both sexes ( $p < 0.05$ ,  $F_{1,20} \pm 6.2$ ), whereas that of *Pomc* was decreased in males only ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test,  $1.0 \pm 0.3$ ,  $n \pm 6$ , control males vs.  $0.29 \pm 0.10$ ,  $n \pm 6$ , FGF21 treated males).

## Discussion

In the present study, we assessed the pharmacological effects of FGF21 in male and female mice with  $A^Y$  mutation, which evokes MC4R blockage. We found that these effects were strongly dependent on the sex of the animals.

FGF21 administered to animals with diabetes and obesity decreases their BW and blood glucose/insulin levels, improves blood lipid profile, and increases insulin sensitivity (Bon-Durant, Potthoff, 2018). In our study, responses to FGF21 administration in male  $A^Y$ -mice were largely consistent with

its expected impact: their BWs and blood insulin decreased, blood levels of FFA tended to decrease, and blood glucose and adiponectin were not affected. Our observation that FGF21 decreased blood insulin without affecting glucose, which retained normal levels, suggests that insulin sensitivity in male *A<sup>y</sup>*-mice was possibly improved. Metabolic effect of FGF21 administration was not associated with changes in blood adiponectin, since adiponectin is not required for the chronic effects of FGF21 to reduce body weight or its effects on glucose homeostasis (BonDurant et al., 2017).

Although we did not monitor energy expenditure, it was most likely increased, since weight loss in male mice took place in the absence of changes in FI. The ability of FGF21 to induce weight loss without affecting FI was reported previously for male mice with diet-induced and genetic obesity (*db/db*, *ob/ob*) (Kharitonov et al., 2005; Xu et al., 2009; Camporez et al., 2013). This effect was arguably due to increased energy expenditure caused by intense locomotor activity (Xu et al., 2009) and elevated metabolic rate (Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009). FGF21-induced growth of metabolic rates is associated with augmentation of fatty acid oxidation in liver and adipose tissue (BAT and WAT), caused in turn by increased expression of genes encoding CPT-1 (in liver only), PGC-1 (in liver and adipose tissue), and UCP-1 (in liver and adipose tissue) (Camporez et al., 2013). No such changes in gene expression have been observed in this study; on the contrary, FGF21 administration to males reduced the expression of *Ppargc1a* and *Cpt1* in liver and *Ppargc1a* in abdominal WAT ( $p < 0.05$ , two-way ANOVA).

Our results are consistent with those reported by (Coskun et al., 2008), demonstrating that weight loss and improved glucose metabolism in FGF21-treated C57Bl males were accompanied by a decrease in liver expression of *Cpt1* (with no changes of *Ppargc1a* expression). However, T. Coskun et al. (2008) found increased expression of genes related to (1) thermogenesis (*Ucp1*) in WAT and BAT, (2) lipolysis (*Lipe*, *Pnpla2*) in WAT, and (3) lipogenesis (*Acaca*, *Acacb*) in WAT, suggesting that energy expenditure is achieved via thermogenesis and induction of a state of increased futile cycling. We have not observed induction of *Ucp1* expression either in BAT or WAT; likewise, there have been no increase in the expression of lipolysis/lipogenesis genes in liver or adipose tissue. Thus, our experimental data provide no indication of futile cycling activation. FGF21-induced activation of energy expenditure involves, in addition to central mechanisms, the sympathetic nervous system (Owen et al., 2014; Lan et al., 2017). Of note, the latter also mediates regulation of energy expenditure by the melanocortin system (Rossi et al., 2011; Berglund et al., 2014). Therefore, FGF21 may act, at least in certain cases, via melanocortin signaling pathways. If so, the blockade of MC4R in *A<sup>y</sup>*-mice can interfere with the activating effect of FGF21 on the expression of the genes we studied. Weight loss in male *A<sup>y</sup>*-mice is indicative of yet other mechanisms whereby energy expenditure may be increased, which remain to be explored.

In females with *A<sup>y</sup>* mutation, the effect of FGF21 differed dramatically from that observed in males. In females unlike males, FGF21 administration did not induce weight loss, but increased liver weight. *A<sup>y</sup>*-mice are hyperphagic (Wolff et al., 1999), and FGF21 exacerbated hyperphagia specifically in

females. It is not known whether this difference is due to *A<sup>y</sup>* mutation or, rather, we are dealing with a general sex-linked discrepancy in responses of female and male mice to FGF21 treatment (the pharmacological effects of FGF21 have thus far not been studied in female mice).

Resistance of female *A<sup>y</sup>*-mice to catabolic effects of FGF21 can be explained by increase of food intake. FGF21 influence on FI in female rodent was not studied, but in males, FGF21 was shown previously to increase FI in rats (Recinella et al., 2017), mice with diet-induced obesity (Coskun et al., 2008), and to increase protein intake while reducing carbohydrate intake in normal mice, and the later effect was mediated via CNS (Larson et al., 2019). However, FGF21-dependent signaling pathways that regulate eating behavior have not been identified. The melanocortin system is involved in the regulation of the response to protein deficiency, and FGF21 may act as the sensor triggering that response. In our experiment, male mice demonstrated no increase in FI, although FGF21 administration decreased hypothalamic expression of *Pomc*. POMC is a precursor of the anorexigenic neuropeptide MSH, and a decrease in *Pomc* expression (limiting MC4R activation by MSH) is associated with increased FI. *A<sup>y</sup>* mutation leads to MC4R blockade, which disrupts MSH regulation of FI and may be the reason why males did not respond to FGF21 by increased FI.

In females, FGF21 administration caused a considerable increase in FI without affecting the expression of the melanocortin system genes. In *A<sup>y</sup>*-females, FGF21 influence on FI may be mediated via estradiol-sensitive mechanism that is not altered by impaired melanocortin signaling (Morton et al., 2004). It is possible that the orexigenic effects of FGF21 in males and females involve distinct neuronal signaling pathways.

According to the data obtained in the control groups, a different metabolic response to exogenous FGF21 in males and females was induced at the background of significant sex differences in the mass of the liver and adipose tissue and in the expression of the liver and fat genes. Sex differences in gene expression in adipose tissue differed depending on localization; in our experiment, we found them only in abdominal adipose tissue. These data are consistent with the results obtained when assessing gene expression in adipose tissue in mice: the number of differentially expressed genes in males and females was significantly higher in abdominal than in subcutaneous fat (Grove et al., 2010). Increased weight of abdominal fat in control *A<sup>y</sup>*-females, compared to males, was associated with increased expression of genes upregulating lipogenesis in adipose tissue: *Ppar*, *Lpl*, *Insr* and *Slc2a4*. FGF21 administration eliminated differences in the expression of these genes, however, it did not lead to significant changes in the mass of adipose tissue. It is possible that more prolonged FGF21 administration is required to detect changes at the level of adipose tissue weight.

The most striking sex differences in gene expression in the control groups were observed in liver. In controls, the expression of most genes studied (except for *Fgf21* and *Fasn*) was higher in females than in males. These results are consistent with transcriptome analysis data demonstrating differential expression rates for 72 % active liver genes in male and female mice (Yang et al., 2006). Sex differences in expression of genes

related to lipid metabolism were found in the liver of mice and rats on high-calorie diet: compared to males, females had enhanced mRNA levels of *Acc1*, *Pparg*, *Cpt1* and other genes in mice (Gasparin et al., 2018), and enhanced protein levels of ACC, PPARs and FAS in rats (Chukijrungroat et al., 2017). As shown by S. Della Torre et al. (2017), liver is the major target for estrogens, and estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) has a direct effect on the regulation of the hepatic genes relevant for energy metabolism.

Increased expression of genes involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation (*Ppara*, *Ppargc1a*, *Cpt1*), glycolysis (*G6p*, *Pklr*), gluconeogenesis (*Pck1*, *Gck*), glucose transport (*Slc2a2*), lipogenesis and lipolysis (*Acaca*, *Acacb*, *Lpl*, *Pnpla2*) possibly indicates that the rate of glucose and fat metabolism is higher in the liver of *A<sup>y</sup>*-females than *A<sup>y</sup>*-males. FGF21 administration reduced liver expression of all the genes mentioned, thereby eliminating entirely any sex-dependent differences, and this effect was associated with the increase of female liver weight. Enlarged liver under the action of FGF21 in female *A<sup>y</sup>*-mice may indicate the development of steatosis. Simultaneous decrease in catabolic (lipolysis, glycolysis) and anabolic (lipogenesis, gluconeogenesis) processes can suggest decreased metabolism in the liver of *A<sup>y</sup>*-females. Decreased liver metabolism in females could reduce liver energy expenditure and contribute, together with increased food intake, to liver weight gain. Additional morphological and biochemical studies are needed to find out whether FGF21 initiates (or promotes) steatosis in *A<sup>y</sup>*-female mice.

Taken together, our findings indicate that therapeutic effects of FGF21 in mice with disrupted melanocortin signaling are strongly sex-dependent. In male *A<sup>y</sup>*-mice, the blockage of MC4Rs does not prevent the anti-obesity effect of FGF21: its administration results in weight loss and blood insulin decrease. However, obese *A<sup>y</sup>*-females exerted resistance to catabolic and antidiabetic effects of FGF21. In females, exogenous FGF21 stimulates FI without reducing BW and blood glucose/insulin, inhibits liver expression of genes related to glucose and lipid turnover, and increases liver weight. The contribution of estrogens and the melanocortin system to those effects remains to be elucidated.

## Conclusion

The pharmacological effect of FGF21 may depend on the animal sex and etiology of obesity. Although an immediate translation to humans of findings obtained in experiments with mice is not possible, our results suggest that detailed preclinical studies of the pharmacological effects of FGF21 are required, taking into account the sex of individuals under study and the genesis of obesity.

## References

Bazhan N., Jakovleva T., Balybina N., Dubinina A., Denisova E., Feofanova N., Makarova E. Sex dimorphism in the Fgf21 gene expression in liver and adipose tissues is dependent on the metabolic condition. *Online J. Biol. Sci.* 2019;19(1):28-36. DOI 10.3844/ojbsci.2019.28.36.

Berglund E.D., Liu T., Kong X., Sohn J.-W., Vong L., Deng Z., Lee C.E., Lee S., Williams K.W., Olson D.P., Scherer P.E., Lowell B.B., Elmquist J.K. Melanocortin 4 receptors in autonomic neurons regulate thermogenesis and glycemia. *Nat. Neurosci.* 2014;17(7):911-913. DOI 10.1038/nn.3737.

BonDurant L.D., Ameka M., Naber M.C., Markan K.R., Idiga S.O., Acevedo M.R., Walsh S.A., Ornitz D.M., Potthoff M.J. FGF21 regulates metabolism through adipose-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab.* 2017;25(4):935-944.e4. DOI 10.1016/j.cmet.2017.03.005.

BonDurant L.D., Potthoff M.J. Fibroblast growth factor 21: a versatile regulator of metabolic homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 2018;38(1):173-196. DOI 10.1146/annurev-nutr-071816-064800.

Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 1992;71(7):1195-1204.

Camporez J.P.G., Jornayvaz F.R., Petersen M.C., Pesta D., Guigni B.A., Serr J., Zhang D., Kahn M., Samuel V.T., Jurczak M.J., Shulman G.I. Cellular mechanisms by which FGF21 improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology.* 2013;154(9):3099-3109. DOI 10.1210/en.2013-1191.

Chukijrungroat N., Khamphaya T., Weerachayaphorn J., Songserm T., Saengsirisuwan V. Hepatic FGF21 mediates sex differences in high-fat high-fructose diet-induced fatty liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2017;313(2):E203-E212. DOI 10.1152/ajpendo.00076.2017.

Clayton J.A. Applying the new SABV (sex as a biological variable) policy to research and clinical care. *Physiol. Behav.* 2018;187:1872-1875. DOI 10.1016/j.physbeh.2017.08.012.

Coskun T., Bina H.A., Schneider M.A., Dunbar J.D., Hu C.C., Chen Y., Moller D.E., Kharitonov A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology.* 2008;149(12):6018-6027. DOI 10.1210/en.2008-0816.

Della Torre S., Lolli F., Ciana P., Maggi A. Sexual dimorphism and estrogen action in mouse liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017;1043:141-151.

Fani L., Bak S., Delhanty P., van Rossum E.F.C., van den Akker E.L.T. The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. *Int. J. Obes. (Lond.)* 2014;38(2):163-169. DOI 10.1038/ijo.2013.80.

Farooqi I.S., Keogh J.M., Yeo G.S.H., Lank E.J., Cheetham T., O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(12):1085-1095. DOI 10.1056/NEJMoa022050.

Gasparin F.R.S., Carreño F.O., Mewes J.M., Gilgioni E.H., Pagadigorria C.L.S., Natali M.R.M., Utsunomiya K.S., Constantin R.P., Ouchida A.T., Curti C., Gaemers I.C., Elferink R.P.J.O., Constantin J., Ishii-Iwamoto E.L. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018;1864(7):2495-2509. DOI 10.1016/j.bbadis.2018.04.004.

Girardet C., Butler A.A. Neural melanocortin receptors in obesity and related metabolic disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1842(3):482-494. DOI 10.1016/j.bbadis.2013.05.004.

Grove K.L., Fried S.K., Greenberg A.S., Xiao X.Q., Clegg D.J. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int. J. Obes. (Lond.)* 2010;34(6):989-1000. DOI 10.1038/ijo.2010.12.

Jackson V.M., Breen D.M., Fortin J.-P., Liou A., Kuzmiski J.B., Loomis A.K., Rives M.-L., Shah B., Carpino P.A. Latest approaches for the treatment of obesity. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015;10(8):825-839. DOI 10.1517/17460441.2015.1044966.

Kharitonov A., Shiyanova T.L., Koester A., Ford A.M., Micanovic R., Galbreath E.J., Sandusky G.E., Hammond L.J., Moyers J.S., Owens R.A., Gromada J., Brozinick J.T., Hawkins E.D., Wroblewski V.J., Li D.-S., Mehrbod F., Jaskunas S.R., Shanafelt A.B. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 2005;115(6):1627-1835. DOI 10.1172/JCI23606.

Lan T., Morgan D.A., Rahmouni K., Sonoda J., Fu X., Burgess S.C., Holland W.L., Kliewer S.A., Mangelsdorf D.J. FGF19, FGF21, and an FGFR1/ $\beta$ -Klotho-activating antibody act on the nervous system to regulate body weight and glycemia. *Cell Metab.* 2017;26(5):709-718.e3. DOI 10.1016/j.cmet.2017.09.005.

Larson K.R., Chaffin A.T.-B., Goodson M.L., Fang Y., Ryan K.K. Fibroblast growth factor-21 controls dietary protein intake in male

- mice. *Endocrinology*. 2019;160(5):1069-1080. DOI 10.1210/en.2018-01056.
- Lee Y.-H., Kim S.H., Kim S.-N., Kwon H.-J., Kim J.-D., Oh J.Y., Jung Y.-S. Sex-specific metabolic interactions between liver and adipose tissue in MCD diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget*. 2016;7(30):46959-46971. DOI 10.18632/oncotarget.10506.
- Markan K.R., Naber M.C., Ameka M.K., Anderegg M.D., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A., Mohammadi M., Potthoff M.J. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes*. 2014;63(12):4057-4063. DOI 10.2337/db14-0595.
- Mauvais-Jarvis F., Arnold A.P., Reue K. A guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. *Cell Metab*. 2017;25(6):1216-1230. DOI 10.1016/j.cmet.2017.04.033.
- Michaud E.J., Mynatt R.L., Miltenberger R.J., Klebig M.L., Wilkinson J.E., Zemel M.B., Wilkison W.O., Woychik R.P. Role of the agouti gene in obesity. *J. Endocrinol*. 1997;155(2):207-209.
- Morton G.J., Mystkowski P., Matsumoto A.M., Schwartz M.W. Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. *Peptides*. 2004;25(4):667-674. DOI 10.1016/j.peptides.2004.02.007.
- Owen B.M., Ding X., Morgan D.A., Coate K.C., Bookout A.L., Rahmouni K., Kliewer S.A., Mangelsdorf D.J. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab*. 2014;20(4):670-677. DOI 10.1016/j.cmet.2014.07.012.
- Recinella L., Leone S., Ferrante C., Chiavaroli A., Di Nisio C., Martinotti S., Vacca M., Brunetti L., Orlando G. Effects of central fibroblast growth factor 21 (FGF21) in energy balance. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2017;31(3):603-613.
- Rossi J., Balthasar N., Olson D., Scott M., Berglund E., Lee C.E., Choi M.J., Lauzon D., Lowell B.B., Elmquist J.K. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2011;13(2):195-204. DOI 10.1016/j.cmet.2011.01.010.
- Singh R.K., Kumar P., Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *C. R. Biol*. 2017;340(2):87-108. DOI 10.1016/j.crvi.2016.11.007.
- Tao Y.-X. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr. Rev*. 2010;31(4):506-543. DOI 10.1210/er.2009-0037.
- Wolff G.L., Roberts D.W., Mountjoy K.G. Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol. Genomics*. 1999;1(3):151-163. DOI 10.1152/physiolgenomics.1999.1.3.151.
- Xie T., Leung P.S. Fibroblast growth factor 21: a regulator of metabolic disease and health span. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2017;313(3):E292-E302. DOI 10.1152/ajpendo.00101.2017.
- Xu J., Lloyd D.J., Hale C., Stanislaus S., Chen M., Sivits G., Vonderfecht S., Hecht R., Li Y.-S., Lindberg R.A., Chen J.-L., Jung D.Y., Zhang Z., Ko H.-J., Kim J.K., Véniant M.M. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009;58(1):250-259. DOI 10.2337/db08-0392.
- Yang X., Schadt E.E., Wang S., Wang H., Arnold A.P., Ingram-Drake L., Drake T.A., Lusis A.J. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res*. 2006;16(8):995-1004. DOI 10.1101/gr.5217506.

#### ORCID ID

E.N. Makarova [orcid.org/0000-0002-6417-9893](https://orcid.org/0000-0002-6417-9893)  
T.V. Yakovleva [orcid.org/0000-0001-7628-5856](https://orcid.org/0000-0001-7628-5856)  
N.Yu. Balyibina [orcid.org/0000-0001-7168-1438](https://orcid.org/0000-0001-7168-1438)  
K.O. Baranov [orcid.org/0000-0002-4029-6518](https://orcid.org/0000-0002-4029-6518)  
E.I. Denisova [orcid.org/0000-0001-8696-8781](https://orcid.org/0000-0001-8696-8781)  
A.D. Dubinina [orcid.org/0000-0003-3907-3488](https://orcid.org/0000-0003-3907-3488)  
N.A. Feofanova [orcid.org/0000-0002-2591-1623](https://orcid.org/0000-0002-2591-1623)  
N.M. Bazhan [orcid.org/0000-0002-7246-4758](https://orcid.org/0000-0002-7246-4758)

**Acknowledgements.** This research was funded by the Russian Science Foundation, Grant No. 17-15-01036.

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

Received October 7, 2019. Revised November 28, 2019. Accepted November 29, 2019. Published online February 03, 2020.

## Участие мобильных элементов в нейрогенезе

Р.Н. Мустафин<sup>1</sup>✉, Э.К. Хуснутдинова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

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

✉ e-mail: ruji79@mail.ru

**Аннотация.** В обзоре представлены накопленные в научной литературе данные об участии мобильных генетических элементов в регуляции дифференцировки нейрональных стволовых клеток и функционирования зрелых нейронов головного мозга. Начиная с первого деления зиготы, эмбриональное развитие управляется закономерными активациями транспозонов, необходимыми для последовательного изменения экспрессии специфических для каждого типа клеток генов. Частным отражением этих процессов может быть дифференцировка нейрональных стволовых клеток – процесс, в ходе которого необходима наиболее тонкая настройка экспрессии генов в нейронах различных областей головного мозга. Доказательствами этого предположения являются данные о высокой активности транспозонов в центре нейрогенеза, зубчатой извилине гиппокампа. Кроме того, мобильные элементы – источники возникновения и эволюции длинных некодирующих РНК, которые коэкспрессируются с необходимыми для работы головного мозга белок-кодирующими генами. Наибольшая активность длинных некодирующих РНК, так же как и транспозонов, обнаружена в центре нейрогенеза человека, что позволяет предположить их участие в управлении работой головного мозга. В регуляции дифференцировкой нейрональных стволовых клеток используются также микроРНК, многие из которых возникают из транскриптов мобильных элементов. Транспозоны посредством собственных процессированных транскриптов играют роль в эпигенетической регуляции дифференцировки нейронов. Объяснением глобальной регуляторной функции мобильных элементов в головном мозге человека может служить их значение в возникновении белок-кодирующих генов в эволюции путем экзонизации, дупликации и доместикации. Эти гены вовлечены в эпигенетическую регуляторную сеть с участием транспозонов, так как содержат нуклеотидные последовательности, комплементарные микроРНК и длинным некодирующим РНК, образуемым из транскриптов мобильных элементов. В формировании памяти выявлена роль обмена вирусоподобными частицами мРНК при помощи белка Arg эндогенных ретровирусов HERV между нейронами. Возможными способами реализации этого механизма могут быть обратная транскрипция мРНК и сайт-специфическая интеграция в геном с регуляторным воздействием на гены, участвующие в консолидации информации. Ключевые слова: головной мозг; дифференцировка; некодирующие РНК; ретроэлементы; стволовые нервные клетки; транспозоны.

**Для цитирования:** Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Участие мобильных элементов в нейрогенезе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):209-218. DOI 10.18699/VJ20.613

## Involvement of transposable elements in neurogenesis

R.N. Mustafin<sup>1</sup>✉, E.K. Khusnutdinova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

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

✉ e-mail: ruji79@mail.ru

**Abstract.** The article is about the role of transposons in the regulation of functioning of neuronal stem cells and mature neurons of the human brain. Starting from the first division of the zygote, embryonic development is governed by regular activations of transposable elements, which are necessary for the sequential regulation of the expression of genes specific for each cell type. These processes include differentiation of neuronal stem cells, which requires the finest tuning of expression of neuron genes in various regions of the brain. Therefore, in the hippocampus, the center of human neurogenesis, the highest transposon activity has been identified, which causes somatic mosaicism of cells during the formation of specific brain structures. Similar data were obtained in studies on experimental animals. Mobile genetic elements are the most important sources of long non-coding RNAs that are coexpressed with important brain protein-coding genes. Significant activity of long non-coding RNA was detected in the hippocampus, which confirms the role of transposons in the regulation of brain function. MicroRNAs, many of which arise from transposon transcripts, also play an important role in regulating the differentiation of neuronal stem cells. Therefore, transposons, through their own processed transcripts, take an active part in the epigenetic regulation of differentiation of neurons. The global regulatory role of transposons in the human brain is due to the emergence of protein-coding genes in evolution by their exonization, duplication and domestication. These genes are involved in an epigenetic regulatory network with the participation of transposons, since they contain nucleotide sequences complementary to miRNA and long non-coding RNA formed from transposons. In the memory formation, the role of

the exchange of virus-like mRNA with the help of the Arc protein of endogenous retroviruses HERV between neurons has been revealed. A possible mechanism for the implementation of this mechanism may be reverse transcription of mRNA and site-specific insertion into the genome with a regulatory effect on the genes involved in the memory. Key words: brain; differentiation; noncoding RNA; retroelements; neuronal stem cells; transposable elements.

**For citation:** Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Involvement of transposable elements in neurogenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):209-218. DOI 10.18699/VJ20.613

## Введение

Мобильные элементы (TE – transposable elements) занимают до 69 % генома человека (de Koning et al., 2011). Помимо этого, многие белок-кодирующие гены (Joly-Lopez, Bureau, 2018), регуляторные последовательности (Ito et al., 2017; Schrader, Schmitz, 2018), теломеры (Kopera et al., 2011) и центромеры хромосом (Cheng, Murata, 2003; Sharma et al., 2013; Han et al., 2016) произошли от TE. Источниками некодирующих РНК (нкРНК), включая микроРНК (Piriyaopongsa et al., 2007; Yuan et al., 2010, 2011; Qin et al., 2015) и длинные нкРНК (Johnson, Guigo, 2014) человека, также являются мобильные элементы. За миллионы лет эволюции клетки выработали различные системы защиты от интеграций TE в их геномы, включая метилирование ДНК, образование гетерохроматина и РНК-интерференцию (РНКи). Эти эпигенетические механизмы внесли значительный вклад в регуляцию специфической экспрессии генов и дифференцировки клеток (Habibi et al., 2015).

Мобильные элементы подразделяют на два основных класса, в соответствии с механизмами их транспозиции. ДНК-транспозоны перемещаются путем «вырезания и вставки». Ретроэлементы (РЭ) интегрируют в новые сайты генома при помощи «копирования и вставки». РЭ могут содержать длинные концевые повторы LTR (long terminal repeat) – LTR-РЭ (рис. 1) или не содержать их – non-LTR РЭ (рис. 2). Последние бывают автономными – LINE (long interspersed nuclear elements) и неавтономными – SINE (short interspersed nuclear elements) и SVA (SINE-VNTR-Alu) (рис. 3) (Klein, O'Neill, 2018).

В геноме человека имеется более 500000 копий LINE 1 (L1), составляющих 17 % всех нуклеотидных последовательностей (НП), из них активны, с полной длиной 6000 п. н., лишь около 100 L1. Среди неавтономных РЭ в геноме человека содержится более 2700 копий SVA (Hancks, Kazazian, 2012). В эволюции приматов было несколько волн ретротранспозиций L1, а также рождение новых TE, таких как SINE, Alu и SVA, что считается одним из важных факторов для развития головного мозга человека (Linker et al., 2017).

Эндогенные ретровирусы человека (HERV) относятся к LTR-РЭ. Они занимают около 8 % генома и служат источниками огромного количества (794 972) сайтов связывания со специфическими транскрипционными факторами (ТФ), активация которых играет роль в эмбриогенезе. Например, LTR взаимодействуют: в мезодерме – с SOX17, FOXA1, GATA4, в плюрипотентных клетках – с SOX2, NANOG, POU5F1, в гемопоэтических – с TAL1, GATA1, PU1 (Ito et al., 2017). Взаимосвязью с тканеспецифической экспрессией генов характеризуются также MIR (mammalian-wide interspersed repeats), древнее семейство SINE, произошедшее от тРНК (Jjing et al., 2014).

Мобильные элементы характеризуются закономерной активацией в зависимости от ткани и стадии развития. На основании высокопроизводительного профилирования сайтов интеграции при помощи секвенирования нового поколения было показано, что транспозиции TE в специфические области генома неслучайны (Sultana et al., 2017). Благодаря запрограммированной активации TE в отдельных клетках при нейрогенезе происходит изменение экспрессии определенных генов, необходимых для дифференцировки в специфические типы нейронов для формирования и функционирования структур головного мозга (Coufal et al., 2009; Bailie et al., 2011; Thomas, Muotri, 2012; Richardson et al., 2014; Evrony et al., 2015; Upton et al., 2015; Muotri, 2016; Suarez et al., 2018). В соответствии с этим выявляемый соматический мозаицизм (СМ) нервных клеток по инсерциям TE (Richardson et al., 2014; Upton et al., 2015; Bachiller et al., 2017; Paquola et al., 2017; Rohrbach et al., 2018; Suarez et al., 2018) может отражать запрограммированный регуляторный паттерн генома, необходимый для созревания специфических структур ЦНС (Paquola et al., 2017; Rohrbach et al., 2018). СМ означает наличие в одном организме клеток с разными геномами в результате *de novo* изменений ДНК. Эти структурные вариации могут быть обусловлены CNV (copy number variations), инсерциями РЭ, делециями под влиянием TE, а также SNV (single nucleotide variants) (Paquola et al., 2017). То есть в разных клетках одного организма изменяется не только генотип, но и весь геном. Это обусловлено возникновением мутаций в экзонах белок-кодирующих генов, межгенных регуляторных областях и интронах, что сопровождается специфическим для каждого типа клеток изменением экспрессии определенных генов.

## Роль транспозонов в дифференцировке нейронов

Головной мозг человека содержит около 86.1 млрд нейронов, каждый из которых образует от 5000 до 20000 синаптических связей, создавая сложную сеть с разнообразными типами и подтипами клеток. Количество подтипов настолько велико, что не поддается современным методам их описания. В связи с этим должны существовать механизмы, обеспечивающие такое разнообразие нейронов с их специфическими временными и пространственными особенностями функционирования (Thomas, Muotri, 2012). Источниками этих механизмов могут быть TE, комбинации перемещений которых способны стать источниками бесчисленного разнообразия. Примером служит молекулярный способ генерирования антител иммунной системой млекопитающих (V(D)J рекомбинация), произошедший от TE (Lapp, Hunter, 2016). Транспозоны играли роль в развитии центральной нервной системы. В эволюции они оказались источниками формирования

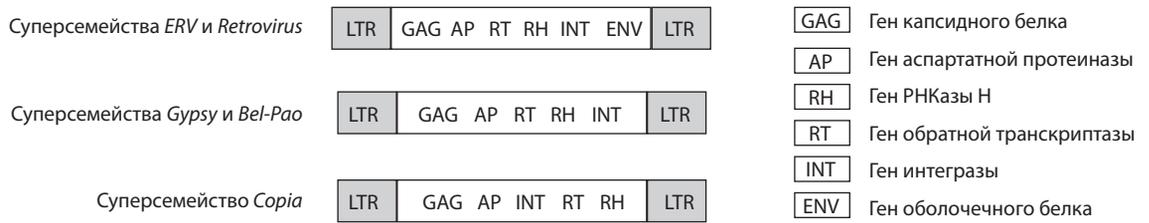


Рис. 1. Схема строения генов LTR-содержащих ретроэлементов.

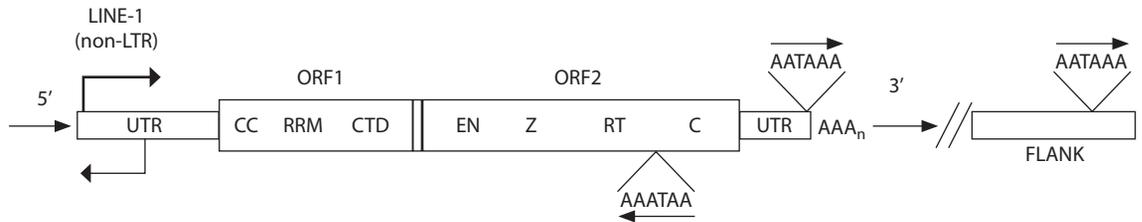


Рис. 2. Схема строения non-LTR ретроэлементов (LINE-1).

UTR – нетранслируемая область; ORF – открытая рамка считывания; CC – спиралевидный домен; RRM – RNA – домен распознавания РНК; CTD – С-концевой домен; EN – эндонуклеаза; Z – Z-домен; RT – обратная транскриптаза; C – цистеин-богатый домен.

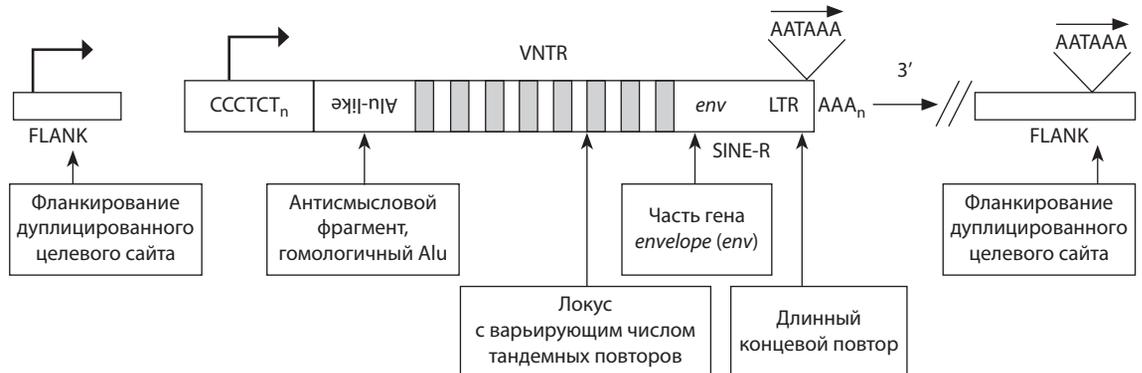


Рис. 3. Схема строения SVA-элементов.

регуляторных структур и генов, участвующих в формировании головного мозга. Так, неавтономные TE MER130 сохранились в эволюции в связи с их расположением вблизи генов неокортекса как необходимое звено для их регуляции. В экспериментах на мышах была показана активация MER130 у эмбрионов на 14-й день развития в качестве энхансеров генов для развития неокортекса (Notwell et al., 2015). Среди 11 специфичных для плацентарных животных генов *sushi-ichi*, произошедших от ретротранспозонов, ген *SIRH11/ZCCHC16*, кодирующий белок CCHC с цинковыми пальцами, способствовал эволюции головного мозга. Этот одомашненный ген вовлечен в развитие когнитивных функций плацентарных (Irie et al., 2016).

Еще в 2009 г. в нейрональных стволовых клетках (СК), изолированных из головного мозга эмбриона, были обнаружены ретротранспозиции L1s, а также увеличение (в сравнении с печенью и сердцем того же индивида) количества копий эндогенных L1s в гиппокампе взрослого человека (Coufal et al., 2009). Помимо L1 (7743 инсерций),

в гиппокампе людей зрелого возраста найдено большое количество соматических транспозиций Alu (13692 инсерции) и SVA (1350 инсерций) (Baillie et al., 2011). Эти интеграции *de novo* могут воздействовать на экспрессию определенных генов, создавая уникальные транскрипты отдельных нейронов (Muotri, 2016), что может быть обусловлено запрограммированной на уровне генома способностью TE к их закономерным сайт-специфическим инсерциям (Sultana et al., 2017). Действительно, в работе (Coufal et al., 2009) из 19 ретротранспозиций 16 оказались на расстоянии менее чем в 100 кб от генов, экспрессирующихся в нейронах. В работе (Upton et al., 2015) при изучении СМ гиппокампа человека 2 из 20 выявленных транспозиций L1 оказались функционально значимыми инсерциями в интроны генов *ZFAND3* и *USP33*, функционирующих в головном мозге. В 2015 г. А.А. Kurnosov с коллегами при исследовании образцов головного мозга человека показали, что из 3100 транспозиций L1 в нейронах зубчатой извилины гиппокампа в генах расположены 50.26 % инсерций, из 2984 Alu – 49.1 % (Kurnosov et al.,

2015). В 2016 г. в работе (Erwin et al., 2016) было выявлено, что в головном мозге здоровых людей 44–63 % нейронов подвергаются СМ в области генов, имеющих значение для работы нервной системы. Так, высокая частота инсерций L1-РЭ характерна для гена *DLG2*, влияющего на когнитивную гибкость, внимание и обучение. Мутации в *DLG2* ассоциированы с развитием шизофрении.

Хотя соматические ретротранспозиции, в отличие от зародышевых, не могут передаваться следующим поколениям, запрограммированная способность к специфическим инсерциям, зависящая от состава и расположения ТЕ в геноме, может наследоваться. Возможным объяснением способности ТЕ к сайт-специфическим инсерциям в области генов, экспрессирующихся в головном мозге, может быть эволюционная взаимосвязь белок-кодирующих генов (Ito et al., 2017; Joly-Lopez, Bureau, 2018) и их регуляторных НП (Gianfrancesco et al., 2017) с мобильными элементами. Были найдены специфические для человека и шимпанзе инсерции вблизи промоторов генов рецептора тахикина *TACR3*, катионных каналов *TRPV1* и *TRPV3*, окситоцина *OXT*. Эти гены связаны с функционированием нейропептидов. Анализ геномов различных млекопитающих показал, что нейрональный энхансер nPE2, регулирующий экспрессию гена *POMC* в гипоталамусе, в эволюции произошел от SINE (Gianfrancesco et al., 2017).

Транспозиции и экспрессия ТЕ варьируют в зависимости от области головного мозга и меняются при средовых воздействиях, так как могут выполнять ряд адаптивных функций (Lapp, Hunter, 2016). Наиболее активными оказались L1, сохранившие способность к транспозициям, вызывая СМ (Suarez et al., 2018). Еще в 2005 г. A.R. Muotri с коллегами предположили, что L1 при помощи соматических транспозиций могут активно создавать мозаицизм геномов нейронов (Muotri et al., 2005). В головном мозге СМ играет важную роль в регуляции познания и поведения. Последствия СМ охватывают обширные изменения – от варианта в одном локусе до генов в нейрональных сетях (Paquola et al., 2017; Rohrbach et al., 2018). При этом особенности СМ отличаются между нейронами различных областей головного мозга. Например, в коре больших полушарий наблюдается всего 0.6 инсерций L1-РЭ, тогда как в гиппокампе – от 80 до 800 вставок на один нейрон (Lapp, Hunter, 2016). СМ вследствие ретротранспозиций – источник фенотипического разнообразия между нейронами во время развития. При этом в головном мозге взрослого человека под действием различных средовых факторов экспрессия L1 может влиять на функционирование нейронов при формировании долговременной памяти (Bachiller et al., 2017).

Гиппокамп – центр нейрогенеза человека, где множество инсерций оказывают влияние на транскрипционную экспрессию, создавая уникальные транскриптомы в нейронах. Кроме того, транскрипционная активация L1 сходна с таковой для гена *NeuroD1*. Это может говорить о влиянии экспрессии L1 на нейрогенез, так как стимуляция *Wnt3a* в нейрональных СК увеличивает экспрессию L1 в 10 раз по пути бета-катенина, аналогично активируя транскрипцию гена *NeuroD1*. Этот ген кодирует ТФ, активирующий гены, участвующие в нейрогенезе. Область промотора *NeuroD1* содержит сайт *Sox/LEF*, сходный с 5'UTR элемента L1,

а паттерны экспрессии во времени генов *NeuroD1* и L1 при дифференцировке нейронов сходны (Thomas, Muotri, 2012).

Генетические вариации между нейронами вследствие ретротранспозиций L1 могут быть связаны со специфическим обогащением энхансеров нейрональных СК. Было показано, что характерные для типов нейронов энхансеры (определенные при помощи FANTOM5) соответствуют координатам в геноме для инсерций L1, которые находятся в пределах 100 п. н. от энхансера. В то же время для астроцитов и гепатоцитов подобные закономерности для L1 не выявлены (Upton et al., 2015). При исследовании особенностей ретротранспозиций L1 в более чем 30 областях головного мозга обнаружено множество линий клеток, специфичных по инсерциям различных L1 (Evrony et al., 2015). В экспериментах на мышах также была показана специфическая экспрессия L1, в зависимости от области ЦНС и возраста животного (Cappucci et al., 2018).

Помимо L1, в регуляции нейрогенезом принимают участие LTR-РЭ. Так, у мышей область расположения полноразмерного ERV<sub>mch8</sub> на 8-й хромосоме оказалась сравнительно менее метилирована в мозжечке, что связано с его специфической экспрессией, в зависимости от стадии развития (Lee et al., 2011). В соответствии с полученными данными, можно предположить, что наблюдаемые в нейрональных СК особенности активации ТЕ могут закономерно изменять экспрессию конкретных генов, необходимых для дифференцировки нейронов при формировании специфических структур головного мозга. Причиной активации ТЕ в СК гиппокампа и их значения в консолидации памяти может быть чувствительность ТЕ к стрессорным средовым воздействиям (Мустафин, Хуснутдинова, 2019). Эти механизмы – частное отображение общего процесса эпигенетического управления развитием всего организма, начиная с первого деления зиготы, в регуляции которого участвуют ТЕ (Мустафин, Хуснутдинова, 2018). Для понимания роли ТЕ в этих процессах необходимо рассмотреть их участие в эмбриогенезе.

### Роль транспозонов в эмбриогенезе

Для иницирования развития организма после оплодотворения гамет репрограммируются к тотипотентности. При этом наблюдается активация ТЕ. Ранее считалось, что это явление – побочный эффект обширного ремоделирования хроматина в основе эпигенетического перепрограммирования гамет. Однако был проведен целевой эпигеномный подход для определения, вызывают ли ТЕ прямое воздействие на организацию хроматина и развитие организма. Оказалось, что сайленсинг L1 элементов снижает доступность хроматина, а длительная активация L1 предотвращает его постепенное уплотнение, которое происходит естественным образом в ходе развития, т. е. активация L1 – неотъемлемая часть программы развития (Jachowicz et al., 2017). В экспериментах на мышах была доказана роль LTR-РЭ в качестве необходимого звена управления ранним эмбриогенезом (Wang et al., 2016).

Для *cis*-регуляторной активности LTR ретроэлементов ERVK, MERVL и GLN необходим комплекс из РНК и белков, формируемый при помощи длинной нкРНК LincGET. Искусственное подавление экспрессии LincGET

у эмбриона на двухклеточной стадии приводит к полной остановке дальнейшего развития вследствие нарушения *cis*-регуляции необходимых для пролиферации генов под влиянием управляемых при помощи LincGET LTR-содержащих РЭ (Wang et al., 2016). Было также показано, что HERV активируются во всех типах клеток человека с характерными особенностями для определенных тканей и органов (Seifarth et al., 2005). При исследовании ассоциации 112 семейств ТЕ в 24 тканях человека отмечено тканеспецифическое обогащение активными областями LTR-РЭ, что говорит об их участии в регуляции экспрессии генов для дифференцировки клеток, в зависимости от их функционального предназначения в онтогенезе. Это обусловлено наличием в последовательностях ТЕ сайтов связывания с ТФ, регулирующих развитие соответствующей ткани. Характерное для определенных клеток обогащение ТЕ в интронных энхансерах коррелирует с тканеспецифическими вариациями экспрессии ближайших генов (Trizzino et al., 2018).

Генетическая программа онтогенеза в двухклеточную стадию эмбриогенеза у мыши и человека контролируется в значительной степени ТФ семейства DUX, ключевыми индукторами активации генома зиготы у плацентарных млекопитающих (De Lasco et al., 2017). Транскрипты L1 у эмбрионов необходимы для сайленсинга Dux, синтеза рРНК и выхода из двухклеточной стадии. В работе (Percharde et al., 2018) было доказано, что для преимплантационного развития обязательна экспрессия L1. В эмбриональных СК транскрипты L1 действуют в качестве каркаса ядерной РНК, который рекрутирует факторы Nucleolin и Kap1/Tgm28 для репрессии Dux. Параллельно с этим продукты L1 опосредуют связывание Nucleolin и Kap1 с рДНК, способствуя синтезу рРНК и самообновлению эмбриональных СК (Percharde et al., 2018). Роль L1 в репрессии транскрипционной программы двухклеточного эмбриона говорит об их участии в специфической для стадии развития регуляции экспрессии генов, необходимой для дифференцировки клеток и развития целостного организма (Jachowicz et al., 2017). Можно предположить, что активность РЭ в нейрональных СК свидетельствует об их использовании в качестве переключателей транскрипционных программ при специфической функционализации нейронов, т.е. ТЕ участвуют в управлении дифференцировкой как эмбриональных клеток, так и постнатальных СК. Регуляция осуществляется путем реализации информации, закодированной в особенностях состава и распределения ТЕ в геноме, посредством последовательной активации строго определенных ТЕ в каждой новой клетке в зависимости от ткани и стадии развития. Наибольшую роль эта видоспецифическая «кодировка» играет в ЦНС, где нейроны отличаются более высокой активностью РЭ. Это отражается в структурно-функциональной сложности головного мозга, по сравнению с другими органами. Важное значение в этих процессах имеет использование ТЕ в качестве источников нкРНК.

### **Взаимосвязь транспозонов с некодирующими РНК в головном мозге**

Согласно последним данным, в первичные процессирующиеся РНК транскрибируется от 75 до 85 % всего

генома человека, при этом лишь 1.2 % транслируется в белки. Большая часть транскриптов регистрируется как нкРНК, которые участвуют в управлении работой генома (Djebali et al., 2012). У человека выявлено 13000 генов длинных нкРНК, за возникновение которых ответственны HERV путем инсерций промоторов. Длинные нкРНК, стимулируемые HERV, специфически транскрибируются в разных типах плюрипотентных клеток, что согласуется с избыточной экспрессией этих РЭ в эмбриональных СК человека (Johnson, Guigo, 2014). Транскрипция большинства длинных нкРНК ассоциирована с экспрессией белок-кодирующих генов в соответствии с типом нейронов и со специфической областью головного мозга. Так, согласно данным гибридизации *in situ* Allen Brain Atlas, из 1328 известных длинных нкРНК мышей в их головном мозге экспрессируются 849, которые ассоциированы с типами клеток и субклеточными структурами. Были показаны биологическая значимость этих нкРНК в функционировании нейронов и взаимосвязь с белок-кодирующими генами (Mercer et al., 2008).

Экспрессирующиеся в головном мозге длинные нкРНК, такие как Miat, Rmst, Gm17566, Gm14207, Gm16758, 2610307P16Rik, C230034O21Rik, 9930014A18Rik, разделяют с генами нейрогенеза сходную модель экспрессии и перекрывают эти гены, что доказывает их роль в нейрогенезе путем управления работой белок-кодирующих генов (Aprea et al., 2013). Полученные данные согласуются с ролью ТЕ в нейрогенезе (Coufal et al., 2009; Kurnosov et al., 2015; Erwin et al., 2016; Muotri, 2016) и регуляции функционированием головного мозга (Thomas, Muotri, 2012; Upton et al., 2015; Rohrbach et al., 2018). Это связано с тем, что ТЕ служат основными источниками возникновения и эволюции длинных нкРНК, формируя их функциональные домены и составляя у человека более 2/3 их зрелых транскриптов (Kapusta, Feschotte, 2014). РЭ могут непосредственно служить в качестве генов длинных нкРНК (Lu et al., 2014). L1 обладают функцией, сходной с lncРНК в регуляции экспрессии генов, необходимых для самообновления СК и преимплантационного развития (Honson, Macfarlan, 2018).

Доказана роль микроРНК в управлении дифференцировкой нейронов, переключении профилей экспрессии важных для функции клеток генов во времени и пространстве (Stappert et al., 2015). В головном мозге человека экспрессируются около 40 % всех известных микроРНК. Специфическая экспрессия многих из них отличается в разных типах клеток и имеет значение в регуляции дифференцировкой, необходимой для огромного многообразия фенотипов нейронов в ЦНС (Smirnova et al., 2005). Отмечено также накопление определенных микроРНК в различных структурах нейронов (аксонах, дендритах, синапсах). Так, в экспериментах на мышах определена роль miR-134 в регуляции специфических мРНК гена *LIMK1* для роста дендритных спинов, в синапсоматах отмечено накопление miR-99a, 124a1-3, 125b1, 125b2, 134, 339 (Lugli et al., 2008). Образование нейритов содействует miR-21 (мишень – мРНК гена *SPRY2*), регенерации аксонов – miR-431 (*Kremen-1*), дифференцировке нейронов – miR-34a (*Tap73, synaptotagmin-1, syntaxin-1A*) и miR-137 (*Mib1, Ezh2*). Усиленная экспрессия miR-9 способствует

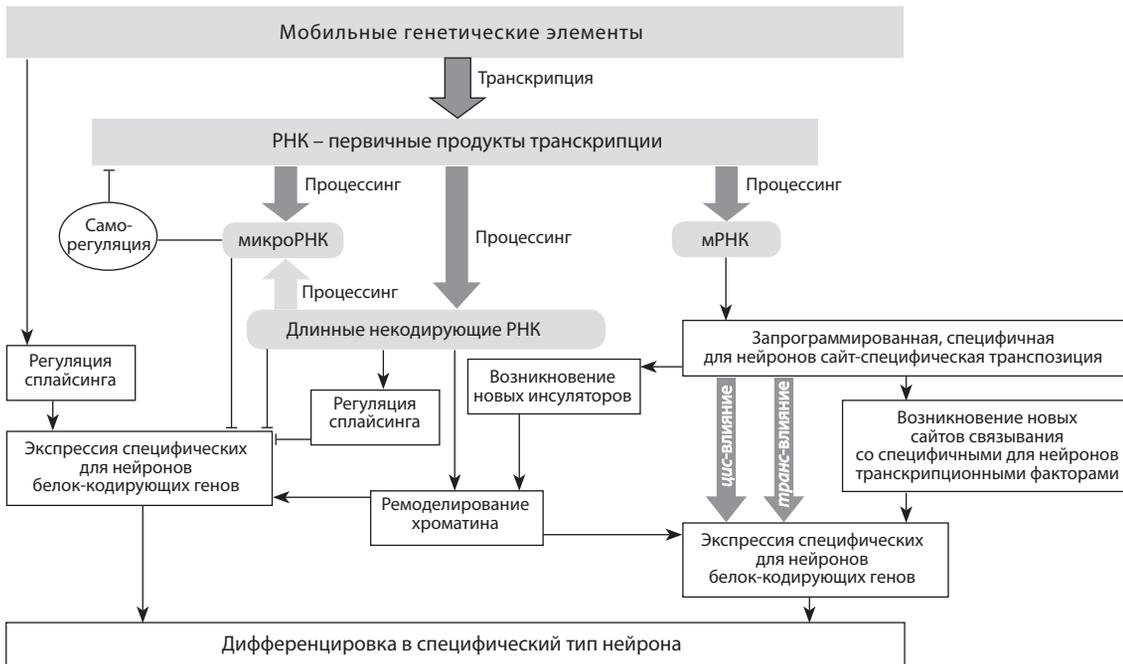


Рис. 4. Схема участия ТЕ в нейрогенезе.

разветвлению и уменьшению роста аксонов путем репрессии белка Map1b, связанного с микротрубочками. Рост аксонов стимулируют miR-431, а также miR-17-92, которая взаимодействует с PTEN (phosphate tensin homolog) в нейронах коры головного мозга эмбриона. Доказана регуляторная роль дифференциальной экспрессии miR-221 и miR-222 в нейрогенезе (Namroothiri, Rajanikant, 2017).

Еще в 2007 г. было обнаружено, что у человека ТЕ могут быть источниками микроРНК (Piriyarongsa et al., 2007), что было подтверждено в других работах (Yuan et al., 2010, 2011; Qin et al., 2015). Образование микроРНК и длинных нкРНК из транскриптов ТЕ (Johnson, Guigo, 2014; Kapusta, Feschotte, 2014) свидетельствует о том, что максимальная активность ТЕ в центре нейрогенеза человека (Kurnosov et al., 2015) как закономерное явление необходимо для эпигенетического управления дифференцировкой нейрональных СК. Другим механизмом участия ТЕ в регуляции экспрессии генов, необходимых для специфической работы нейронов, служит *цис*- и *транс*-воздействие ТЕ (Garcia-Perez et al., 2016). Это служит подтверждением закономерных активаций ТЕ как источника гетерогенных субпопуляций нейронов (рис. 4) (Faulkner, 2011).

### Роль ретроэлементов во взаимодействиях между нейронами

В развитии и функционировании головного мозга важную роль играют межклеточные взаимодействия, исследование механизмов регуляции которыми перспективно для таргетного воздействия на работу ЦНС. Для этого важно определить первоисточник управления экспрессией генов и посттранскрипционной эпигенетической регуляции структурных компонентов нейронов. На основании данных о роли ТЕ в управлении работой генома в эмбриональном развитии (Garcia-Perez et al., 2007; Van den

Hurk et al., 2007; Macia et al., 2011; Kurnosov et al., 2015; Percharde et al., 2018) и физиологического функционирования головного мозга человека (Coufal et al., 2009; Bailie et al., 2011; Thomas, Muotri, 2012; Richardson et al., 2014; Evrony et al., 2015; Upton et al., 2015; Muotri, 2016; Suarez et al., 2018) было сделано заключение о том, что в эпигенетической регуляции генов в онтогенезе участвуют ТЕ (Мустафин, Хуснутдинова, 2017, 2018). Несмотря на отсутствие митотической активности зрелых нейронов, специфическая экспрессия ТЕ в них имеет значение в управлении как межнейронными взаимодействиями, так и структурно-функциональными особенностями нейронов (Bailie et al., 2011; Richardson et al., 2014; Erwin et al., 2016). Данные свойства могут быть обусловлены процессингом специфических микроРНК (Piriyarongsa et al., 2007; Yuan et al., 2010, 2011; Qin et al., 2015) и длинных нкРНК (Lu et al., 2014; Honson, Macfarlan, 2018) из транскриптов ТЕ с возможностью их внутри- и межклеточной регуляции. Действительно, в экспериментах на лабораторных животных было показано обогащение определенных структур и областей нейронов специфическими микроРНК. Например, обнаружено избытие miR-15b, miR-16, miR-204, miR-221 в дистальных отделах аксонов, по сравнению с телами нейронов (Natera-Naranjo et al., 2010), а также обогащение синапсов специфическими микроРНК, что имеет значение для локальной посттранскрипционной регуляции экспрессии нейронспецифических генов (Lugli et al., 2008). Показаны роль микроРНК в межклеточных взаимодействиях в ЦНС, а также значение электрической активности нейронов в секреции miR-124 и miR-9, которые могут проникать в микроглию и изменять фенотип ее клеток (Veremeuko et al., 2019).

Мобильные элементы участвуют в управлении работой ЦНС, так как служат источниками транскрипции микроРНК, которые регулируют экспрессию генов в

нейронах и межклеточных взаимодействиях в головном мозге. Кроме того, выявлено значение ERV в передаче информации между нейронами для консолидации памяти. В геноме человека HERV-K полной длины (около 10000 п. н.) состоят из древних остатков ретровирусов и включают фланкированные двумя LTR области, включающие три ретровирусные ORF: *pol-pro* (кодирует ферменты протеазу, RT и интегразу), *env* (кодирует белки, обеспечивающие горизонтальный перенос) и *gag* (кодирует структурные белки ретровирусного капсида) (Klein, O'Neill, 2018). В ходе эволюции от специфического ERV Ту3/gypsy произошел ген, кодирующий белок Arc, по биологическим свойствам сходный с продуктом экспрессии ретровирусного гена *gag* (Pastuzyn et al., 2018).

С момента доместикации и использования для нужд хозяина ген *Arc* стал высококонсервативным для позвоночных, играя роль в функционировании их головного мозга. Экспрессия *Arc* высокочастотна в ЦНС в соответствии с кодировкой информации в нейрональных сетях – мРНК транспортируется к дендритам и накапливается в местах локальной синаптической активности, где происходит трансляция в белок (Shepherd, 2018). В нейронах белок *Arc* формирует пространственные структуры, напоминающие вирусные капсиды, которые инкапсулируют мРНК клеток. Образованные в результате этого вирусоподобные элементы в составе внеклеточных везикул передаются в соседние нейроны, где они способны транслироваться. Этот механизм используется для консолидации долговременной памяти (Pastuzyn et al., 2018), в формировании которой участвует центр нейрогенеза, гиппокамп, где обнаруживается максимальная активность TE (Coufal et al., 2009; Bailie et al., 2011; Thomas, Muotri, 2012; Bachiller et al., 2017).

Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое явление межклеточной взаимосвязи нейронов при помощи *Arc* сложилось в эволюции как отражение адаптирующего значения переноса транскриптов TE между постмитотическими клетками. Возможно, при обмене между нейронами вирусоподобными частицами мРНК для формирования долговременной памяти используется способность TE к сайт-специфической интеграции (Sultana et al., 2017) с изменением экспрессии нейронспецифических генов. Это отражается на их функционировании и хранении информации в ЦНС (Bachiller et al., 2017).

### Другие функции мобильных элементов

Транспозиции TE изменяют экспрессию генов различными путями. Инсерции внутри гена могут вызвать мутации со сдвигом рамки считывания, преждевременные стоп-кодоны или пропуск экзона. В транскрибируемой части гена TE может снизить уровни мРНК путем замедления транскрипции из-за высокого содержания А/Т в ORF2 таких TE, как L1 РЭ (Thomas, Muotri, 2012). Однако, несмотря на потенциально мутагенное действие, TE играют роль в эволюции геномов всех эукариот за счет использования последовательностей TE для формирования адаптивных способностей хозяев (Мустафин, Хуснутдинова, 2019). Мобильные элементы участвуют в управлении экспрессией белок-кодирующих генов, многие из которых (Joly-Lopez, Bureau, 2018), в том числе ТФ (Ito et al., 2017),

произошли от TE. Помимо непосредственной доместикации TE, новые белок-кодирующие гены образовались за счет экзонизации и дупликации генов с помощью TE (Thomas, Muotri, 2012; Мустафин, Хуснутдинова, 2018; Joly-Lopez, Bureau, 2018).

Механизмы, полученные от TE, используются иммунной системой млекопитающих для генерирования антител с помощью системы V(D)J рекомбинации. Мобильные элементы служат источниками большинства рецепторов к стероидам, участвуя в глобальной регуляции функции клеток гормональной системой (Lapp, Hunter, 2016). От TE происходят регуляторные НП, сайленсеры и инсуляторы (Jjing et al., 2014; Ito et al., 2017; Schrader, Schmitz, 2018). При инсерции в некодирующие области геномов TE используются в качестве альтернативных промоторов, энхансеров и сигналов полиаденилирования генов. Так, L1s обнаружены в некодирующих областях 80 % генов человека, характер экспрессии которых зависит от плотности расположения данных РЭ (Klein, O'Neill, 2018).

Около 60 % всех SVA в геноме человека локализованы в генах или фланкируют их в пределах 10 кб. Данные SVA характеризуются как мобильные CpG островки, способные позитивно или негативно регулировать экспрессию генов путем рекрутирования ТФ. Кроме того, SVA вследствие высокого содержания GC могут формировать альтернативные структуры ДНК, такие как G-квадруплекс (характерны для промоторов 40 % генов человека), что влияет на транскрипцию (Gianfrancesco et al., 2017). Многие ТФ непосредственно направлены на взаимосвязь с TE, формируя и поддерживая гетерохроматин (Lapp, Hunter, 2016). Мобильные элементы являются источниками *цис*- и *транс*-регуляторных элементов, которые координируют экспрессию групп генов. Помимо функционирования в качестве промоторов, управляющих экспрессией альтернативных изоформ генов хозяев, сайты связывания с ТФ внутри TE могут действовать как энхансеры в определенных тканях и на стадиях развития (Garcia-Perez et al., 2016).

В эволюции TE оказались источниками значительной части специфических последовательностей генома, а также взаимодействующих с ними транскриптов и белков. Это говорит о глобальной регуляторной роли TE, необходимой как для митоза и мейоза, так и для управления работой клеток в интерфазе. Например, от TE произошли как сплайсосомные интроны (Kubiak, Makalowska, 2017), так и компонент сплайсосомы Prp8 (Galej et al., 2013). Сплайсинговые энхансеры и сайленсеры, нкРНК длиной 10 нуклеотидов, взаимодействующих с SR-белками и мяРНК, образуются при процессинге транскриптов Alu-РЭ (Pastor et al., 2009). За счет способности к сайт-специфическим инсерциям (McGurk, Barbash, 2018), незаконной рекомбинации с последующей амплификацией путем геной конверсии (Han et al., 2016) TE оказались источниками сателлитов. От TE произошли теломераза и теломеры (Kopera et al., 2011), а также центромеры (Cheng, Murata, 2003; Sharma et al., 2013; Han et al., 2016) и взаимодействующий с ними белок CENP/CENH3 (Lopez-Flores et al., 2004; Volff, 2006). Малые нкРНК, образуемые при транскрипции центромерных РЭ, участвуют в регуляции этих взаимодействий (Carone et al., 2013).

## Заключение

За кодирование белков отвечают менее 1.2 % генома человека. Значительную роль в образовании некодирующей части генома играют мобильные элементы. Полученные данные об их участии в регуляции переключения генов при дифференцировке клеток в эмбриогенезе, начиная с первого деления зиготы (Seifarth et al., 2005; Van den Hurk et al., 2007; Wang et al., 2016; Jachowicz et al., 2017; Мустафин, Хуснутдинова, 2018; Percharde et al., 2018; Trizzino et al., 2018), позволяют предположить, что наблюдаемый в нейронах соматический мозаицизм (Upton et al., 2015; Bachiller et al., 2017; Paquola et al., 2017; Rohrback et al., 2018; Suarez et al., 2018) отражает активную роль ТЕ в нейрогенезе. Опубликован ряд работ, доказывающих участие ТЕ в управлении дифференцировкой нейронов (Coufal et al., 2009; Kurnosov et al., 2015; Muotri, 2016). Мобильные элементы являются источниками некодирующих РНК (Piriyarongsa et al., 2007; Yuan et al., 2010, 2011; Johnson, Guigo, 2014; Qin et al., 2015), которые также имеют значение в переключении генов в клетках головного мозга. Установленная роль LTR-содержащих РЭ в обмене транскриптами между нейронами (Erwin et al., 2016; Pastuzyn et al., 2018) может отражать общий принцип участия ТЕ в регуляции экспрессии генов для развития и поддержания функционирования головного мозга. Использование Arg для формирования вирусоподобных частиц в передаче информации между клетками (Shepherd, 2018) свидетельствует об эволюционных способах преобразований ТЕ в вирусы для формирования адаптивных функций. Этот механизм связан с использованием ТЕ для обеспечения динамичности геномов постмитотических клеток с возможностью их адаптивных изменений в ответ на средовые воздействия. Реализация этого феномена возможна за счет обратной транскрипции транспортируемой между клетками мРНК с сайт-специфическими инсерциями, формированием СМ зрелых нейронов и изменением экспрессии генов для консолидации памяти.

Так как СМ не может наследоваться, функциональную роль инсерций ТЕ в нейрогенезе трудно доказать. Более того, эти изменения могут быть охарактеризованы как случайные события, имеющие большое значение для развития неврологической патологии. Однако приведенные в обзоре данные доказывают значение транспозиций в функционально значимые области генома, необходимые для дифференцировки нейрональных СК (Coufal et al., 2009; Thomas, Muotri, 2012; Kurnosov et al., 2015; Upton et al., 2015; Erwin et al., 2016; Muotri, 2016; Rohrback et al., 2018) и реагирования на средовые воздействия (Cappucci et al., 2018). Объяснением этого закономерного явления служит способность ТЕ к сайт-специфическим перемещениям, запрограммированным собственным положением в геноме (Irie et al., 2016; Gianfrancesco et al., 2017; Sulтана et al., 2017). Эти неслучайные события отбираются в ходе эволюции многоклеточных (Мустафин, Хуснутдинова, 2018), способствуя регуляторной настройке экспрессии генов при дифференцировке клеток (Trizzino et al., 2018).

Полученные результаты о значении транспозиций ТЕ в нейрогенезе отражают один из этапов регуляции экспрессии генов в последовательных делениях клеток при

дифференцировке тканей и органов всего организма. СМ в нейронах и СК свидетельствует в пользу этого предположения, так как головной мозг характеризуется выраженным разнообразием типов клеток, для специфической настройки экспрессии генов которых необходимы универсальные комбинаторные единицы, которыми могут служить мобильные элементы.

## Список литературы / References

- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o.
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6): 742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o. (in Russian)]
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Роль транспозонов в эпигенетической регуляции онтогенеза. Онтогенез. 2018;49(2):61-78.
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposons in epigenetic regulation of ontogenesis. Russian Journal of Developmental Biology. 2018;49(2):61-78.]
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506.
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506. (in Russian)]
- Allen Brain Atlas. Available at: [www.brain-map.org](http://www.brain-map.org)
- Aprea J., Prenninger S., Dori M., Ghosh T., Monasor L.S., Wessendorf E., Zocher S., Massalini S., Alexopoulou D., Lesche M., Dahl A., Groszer M., Hiller M., Calegari F. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. EMBO J. 2013;32(24):3145-3160.
- Bachiller S., Del-Pozo-Martin Y., Carrio A.M. L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation. Brain. Behav. Immun. 2017;64:65-70.
- Bailly J.K., Barnett M.W., Upton K.R., Gerhardt D.J., Richmond T.A., De Sapio F., Brennan P.M., Rizzu P., Smith S., Fell M., Talbot R.T., Gustinicich S., Freeman T.C., Mattick J.S., Hume D.A., Heutink D.A., Carninci P., Jeddeloh J.A., Faulkner G.J. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. Nature. 2011;479:534-537.
- Cappucci U., Torromino G., Casale A.M., Camon J., Capitano F., Berloco M., Mele A., Pimpinelli S., Rinaldi A., Piacentini L. Stress-induced strain and brain region-specific activation of LINE-1 transposons in adult mice. Stress. 2018;21:575-579.
- Carone D.M., Zhang C., Hall L.E., Oberfell C., Carone B.R., O'Neill M.J., O'Neill R.J. Hyperomorphic expression of centromeric retroelement-encoded small RNAs impairs CENP-A loading. Chromosome Res. 2013;21:49-62.
- Cheng Z.J., Murata M. A centromeric tandem repeat family originating from a part of Ty3/gypsy-retroelement in wheat and its relatives. Genetics. 2003;164:665-672.
- Coufal N.G., Garcia-Perez J.L., Peng G.E., Yeo G.W., Mu Y., Lovci M.T., Morell M., O'Shea K.S., Moran J.V., Gage F.H. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. Nature. 2009;460:1127-1131.
- De Koning A.P., Gu W., Castoe T.A., Batzer M.A., Pollock D.D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. PLoS Genet. 2011;7:e1002384.
- De Laco A., Planet E., Coluccio A., Verp S., Cuc J., Trono D. DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals. Nat. Genet. 2017;49:941-945.

- Djebali S., Davis C.A., Merkel A., Dobin A., Lassmann T., Mortazavi A., Tanzer A., Lagarde J., Lin W., Schlesinger F., Xue C., Marinov G.K., Khatun J., Williams B.A., Zaleski C., Rozowsky J., Roder M., Kokocinski F., Abdelhamid R.F., Alioto T., Antoshechkin I., Carninci P., Guigo R., Gingeras T.R. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012;489(7414):101-108.
- Erwin J.A., Paquola A.C., Singer T., Gallina I., Novotny M., Quayle C., Bedrosian T., Ivanio F., Butcher C.R., Herdy J.R., Sarkar A., Lasken R.S., Muotri A.R., Gage F.H. L1-associated genomic regions are deleted in somatic cells of the healthy human brain. *Nat. Neurosci*. 2016;19:1583-1591.
- Evrony G.D., Lee E., Mehta B.K., Benjamini Y., Johnson R.M., Cai X., Yang L., Haseley P., Lehmann H.S., Park P.J., Walsh C.A. Cell lineage analysis in human brain using endogenous retroelements. *Neuron*. 2015;85:49-59.
- Faulkner G.J. Retrotransposons: mobile and mutagenic from conception to death. *FEBS Lett*. 2011;585(11):1589-1594.
- Galej W.P., Oubridge C., Newman A.J., Nagai K. Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the spliceosome. *Nature*. 2013;493:638-643.
- Garcia-Perez J.L., Marchetto M.C., Muotri A.R., Coufal N.G., Gage F.H., O'Shea K.S., Moran J.V. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet*. 2007;16(13):1569-1577.
- Garcia-Perez J.L., Widmann T.J., Adams I.R. The impact of transposable elements on mammalian development. *Development*. 2016;143:4101-4114.
- Gianfrancesco O., Bubb V.J., Quinn J.P. SVA retrotransposons as potential modulators of neuropeptide gene expression. *Neuropeptides*. 2017;64:3-7.
- Habibi L., Pedram M., AmirPhirozy A., Bonyadi K. Mobile DNA elements: the seeds of organic complexity on earth. *DNA Cell Biol*. 2015;34:597-609.
- Han J., Masonbrink R.E., Shan W., Song F., Zhang J., Yu W., Wang K., Wu Y., Tang H., Wendel J.F., Wang K. Rapid proliferation and nucleolar organizer targeting centromeric retrotransposons in cotton. *Plant J*. 2016;88:992-1005.
- Hancks D.C., Kazazian H.H. Jr. Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2012;22(3):191-203. DOI 10.1016/j.gde.2012.02.006.
- Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development. *Dev. Cell*. 2018;46:132-134.
- Irie M., Koga A., Kaneko-Ishino T., Ishino F. An LTR retrotransposon-derived gene displays lineage-specific structural and putative species-specific functional variations in eutherians. *Front. Chem*. 2016;4:26.
- Ito J., Suqimoto R., Nakaoka H., Yamada S., Kimura T., Hayano T., Inoue I. Systematic identification and characterization of regulatory elements derived from human endogenous retroviruses. *PLoS Genet*. 2017;13(7):e1006883.
- Jachowicz J.W., Bing X., Pontabry J., Boskovic A., Rando O.J., Torres-Padilla M.E. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat. Genet*. 2017;49:1502-1510.
- Jjingo D., Conley A.B., Wang J., Marino-Ramirez L., Lunyak V.V., Jordan I.K. Mammalian-wide interspersed repeat (MIR)-derived enhancers and the regulation of human gene expression. *Mob. DNA*. 2014;5:5-14.
- Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA*. 2014;20(7):959-976.
- Joly-Lopez Z., Bureau T.E. Exaptation of transposable element coding sequences. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2018;49:34-42.
- Kapusta A., Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends Genet*. 2014;30(10):439-452.
- Klein S.J., O'Neill R.J. Transposable elements: genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict. *Chromosome Res*. 2018;26:5-23.
- Kopera H.C., Moldovan J.B., Morrish T.A., Garcia-Perez J.L., Moran J.V. Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108:20345-20350.
- Kubiak M.R., Makalowska I. Protein-coding genes' retrocopies and their functions. *Viruses*. 2017;9(4):pii: E80.
- Kurnosov A.A., Ustyugova S.V., Nazarov V., Minervina A.A., Komkov A.Y., Shugay M., Pogorelyy M.V., Khodosevich K.V., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. The evidence for increased L1 activity in the site of human adult brain neurogenesis. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117854.
- Lapp H.E., Hunter R.G. The dynamic genome: transposons and environmental adaptation in the nervous system. *Epigenomics*. 2016;8:237.
- Lee K.H., Horiuchi M., Itoh T., Greenhalgh D.G., Cho K. Cerebellum-specific and age-dependent expression of an endogenous retrovirus with intact coding potential. *Retrovirology*. 2011;8:82.
- Linker S.B., Marchetto M.C., Narvaiza I., Denli A.M., Gage F.H. Examining non-LTR retrotransposons in the context of the evolving primate brain. *BMC Biol*. 2017;15:68.
- Lopez-Flores I., de la Herran R., Garrido-Ramos M.A., Boudry P., Ruiz-Rejon C., Ruiz-Rejon M. The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons. *Gene*. 2004;339:181-188.
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P.E., Goke J., Bourque G., Ng H.H. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2014;21(4):423-425.
- Lugli G., Torvik V.L., Larson J., Smalheiser N.R. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J. Neurochem*. 2008;106:650-661.
- Macia A., Munoz-Lopez M., Cortes J.L., Hastings R.K., Morell S., Lucena-Aguilar G., Marchal J.A., Badge R.M., Garcia-Perez J.L. Epigenetic control of retrotransposons expression in human embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol*. 2011;31(2):300-316.
- McGurk M.P., Barbash D.A. Double insertion of transposable elements provides a substrate for the evolution of satellite DNA. *Genome Res*. 2018;28(5):714-725.
- Mercer T.R., Dinger M.E., Sunken S.M., Mehler M.F., Mattick J.S. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(2):716-721.
- Muotri A.R. L1 retrotransposition in neural progenitor cells. *Methods Mol. Biol*. 2016;1400:157-163.
- Muotri A.R., Chu V.T., Marchetto M.C., Deng W., Moran J.V., Gage F.H. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*. 2005;435:903-910.
- Nampoothiri S.S., Rajanikant G.K. Decoding the ubiquitous role of microRNAs in neurogenesis. *Mol. Neurobiol*. 2017;54:2003-2011.
- Natera-Naranjo O., Aschrafi A., Gioio A.E., Kaplan B.B. Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA*. 2010;16:1516-1529.
- Notwell J.H., Chung T., Heavner W., Bejerano G. A family of transposable elements co-opted into developmental enhancers in the mouse neocortex. *Nat. Commun*. 2015;6:6644.
- Paquola A.C.M., Erwin J.A., Gage F.H. Insight into the role of somatic mosaicism in the brain. *Curr. Opin. Syst. Biol*. 2017;1:90-94.
- Pastor T., Talotti G., Lewandowska M.A., Pagani F. An Alu-derived intronic splicing enhancer facilitates intronic processing and modulates aberrant splicing in ATM. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:7258-7267.
- Pastuzyn E.D., Day C.E., Kearns R.B., Kyrke-Smith M., Taibi A.V., McCormick J., Yoder N., Belnap D.M., Erendsson S., Morado D.R., Briggs J.A.G., Feschotte C., Shephered J.D. The neuronal gene *Arc* encodes a repurposed retrotransposon Gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell*. 2018;172:275-278.
- Percharde M., Lin C.J., Yin Y., Guan J., Peixoto G.A., Bulut-Rarslioglu A., Biechele S., Huang B., Shen X., Ramalho-Santos M. A LINE1-nucleolin partnership regulates early development and ESC identity. *Cell*. 2018;174:391.

- Piriyapongsa J., Marino-Ramirez L., Jordan I.K. Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. *Genetics*. 2007; 176(2):1323-1337.
- Qin S., Jin P., Zhou X., Chen L., Ma F. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131365.
- Richardson S.R., Morell S., Faulkner G.J. L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. *Annu. Rev. Genet.* 2014;48:1-27.
- Rohrbach S., Siddoway B., Liu C.S., Chun J. Genomic mosaicism in the developing and adult brain. *Dev. Neurobiol.* 2018;78:1026-1048.
- Schrader L., Schmitz J. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol. Ecol.* 2018(6):1537-1549. DOI 10.1111/mec.14794.
- Seifarth W., Frank O., Zeilfelder U., Spiess B., Greenwood A.D., Hehlmann R., Leib-Mosch C. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J. Virol.* 2005;79(1):341-352.
- Sharma A., Wolfgruber T.K., Presting G.G. Tandem repeats derived from centromeric retrotransposons. *BMC Genomics*. 2013;14:142.
- Shepherd J.D. Arc-An endogenous neuronal retrovirus? *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018;77:73-78.
- Smirnova L., Grafe A., Seiler A., Schumacher S., Nitsch R., Wulczyn F.G. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* 2005;21:1469-1477.
- Stappert L., Roese-Koerner B., Brustle O. The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. *Cell Tissue Res.* 2015;359:47-64.
- Suarez N.A., Macia A., Muotri A.R. LINE-1 retrotransposons in healthy and diseased human brain. *Dev. Neurobiol.* 2018;78:434-455.
- Sultana T., Zamborlini A., Cristofari G., Lesage P. Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(5):292-308.
- Thomas C.A., Muotri A.R. LINE-1: creators of neuronal diversity. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 2012;4:1663-1668.
- Trizzino M., Kapusta A., Brown C.D. Transposable elements generate regulatory novelty in a tissue-specific fashion. *BMC Genomics*. 2018;19:468.
- Upton K.R., Gerhardt D.J., Jesuadian J.S., Richardson S.R., Sanchez-Luque F.J., Bodea G.O., Ewing A.D., Salvador-Palomeque C., van der Knaap M.S., Brennan P.M., Vanderver A., Faulkner G.J. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell*. 2015;161(2):228-239.
- Van den Hurk J.A., Meij I.C., Seleme M.C. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(13):1587-1592.
- Veremeyko T., Kuznetsova I.S., Dukhinova M., Yung A., Kopeikina E., Barteneva N.S., Ponomarev E.D. Neuronal extracellular microRNAs miR-124 and miR-9 mediate cell-cell communication between neurons and microglia. *J. Neurosci. Res.* 2019;97(2):162-184.
- Volff J.N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays*. 2006; 28:913-922.
- Wang J., Li X., Wang L., Li J., Zhao Y., Bou G., Li Y., Jiao G., Shen X., Wei R., Liu S., Xie B., Lei L., Li W., Zhou Q., Liu Z. A novel long intergenic noncoding RNA indispensable for cleavage of mouse two-cell embryos. *EMBO Rep.* 2016;17:1452-1470.
- Yuan Z., Sun X., Jianq D., Ding Y., Lu Z., Gong L., Liu H., Xie J. Origin and evolution of a placental-specific microRNA family in the human genome. *BMC Evol. Biol.* 2010;10:346-358.
- Yuan Z., Sun X., Liu H., Xie J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. *PLoS One*. 2011;6(3):e17666.

---

#### ORCID ID

R.N. Mustafin [orcid.org/0000-0002-4091-382X](https://orcid.org/0000-0002-4091-382X)  
E.K. Khusnutdinova [orcid.org/0000-0003-2987-3334](https://orcid.org/0000-0003-2987-3334)

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

Поступила в редакцию 19.06.2019. После доработки 22.09.2019. Принята к публикации 02.10.2019.

# Современная классификация и молекулярно-генетические аспекты незавершенного остеогенеза

А.Р. Зарипова<sup>1</sup>✉, Р.И. Хусаинова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Республиканский медико-генетический центр, Уфа, Россия

✉ e-mail: a.ramilna@bk.ru

**Аннотация.** Незавершенный остеогенез (несовершенный остеогенез в русскоязычной литературе) – наиболее распространенная наследственная форма ломкости костей, генетически и клинически гетерогенное заболевание с широким спектром клинической тяжести, основное клиническое проявление которого – множественные переломы начиная с натального периода жизни, зачастую приводящие к инвалидизации с детского возраста. К основным клиническим признакам незавершенного остеогенеза относятся голубые склеры, потеря слуха, аномалия дентина, повышенная ломкость костей, нарушение роста и осанки с развитием характерных инвалидизирующих деформаций костей и сопутствующих проблем, включающих дыхательные, неврологические, сердечные, почечные нарушения. Незавершенный остеогенез встречается и у мужчин, и у женщин, заболевание наследуется как по аутосомно-доминантному, так и аутосомно-рецессивному типам, существуют спорадические случаи заболевания, обусловленные мутациями *de novo*, а также обнаружены X-сцепленные формы. Термин «незавершенный остеогенез» был введен W. Vrolick в 1840-х гг. Первая классификация заболевания сделана в 1979 г. и неоднократно пересматривалась из-за идентификации молекулярной причины заболевания и открытия новых механизмов развития незавершенного остеогенеза. В начале 1980-х гг. мутации в двух генах коллагена типа I (*COL1A1* и *COL1A2*) впервые были ассоциированы с аутосомно-доминантным типом наследования незавершенного остеогенеза. С тех пор идентифицированы еще 18 генов, продукты которых участвуют в процессах формирования и минерализации костной ткани. До сих пор не определена степень генетической гетерогенности заболевания, исследователи продолжают идентифицировать новые гены, вовлеченные в его патогенез, число которых достигло 20. В последнее десятилетие стало известно, что аутосомно-рецессивные, аутосомно-доминантные и X-связанные мутации в широком спектре генов, кодирующих белки, участвующие в синтезе коллагена типа I, его процессинге, секреции и посттрансляционной модификации, а также в белках, регулирующих дифференцировку и активность костеобразующих клеток, вызывают несовершенный остеогенез. Большое количество причинных генов усложнило классическую классификацию заболевания, и в связи с новыми достижениями в области молекулярных основ незавершенного остеогенеза постоянно совершенствуется и классификация. В этом обзоре мы систематизировали и обобщили информацию о результатах исследований в области изучения клинико-генетических аспектов незавершенного остеогенеза и отразили современное состояние классификационных критериев диагностики заболевания. Ключевые слова: незавершенный (несовершенный) остеогенез; коллаген; хрупкость костей; бисфосфонаты; множественные переломы.

**Для цитирования:** Зарипова А.Р., Хусаинова Р.И. Современная классификация и молекулярно-генетические аспекты незавершенного остеогенеза. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):219-227. DOI 10.18699/VJ20.614

## Modern classification and molecular-genetic aspects of osteogenesis imperfecta

A.R. Zaripova<sup>1</sup>✉, R.I. Khusainova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Republican Medical-Genetic Center, Ufa, Russia

✉ e-mail: a.ramilna@bk.ru

**Abstract.** Osteogenesis imperfecta (imperfect osteogenesis in the Russian literature) is the most common hereditary form of bone fragility, it is a genetically and clinically heterogeneous disease with a wide range of clinical severity, often leading to disability from early childhood. It is based on genetic disorders leading to a violation of the structure of bone tissue, which leads to frequent fractures, impaired growth and posture, with the development of characteristic disabling bone deformities and associated problems, including respiratory, neurological, cardiac, renal impairment, hearing loss. Osteogenesis imperfecta occurs in both men and women, the disease is inherited in both autosomal dominant and autosomal recessive types, there are sporadic cases of the disease due to *de novo* mutations, as well as X-linked forms. The term “osteogenesis imperfecta” was coined by W. Vrolick in the 1840s. The first classification of the

disease was made in 1979 and has been repeatedly reviewed due to the identification of the molecular cause of the disease and the discovery of new mechanisms for the development of osteogenesis imperfecta. In the early 1980s, mutations in two genes of collagen type I (*COL1A1* and *COL1A2*) were first associated with an autosomal dominant inheritance type of osteogenesis imperfecta. Since then, 18 more genes have been identified whose products are involved in the formation and mineralization of bone tissue. The degree of genetic heterogeneity of the disease has not yet been determined, researchers continue to identify new genes involved in its pathogenesis, the number of which has reached 20. In the last decade, it has become known that autosomal recessive, autosomal dominant and X-linked mutations in a wide range of genes, encoding proteins that are involved in the synthesis of type I collagen, its processing, secretion and post-translational modification, as well as in proteins that regulate the differentiation and activity of bone-forming cells, cause imperfect osteogenesis. A large number of causative genes complicated the classical classification of the disease and, due to new advances in the molecular basis of the disease, the classification of the disease is constantly being improved. In this review, we systematized and summarized information on the results of studies in the field of clinical and genetic aspects of osteogenesis imperfecta and reflected the current state of the classification criteria for diagnosing the disease.

Key words: osteogenesis imperfecta; collagen; bone fragility; bisphosphonates; multiple fractures.

**For citation:** Zaripova A.R., Khusainova R.I. Modern classification and molecular-genetic aspects of osteogenesis imperfecta. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(2):219-227. DOI 10.18699/VJ20.614

## Введение

Незавершенный остеогенез (НО) (код по МКБ-10 – Q78.0), распространенное название «несовершенный остеогенез», – клинически и генетически гетерогенное наследственное заболевание соединительной ткани, основной причиной которого является генетически обусловленное нарушение качества костной ткани, приводящее к частым переломам с развитием инвалидизирующих деформаций костей и комплекса сопутствующих проблем со стороны дыхательной, сердечно-сосудистой, нервно-мышечной систем.

Незавершенный остеогенез встречается как у мужчин, так и у женщин, частота встречаемости заболевания составляет от 1:10000 до 1:30000 новорожденных детей в различных странах мира. В России НО – самое частое генетическое заболевание костей: один случай на 10–20 тыс. новорожденных. По данным Минздрава на 2014 г., в России живут 556 взрослых и детей с незавершенным остеогенезом (Крючкова, Круглов, 2014). Заболевание наследуется как по аутосомно-доминантному, так и аутосомно-рецессивному типам с преобладанием аутосомно-доминантного типа наследования с семейным мозаицизмом, однако существуют и спорадические случаи заболевания, обусловленные мутациями *de novo*, частоту которых еще предстоит выяснить, а также обнаружены X-сцепленные формы (Marini et al., 2017).

На сегодняшний день идентифицировано 20 генов, ответственных за развитие разных форм НО, продолжается поиск новых генов, участвующих в патогенезе заболевания. За последние пять лет было идентифицировано шесть новых генов, вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза. Последний ген идентифицирован в 2018 г., и все еще не выяснено, насколько это заболевание клинически и генетически гетерогенно. Генетические дефекты при незавершенном остеогенезе трансформируются в дефекты синтеза коллагена, структуры его цепей, пост-трансляционной модификации коллагена, его правильного сворачивания в тройную спираль и сшивания (Надыршина и др., 2012). Наблюдаются также дефекты минерализации костной ткани и дифференцировки остеобластов. В связи с обнаружением новых молекулярных причин заболевания проводятся постоянное совершенствование критериев

диагностики и пересмотр классификации незавершенного остеогенеза.

Цель настоящей работы – обзор современного состояния клиничко-генетических аспектов незавершенного остеогенеза и обобщение результатов молекулярного патогенеза заболевания.

## Эволюция классификационных критериев незавершенного остеогенеза

О существовании заболевания, клинические признаки которого соответствуют незавершенному остеогенезу, известно с давних времен. Самый ранний из случаев заболевания выявлен при исследовании частично мумифицированного скелета младенца из древнего Египта, датированного 1000 лет до н. э., в настоящее время размещенного в Британском музее в Лондоне (Lowenstein, 2009; Ramachandran, Jones, 2018). Существует история об Иваре Бескостном, который руководил скандинавским вторжением в Англию в девятом веке. Согласно легенде, у него вместо костей были хрящи, и, так как он не мог ходить на своих ногах, его вынесли на поле битвы на щите (Mahoney, 2017). Тематические публикации об исследованиях хрупких костей и потери слуха начали появляться в медицинской литературе с 1600 г. J.F. Lobstein и W. Vrolik стали одними из первых, кто правильно понял этиологию этого заболевания. В 1825 г. J.F. Lobstein привел сведения о трех больных детях разного возраста, у которых без видимых причин возникали переломы трубчатых костей. Он предложил называть это заболевание остеопсагирозом и в своем трактате по патологической анатомии посвятил ему целую главу.

В 1849 г. W. Vrolik описал под названием «несовершенное остеобразование» синдром хрупкости костей со множественными переломами, которые происходили во внутриутробном периоде или сразу после рождения. При изучении литературы по данному вопросу можно проследить, как постепенно врожденная ломкость костей выделялась из понятия рахитизма, а начиная уже с 1900 г. многие авторы стали указывать на генетический характер этого заболевания.

Позднее, в 1906 г., E. Looser состояние незавершенного остеогенеза разделил на «раннее», или «врожденное»,

**Таблица 1.** Классификация незавершенного остеогенеза, по F.H. Glorieux

Тип НО	Тяжесть заболевания	Дентиногенез	Типичные симптомы	Генетический вариант	Мутации
I	Легкое течение, без деформаций	Нормальный	Нормальная длина ребенка, голубые склеры	Аутосомно-доминантный	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>
II	Перинатальная смерть	Не изучен	Множественные переломы и деформации при рождении	Аутосомно-доминантный, спонтанные мутации, семейный мозаицизм	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>
III	Тяжелое	Несовершенный	Задержка физического развития ребенка, треугольное лицо, голубые склеры	Аутосомно-доминантный, очень редко аутосомно-рецессивный, семейный мозаицизм	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>
IV	Среднетяжелое, тяжелое	Несовершенный	Задержка физического развития ребенка, голубые или белые склеры	Аутосомно-доминантный	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>
V	Среднетяжелое, тяжелое	Нормальный	Гиперпластическая костная мозоль, белые склеры	»	Не изучен
VI	Среднетяжелое, тяжелое	Нормальный	Белые склеры	Аутосомно-рецессивный	Не изучен
VII	Среднетяжелое, тяжелое, перинатальная смерть	Нормальный	»	»	<i>CRTAP</i>
VIII	Тяжелое, перинатальная смерть	Нормальный	»	»	<i>LEPRE1</i>

и «позднее». В 1896 г. J. Sprigway обратил внимание на тот факт, что у некоторых пациентов с хрупкими костями были также и голубые склеры. E. Bronson в 1917 г. отметил наличие семейной глухоты у людей с хрупкими костями и голубыми склерами. В 1918 г. J. Ноеве и А. Kleyn описали наличие хрупких костей в сочетании с голубой склерой и ранней глухотой как отдельный наследственный синдром. В 1926 г. J.A. Кеу добавил к симптомам заболевания еще гипертонус связок и гипермобильность суставов, на чем описание клинической картины незавершенного остеогенеза практически закончилось.

В 1970-х гг. D. Sillence и его команда исследователей из Австралии разработали систему классификации заболевания с использованием типов, которая применяется и в настоящее время. Его оригинальные четыре типа (I, II, III и IV) объединяют клинические симптомы с генетическими компонентами. Типы варьируют от самых легких до самых тяжелых. Эта система классификации с 1979 г. общепринята во всем мире и продолжает развиваться по мере получения новой информации о молекулярном патогенезе заболевания (Яхяева и др., 2015б). В дальнейшем эта классификация была дополнена M. Ramachandran (Пигарова и др., 2017), в ней также учитывалось нарушение дентиногенеза, но тип IV НО был подразделен на подтип В, сопровождающийся дефектами дентиногенеза, и подтип А, не имеющий этих нарушений.

В 2000 г. F.H. Glorieux представил классификацию незавершенного остеогенеза, в которой помимо уже известных типов было выделено еще четыре типа НО: V, VI, VII, VIII, не связанных с патологией коллагена типа I. В этой классификации учитывались современные достижения в области молекулярно-генетических исследований заболевания (табл. 1).

У менее 5 % пациентов с диагнозом НО встречается тип V, который наследуется по аутосомно-доминантно-типу. Клинический фенотип НО типа V отличается от

других типов НО и характеризуется кальцификацией межкостной мембраны предплечья и формированием гиперпластического каллюса. Несовершенный остеогенез типа V имеет широкий спектр тяжести заболевания (Glorieux et al., 2000).

Тип VI клинически подобен типам II и IV, но отличается характерной гистологической картиной – формированием обширных полей остеоида за счет нарушения минерализации (Glorieux et al., 2002).

Тип VII проявляется деформациями длинных костей, укорочением проксимальных отделов конечностей, *coxa vara* (варусные деформации шейки бедра), сопровождается нормальным дентиногенезом и обычным цветом склер, характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования. Тип VII НО обусловлен мутацией гена в хромосоме 3p22-24.1, который кодирует белок, ассоциированный с хрящом (*CRTAP*). *CRTAP* является кофактором для посттрансляционной модификации коллагена типа I. Тяжесть заболевания зависит от степени дефицита *CRTAP*. При полном отсутствии белка *CRTAP* наступает пренатальная смерть или ребенок рождается с тяжелой формой НО (Ward et al., 2002).

Тип VIII – тяжелый тип течения, клинически подобен типу II НО, характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования, связан с мутациями в гене *LEPRE1*. Диагностируется в перинатальном возрасте; ему присущи тяжелые деформации костей, белые склеры; сопровождается нормальным дентиногенезом (Fratzl-Zelman et al., 2016).

Типы I–V имеют преимущественно аутосомно-доминантный тип наследования, VI–XVIII – аутосомно-рецессивный. При обнаружении новых генов классификация расширялась, и к 2015 г. число форм заболевания достигло 18.

Несовершенный остеогенез типа I характеризуется наличием дефекта в гене *COL1A1*, что приводит к сни-

**Таблица 2.** Современная классификация незавершенного остеогенеза

Тип	Название типа	Ген	Тип наследования
I	Недеформирующий тип с голубыми склерами	<i>COL1A1, COL1A2, SP7, BMP1, P3H1, PLS3</i>	АД, X-сцепленный
II	Перинатально летальный, тяжелый	<i>COL1A1, COL1A2, CRTAP, P3H1, CREB3L1, PPIB, BMP1</i>	АД, АР
III	Прогрессивно деформирующий, умеренно тяжелый	<i>COL1A1, COL1A2, BMP1, CRTAP, FKBP10, P3H1, PLOD2, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, FAM46A</i>	АД, АР
IV	Вариабельный НО с голубыми склерами, среднетяжелый	<i>COL1A1, COL1A2, WNT1, CRTAP, PPIB, SP7, PLS3, TMEM38B, FKBP10, SPARC</i>	АД, АР, X-сцепленный
V	Среднетяжелый НО с оссификацией межкостной мембраны предплечья	<i>IFITM5</i>	АД

Примечание. Тип наследования: АД – аутосомно-доминантный; АР – аутосомно-рецессивный.

жению количества вырабатываемого коллагена типа I; при типах II–IV – к его качественным изменениям из-за мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2*; тип V обусловлен мутациями в гене *IFITM5* и нарушениями регуляции минерализации костей; тип VI возникает вследствие мутации в гене *SERPINF1*, приводящей к дефекту минерализации костной ткани; типы VII (ген *CRTAP*), VIII (ген *LEPRE1*, известный также как *P3H1*), и IX (ген *PPIB*) – результат дефекта процесса 3-гидроксилирования коллагена. Причиной незавершенного остеогенеза типов X и XI служит нарушение обработки и сшивания коллагена в результате мутаций в генах *SERPINH1* и *FKBP10* соответственно. Мутации в генах *PLOD2* и *BMP1* приводят к незавершенному остеогенезу типа XII. Эти гены участвуют в посттрансляционной модификации, обработке, фальцовке, секреции, а также сшивании проколлагена типа I. Типы XIII–XVIII незавершенного остеогенеза отличаются нарушением дифференцировки остеобластов: мутации в гене *SP7* приводят к проявлению типа XIII, в гене *TMEM38B* – типа XIV, в *WNT1* – типа XV, в *CREB3L1* – типа XVI, в *SPARC* – типа XVII, в *MBTPS2* – типа XVIII (Marini et al., 2017).

Классификация заболевания с учетом молекулярного патогенеза заболевания осложнила работу клинических врачей, и в 2016 г. Международный комитет номенклатуры конституциональных нарушений скелета (International committee of nomenclature of constitutional disorders of the skeleton, INCDS) сократил классификацию до 5 форм, сохранив 4 типа, которые первоначально были описаны D. Sillence, и добавив 5-й тип. Всего было выделено пять групп заболевания с использованием арабской цифровой системы, которая указывает на объединяющие фенотипические характеристики, а индивидуальные (свойственные определенному типу) изменения по-прежнему сохранили свое оригинальное римское обозначение (табл. 2) (Игнатович и др., 2018). Эта классификация оставляет место для включения новых генов, обнаруженных в качестве причины незавершенного остеогенеза, пока не будет идентифицирована степень гетерогенности заболевания.

Таким образом, классификация незавершенного остеогенеза претерпела ряд принципиальных изменений, связанных с достижениями в области изучения молекулярного патогенеза заболевания. До сих пор не определена степень гетерогенности заболевания, не оценена частота

возникновения случаев *de novo*, в связи с чем, вероятно, будет продолжено совершенствование классификационных критериев диагностики незавершенного остеогенеза.

### Современные представления об этиологии и патогенезе незавершенного остеогенеза

Незавершенный остеогенез характеризуется широкой клинической и генетической гетерогенностью. Ранее заболевание относили к коллагенопатиям, так как в большинстве случаев нарушаются структура и функция основного белка костной ткани – коллагена типа I, а также его стабильность. Позже у пациентов с незавершенным остеогенезом были выявлены мутации в генах, не участвующих в формировании структуры и фолдинге коллагена (Tournis, Dede, 2018).

В настоящее время идентифицировано 20 генов, ответственных за развитие НО. Аутосомно-доминантный тип наследования НО в большинстве случаев вызывается дефектами в генах *COL1A1* или *COL1A2* цепей коллагена типа I, кодирующих  $\alpha 1$  (I) и  $\alpha 2$  (I) пептидные цепи коллагена типа I соответственно (Игнатович и др., 2018). Аутосомно-доминантные варианты наследования заболевания были описаны также у нескольких больных в случае мутаций в генах *IFITM5* (MIM: 614757) и *P4HB* (MIM: 176790). *P4HB* кодирует бета-субъединицу пролил-4-гидроксилазы, которая участвует в пролилгидроксилировании и фолдинге проколлагена (Li et al., 2019), а *IFITM5* – ген, специфичный для остеобластов, связанный с минерализацией матрикса (Glorieux et al., 2000). Ген *IFITM5* локализован на хромосоме 11 (p15.5) в кластере родственных генов (*IFITM1*, 2, 3, 10) и принадлежит к семейству генов, кодирующих белки, содержащие два трансмембранных домена, которые осуществляют различные значимые клеточные функции (Яхяева и др., 2015а).

Незавершенный остеогенез передается также по аутосомно-рецессивному типу наследования, который обусловлен мутациями в следующих генах: *BMP1* (MIM: 112264) (Asharani et al., 2012), *CRTAP* (MIM: 605497) (Morello et al., 2006), *FKBP10* (MIM: 607063) (Barnes et al., 2012), *P3H1* (MIM: 610339) (Cabral et al., 2007), *PLOD2* (MIM: 601865) (Puig-Hervás et al., 2012), *PPIB* (MIM: 123841) (VanDijk et al., 2009), *SEC24D* (MIM: 607186) (Zhang et al., 2017), *SERPINH1* (MIM: 600943) (Christiansen

et al., 2010) и *TMEM38B* (MIM: 611236) (Rubinato et al., 2014), участвующих в посттрансляционных модификациях, обработке, свертывании, секреции и сшивании проколлагена типа I. Однако есть и другая группа локусов НО с типом аутосомно-рецессивного наследования, которые не распознаются как непосредственно вовлеченные в биосинтез коллагена типа I, но играют роль в минерализации или развитии остеобластов. К этой группе генов относятся *CREB3L1* (MIM: 616215) (Symoens et al., 2013), *SERPINF1* (MIM: 172860) (Becker et al., 2011), *SP7* (MIM: 606633) (Lapunzina et al., 2010), *SPARC* (MIM: 182120) (Mendoza-Londono et al., 2015) и *WNT1* (MIM: 164820) (Laine et al., 2013; Pyott et al., 2013). Наконец, мутации в генах *PLS3* (MIM: 300131) (Costantini et al., 2018) и *MBTPS2* (MIM: 300294) были связаны с двумя различными формами X-сцепленных форм незавершенного остеогенеза.

Известно, что есть два гена, кодирующих белки, которые являются частью метаболической цепи, регулирующих внутримембранный протеолиз (RIP) в остеобластах, приводящих к формированию фенотипа незавершенного остеогенеза. Во время внутримембранного протеолиза эндопептидазы S1P (кодируемые геном *MBTPS1*) и S2P (кодируемые геном *MBTPS2*) в мембране Гольджи последовательно расщепляют регуляторные белки, транспортируемые из мембраны эндоплазматической сети во время стресса эндоплазматического ретикулума или дефицита метаболита стерола. У пациентов с мутациями в гене *MBTPS2* снижено гидроксилирование лизина  $\alpha 1(I)$ - и  $\alpha 2(I)$ -цепи, изменено сшивание коллагена и нарушена прочность костной ткани. Один из факторов транскрипции, активируемых RIP, – специфически индуцированное астроцитами вещество (OASIS, кодируется *CREB3L1*). О дефиците этого вещества сообщалось в связи с семьей с тяжелой формой незавершенного остеогенеза. OASIS – стресс-преобразователь эндоплазматического ретикулума, который регулирует транскрипцию генов, участвующих в процессах развития, дифференцировки и созревания остеобластов. У мышей с нокаутированным геном *CREB3L1* наблюдалась тяжелая остеопения со спонтанными переломами и снижением выработки коллагена типа I в кости (Lindert et al., 2016).

В 2018 г. был открыт еще один ген – *FAM46*, который также приводит к незавершенному остеогенезу с аутосомно-рецессивным типом наследования. *FAM46A* относится к суперсемейству нуклеотидилтрансферазных складчатых белков, но его точная функция неизвестна. Тем не менее есть ряд доказательств, указывающих на соответствующую роль *FAM46A* в развитии костей. С помощью RT-PCR-анализа была обнаружена специфическая экспрессия *FAM46A* в остеобластах человека и, что интересно, недавно идентифицирована нонсенс-мутация в *FAM46A* у мыши, это изменение характеризуется уменьшенной длиной тела, конечностей, деформацией ребер, таза и черепа и уменьшенным кортикальным слоем трубчатых костей (Doyard et al., 2018) (табл. 3).

Приблизительно 90 % из 3000 человек из базы данных по незавершенному остеогенезу (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>) обладают изменениями в гене *COL1A1* либо *COL1A2*, а у оставшихся 10 % обнаруживаются гомо- или гетерозиготные мутации в других генах, вовлечен-

ных в патогенез НО. Тем не менее основные центры секвенирования, предлагающие панель причинных мутаций, связанных с незавершенным остеогенезом, идентифицируют более низкую частоту структурных мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2* у пациентов с клинической картиной заболевания от средней до тяжелой степени. Например, у 77 % из 598 пациентов с НО из клиники Шрайнерс (Монреаль, Канада) выявлены гетерозиготные мутации в генах *COL1A1* или *COL1A2*, 9 % имели одну мутацию в гене *IFITM5*, а остальные – гомозиготные или гетерозиготные мутации в других генах, вызывающих незавершенный остеогенез. Летальные мутации в гене коллагена могли быть утеряны в этом исследовании. В популяциях с высоким уровнем кровного родства частота незавершенного остеогенеза выше, например среди афроамериканцев в Соединенных Штатах Америки частота мутантного варианта в гене *P3H1* (ранее называвшегося *LEPRE1*, кодирующего пролил 3-гидроксилазу 1) составляет около 1 на 240 человек. Гомозиготность по этому так называемому западноафриканскому аллелю составляет 25 % всех случаев незавершенного летального остеогенеза в этой популяции, который может быть клинически ошибочно классифицирован как НО типа II. Среди западных африканцев Ганы и Нигерии частота встречаемости данного аллеля составляет 1.5 %, что может привести к частоте летального рецессивного незавершенного остеогенеза, равной частоте мутаций *de novo* в коллагене типа I.

Несмотря на большое количество мутаций, зарегистрированных в базе данных по незавершенному остеогенезу (<https://oi.gene.le.ac.uk>), для каждой популяции характерен свой спектр, состоящий из небольшого числа мутаций, при этом каждый исследователь находит ранее неописанные в литературе мутации.

Как и в случае других рецессивных заболеваний, в некоторых популяциях имеются единичные мутации в редких генах, которые не встречаются в других популяциях: делеция экзона в гене *TMEM38B* обнаружена в семье из Саудовской Аравии; смещение рамки считывания в гене *FKBP10* найдено у больных из Турции; миссенс-мутации в гене *WNT1* – в этнической группе хмонг из Вьетнама и Китая (Marini et al., 2017). Среди населения Северного Онтарио (Канада) интронный вариант приводит к дестабилизации мРНК гена *CRTAP*, кодирующего белок, ассоциированный с хрящом, и развитию фенотипа незавершенного остеогенеза типа VII.

Клиническая картина НО и степени тяжести заболевания многообразна, возможны летальные варианты с явными аномалиями скелета у детей или может быть легкая манифестация у людей зрелого возраста. Тяжесть заболевания обуславливается частотой переломов, прогрессирующей деформацией, хронической болью в костях и потерей подвижности. Из-за клинической гетерогенности заболевания существуют трудности в диагностике и верификации диагноза. У детей с НО выявляют задержку физического развития, сколиоз, прогрессирующие деформации длинных костей, тугоухость, патологию прорезывания зубов. Поэтому только идентификация молекулярной причины заболевания позволяет установить точный диагноз.

**Таблица 3.** Характеристика генов и их белковых продуктов, ответственных за развитие НО

Гены и их белковые продукты	Локализация	Тип НО	Тип наследования	Функция	Число экзонов	Число мутаций
<i>COL1A1</i> – коллаген, тип 1, альфа-1 цепь	17q21.33	I, II, III, IV	Аутосомно-доминантный	Входит в состав коллагена типа I	52	1035
<i>COL1A2</i> – коллаген, тип 1, альфа-2 цепь	27q21.3	I, II, III, IV	»	Входит в состав коллагена типа I	52	604
<i>CRTAP</i> – ассоциированный с хрящом белок	3p22.3	III, IV	Аутосомно-рецессивный	Участвует в посттрансляционной модификации коллагена типа I	7	32
<i>FKBP10</i> – пептидил-пролил цис/транс изомераза	17q21.2	III, IV	»	Служит в качестве коллагеновых шаперонов	11	39
<i>IFITM5</i> – интерферон-индуцированный трансмембранный белок 5	11p15.5	V	Аутосомно-доминантный	Экспрессируется в скелетных тканях и участвует в образовании кости	2	2
<i>P3H1</i> – пролил 3-гидроксилаза 1	1p34.2	III	Аутосомно-рецессивный	Участвует в посттрансляционной модификации коллагена типа I	16	69
<i>SP7</i> – транскрипционный фактор	12q13.13	III	»	Участвует в регуляции дифференцировки костных клеток	5	2
<i>TMEM38B</i> – трансмембранный белок	9q31.2	IV	»	Участвует в переносе двухвалентного Са	6	6
<i>WNT1</i> – сигнальный белок, член семейства сайтов интеграции	12q13.12	IV	»	Участвует в функционировании остеобластов и развитии кости	4	36
<i>BMP1</i> – морфогенетический белок кости 1	8p21.3	I, III, IV	»	Участвует в С-терминальном процессинге обеих проколлагеновых цепей белка	20	11
<i>PPIB</i> – пептидилпролил изомераза В (циклофилин В)	15q22.31	III	»	Участвует в посттрансляционной модификации коллагена типа I	5	17
<i>SERPINF1</i> – ингибитор серпин пептидазы F (альфа-2 антиплазмин)	17p13.3	III, IV	»	Участвует в процессе минерализации кости	9	38
<i>SERPINH1</i> – ингибитор серпин пептидазы H	11q13.5	III, IV	»	Является шапероном коллагена	7	9
<i>PLS3</i> (plastin 3) – пластин 3	Xq23	I	X-сцепленный тип	Молекулярная функция пластина-3 до конца не выяснена, может играть роль в дифференцировке костных клеток	21	11
<i>CREB3L1</i> – цАМФ-связывающий белок 3	11p11.2	II	Аутосомно-рецессивный	Регулирует образование I типа проколлагена в процессе формирования костной ткани	13	4
<i>P4HB</i> – пролил 4-гидроксилаза, бета-субъединица	17q25.3	III	Аутосомно-доминантный	Катализирует гидроксилирование остатков пролина в повторях X-Pro-Gly в спиральном домене проколлагена	11	2
<i>PLOD2</i> – проколлаген-лизин, 2-оксоглутарат 5 – диоксигеназа 2	3q24	III, IV	Аутосомно-рецессивный	Участвует в гидроксилировании лизиновых остатков в коллагеновых волокнах	23	10
<i>SEC24D</i> – SEC 24, член семейства D	4q26	III, IV	»	Функция не до конца изучена	25	7
<i>SPARC</i> – остеоонектин	5q33.1	IV	»	Регулирует пролиферацию и взаимодействие клеток и матрикса путем связывания ионов кальция с гидроксиапатитом	10	2
<i>FAM46A</i> – семейство сходных последовательностей 46A	6q14.1	III	»	Функция не до конца изучена	3	3

Таким образом, достигнуты значительные успехи в изучении молекулярного патогенеза незавершенного остеогенеза, однако все еще предстоит выяснить степень гетерогенности заболевания. С развитием технологий генотипирования и широкого внедрения методов глубокого ресеквенирования и полноэкзомного секвенирования стало возможным не только идентифицировать новые мутации в известных генах, но и находить новые гены, вовлеченные в развитие заболевания.

### Перспективы лечения незавершенного остеогенеза

Проводятся активные исследования возможностей таргетной терапии пациентов с наследственными заболеваниями с учетом молекулярного дефекта. Получены обнадеживающие результаты при патогенетической терапии муковисцидоза.

Бисфосфонаты (БФ) – основные лекарственные средства для лечения как детей, так и взрослых пациентов с незавершенным остеогенезом. Считается, что БФ могут быть менее эффективными или даже приводить к неблагоприятным последствиям в случаях недостаточного потребления кальция и/или дефицита витамина D (Weaver et al., 2016).

Есть также доклинические и небольшое количество клинических исследований у взрослых пациентов с НО в отношении деносумаба – моноклонального антитела, нацеленного на RANKL (рецептор активатора ядерного лиганд фактора каппа-В). Что касается анаболической терапии, то терипаратид – единственный на данный момент доступный анаболический агент – показал многообещающие результаты у взрослых пациентов с НО типа I. Доклинические исследования выявили, что ингибирование передачи сигналов TGF-бета, а также ингибирование склеростина могут играть роль в лечении хрупкости костей. Помимо фармакологических вмешательств первостепенное значение для обеспечения наилучшей медицинской помощи имеет междисциплинарный подход, который обеспечивают опытные хирурги-ортопеды, специалисты по стоматологической помощи, физиотерапевты и специалисты по кинезотерапии.

В настоящее время для лечения детей с НО широко используются бисфосфонаты. Показано, что как пероральное (алендронат, ризедронат), так и внутривенное введение БФ (памидронат, золедронат, неридронат) улучшает уровень минеральной плотности костной ткани (МПКТ), особенно в позвоночнике. Тем не менее данные рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, касающихся эффективности противодействия переломам, облегчения боли и улучшения двигательной активности, все еще отсутствуют. Недавние исследования не выявили последовательного снижения частоты переломов и улучшения клинического статуса пациентов при лечении БФ (Dwan et al., 2014).

Относительно влияния БФ у взрослых с НО имеются ограниченные данные, в которых проверялось влияние различных БФ на уровень МПКТ. Почти во всех исследованиях сообщалось о благоприятном воздействии на уровень МПКТ нижнего отдела позвоночника (увеличение до 13.9 %) с менее выраженными эффектами на общий

уровень МПКТ бедра (увеличение до 4.3 %) (Lindahl et al., 2014). За последнее время опубликовано несколько сообщений об атипичных переломах бедра у взрослых пациентов с НО, получающих лечение бисфосфонатами.

В ряде исследований оценивался эффект деносумаба у пациентов с НО, вызванным мутацией в *SERPINF1*, который характеризуется слабым ответом на БФ, а также у пациентов с НО I/IV ( $n = 8$ ) и НО III ( $n = 2$ ) типами (Hoyer-Kuhn et al., 2016). Используемая доза составляла 1 мг/кг подкожно каждые 3 мес. Во всех исследованиях сообщалось о значительном увеличении МПКТ и отсутствии значительных побочных эффектов лечения в течение двухлетнего периода.

Ингибирование склеростина может быть еще одним вариантом лечения ломкости костей при незавершенном остеогенезе. Недавно опубликованные исследования показали, что введение ромосозумаба (моноклонального антитела, связывающего склеростин) в течение одного года снижает частоту переломов позвоночника и остеопороза у женщин в постменопаузе с остеопорозом (Sinder et al., 2015; Grafе et al., 2016).

В мышинной модели с НО было обнаружено, что повышенная передача сигналов TGF- $\beta$  участвует в фенотипе НО, в то время как ингибирование TGF- $\beta$  улучшает костную массу и силу. Фаза I исследования проверяет безопасность фрезолимумаба, высокоаффинного нейтрализующего антитела, которое нацелено на все три изоформы TGF- $\beta$ , у взрослых с умеренно выраженной клиникой незавершенного остеогенеза. Комбинированная терапия с антирезорбтивными и анаболическими агентами – еще один потенциальный вариант лечения ломкости костей у пациентов с незавершенным остеогенезом. Другие способы лечения, такие как трансплантация костного мозга и генная терапия, находятся на стадии оценки эффективности для лечения тяжелых форм НО (Marini et al., 2017).

Таким образом, несмотря на достигнутый прогресс в понимании патофизиологии НО, все еще необходимы дополнительные исследования, чтобы определить лучший терапевтический подход к этому гетерогенному заболеванию.

### Заключение

Обобщая вышеизложенное, можно сделать вывод, что произошел прорыв в идентификации молекулярного патогенеза незавершенного остеогенеза, что обусловлено внедрением современных технологий секвенирования следующего поколения (NGS). Тем не менее все еще далеки от завершения вопросы о распространенности заболевания в целом и его отдельных клинических форм в различных популяциях мира. Степень молекулярной гетерогенности НО остается неизвестной, продолжается выявление новых патогенетических механизмов формирования фенотипа заболевания на основе идентификации новых генов, вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза. В настоящее время предпринимаются попытки разработки таргетной терапии заболевания с учетом новых знаний о клинико-генетических аспектах НО, однако еще много противоречивых результатов и решение проблемы лечения заболевания пока не найдено.

## Список литературы / References

- Игнатович О.Н., Намазова-Баранова Л.С., Маргиева Т.В., Яхьяева Г.Т., Журкова Н.В., Савостьянов К.В., Пушков А.А., Кротов И.А. Несовершенный остеогенез: особенности диагностики. Педиатр. фармакология. 2018;15(3):224-232. DOI 10.15690/pf.v15i3.1902.  
[Ignatovich O.N., Namazova-Baranova L.S., Margieva T.V., Yakhyayeva G.T., Zhurkova N.V., Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Krotov I.A. Osteogenesis imperfecta: diagnostic feature. *Pediatricheskaya Farmakologiya = Pediatric Pharmacology*. 2018;15(3):224-232. DOI 10.15690/pf.v15i3.1902. (in Russian)]
- Крючкова О.А., Круглов С.В. Несовершенный остеогенез: лечение. Несовершенный остеогенез: симптомы. 2014. <https://ymkababy.ru/pregnancy/nesovershennyi-osteogenez-lechenie-nesovershennyi-osteogenez-simptom.html>.
- [Kruchkova O.A., Kruglov S.V. Treatment of osteogenesis imperfecta. Symptoms of osteogenesis imperfecta. 2014. Available at <https://ymkababy.ru/pregnancy/nesovershennyi-osteogenez-lechenie-nesovershennyi-osteogenez-simptom.html>. (in Russian)]
- Надыршина Д.Д., Хусайнова Р.И., Хуснутдинова Э.К. Исследование  $\alpha 1$ -цепи коллагена I-го типа (COL1A1) у больных несовершенным остеогенезом. Генетика. 2012;48(3):372-380.  
[Nadyrshina D.D., Khusainova R.I., Khusnutdinova E.K. Studies of type I collagen (COL1A1)  $\alpha 1$  chain in patients with osteogenesis imperfecta. *Russ. J. Genet.* 2012;48(3):321-328.]
- Пигарова Е.А., Шеремета М.С., Куликова К.С., Беловалова И.М., Тюльпаков А.Н., Румянцев П.О. Клинический случай сочетания несовершенного остеогенеза и болезни Грейвса. Ожирение и метаболизм. 2017;14(4):77-82. DOI 10.14341/OMET2017477-82.  
[Pigarova E.A., Sheremeta M.S., Kulikova K.S., Belovalova I.M., Tulpakov A.N., Rumiantsev P.O. Osteogenesis imperfecta in combination with Graves disease. *Ozhirenie i Metabolism = Obesity and Metabolism*. 2017;14(4):77-82. DOI 10.14341/OMET2017477-82. (in Russian)]
- Яхьяева Г.Т., Маргиева Т.В., Намазова-Баранова Л.С., Савостьянов К.В., Пушков А.А., Журкова Н.В., Жердев К.В., Вашакмадзе Н.Д., Геворкян А.К. V тип несовершенного остеогенеза. Наблюдение редкого случая. Педиатр. фармакология. 2015a;12(1):79-84.  
[Yakhyayeva G.T., Margieva T.V., Namazova-Baranova L.S., Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Zhurkova N.V., Zherdev K.V., Vashakmadze N.D., Gevorkyan A.K. Clinical case of rare type V osteogenesis imperfecta. *Pediatricheskaya Farmakologiya = Pediatric Pharmacology*. 2015a;12(1):79-84. (in Russian)]
- Яхьяева Г.Т., Намазова-Баранова Л.С., Маргиева Т.В. Новые аспекты генетической основы, классификации и лечения несовершенного остеогенеза: литературный обзор. Педиатр. фармакология. 2015b;12(5):579-588. DOI 10.15690/pf.v12i5.1461.  
[Yakhyayeva G.T., Namazova-Baranova L.S., Margieva T.V. New aspects of the genetic basis, classification and treatment of osteogenesis imperfecta: a literature review. *Pediatricheskaya Farmakologiya = Pediatric Pharmacology*. 2015b;12(5):579-588. DOI 10.15690/pf.v12i5.1461. (in Russian)]
- Asharani P.V., Keupp K., Semler O., Wang W., Li Y., Thiele H., Yigit G., Pohl E., Becker J., Frommolt P., Sonntag C., Altmüller J., Zimmermann K., Greenspan D.S., Akarsu N.A., Netzer C., Schönau E., Wirth R., Hammerschmidt M., Nürnberg P., Wollnik B., Carney T.J. Attenuated *BMP1* function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(4):661-674. DOI 10.1016/j.ajhg.2012.02.026.
- Barnes A.M., Cabral W.A., Weis M., Makareeva E., Merta E.L., Leikin S., Eyre D., Trujillo C., Marini J.C. Absence of *FKBP10* in recessive type XI OI leads to diminished collagen cross-linking and reduced collagen deposition in extracellular matrix. *Hum. Mutat.* 2012;33(11):1589-1598. DOI 10.1002/humu.22139.
- Becker J., Semler O., Gilissen C., Li Y., Bolz H.J., Giunta C., Bergmann C., Rohrbach M., Koerber F., Zimmermann K. Exome sequencing identifies truncating mutations in human *SERPINF1* in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;88(3):362-371. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.01.015. Belgian Bone Club. 2019. Available at <http://www.bbcbonehealth.org/osteogenesis-imperfecta>.
- Cabral W.A., Chang W., Barnes A.M., Weis M.A., Scott M.A., Leikin S., Makareeva E., Kuznetsova N.V., Rosenbaum K.N., Tift C.J., Bulas D.I., Kozma C., Smith P.A., Eyre D.R., Marini J.C. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat. Genet.* 2007;39(3):359-365. DOI 10.1038/ng1968.
- Christiansen H.E., Schwarze U., Pyott S.M., AlSwaid A., Al Balwi M., Alrasheed S., Pepin M.G., Weis M.A., Eyre D.R., Byers P.H. Homozygosity for a missense mutation in *SERPINH1*, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;86(3):389-398. DOI 10.1016/j.ajhg.2010.01.034.
- Costantini A., Krallis P.N., Kämpe A., Karavitakis E.M., Taylan F., Mäkitie O., Doulgeraki A. A novel frameshift deletion in *PLS3* causing severe primary osteoporosis. *J. Hum. Genet.* 2018;63(8):923-926. DOI 10.1038/s10038-018-0472-5.
- Doyard M., Bacrot S., Huber C., Di Rocco M. *FAM46A* mutations are responsible for autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.* 2018;55(4):278-284. DOI 10.1136/jmedgenet-2017-104999. Epub 2018 Jan 22.
- Dwan K., Phillipi C.A., Steiner R.D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014;7:Cd005088.
- Fratzl-Zelman N., Barnes A.M., Weis M., Carter E., Hefferan T.E., Perino G., Chang W., Smith P.A., Roschger P., Klaushofer K., Glorieux F.H., Eyre D.R., Raggio C., Rauch F., Marini J.C. Non-lethal type VIII osteogenesis imperfecta has elevated bone matrix mineralization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101(9):3516-3525. DOI 10.1210/jc.2016-1334.
- Glorieux F.H., Rauch F., Plotkin H., Ward L., Travers R., Roughley P., Lalic L., Glorieux D.F., Fassier F., Bishop N.J. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. *J. Bone Miner. Res.* 2000;15(9):1650-1658. DOI 10.1359/jbmr.2000.15.9.1650.
- Glorieux F.H., Ward L.M., Rauch F., Lalic L., Roughley P.J., Travers R. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J. Bone Miner. Res.* 2002;17(1):30-38. DOI 10.1359/jbmr.2002.17.1.30.
- Grafe I., Alexander S., Yang T., Lietman C., Homan E.P., Munivez E., Chen Y., Jiang M.M., Bertin T., Dawson B., Asuncion F., Ke H.Z., Ominsky M.S., Lee B. Sclerostin antibody treatment improves the bone phenotype of *Crtap*<sup>-/-</sup> mice, a model of recessive Osteogenesis Imperfecta. *J. Bone Miner. Res.* 2016;31(5):1030-1040.
- Hoyer-Kuhn H., Franklin J., Allo G., Kron M., Netzer C., Eysel P., Hero B., Schoenau E., Semler O. Safety and efficacy of denosumab in children with osteogenesis imperfect – a first prospective trial. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* 2016;16(1):24-32.
- Laine C.M., Joeng K.S., Campeau P.M., Kiviranta R., Tarkkonen K., Grover M., Lu J.T., Pekkinen M., Wessman M., Heino T.J., Nieminen-Pihala V., Aronen M., Laine T., Kröger H., Cole W.G., Lehesjoki A.E., Nevarez L., Krakow D., Curry C.J., Cohn D.H., Gibbs R.A., Lee B.H., Mäkitie O. *WNT1* mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:1809-1816. DOI 10.1056/NEJMoa1215458.
- Lapunzina P., Aglan M., Temtamy S., Caparrós-Martin J.A., Valencia M., Letón R., Martínez-Glez V., Elhossini R., Arm K., Vilaboa N., Ruiz-Perez V.L. Identification of a frameshift mutation in *Osterix* in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;87(1):110-114. DOI 10.1016/j.ajhg.2010.05.016.
- Li L., Zhao D., Zheng W., Wang O., Jiang Y., Xia W., Xing X., Li M. A novel missense mutation in *P4HB* causes mild osteogenesis imperfecta. *Biosci. Rep.* 2019;39(4). DOI 10.1042/BSR20182118.
- Lindahl K., Langdahl B., Ljunggren O., Kindmark A. Treatment of osteogenesis imperfecta in adults. *Eur. J. Endocrinol.* 2014;171(2):R79-R90. DOI 10.1530/EJE-14-0017.

- Lindert U., Cabral W.A., Ausavarat S., Tongkobpetch S. *MBTPS2* mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. *Nat. Commun.* 2016;7:11920. DOI 10.1038/ncomms11920.
- Lowenstein E.J. Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. *Childs Nerv. Syst.* 2009;25(5):515-516. DOI 10.1007/s00381-009-0817-7.
- Mahoney M. Ivar the Boneless. 2017. Available at: [www.englishmonarchs.co.uk/vikings\\_10.html](http://www.englishmonarchs.co.uk/vikings_10.html).
- Marini J.C., Forlino A., Bächinger H.P., Bishop N.J., Byers P.H., De Paepe A., Fassier F., Fratzi-Zelman N., Kozloff K.M., Krakow D., Montpetit K., Semler O. Osteogenesis imperfecta. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017;3:1-19. DOI 10.1038/nrdp.2017.52.
- Mendoza-Londono R., Fahiminiya S., Majewski J. Care4Rare Canada Consortium; Tétreault M., Nadaf J., Kannu P., Sochett E., Howard A., Stimec J., Dupuis L., Roschger P., Klaushofer K., Palomo T., Ouellet J., Al-Jallad H., Mort J.S., Moffatt P., Boudko S., Bächinger H.P., Rauch F. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in *SPARC*. *Am. J. Hum. Genet.* 2015;96(6):979-985. DOI 10.1016/j.ajhg.2015.04.021.
- Morello R., Bertin T.K., Chen Y., Hicks J., Tonachini L., Monticone M., Castagnola P., Rauch F., Glorieux F.H., Vranka J., Bächinger H.P., Pace J.M., Schwarze U., Byers P.H., Weis M.A., Fernandes R.J., Eyre D.R., Yao Z., Boyce B.F., Lee B. *CRTAP* is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell.* 2006;127(2):291-304. DOI 10.1016/j.cell.2006.08.039.
- Puig-Hervás M.T., Temtamy S., Aglan M., Valencia M., Martínez-Glez V., Ballesta-Martínez M.J., López-González V., Ashour A.M., Amr K., Pulido V., Guillén-Navarro E., Lapunzina P., Caparrós-Martín J.A., Ruiz-Perez V.L. Mutations in *PLOD2* cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome-osteogenesis imperfecta phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 2012;33(10):1444-1449. DOI 10.1002/humu.22133.
- Pyott S.M., Tran T.T., Leistriz D.F., Pepin M.G., Mendelsohn N.J., Temme R.T., Fernandez B.A., Elsayed S.M., Elsobky E., Verma I., Nair S., Turner E.H., Smith J.D., Jarvik G.P., Byers P.H. *WNT1* mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;92(4):590-597. DOI 10.1016/j.ajhg.2013.02.009.
- Ramachandran M., Jones D. Osteogenesis imperfecta. 2018. Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/1256726-overview>.
- Rubinato E., Morgan A., D'Eustacchio A., Pecile V., Gortani G., Gasparini P. A novel deletion mutation involving *TMEM38B* in a patient with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Gene.* 2014;545(2):290-292. DOI 10.1016/j.gene.2014.05.028.
- Sinder B.P., Salemi J.D., Ominsky M.S., Caird M.S., Marini J.C., Kozloff K.M. Rapidly growing *Brl/+* mouse model of osteogenesis imperfecta improves bone mass and strength with sclerostin antibody treatment. *Bone.* 2015;71:115-123.
- Symoens S., Malfait F., D'hondt S., Callewaert B., Dheedene A., Steyaert W. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013;8:154. DOI 10.1186/1750-1172-8-154.
- Tournis S., Dede A.D. Osteogenesis imperfecta – a clinical update. *Metabolism.* 2018;80:27-37. DOI 10.1016/j.metabol.2017.06.001.
- VanDijk F.S., Nesbitt I.M., Zwickstra E.H., Nikkels P.G.J., Piersma S.R., Fratantoni S.A., Jimenez C.R., Huizer M., Morsman A.C., Cobben J.M., van Roij M.H.H., Elting M.W., Verbeke M.I.J.L., Wijnaendts L.C.D., Shaw N.J., Högl W., McKeown C., Sistermans E.A., Dalton A., Meijers-Heijboer H., Pals G. *PP1B* mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;85(4):521-527. DOI 10.1016/j.ajhg.2009.09.001.
- Ward L.M., Rauch F., Travers R., Chabot G., Azouz E.M., Lalic L., Roughley P.J., Glorieux F.H. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone.* 2002;31(1):12-18.
- Weaver C.M., Alexander D.D., Boushey C.J., Dawson-Hughes B., Lappe J.M., LeBoff M.S., Liu S., Looker A.C., Wallace T.C., Wang D.D. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporos. Int.* 2016;27:367-376.
- Zhang H., Yue H., Wang C., Gu J., He J., Fu W., Hu W., Zhang Z. Novel mutations in the *SEC24D* gene in Chinese families with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Osteoporos. Int.* 2017;28(4):1473-1480. DOI 10.1007/s00198-0163866-2.

#### ORCID ID

R.I. Khusainova [orcid.org/0000-0002-8643-850X](https://orcid.org/0000-0002-8643-850X)

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00489\_a.

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

Поступила в редакцию 11.06.2019. После доработки 06.08.2019. Принята к публикации 17.10.2019.

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 10.04.2020. Выход в свет 30.04.2020. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.72.

Уч.-изд. л. 16.2. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.). Заказ № 310. Цена свободная.

.....  
Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.