

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ20.624

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

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

Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ20.624

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

Актуальные технологии генетики растений

- 331 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Референсный транскриптом микоризованных корней гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с высоким покрытием.
А.М. Афонин, И.В. Леппянен, О.А. Кулаева, О.Ю. Штарк, И.А. Тихонович, Е.А. Долгих, В.А. Жуков (на англ. языке)
- 340 **ОБЗОР**
Анализ цветковых и текстурных характеристик зерен злаков на цифровых изображениях.
Е.Г. Комышев, М.А. Генаев, Д.А. Афонников
- 348 **ОБЗОР**
NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя.
И.В. Розанова, Е.К. Хлесткина

Селекция растений

- 356 **ОБЗОР**
Полегание пшеницы: генетические и экологические факторы и способы преодоления.
Е.В. Агеева, И.Н. Леонова, И.Е. Лихенко
- 363 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сорта мента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России.
А.В. Хютти, Д.А. Рыбаков, Т.А. Гавриленко, О.С. Афанасенко

Генетика микроорганизмов

- 376 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Комплексный метод таксономической идентификации микроорганизмов.
Ю.Е. Уварова, А.В. Брянская, А.С. Розанов, В.Н. Шляхтун, Е.А. Демидов, К.В. Старостин, Т.Н. Горячковская, С.В. Шеховцов, Н.М. Слынько, С.Е. Пельтек
- 383 **ОБЗОР**
Геномика и протеомика возбудителя описторхоза *Opisthorchis felinus*.
В.А. Мордвинов, Н.И. Ершов, О.Г. Запарина, М.Ю. Пахарукова

Медицинская генетика

- 391 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Роль полиморфных вариантов генов аргиназы (*ARG1*, *ARG2*), участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, в развитии и течении бронхиальной астмы.
О.Н. Савельева, А.С. Карунас, Ю.Ю. Федорова, Р.Р. Мурзина, А.Н. Савельева, Р.Ф. Гатиятуллин, Э.И. Эткина, Э.К. Хуснутдинова
- 399 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Полиморфизм и экспрессия генов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию.
Е.А. Блинова, В.С. Никифоров, М.А. Янишевская, А.А. Аклеев

Эволюционная генетика и видообразование

- 407 **ОБЗОР**
Причины глобальных вымираний в истории жизни: факты и гипотезы.
Т.М. Хлебодарова, В.А. Лихошвай
- 420 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Метод выявления и определения типов несоответствий между филогенетическими деревьями, построенными по ядерным и митохондриальным маркерам.
А.А. Порошина, Д.Ю. Щербаков, Т.Е. Перетолчина (на англ. языке)

Физиологическая генетика

- 427 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина у самок и самцов мышей.
Т.В. Яковлева, Н.Е. Костина, Е.Н. Макарова, Н.М. Бажан
- 435 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Апоптоз в печени самцов мышей *db/db* при развитии ожирения и сахарного диабета 2-го типа.
С.В. Мичурина, И.Ю. Ищенко, С.А. Архипов, М.А. Черепанова, Д.В. Васендин, Е.Л. Завьялов
- 441 **МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ**
Адаптация сульфопосфорованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster*.
М.А. Еремина, Н.Е. Грунтенко

Mainstream technologies in plant genetics

331 ORIGINAL ARTICLE
A high coverage reference transcriptome assembly of pea (*Pisum sativum* L.) mycorrhizal roots. A.M. Afonin, I.V. Leppyanen, O.A. Kulaeva, O.Y. Shtark, I.A. Tikhonovich, E.A. Dolgikh, V.A. Zhukov

340 REVIEW
Analysis of color and texture characteristics of cereals on digital images. E.G. Komyshev, M.A. Genaev, D.A. Afonnikov

348 REVIEW
NGS sequencing in barley breeding and genetic studies. I.V. Rozanova, E.K. Khlestkina

Plant breeding

356 REVIEW
Lodging in wheat: genetic and environmental factors and ways of overcoming. E.V. Ageeva, I.N. Leonova, I.E. Likhenko

363 ORIGINAL ARTICLE
Resistance to causal agents of late blight and golden potato nematode of the modern cultivars of seed potatoes and their phytosanitary status in various agroclimatic zones of the European part of Russia. A.V. Khiutti, D.A. Rybakov, T.A. Gavrilenko, O.S. Afanasenko

Microbial genetics

376 ORIGINAL ARTICLE
An integrated method for taxonomic identification of microorganisms. Yu.E. Uvarova, A.V. Bryanskaya, A.S. Rozanov, V.N. Shlyakhtun, E.A. Demidov, K.V. Starostin, T.N. Goryachkovskaya, S.V. Shekhovtsov, N.M. Slynko, S.E. Peltek

383 REVIEW
Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felinus*. V.A. Mordvinov, N.I. Ershov, O.G. Zapparina, M.Y. Pakharukova

Medical genetics

391 ORIGINAL ARTICLE
The role of polymorphic variants of arginase genes (*ARG1*, *ARG2*) involved in beta-2-agonist metabolism in the development and course of asthma. O.N. Savelieva, A.S. Karunas, Yu.Yu. Fedorova, R.R. Murzina, A.N. Savelieva, R.F. Gatiyatullin, E.I. Etkina, E.K. Khusnutdinova

399 ORIGINAL ARTICLE
Single nucleotide polymorphisms and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals. E.A. Blinova, V.S. Nikiforov, M.A. Yanishevskaya, A.A. Akleyev

Evolutionary genetics and speciation

407 REVIEW
Causes of global extinctions in the history of life: facts and hypotheses. T.M. Khlebodarova, V.A. Likhoshvai

420 ORIGINAL ARTICLE
Diagnosis of the mechanisms of different types of discordances between phylogenies inferred from nuclear and mitochondrial markers. A.A. Poroshina, D.Y. Sherbakov, T.E. Peretolchina

Physiological genetics

427 ORIGINAL ARTICLE
Effect of gonadectomy and estradiol on the expression of insulin signaling cascade genes in female and male mice. T.V. Iakovleva, N.E. Kostina, E.N. Makarova, N.M. Bazhan

435 ORIGINAL ARTICLE
Apoptosis in the liver of male *db/db* mice during the development of obesity and type 2 diabetes. S.V. Michurina, I.Yu. Ishchenko, S.A. Arkhipov, M.A. Cherepanova, D.V. Vasendin, E.L. Zavjalov

441 METHODS AND PROTOCOLS
Adaptation of the sulfophosphovanillin method of analysis of total lipids for various biological objects as exemplified by *Drosophila melanogaster*. M.A. Eremina, N.E. Gruntenko

A high coverage reference transcriptome assembly of pea (*Pisum sativum* L.) mycorrhizal roots

A.M. Afonin¹✉, I.V. Leppyanen¹, O.A. Kulaeva¹, O.Y. Shtark¹, I.A. Tikhonovich^{1,2}, E.A. Dolgikh¹, V.A. Zhukov¹

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

² Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: afoninalexeym@gmail.com

Abstract. Arbuscular mycorrhiza (AM) is an ancient mutualistic symbiosis formed by 80–90 % of land plant species with the obligatorily biotrophic fungi that belong to the phylum Glomeromycota. This symbiosis is mutually beneficial, as AM fungi feed on plant photosynthesis products, in turn improving the efficiency of nutrient uptake from the environment. The garden pea (*Pisum sativum* L.), a widely cultivated crop and an important model for genetics, is capable of forming triple symbiotic systems consisting of the plant, AM fungi and nodule bacteria. As transcriptomic and proteomic approaches are being implemented for studying the mutualistic symbioses of pea, a need for a reference transcriptome of genes expressed under these specific conditions for increasing the resolution and the accuracy of other methods arose. Numerous transcriptome assemblies constructed for pea did not include mycorrhizal roots, hence the aim of the study to construct a reference transcriptome assembly of pea mycorrhizal roots. The combined transcriptome of mycorrhizal roots of *Pisum sativum* cv. Frisson inoculated with *Rhizophagus irregularis* BEG144 was investigated, and for both the organisms independent transcriptomes were assembled (coverage 177x for pea and 45x for fungus). Genes specific to mycorrhizal roots were found in the assembly, their expression patterns were examined with qPCR on two pea cultivars, Frisson and Finale. The gene expression depended on the inoculation stage and on the pea cultivar. The investigated genes may serve as markers for early stages of inoculation in genetically diverse pea cultivars. Key words: RNAseq; transcriptomics; arbuscular mycorrhiza; garden pea.

For citation: Afonin A.M., Leppyanen I.V., Kulaeva O.A., Shtark O.Y., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A., Zhukov V.A. A high coverage reference transcriptome assembly of pea (*Pisum sativum* L.) mycorrhizal roots. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):331-339. DOI 10.18699/VJ20.625

Референсный транскриптом микоризованных корней гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с высоким покрытием

А.М. Афонин¹✉, И.В. Леппянен¹, О.А. Кулаева¹, О.Ю. Штарк¹, И.А. Тихонович^{1,2}, Е.А. Долгих¹, В.А. Жуков¹

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, факультет биологии, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: afoninalexeym@gmail.com

Аннотация. Арбускулярная микориза (AM) – это древний мутуалистический симбиоз, который образуют 80–90 % видов наземных растений с облигатно биотрофными грибами, принадлежащими к филе Glomeromycota. Этот симбиоз является взаимовыгодным, поскольку грибы AM питаются продуктами фотосинтеза растений, в свою очередь повышая эффективность поглощения питательных веществ растением из окружающей среды. Горох (*Pisum sativum* L.), широко распространенная сельскохозяйственная культура и важный модельный объект генетики, способен образовывать тройные симбиотические системы, состоящие из растения, грибов AM и клубеньковых бактерий. По мере распространения транскриптомных и протеомных подходов в изучении мутуалистических симбиозов гороха, для повышения разрешающей способности и точности других методов возникла необходимость в референсном транскриптоме, т.е. в знании последовательностей генов, экспрессирующихся в различных экспериментальных условиях. Многочисленные транскриптомные сборки, сконструированные для гороха, не включали микоризованные корни, поэтому целью данного исследования было создание референсной транскриптомной сборки микоризованных корней. Было проведено глубокое РНК-секвенирование транскриптома микоризованных корней *Pisum sativum* сорта Frisson, инокулированных *Rhizophagus irregularis* BEG144, и для каждого из организмов получены независимые транскриптомные сборки (покрытие 177x для транскриптома гороха и 45x для транскриптома гриба). Качество сборки транскриптома гороха оценено путем сравнения с уже имеющимися сборками транскриптомов других тканей. Для дополнительной оценки качества сборки, у двух сортов гороха (Frisson и Finale) с помощью qPCR проведен анализ экспрессии генов, специфичных для микоризованных корней, последовательности которых были найдены в созданной сборке. Исследованные гены могут служить маркерами ранних стадий развития арбускулярной микоризы у генетически разнообразных сортов гороха.

Ключевые слова: РНК-секвенирование; транскриптомика; арбускулярная микориза; горох посевной.

Introduction

Plants are able to establish mutualistic association with the arbuscular mycorrhizal (AM) fungi that improve the efficiency of nutrient uptake from the environment. About 80–90 % of all land plant species may form mutually beneficial symbiosis with the obligatorily biotrophic AM fungi that belong to the phylum Glomeromycota (Kaschuk, 2009; Alizadeh, 2011; Tisserant et al., 2012; Gutjahr, Parniske, 2013; Manck-Götzenberger, Requena, 2016). The AM facilitates plant nutrition and increases plant tolerance to biotic and abiotic stresses, when AM fungi feed on photosynthesis products and utilize a considerable proportion of the assimilated carbon (Siddiqui et al., 2008; Solaiman et al., 2014).

The garden pea (*Pisum sativum* L.) is a widely cultivated crop plant and the first model object of genetics. Similarly to other legume plants belonging to the Fabaceae family, it is capable of forming triple symbiotic systems consisting of plant, AM fungi and nodule bacteria (Tikhonovich et al., 2015). The formation of symbioses increases yield and plant fitness in general (Jacobi et al., 1999; Borisov et al., 2004; Shtark et al., 2006; Zhukov et al., 2019), although the effect of inoculation is often dependent on experimental conditions and plant genotype (Shtark et al., 2006; Zhukov et al., 2017; Mamonova et al., 2019). During the last decade, transcriptomic and proteomic approaches had been implemented for studying the mutualistic symbioses of pea, which implied the need for a reference genomic or transcriptomic sequences required for proper annotation of transcripts/proteins under analysis. Although numerous transcriptome assemblies were constructed (Franssen et al., 2011; Alves-Carvalho et al., 2015; Sudheesh et al., 2015; Zhukov et al., 2015; Kerr et al., 2017), no samples containing mycorrhizal roots had been analysed. Moreover, the only available genomic sequence (Kreplak et al., 2019) is far from ideal and lacks sequences of many important genes (for example, short peptides of NCR and defensin families).

Thus, the present work aimed at obtaining the reference transcriptome assembly of pea mycorrhizal roots using RNA-seq. In order to validate the constructed assembly, which is destined for further analysis of the mycorrhization in pea with use of transcriptomics and/or proteomics, we designed the set of primers for qPCR expression analysis and successfully quantitated the expression level of 10 AM-specific genes in mycorrhizal roots of two pea cultivars.

Materials and methods

Plants and microorganisms used. The wild-type *Pisum sativum* L. cultivars Frisson (= JI2491 (Duc, Messenger, 1989)) and Finale (= JI2678 (Engvild, 1987)) were used in this study. The fungal isolate *Rhizophagus irregularis* BEG144 was provided by the International Bank for the Glomeromycota (Dijon, France) as a substrate-root based inoculum for leek (*Allium porrum* L.) pot cultures. It was used to obtain nurse pots of chives (*Allium schoenoprasum* L.) for the *R. irregularis*-inoculated pea plants (according to (Shtark et al., 2016)).

Plant growth conditions and root sampling. In order to provide an efficient inoculation of *P. sativum* plants, nurse pots with established mycorrhiza were used. These were 300-ml ceramic flower pots filled with opoka-rock mineral substrate, which is silica rich marl (Krasnodar, Russia), supplemented with $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ calcium orthophosphate. Prior to nurse pots pre-

paration, pots with substrate were sterilized by autoclaving for 60 min at $134 \text{ }^\circ\text{C}$ and 0.22 MPa. Procedures for the chive-based nurse pots are described by (Demchenko et al., 2004; Shtark et al., 2016).

Seeds of *P. sativum* were surface-sterilised for 10 minutes with 98 % sulphuric acid, rinsed with sterile deionised water five times, and then germinated for 3 days at $27 \text{ }^\circ\text{C}$ in the dark on sterile vermiculite in Petri dishes with 30 ml of water added to each one. Three *P. sativum* seedlings of similar size were planted into each nurse pot around a mycorrhizal chive plant. Plants were grown in a growth chamber (model VB 1514, Vötsch, Germany) under the following conditions: day/night, 16/8 h; temperature, $24/22 \text{ }^\circ\text{C}$; relative humidity, 75; irradiation 10000 lux and were supplemented once a week with 1/2-x Hoagland's solution (Hoagland, Arnon, 1950) without phosphate (50 mL per pot), and watered as needed.

After several days of co-cultivation with chives in nurse pots *P. sativum* root samples were collected for transcriptome analyses and RT-qPCR (see relevant sections) and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Frozen root samples were ground in liquid nitrogen using pestle and mortar. Before collecting plant material for those analyses, several lateral roots (15 cm length) from each pea root system were randomly selected and frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ and then subjected to analysis of AM development as described by Shtark and colleagues (Shtark et al., 2016). The parameters of root colonization of these pea plants estimated according to (Trouvelot et al., 1986) were: $M \%$ (intensity of internal colonization of the root system), and $a \%$ (arbuscule abundance in mycorrhizal root fragments).

For transcriptome sequencing root samples were collected after 25 days of co-cultivation with chives. Three plants of cv. Frisson with $M \% = 68.6 \pm 2.6$, and $a \% = 50.9 \pm 1.2$ (this level of root colonization is common with this genotype (Morandi et al., 2000; Grunwald et al., 2004)), were chosen for the transcriptome analysis. The whole root systems were cut off directly below the cotyledons and frozen in liquid nitrogen in 50 mL Falcon tubes.

For RT-qPCR assays root samples were collected after 7, 14 or 28 days of co-cultivation with chives. Root samples of uninoculated plants grown under the same conditions during the same time periods were used as a control. Lateral roots were used, in which tips 1 cm long were removed. The collected samples were frozen in 2 mL Eppendorf™ tubes. The AM development was analysed at two time points (after 14 and 28 days of co-cultivation with chives). The parameters of cv. Finale root colonization were: $M \% = 17.5 \pm 2.3$, and 35.0 ± 4.7 , respectively; $a \% = 29.4 \pm 5.7$, and 36.5 ± 5.7 , respectively. This level of colonization is common with cv. Finale (Shtark et al., 2016; Leppyanen et al., 2018). The parameters of cv. Frisson root colonization were: $M \% = 44.6 \pm 4.7$, and 68.1 ± 5.4 , respectively; $a \% = 62.6 \pm 3.5$, and 65.3 ± 4.4 , respectively. This is also consistent with previous investigations; in particular it was shown that internal AM colonization and arbuscule development reaches higher values in cv. Frisson than in cv. Finale (Morandi et al., 2000; Grunwald et al., 2004).

Transcriptome sequencing. The RNA extraction, library construction and the sequencing on an Illumina 2500 HiSeq platform was carried out by GenXPro GmbH (Frankfurt-am-Main, Germany).

Read preparation. In order to remove possible human and bacterial contaminants from the raw data we used the method, devised by dr. Brian Bushnell and described in *removeHuman* tool from the *BBTools suite* (Bushnell, 2014). Additionally, reads belonging to bacteria and viruses were discarded using the databases provided by the author of the package. In order to separate fungal reads from those of pea, we first prepared the genome assembly of *Rhizophagus irregularis* strain DAOM197198 from (Tisserant et al., 2013) as described by the author of the *bbmap* package. The areas of genome, containing multiple tandem short k-mers, as well as windows of low entropy sequences, which were calculated using pentamer frequencies, were masked using the *bbmask.sh* script. In order to exclude the sequences, common between the *R. irregularis* genome and plant genomes, all the available non-draft plant genomes from the Phytozome V12 (Goodstein et al., 2012) were masked for repetitive sequences, and then used to exclude all the non-specific parts of the DAOM197198 genome as described for the *bbmask.sh* script. The resulting masked assembly was used for read mapping using the *bbmap.sh* script. All the mapped reads were considered to belong to the fungus, all the non-mapped reads were considered plant reads. The transcriptome completeness and assembly quality were assessed using BUSCO algorithm (Simão et al., 2015). Blast search was used for the comparison of the various transcriptomes.

Transcriptome assembly. The reads belonging to *Pisum* were then assembled using *Trinity* assembler (v2.6.6) (Grabherr et al., 2011) with default parameters, *rnaSPAdes* (v3.11.1) (Bankevich et al., 2012). *Corset/Lace* pipeline was used to assemble the SuperTranscriptome (Davidson et al., 2017).

The transcriptome shotgun assemblies (TSAs) from the following bioprojects were downloaded from the NCBI for comparison to current assembly: PRJNA277074 – cv. Kaspas (Sudheesh et al., 2015), PRJNA277076 – cv. Parafield (Sudheesh et al., 2015), PRJNA308776 – cv. Torsdag (Kerr et al., 2017). The assembly of the nodule transcriptome of cv. SGE (accession GDTM00000000.1) and the assembly of roots of cv. SGE (accession GDTL00000000.1) were also downloaded from the NCBI (Zhukov et al., 2015). Additionally, the assemblies from cv. Caméor (Alves-Carvalho et al., 2015) and cv. Little Marvel (Franssen et al., 2011) were downloaded from supplementary files for the respective articles. The CDS sequences from the *M. truncatula* v4.0v2 genome were used for benchmarking the assembled transcriptomes (Young et al., 2011).

The following accessions were downloaded from the NCBI in order to identify the *R. irregularis* strain closest to BEG144: GCA_000439145.3, GCA_000597565.1, GCA_000597585.1, GCA_000597605.1, GCA_000597625.1, GCA_000597645.1, GCA_000597665.1, GCA_000597685.1, GCA_001593125.1, GCA_001593145.1, GCA_001593155.1, GCA_001593205.1, GCA_002897155.1, GCA_003833045.1, GCA_003833115.1. The reads binned as belonging to the fungi were assembled *de novo* using the *Trinity* assembler. *Cufflinks* (v2.2.1) (Trapnell et al., 2010) was used to build a genome-guided assembly.

Annotation. CDS discovery for both the organisms was performed using the *transdecoder* (v5.2.0) algorithm (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/>). Both the *hmm* and the *blast* homology search options were used, according to the

Table 1. Constructed primers used for qPCR

Name	Sequence, 5'-3'
<i>PsUbiquitin-F</i>	ATGCAGATYTTTGTGAAGAC
<i>PsUbiquitin-R</i>	ACCACCACGRAGACGGAG
<i>PsActin-F</i>	CTCAGCACCTTCCAGCAGATGTG
<i>PsActin-R</i>	CTTCTTATCCATGGCAACATAGTTC
<i>PsAJ308147-F</i>	TTAGGGGCTAGAAAATTTGGCATC
<i>PsAJ308147-R</i>	AACATGGACCCTCTCCATCAAC
<i>PsAJ308164-F</i>	AAAGAAACTGAAAAGTTGTGAGATTC
<i>PsAJ308164-R</i>	TCACTTCATTGCTTTTGAGGGC
<i>PsAJ308156-F</i>	CAAAGCGTCTCTGTACATCCG
<i>PsAJ308156-R</i>	ATCTTCTCATCAAGACCAGCACC
<i>PsAJ308170-F</i>	GAAGGGAAGTAGGAAATGAAAAGTTG
<i>PsAJ308170-R</i>	CCAGAACTAGTCTCCAAACTCAC
<i>PsMAPK-F</i>	TGCACTGGCACACCCTTACTTG
<i>PsMAPK-R</i>	CTGCTGGTACTCGGGGTAAATG
<i>PsPR6-F</i>	CCCGTGTGGTTGACCTCATTG
<i>PsPR6-R</i>	GATCATAGTGTGAAACTTGATTAGTACAG
<i>PsRAD1-F</i>	GAAAAGACCAACCGTAACTATCCC
<i>PsRAD1-R</i>	GAAGTAGTCTCATTCCATCAGCACA
<i>PsVPN-F</i>	ATAGCAGCAGCCAATGGAGATG
<i>PsVPN-R</i>	CCACCACTTTCCAAAACCTTT

Note: Melting point (Tm) for every primer was 54 °C.

manual. The annotation was performed using the EggNOG 5.0 database using the *eggNOG-mapper* (v2.0.1) (Huerta-Cepas et al., 2016).

In order to determine the best overall assembly, the three transcriptomes were evaluated using the *BUSCO* tool (Simão et al., 2015).

RT-qPCR. Total RNA was isolated using the TriZol reagent (ThermoScientific, USA). cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (ThermoScientific, USA) and oligo-dT primers (Evrogen, Russia; www.evrogen.com). RT-qPCR was performed on the CFX-96 C1000 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, USA) with the double-stranded DNA dye SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, USA). The data was analysed using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (Livak, Schmittgen, 2001). PCR amplification was confirmed with the dissociation curve method (55 to 95 °C). mRNA levels were normalised in relation to the ubiquitin and actin reference genes. Three biological replicates were analysed. The primers were constructed using the Vector NTI suite (Lu, 2004) (Table 1). The expression levels of the genes of interest (GOI) relative to the reference genes *Ubiquitin* and *Actin* were calculated for each cDNA sample using the CFX Manager™ software version 2.1 (BioRad Laboratories, USA). The expression levels of GOI were calculated as ratio of treated samples to control samples. Statistical analysis was conducted by SIGMAPLOT 13 (Systat Software, Inc., San Jose California, USA).

Results and discussion

In order to obtain a reference transcriptome of the mycorrhizal roots of *P. sativum*, the RNA from this tissue was sequenced on an Illumina 2500 sequencing platform.

A total of 120 mln pairs of reads with average length of 150 bp were obtained. After quality trimming 119 mln reads remained. Since we knew, that *R. irregularis* transcripts are present in the tissues, we decided to remove all possible contaminants (as described in the Materials and methods section). Additionally, we masked low complexity regions and repetitive elements from *R. irregularis* genome. Of the 119 mln remaining reads 6.7 mln (approximately 5 %) of the paired reads were mapped onto the masked *Rhizophagus* genome.

The resulting reads belonging to *P. sativum* were then assembled using two assemblers: *Trinity* with default parameters and *rnaSPAdes* with default parameters. Afterwards, with use of *Corset/Lace* pipeline, a SuperTranscripts assembly was constructed using these two assemblies comprising 94360 supertranscripts (Table 2).

Transcriptome evaluation

In order to determine the best overall assembly, the three transcriptomes were evaluated using the *BUSCO* tool. Results of the analysis are presented in the Table 3.

As *BUSCO* tends to favor the number of transcripts, the *Trinity* assembly scored higher than the SuperTranscripts assembly, despite the latter containing the former. The other comparisons, such as N50 and the duplication numbers speak in favor of the SuperTranscripts assembly.

The resulting SuperTranscripts assembly, as well as the other two assemblies, the table of relation between the assemblies and the full results of are available at the (<https://cloud.arriam.ru/s/RKD67CZak58BzzN>).

Since the SuperTranscript assembly contains the two other assemblies, it was used to compare to all available pea transcriptome assemblies. The comparison was performed using the BLASTN algorithm (e-value < 10⁻¹⁰, identity > 90 %, query coverage > 90 %), the results are presented in the Table 4.

The low numbers of query matches in the case of the cv. Caméor is most probably due to the fact, that the transcriptome in this study represents a single, rather than multiple, plant tissues.

All the available pea transcriptomes were compared to the latest *Medicago truncatula* Gaertn. transcriptome in order to determine the fullness of the transcriptomes and the number of novel transcripts (Table 5). Our assembly had an almost identical number of transcripts, homologous to those of *M. truncatula* as the more diverse transcriptomes of cv. Kaspá, cv. Parafield, and cv. Caméor, and also showed a large number of previously undiscovered transcripts.

Determining the specificity of inoculation

In order to check for possible rhizobial contamination and formation of nodules possibly missed during sample preparation we decided to search for nodule specific proteins. Since the expression counts for a single RNAseq analysis cannot be considered statistically significant, we chose instead to search for contigs, encoding proteins, specific to nodules – NCR peptides (Zorin et al., 2019). Using the approach from

Table 2. Comparison of transcriptome assemblies' parameters

Parameters	SPAdes	Trinity	SuperTranscripts
Identified "genes"	136817	71149	94360
Identified isoforms	139631	182345	190210
Longest isoform	16300	15688	16300
Average isoform length	812	1110	1277
Transcript n50	884	2168	4357

Note: The estimated coverage for the transcriptome was 177x.

Table 3. The comparison of the transcriptome assemblies using the *BUSCO* tool

Transcriptome assembly	Complete and single-copy	Complete and duplicated	Fragmented	Missing
SPAdes	852	284	119	185
SuperTranscripts	454	707	109	170
Trinity	597	665	63	115

Table 4. The results of comparison of the SuperTranscripts assembly to the other available transcriptome assemblies

Transcriptome	# of query matches	# of SuperTranscripts matches
cv. Kaspá	68210 (54 %)	51787 (54 %)
cv. Parafield	73966 (50 %)	52932 (56 %)
cv. Caméor	26734 (51 %)	42059 (44 %)
cv. SGE nodules	45081 (77 %)	40290 (42 %)
cv. SGE roots	32228 (86 %)	34739 (36 %)
cv. Torsdag	76244 (39 %)	41683 (43 %)
cv. Little Marvel	48964 (60 %)	25982 (27 %)

Table 5. The results of comparison of the pea transcriptome assemblies (query) to the *M. truncatula* transcriptome (reference)

Transcriptome	# of reference matches	# of query matches
cv. Kaspá	43772 (76 %)	62335 (49 %)
cv. Parafield	43931 (76 %)	67221 (46 %)
cv. Caméor	45004 (78 %)	35602 (68 %)
cv. SGE nodules	41639 (72 %)	40414 (69 %)
cv. SGE roots	39298 (68 %)	29188 (78 %)
cv. Torsdag	43914 (76 %)	117639 (60 %)
cv. Little Marvel	35048 (60 %)	59517 (73 %)
SuperTranscripts	44068 (76 %)	59029 (62 %)

Note: e-value < e⁻¹⁰, query coverage > 80 %, identity > 60 %.

that article, we found only 28 genes of the NCR gene family in the newly assembled transcriptome, compared to 40 in the cv. SGE root tips and 425 in the cv. SGE nodules. Therefore, it is reasonable to assume that the plants were not accidentally infected with rhizobia, and thus are representative of a fungal monoinoculation.

Table 6. The results of mapping of fungal reads onto the transcriptome assemblies of *R. irregularis* from the NCBI

The accession of <i>R. irregularis</i> genome assembly	The percentage of mapped reads
GCA_001593125.1 (A1)	84.99
GCA_000597645.1	82.73
GCA_000597665.1	73.00
GCA_000597685.1	70.37
GCA_001593205.1	69.84
GCA_003833045.1	68.33
GCA_001593145.1	66.08
GCA_002897155.1	65.93
GCA_001593155.1	65.02
GCA_003833115.1	62.08
GCA_000597625.1	61.37
GCA_000597605.1	47.71
GCA_000597565.1	44.23
GCA_000597585.1	37.80

Note: *BBmap.sh* tool was used to map the reads against the genomes.

Table 7. Comparison of *R. irregularis* transcriptome assemblies

Transcriptome assembler	Trinity	Cufflinks
Identified "genes"	17425	10488
Identified isoforms	28074	14561
Longest isoform	13072	13849
Average isoform length	1070.77	1451.65
Transcript n50	1861	1869

Novel transcripts of *Rhizophagus irregularis*

Since for now there is no published genome available for the strain BEG144 used in this study, we decided to determine the closest related strain in the NCBI database. To do this, we downloaded all the available *R. irregularis* genomes and mapped the filtered transcripts using *bbmap.sh* to the genomes. The best overall mapping was to the strain A1 of *R. irregularis* GCA_001593125.1 (registered bioproject url: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA299202/>).

This genome was used for a genome-guided Cufflinks assembly. The mapping results are presented in the Table 6.

Genome guided Trinity assembly did not yield any assembled contigs, possibly due to the lower coverage of the fungal genome, so a de-novo assembly of the fungal transcriptome was performed. The results of the assemblies are present in the Table 7.

The likely protein-coding genes from the assemblies were identified by *transdecoder* (see Materials and methods section). The Cufflinks assembly contained 12036 (77.8 %) protein-coding genes, whereas the Trinity assembly contained 17909 (63.7 %). After comparing the assemblies with the blast algorithm we discovered that 8301 (68 %) of Cufflinks CDS-containing transcripts corresponded to 12036 (60.1 %) of CDS-containing transcripts of Trinity. The rest of the transcripts, unique to the Trinity assembly may represent the parts of genome different between the strain BEG144 and the strain used as the reference. The low coverage and the unavailability of the genome of the strain BEG144 make it harder to distinguish the real transcripts from the chimeric. The results, however, show the usability of proposed methods to assemble the transcriptomes of mixed samples, even in the absence of high-quality reference genomes.

RT-qPCR of AM-specific genes

In order to study the inoculation effects in detail and to monitor the AM development during the experiments, the set of marker genes with AM-specific expression pattern was required. In previous work by Grunwald et al. (2004), a set of 25 genes which were upregulated more than in 2.5 times in response to inoculation with AM fungus in roots of pea cultivar Finale was identified using suppressive subtractive hybridization. We selected eight of them for the present study and supplemented this list with the well-characterized mycorrhiza-related genes encoding the transcription factor RAD1 and the VAPYRIN protein for analysis (Pumplin et al., 2010; Murray et al., 2011; Park et al., 2015). In order to find the sequences of 10 AM-specific genes of cv. Frisson, a BLASTN search of corresponding genes was performed against the newly created SuperTranscripts transcriptome assembly. The accessions are presented in Table 8. We compared the RT-PCR expression

Table 8. Genes chosen according to (Grunwald et al., 2004) and their corresponding accessions in the SuperTranscripts assembly

Accession #	Encoded gene	SuperTranscripts	ID
AJ308129	Methallothionein	Cluster-40920.0	129
AJ308147	GDSL-motif lipase/acylhydrolase	Cluster-12403.0	147
AJ308148	MAP kinase	Cluster-38009.0	MAPK
AJ308156	Translation initiation factor 1α	Cluster-9362.0	156
AJ308158	Proteinase inhibitor PR6	Cluster-38215.1	PR6
AJ308163	Trypsin inhibitor	Cluster-56992.0	TI
AJ308164	Putative lipid-transfer protein	Cluster-57882.0	164
AJ308170	Polyphosphate inosite-binding protein	Cluster-48448.0	170
Medtr4g104020.1	Transcription factor RAD1	Cluster-11628.0	RAD1
Medtr6g027840.1	VAPYRIN	Cluster-42154.0	VPN

Note: "ID" column contains the chosen shorter names, used in the text and figures.

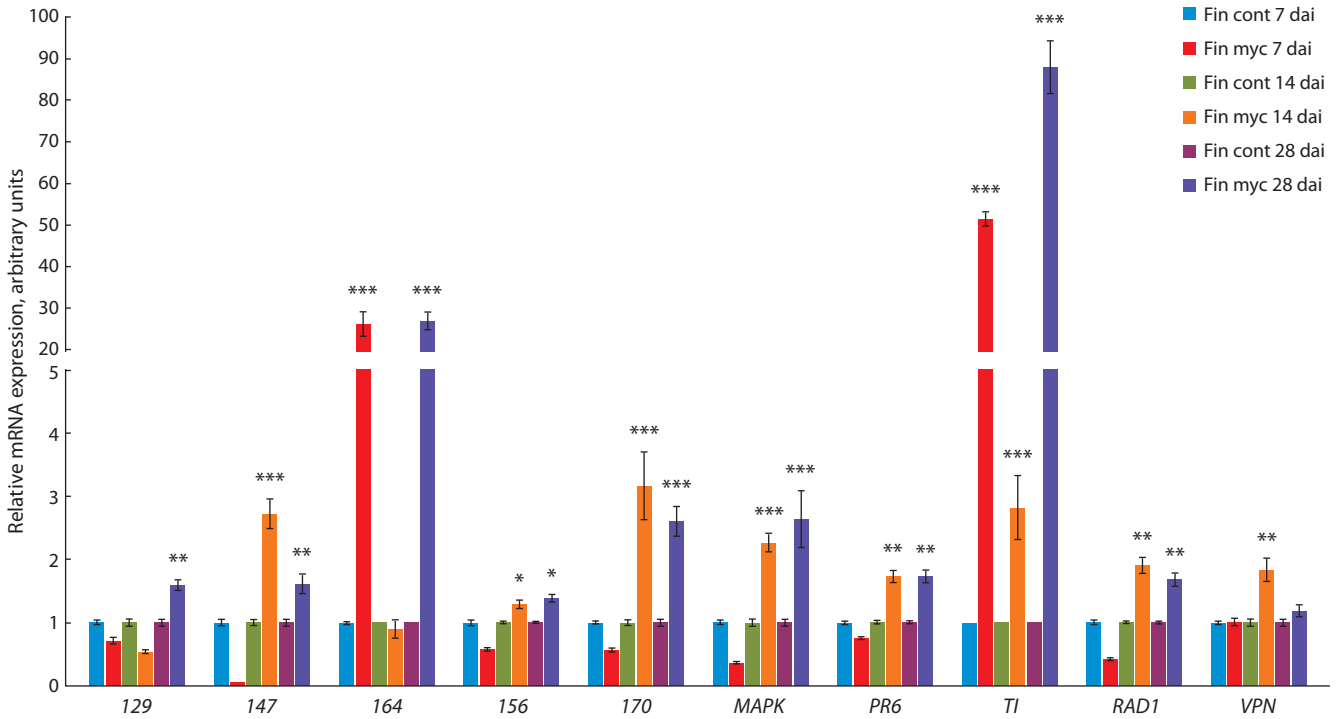


Fig. 1. Transcript levels of genes encoding markers of AM development in pea roots of cv. Finale infected with *R. irregularis* after 7, 14 and 28 days. Here and in Figure 2: uninoculated plant roots were used as control (cont); the treatment was mycorrhization (myc). The relative expression was normalized against the constitutively expressed ubiquitin and actin genes. Values are means \pm SEM of three technical repeats. The graphs show the results of one biological replication, representative of three biological independent experiments, the asterisks indicate the significant differences between control and treatment as analysed by Student's *t*-test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

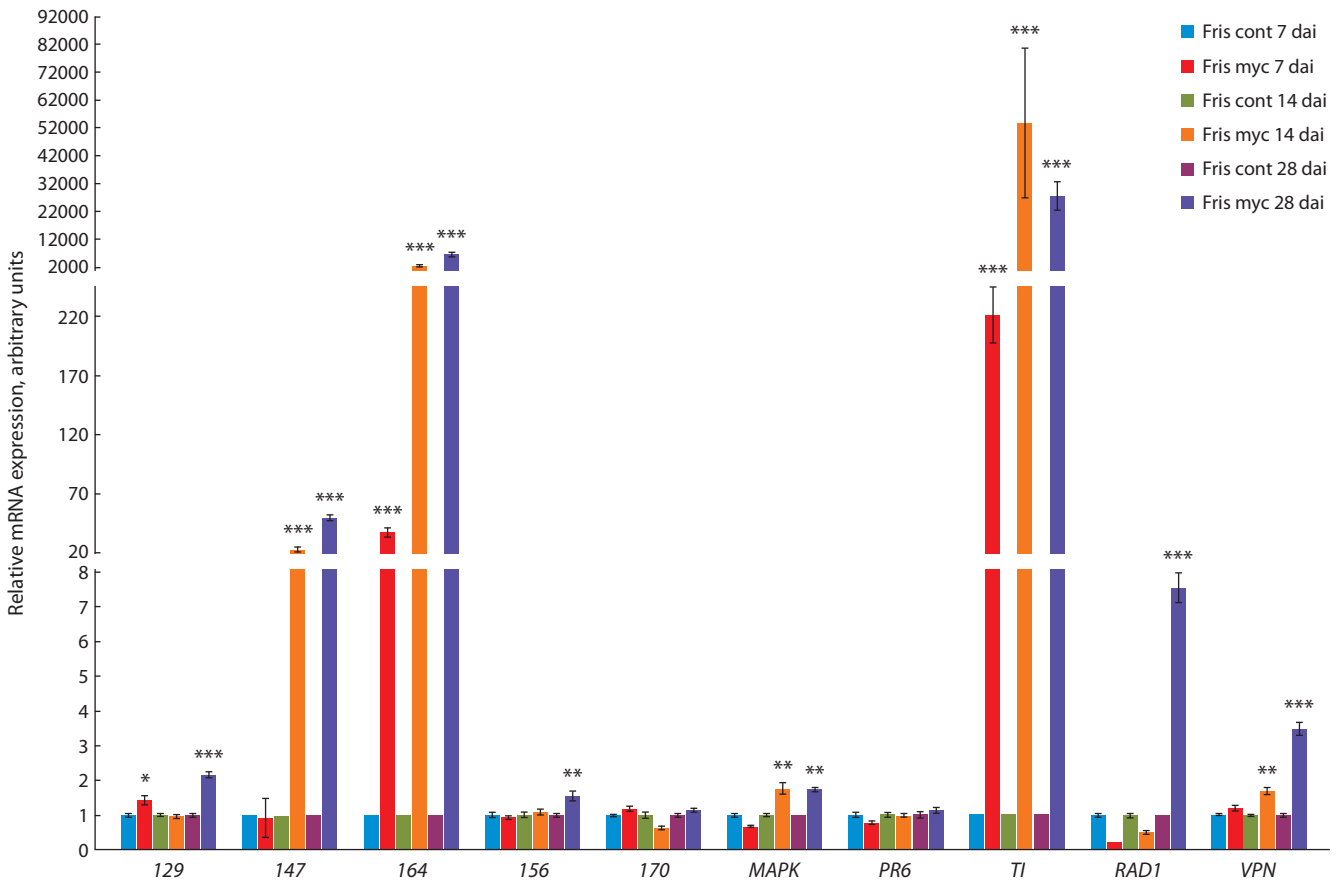


Fig. 2. Transcript levels of genes encoding markers of AM development in pea roots of cv. Frisson infected with *R. irregularis* after 7, 14, and 28 days.

patterns for chosen genes in cv. Finale as well as cv. Frisson pea plants (Grunwald et al., 2004). The used primers are presented in the Table 1.

This allowed the identification of predicted full-length sequences for genes of interest. The expression of 10 genes was investigated by RT-PCR using RNA from control and inoculated roots of cv. Finale and cv. Frisson on several days after inoculation (dai) (Figure 1, 2). The cv. Finale was chosen to compare the results with previously obtained data for this genotype, while cv. Frisson was used for analysis, because the newly created transcriptome was assembled for this cultivar. Indeed up-regulation of a number of genes was confirmed by RT-PCR using RNA from controls and mycorrhiza-inoculated pea roots of cv. Frisson and cv. Finale. The expression of RAD1 and VAPYRIN genes was mainly enhanced at stages of symbiosis development related to AM fungal colonization of root cells and arbuscules formation (14–28 dai). The similar results were previously obtained for model legume plant *M. truncatula* (Pumplin et al., 2010; Murray et al., 2011; Park et al., 2015).

The highest levels of expression were found for four genes encoding GDSL-motif lipase/acylhydrolase (*I47*), MAP kinase (*MAPK*), trypsin inhibitor (*TI*) and putative lipid-transfer protein (*I64*) in both genotypes (see Figures 1, 2). It is in a good agreement with previous results (Grunwald et al., 2004). It is interesting to note that activation of *TI* and *I64* was connected with early stages of AM symbiosis development such as 7 dai. These markers may be helpful to estimate the inoculation effect, because usually visible signs of inoculation seem to be connected with later stages of symbiosis between pea plants and AM fungi like 14 dai. At the same time some cultivar-specific mycorrhiza-related pattern of expression was found in our experiments. It was shown for gene *I70* with high level of expression in cv. Finale, but not in cv. Frisson (see Figure 1, 2). Moderate level of expression was shown for the stress-related genes like *I29* and *PR6* in our experiments that may be due to differences in experimental conditions as compared to previous study (Grunwald et al., 2004).

Conclusion

Studies on model legume plants *M. truncatula* and *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen resulted in the description of the molecular mechanisms underlying the formation and functioning of the symbioses (Gutjahr, Parniske, 2013; Gobbato, 2015; Pimprikar, Gutjahr, 2018). However, for the agriculturally important legume plants, the information regarding the molecular bases of AM and root nodule symbiosis (RNS) is still limited. As for the garden pea, about 40 regulatory symbiotic genes are known (Zhukov et al., 2016), of which about a half are attributed to the ‘common’ symbiotic genes needed for both AM and RNS (Borisov et al., 2007). The recent development of transcriptome sequencing technologies has made it possible to analyze the molecular machinery of symbiotic nodules and, in particular, to pinpoint the single nucleotide deletion mutation in important symbiotic gene *Sym33* (*IPD3*) (Zhernakov et al., 2019). Our first assembled transcriptome of mycorrhizal pea roots will help in characterization of the key plant genes involved in the regulation of mycorrhizal symbiosis and, therefore, will be a basis for the future advances in our understanding of plant-microbe inter-

actions. The AM-specific genes that we selected on the base of this reference transcriptome may also serve as markers of successful colonisation in inoculation experiments, which is important for analysing the early stages of mycorrhization, when intraradical mycelium is almost invisible.

References

- Alizadeh O. Mycorrhizal symbiosis. *Adv. Stud. Biol.* 2011;3(6):273-281.
- Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., Cruaud C., Brochot A.L., Jacquain F., Klein A., Martin C., Boucherot K., Kreplak J., Da Silva C., Moreau S., Gamas P., Wincker P., Gouzy J., Burstin J. Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *Plant J.* 2015;84(1):1-19. DOI 10.1111/tpj.12967.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5):455-477. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.
- Borisov A., Vasil'chikov A., Voroshilova V., Danilova T., Zhernakov A., Zhukov V., Koroleva T., Kuznetsova E., Madsen L., Mofett M., Naumkina T., Nemankin T., Ovchinnikova E., Pavlova Z., Petrova N., Pinaev A., Radutoiu S., Rozov S., Rychagova T., Solovov I., Stougaard J., Topunov A., Weeden N., Tsyganov V., Shtark O., Tikhonovich I. Regulatory genes of garden pea (*Pisum sativum* L.) controlling the development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza: a review of basic and applied aspects. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2007;43(3):237-243. DOI 10.1134/S0003683807030027.
- Borisov A.Y., Danilova T.N., Koroleva T.A., Naumkina T.S., Pavlova Z.B., Pinaev A.G., Shtark O.Y., Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application. *Biologia (Bratislava)*. 2004;59(13):137-144.
- Bushnell B. BBMap. 2014. Available at: sourceforge.net/projects/bbmap/
- Davidson N.M., Hawkins A.D.K., Oshlack A. SuperTranscripts: a data driven reference for analysis and visualisation of transcriptomes. *Genome Biol.* 2017;18:148. DOI 10.1186/s13059-017-1284-1.
- Demchenko K., Winzer T., Stougaard J., Parniske M., Pawlowski K. Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol.* 2004;163(2):381-392. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01123.x.
- Duc G., Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Sci.* 1989;60(2):207-213. DOI 10.1016/0168-9452(89)90168-4.
- Engvild K.C. Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, *Pisum sativum*. *Theor. Appl. Genet.* 1987;74(6):711-713. DOI 10.1007/BF00247546.
- Franssen S.U., Shrestha R.P., Bräutigam A., Bornberg-Bauer E., Weber A.P. Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. *BMC Genomics.* 2011;12(1):227. DOI 10.1186/1471-2164-12-227.
- Gobbato E. Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015;26:1-7. DOI 10.1016/j.pbi.2015.05.006.
- Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):D1178-D1186. DOI 10.1093/nar/gkr944.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Bir-

- ren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(7):644-652. DOI 10.1038/nbt.1883.
- Grunwald U., Nyamsuren O., Tamasloukht M., Lapopin L., Becker A., Mann P., Gianinazzi-Pearson V., Krajinski F., Franken P. Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. *Plant Mol. Biol.* 2004;55(4):553-566. DOI 10.1007/s11103-004-1303-y.
- Gutjahr C., Parniske M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2013;29(1):593-617. DOI 10.1146/annurev-cellbio-101512-122413.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agric. Exp. Station.* 1950; 347(2).
- Huerta-Cepas J., Szklarczyk D., Forslund K., Cook H., Heller D., Walter M.C., Rattei T., Mende D.R., Sunagawa S., Kuhn M., Jensen L.J., von Mering C., Bork P. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D286-D293. DOI 10.1093/nar/gkv1248.
- Jacobi L.M., Kukalev A.S., Ushakov K.V., Tsyganov V.E., Provorov N.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I. Genetic variability of garden pea (*Pisum sativum* L.) for symbiotic capacities. *Pisum Genet.* 1999; 31:44-45.
- Kaschuk G. Sink Stimulation of Leaf Photosynthesis by the Carbon Costs of Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Fungal Symbioses. Wageningen, Wageningen Univ., S.n., 2009.
- Kerr S.C., Gaiti F., Beveridge C.A., Tanurdzic M. *De novo* transcriptome assembly reveals high transcriptional complexity in *Pisum sativum* axillary buds and shows rapid changes in expression of diurnally regulated genes. *BMC Genomics.* 2017;18(1):221. DOI 10.1186/s12864-017-3577-x.
- Kreplak J., Madoui M.A., Cápál P., Novák P., Labadie K., Aubert G., Bayer P.E., Gali K.K., Syme R.A., Main D., Klein A., Bérard A., Vrbová I., Fournier C., D'Agata L., Belser C., Berrabah W., Toegelová H., Milec Z., Vrána J., Lee H.T., Kougbeadjo A., Térézol M., Huneau C., Turo C.J., Mohellibi N., Neumann P., Falque M., Gallardo K., McGee R., Tar'an B., Bendahmane A., Aury J.M., Batley J., Le Paslier M.C., Ellis N., Warkentin T.D., Coyne C.J., Salse J., Edwards D., Lichtenzweig J., Macas J., Doležel J., Wincker P., Burstin J. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nat. Genet.* 2019;51(9):1411-1422. DOI 10.1038/s41588-019-0480-1.
- Leppyanen I.V., Shakhnazarova V.Y., Shtark O.Y., Vishnevskaya N.A., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Receptor-like kinase LYK9 in *Pisum sativum* L. is the CERK1-like receptor that controls both plant immunity and AM symbiosis development. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19:8. DOI 10.3390/ijms19010008.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
- Lu G. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinformatics.* 2004;5(4):378-388. DOI 10.1093/bib/5.4.378.
- Mamontova T., Afonin A.M., Ihling C., Soboleva A., Lukasheva E., Sulima A.S., Shtark O.Y., Akhtemova G.A., Povydysh M.N., Sinz A., Frolov A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecules.* 2019;24(8):1603. DOI 10.3390/molecules24081603.
- Manck-Götzenberger J., Requena N. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato *SWEET* sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* 2016;7:487. DOI 10.3389/fpls.2016.00487.
- Morandi D., Sagan M., Prado-Vivant E., Duc G. Influence of genes determining supernodulation on root colonization by the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* mutants. *Mycorrhiza.* 2000;10(1):37-42. DOI 10.1007/s005720050285.
- Murray J.D., Muni R.R.D., Torres-Jerez I., Tang Y., Allen S., Andriankaja M., Li G., Laxmi A., Cheng X., Wen J., Vaughan D., Schultze M., Sun J., Charpentier M., Oldroyd G., Tadege M., Ratet P., Mysore K.S., Chen R., Udvardi M.K. *Vapyrin*, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *Plant J.* 2011;65(2):244-252. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04415.x.
- Park H.J., Floss D.S., Levesque-Tremblay V., Bravo A., Harrison M.J. Hyphal branching during arbuscule development requires *Reduced Arbuscular Mycorrhizal*. *Plant Physiol.* 2015;169(4):2774-2788. DOI 10.1104/pp.15.01155.
- Pimprikar P., Gutjahr C. Transcriptional regulation of arbuscular mycorrhiza development. *Plant Cell Physiol.* 2018;59(4):876. DOI 10.1093/pcp/pcy024.
- Pumplin N., Mondo S.J., Topp S., Starker C.G., Gantt J.S., Harrison M.J. *Medicago truncatula* *Vapyrin* is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J.* 2010;61(3):482-494. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.04072.x.
- Shtark O.Y., Danilova T.N., Naumkina T.S., Vasilchikov A.G., Chebotar V.K., Kazakov A.E., Zhernakov A.I., Nemankin T.A., Prilepskaya N.A., Borisov A.U., Tikhonovich I.A. Analysis of pea (*Pisum sativum* L.) source material for breeding of cultivars with high symbiotic potential and choice of criteria for its evaluation. *Ecol. Genet.* 2006;4(2):22-28. DOI 10.17816/ecogen4222-28.
- Shtark O.Y., Sulima A.S., Zhernakov A.I., Kliukova M.S., Fedorina J.V., Pinaev A.G., Kryukov A.A., Akhtemova G.A., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Arbuscular mycorrhiza development in pea (*Pisum sativum* L.) mutants impaired in five early nodulation genes including putative orthologs of *NSP1* and *NSP2*. *Symbiosis.* 2016; 68(1-3):129-144. DOI 10.1007/s13199-016-0382-2.
- Siddiqui Z.A., Akhtar M.S., Futai K. (Eds.). *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer, 2008. DOI 10.1007/978-1-4020-8770-7.
- Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics.* 2015;31(19): 3210-3212. DOI 10.1093/bioinformatics/btv351.
- Solaiman Z., Abbott L.K., Varma A. (Eds.). *Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. DOI 10.1007/978-3-662-45370-4.
- Sudheesh S., Sawbridge T.I., Cogan N.O., Kennedy P., Forster J.W., Kaur S. *De novo* assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNA-Seq. *BMC Genomics.* 2015;16(1):611. DOI 10.1186/s12864-015-1815-7.
- Tikhonovich I.A., Andronov E.E., Borisov A.Y., Dolgikh E.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Provorov N.A., Roumiantseva M.L., Simarov B.V. The principle of genome complementarity in the enhancement of plant adaptive capacities. *Russ. J. Genet.* 2015;51(9): 831-846. DOI 10.1134/S1022795415090124.
- Tisserant E., Kohler A., Dozolme-Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., Colard A., Croll D., ... Shachar-Hill Y., Tuskan G., Young J.P.W., Gianinazzi-Pearson V., Martin F. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol.* 2012;193(3):755-769. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.03948.x.
- Tisserant E., Malbreil M., Kuo A., Kohler A., Symeonidi A., Balestrini R., Charron P., ... Rensing S.A., Grigoriev I.V., Corradi N., Roux C., Martin F. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(50):20117-20122. DOI 10.1073/pnas.1313452110.
- Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., Van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B.J., Pachter L. Transcript assem-

- bly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* 2010;28(5):511-515. DOI 10.1038/nbt.1621.
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Mycorrhizae: Physiologie et Génétique.* 1986;217-221.
- Young N.D., Debelle F., Oldroyd G.E.D., Geurts R., Cannon S.B., Udvardi M.K., Benedito V.A., ... Schwartz D.C., Rogers J., Quétier F., Town C.D., Roe B.A. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature.* 2011;480:520-524. DOI 10.1038/nature10625.
- Zhernakov A.I., Shtark O.Y., Kulaeva O.A., Fedorina J.V., Afonin A.M., Kitaeva A.B., Tsyganov V.E., Afonso-Grunz F., Hoffmeier K., Rötter B., Winter P., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Mapping-by-sequencing using NGS-based 3'-MACE-Seq reveals a new mutant allele of the essential nodulation gene *Sym33 (IPD3)* in pea (*Pisum sativum* L.). *PeerJ.* 2019;7. DOI 10.7717/peerj.6662.
- Zhukov V.A., Akhtemova G.A., Zhernakov A.I., Sulima A.S., Shtark O.Yu., Tikhonovich I.A. Evaluation of the symbiotic effectiveness of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes in pot experiment. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2017; 52(3):607-614. DOI 10.15389/agrobiol.2017.3.607eng.
- Zhukov V.A., Shtark O.Y., Nemankin T.A., Kryukov A.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Genetic mapping of pea (*Pisum sativum* L.) genes involved in symbiosis. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2016;51(5):593-601. DOI 10.15389/agrobiol.2016.5.593eng.
- Zhukov V.A., Shtark O.Y., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., Yurkov A.P., Smolikova G.N., Yemelyanov V.V., Kliukova M.S., Shavarda A.L., Kirpichnikova A.A., Zhernakov A.I., Afonin A.M., Tikhonovich I.A., Shishova M.F. Metabolic alterations in pea leaves during arbuscular mycorrhiza development. *PeerJ.* 2019; DOI 10.7717/peerj.7495.
- Zhukov V.A., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Ershov N.I., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. *De novo* assembly of the pea (*Pisum sativum* L.) nodule transcriptome. *Int. J. Genomics.* 2015:695947. DOI 10.1155/2015/695947.
- Zorin E.A., Kliukova M.S., Kulaeva O.A., Afonin A.M., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Identification of sequences encoding for NCR-peptides and defensins in the "meta-assembly" of transcriptome of pea (*Pisum sativum* L.) nitrogen-fixing nodules. *Ecol. Genet.* 2019;17(3):39-46. DOI 10.17816/ecogen17339-17346.

Data availability. All the data described in this project are available in the NCBI database under the Bioproject PRJNA592445. This Transcriptome Shotgun Assembly project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession GICP00000000. The version described in this paper is the first version, GICP01000000. The additional transcriptome assemblies are available at <https://cloud.rriam.ru/s/RKD67CZak58BzzN>

Acknowledgements. The work of A.M. Afonin, O.A. Kulaeva, O.Y. Shtark, I.A. Tikhonovich and V.A. Zhukov on pea transcriptome sequencing, assembly and analysis was supported by the Russian Science Foundation grant # 16-16-00118. The work of I.V. Leppyanen and E.A. Dolgikh on primer design and analysis of expression of the marker genes was supported by the Russian Science Foundation grant # 16-16-10043.

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

Received December 5, 2019. Revised May 10, 2020. Accepted May 11, 2020.

Анализ цветowych и текстурных характеристик зерен злаков на цифровых изображениях

Е.Г. Комышев^{1, 2}✉, М.А. Генаев^{1, 2, 3}, Д.А. Афонников^{1, 2, 3}

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

² Курчатовский геномный центр Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: komyshev@bionet.nsc.ru

Аннотация. Цвет оболочки зерен злаков – важный признак, характеризующий содержащиеся в ней пигменты и метаболиты. Оболочка зерна служит основным барьером между зерном и внешней средой, поэтому с ее характеристиками связан ряд важных биологических функций: поглощение влаги, жизнеспособность зерна, устойчивость к предуборочному прорастанию. Наличие пигментов в оболочке влияет на различные технологические свойства зерна. Цветовые характеристики, как и внешний вид оболочки, зерна, – важный индикатор заболеваний растений. Цвет зерна давно используется в систематике пшеницы для описания ее ботанических разновидностей, и для некоторых систем это одна из основных характеристик. Генетический контроль формирования окраски зерен и других органов растений осуществляется генами, кодирующими ферменты, вовлеченные в биосинтез пигментов, и регуляторными генами. Для ряда пигментов эти гены исследованы достаточно хорошо, однако для некоторых пигментов, например меланина, обуславливающего черную окраску зерен у ячменя, молекулярные механизмы биосинтеза еще слабо изучены. При исследовании механизмов генетического контроля окраски зерен селекционеры и генетики постоянно сталкиваются с необходимостью оценки цветowych характеристик их оболочки. К техническим средствам решения этой задачи относятся спектрофотометры, спектрометры, гиперспектральные камеры. Однако эти камеры дорогостоящие, в особенности с высоким разрешением, как пространственным, так и спектральным. Альтернативой является использование цифровых фотокамер, позволяющих получать высококачественные изображения с высоким пространственным и цветowym разрешением. В связи с этим в последнее время в области фенотипирования растений интенсивно развиваются методы оценки цветowych и текстурных характеристик зерен злаков, основанные на анализе двумерных изображений, полученных цифровыми камерами. Данный мини-обзор посвящен основным задачам, связанным с анализом цветowych и текстурных характеристик зерен злаков, методам их описания на основе цифровых изображений.

Ключевые слова: цвет; текстура; цифровые изображения; анализ изображений; зерна злаков.

Для цитирования: Комышев Е.Г., Генаев М.А., Афонников Д.А. Анализ цветowych и текстурных характеристик зерен злаков на цифровых изображениях. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):340-347. DOI 10.18699/VJ20.626

Analysis of color and texture characteristics of cereals on digital images

E.G. Komyshev^{1, 2}✉, M.A. Genayev^{1, 2, 3}, D.A. Afonnikov^{1, 2, 3}

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

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: komyshev@bionet.nsc.ru

Abstract. The color of the grain shell of cereals is an important feature that characterizes the pigments and metabolites contained in it. The grain shell is the main barrier between the grain and the environment, so its characteristics are associated with a number of important biological functions: moisture absorption, grain viability, resistance to pre-harvest germination. The presence of pigments in the shell affects various technological properties of the grain. Color characteristics, as well as the appearance of the grain shell are an important indicator of plant diseases. In addition, the color of the grains serves as a classifying feature of plants. Genetic control of the color formation of both grains and other plant organs is exerted by genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of pigments, as well as regulatory genes. For a number of pigments, these genes are well understood, but for some pigments, such as melanin, which causes the black color of grains in barley, the molecular mechanisms of biosynthesis are still poorly understood. When studying the mechanisms of genetic control of grain color, breeders and

geneticists are constantly faced with the need to assess the color characteristics of their shell. The technical means of addressing this problem include spectrophotometers, spectrometers, hyperspectral cameras. However, these cameras are expensive, especially with high resolution, both spatial and spectral. An alternative is to use digital cameras that allow you to get high-quality images with high spatial and color resolution. In this regard, recently, in the field of plant phenotyping, methods for evaluating the color and texture characteristics of cereals based on the analysis of two-dimensional images obtained by digital cameras have been intensively developed. This mini-review is devoted to the main tasks related to the analysis of color and texture characteristics of cereals, and to methods of their description based on digital images.

Key words: color; texture; digital images; image analysis; cereal grains.

For citation: Komyshev E.G., Genaev M.A., Afonnikov D.A. Analysis of color and texture characteristics of cereals on digital images. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):340-347. DOI 10.18699/VJ20.626

Введение

Цвет оболочки зерен злаков – важный признак, он характеризует пигменты и метаболиты, содержащиеся в ней. Фиолетовая и голубая окраска зерен определяется наличием антоцианов, желтоватый цвет может быть вызван присутствием каротиноидов. Окраска семян в красновато-коричневый или темно-коричневый цвет обусловлена наличием в их оболочке флавоноидов, таких как проантоцианидины и флюбафены (Аджиева и др., 2015; Lachman et al., 2017). Взаимосвязь между окраской оболочки и содержанием этих веществ установлена экспериментально. Показаны значимые корреляционные зависимости между цветом оболочки зерна риса и ее антиоксидантными свойствами, а также содержанием фенолов и флавоноидов (Shen et al., 2009). Содержание фенолов, флавоноидов, антоцианов, β-каротиноидов, лютеинов значимо различается для зерен с разной окраской у кукурузы (Žilić et al., 2012). Флавоноиды, антоцианы и каротиноиды обладают рядом ценных свойств, являются антиоксидантами и влияют на пищевую ценность зерна. Добавление в муку отрубей пшеницы с пурпурным перикарпием или голубым алейроновым слоем позволяет улучшить качество хлебопекарной продукции за счет вкусовых, текстурных и цветовых характеристик (Macháľková et al., 2017). В связи с этим к сортам и линиям с разнообразной окраской зерен в последнее время выражен большой интерес со стороны пищевой индустрии (Хлесткина и др., 2016; Corrêa et al., 2019).

Оболочка зерна – это основной барьер между зерном и внешней средой, поэтому с ее характеристиками связан ряд важных биологических функций: поглощение влаги, жизнеспособность зерна, устойчивость к предуборочному прорастанию (Souza, Marcos-Filho, 2001). Наличие пигментов в оболочке влияет на различные технологические свойства зерна. Например, флюбафены (конденсированные танины), придающие окраске перикарпия зерна красный цвет, положительно влияют на продолжительность состояния покоя зерна и препятствуют его предуборочному прорастанию (Flintham et al., 2002). Ввиду этого генотипы пшеницы с красной окраской зерен используются в селекции в качестве доноров генов устойчивости к предуборочному прорастанию зерна (Крупнов и др., 2012; Fakhongphan et al., 2016). У риса цвет оболочки зерен (интенсивность красной, зеленой и голубой компонент цвета) значимо связан с такими характеристиками качества, как прозрачность зерна и доля разрушенных зерен (Septiningsih et al., 2003).

Цветовые характеристики, как и внешний вид оболочки зерна, – также важный индикатор заболеваний растений. Например, заражение растений фузариозом выражается в виде розовой или синеватой окраски на оболочке зерна у пшеницы и ячменя (McMullen et al., 1997). Другое заболевание, черный зародыш пшеницы, характеризуется появлением черных пятен в области зародыша (Draz et al., 2016).

Цвет зерен может также быть классифицирующим признаком растений. Еще в 1885 г. F. Körnicke предложил использовать цвет зерна для описания ботанических разновидностей пшеницы (Körnicke, Werner, 1885). Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова используется система ботанических разновидностей для пшеницы (Дорофеев и др., 1979), в которой цвет зерна – одна из основных характеристик.

Генетический контроль формирования окраски как зерен, так и других органов растений осуществляется генами, кодирующими ферменты, вовлеченные в биосинтез пигментов, а также регуляторными генами (Хлесткина, 2014; Lachman et al., 2017; Шоева и др., 2018). Для ряда пигментов эти гены исследованы достаточно хорошо, вплоть до полной расшифровки их нуклеотидных последовательностей и расположения в геноме. Однако для некоторых пигментов, таких, например, как меланин, вызывающий черную окраску зерен ячменя, молекулярные механизмы биосинтеза еще полностью не известны (Glagoleva et al., 2017; Шоева и др., 2018).

При изучении механизмов генетического контроля окраски зерен селекционеры и генетики сталкиваются с необходимостью оценки цветовых характеристик их оболочки. К техническим средствам решения этой задачи относятся прежде всего спектрофотометры, позволяющие с высокой точностью характеризовать как цветовые, так и текстурные характеристики зерен. Они применяются давно и успешно, служат стандартами для оценки цвета биологических объектов (Black, Panozzo, 2004; Garg et al., 2016; Macháľková et al., 2017). Другим подходом является использование спектрометров, имеющих диапазон длин волн как в видимом, так и ближнем инфракрасном участках спектра (гиперспектральных камер видимого и ближнего инфракрасного диапазонов) (Black, Panozzo, 2004; ElMasry et al., 2019). Но это дорогостоящие камеры, особенно камеры с высоким разрешением, как пространственным, так и спектральным. Альтернатива – использование цифровых фотокамер, обеспечивающих высококачественные изображения с высоким пространственным и цветовым разрешением. Стоимость цифровых

фотокамер постоянно снижается, и в настоящее время они широкодоступны, а съемка даже на любительскую камеру позволяет делать снимки высокого разрешения и качества. В последнее время в области фенотипирования растений интенсивно развиваются методы оценки цветовых и текстурных характеристик зерен злаков, основанные на анализе двумерных изображений, полученных цифровыми камерами.

В настоящем мини-обзоре мы представим основные направления применения методов компьютерного анализа цветовых и текстурных характеристик зерен злаков, приведем примеры их практического использования.

Задачи, связанные с анализом цветовых и текстурных характеристик изображений зерен

Одно из актуальных направлений применения анализа изображений зерен – это классификация. Ее цели могут быть разными. Например, необходимо отнести растение по признакам цвета/текстуры его зерна к одному из нескольких возможных генотипов (Pourgeza et al., 2012; Olgun et al., 2016). В таких задачах часто к параметрам цвета и текстуры дополнительно используют характеристики размера и формы зерен (Majumdar, Jayas, 2000; Chaugule, Mali, 2014; Sabanci et al., 2016).

Похожая задача – сортировка зерен по качеству на основании цвета и текстуры (Pearson, 2010). Для массового анализа большого количества зерен разрабатываются сортеры, позволяющие отделить здоровые зерна от поврежденных и от различного мусора. Работам в области оценки качества зерен на основе анализа изображений, включая и гиперспектральные, посвящен обзор (Huang et al., 2015). В исследовании Z. Gong с коллегами (2015) представлены также инженерные подходы для решения задачи определения качества зерна.

Иногда рассматривают разделение зерен только по их типу окраски (красная или белая). Так, в работе (Ram et al., 2002) с помощью спектрофотометра и спектрометра построена процедура для определения цвета оболочки зерна у красnozерных и белозерных сортов пшеницы. T.N. McCaig с коллегами (1993) провели классификацию на красnozерные и белозерные сорта с помощью спектрометрических данных для 262 генотипов как мягкой, так и твердой пшеницы. На основе анализа цветовых характеристик определяются также зерна, пораженные патогенами (Ahmad et al., 1999; Goriewa-Duba et al., 2018) или механически (Delwiche et al., 2013). Необходимо отметить, что наравне с анализом изображений при решении указанных задач часто применяются методы машинного обучения и искусственного интеллекта (Patrício, Rieder, 2018).

Системы кодировки цвета

Цвет поверхности – характеристика ее спектральной отражательной способности, которая представляет собой результат действия многих факторов, таких как поглощение излучения от источника света на разных длинах волн, его отражение и рассеяние (Форсайт, Понс, 2004). Наиболее полно параметры отражения или поглощения излучения в разных интервалах длин волн могут быть оценены спектрометрами. В большинстве же обычных

цифровых камер используются матрицы, реагирующие на отраженное излучение в диапазоне видимых глазу длин волн (400–780 нм). Следует отметить, что восприятие цвета человеческим глазом имеет свои особенности, связанные со строением зрительного аппарата: между восприятием цвета поверхности глазом и ее спектральной отражательной способностью не существует однозначного соответствия. Например, один и тот же оттенок серого цвета может быть воспроизведен отраженным излучением с совершенно различными интенсивностями для разных длин волн.

При изучении человеческого восприятия цвета было выяснено, что достаточно трех основных цветов – красного, зеленого и синего, – чтобы при их смешивании в различных пропорциях получить все остальные воспринимаемые человеком цвета (Форсайт, Понс, 2004). Этот вывод подтверждается строением человеческого глаза, так как человеческая сетчатка глаза имеет три вида рецепторов (колбочек), ответственных за цветное зрение.

Для цифрового представления цветов разработаны различные цветовые модели (цветовые пространства). Цветовая модель задает систему координат, в которой однозначно определяются цвета. Существует целый ряд различных цветовых моделей, которые были разработаны для наилучшего способа описания цвета в таких системах, как телевидение, фото- и видеокамеры, цветная печать. Из наиболее часто используемых в анализе цифровых изображений растений необходимо отметить следующие.

Цветовая модель RGB – наиболее известное цветовое пространство, в котором цвет кодируется относительной интенсивностью трех его компонент: красной (R), зеленой (G) и синей (B). Эти компоненты описываются целыми числами, чаще всего от 0 до 256. Чем больше значения, тем выше интенсивность цвета (яркость). Цвета с одинаковыми значениями компонент являются оттенками серого цвета. Такое представление используется в основном в мониторах и цифровых камерах.

Модель HSV (HSB) – цветовое пространство, предложенное в середине 1970-х гг. и использующее три компоненты цвета. Цветовой тон (Hue) варьирует от 0 до 360 и определяет цветность (значения, близкие к 0 или 360, соответствуют красному цвету, 60 – желтому, 120 – зеленому, 180 – голубому, 240 – синему, 300 – малиновому). Насыщенность (Saturation) имеет тем большие значения, чем насыщенней оттенок цвета, а малые значения параметра соответствуют оттенкам серого. Яркость (Value/Brightness) принимает меньшие значения для темных цветов, большие – для ярких. Один из недостатков цветовых моделей HSV и RGB заключается в том, что количество различимых глазом уровней насыщенности и оттенков в этих цветовых пространствах уменьшается при приближении яркости (V) к нулю.

Модель CIE L*a*b* – это предложенное в 1976 г. Международной комиссией по освещению (International Commission on Illumination, CIE) цветовое пространство, обеспечивающее однородное изменение цветов с точки зрения человеческого зрения. Это означает, что кратное увеличение или уменьшение интенсивности цветовых компонент воспринимается человеком соответствующе. К примеру, двукратное увеличение компоненты яркости будет воспри-

ниматься человеческим глазом как двукратное увеличение яркости пикселя. Как и в HSV, в CIE $L^*a^*b^*$ значение яркости (компонента L^*) отделено от хроматической составляющей цвета (Pathare et al., 2013). Параметр L^* является приблизительной оценкой яркости. Параметр a^* принимает положительные значения для красноватых цветов и отрицательные – для зеленоватых, тогда как параметр b^* принимает положительные значения для желтоватых цветов и отрицательные – для голубоватых. Цветовая модель CIE $L^*a^*b^*$ нашла широкое применение в программном обеспечении для обработки изображений и цветокоррекции. Эта модель используется для результатов оценки характеристик цвета в спектрофотометрах.

Существует также целый ряд других цветовых пространств, их описание и характеристики можно найти в специальной литературе по анализу изображений (Фисенко В.Т., Фисенко Т.Ю., 2008; Домасев, Гнатюк, 2009). Компоненты для одного и того же цвета в различных системах связаны правилами преобразования, поэтому, зная значения цветовых компонент цвета в одной системе, всегда можно вычислить значения компонент этого цвета в других цветовых пространствах. Например, из значений компонент RGB можно вычислить значения цветовых компонент HSV и наоборот. Все это позволяет в зависимости от задачи выбрать ту или иную модель представления цвета изображения.

В задачах компьютерного зрения и анализа цветовых характеристик наиболее интересны такие цветовые модели, как HSV и $L^*a^*b^*$, в которых цвета представлены с точки зрения таких же понятий, которыми оперирует человек при описании цвета – цветового тона, насыщенности, яркости (светлоты).

Анализ цветowych характеристик зерен

Изображения, используемые при анализе зерен, как правило, получены цифровыми камерами в модели RGB в результате съемок в лабораторных условиях при контролируемом освещении. Зерна на изображении обычно располагаются на контрастном фоне таким образом, что между ними отсутствует касание (Sabanci et al., 2017; Góřiewa-Duba et al., 2018). Этот протокол дает возможность использовать для анализа характеристики не только цвета и текстуры, но также формы и размера зерен. В некоторых исследованиях изучаются объемные образцы, в которых зерна плотно касаются друг друга (Pourgeza et al., 2012; Olgun et al., 2016). В таких работах, как правило, отдельные зерна не распознаются, определяются текстурные и цветовые характеристики всего образца.

В случае анализа изображений отдельных зерен необходимо выделить их образы. Для этого производят предварительную обработку изображений (сглаживание, удаление шума, посторонних объектов), сегментацию для идентификации областей изображений, соответствующих зернам. Затем выполняется извлечение количественных признаков изображений для этих областей. Следует отметить, что при получении изображений достаточно трудно контролировать условия освещения, особенно если съемка происходит не в условиях фотолaborаторий (Berry et al., 2018). Поэтому при анализе цветовых характеристик

изображений полезно применять цветовую коррекцию на основе специальных цветowych шаблонов – карточек, имеющих ячейки с заранее заданными стандартными цветами (Berry et al., 2018; Genaev et al., 2019; Alemu et al., 2020).

На изображении области, соответствующие зернам, состоят из сотен пикселей, каждый из которых обладает своими характеристиками цвета в выбранном цветовом пространстве (например, тремя значениями компонент R, G, B). Поэтому для описания цвета этих объектов наиболее часто используются статистические характеристики цветowych компонент. Прежде всего рассчитываются гистограммы распределений пикселей по интенсивности для каждой из цветowych компонент, независимо от других компонент и расположения пикселей на изображении. На основе гистограмм рассчитываются такие параметры, как среднее, дисперсия, асимметрия и эксцесс распределения пикселей по интенсивности для каждой цветовой компоненты (Ahmad et al., 1999; Majumdar, Jayas, 2000). Эти величины в дальнейшем применяются для описания цветowych свойств зерен.

Так, T. Pearson и D. Brabec (2008) разработали систему машинного зрения для автоматизированной оценки и сортировки зерен пшеницы и других зерновых в режиме реального времени. Изображения с разрешением 640×480 пикселей были получены с помощью камеры и для анализа передавались на персональный компьютер, контролирующий работу воздушного клапана, посредством которого осуществлялась сортировка. Классификационными признаками выступали гистограммы интенсивности, среднее и стандартное отклонение интенсивностей каналов RGB (в общей сложности 198 признаков для каждого образа зерна). Для классификации применялся линейный дискриминантный анализ. Точность системы при сортировке красных и белых зерен твердой пшеницы составила от 94 до 99 %, в зависимости от сорта пшеницы, скорости подачи и количества классификационных признаков.

N.S. Visen с коллегами (2002) сравнили точность различных архитектур простых и специализированных нейронных сетей в задаче классификации зерновых. На вход нейронных сетей подавались значения морфологических и цветowych признаков зерен пшеницы, ячменя, овса и ржи, рассчитанные на основе цветowych изображений, полученных цифровой камерой. В качестве цветowych признаков рассчитывались характеристики распределения уровней серого для пикселей: среднее, медиана, мода и стандартное отклонение. Наилучшая средняя точность для различных культур в 98 % была достигнута с использованием специализированных вероятностных нейронных сетей.

В работе K. Góřiewa-Duba с коллегами (2018) для изучения формы и цвета зерен шести видов пшеницы были получены цифровые изображения с планшетного сканера. Ученые исследовали влияние заражения эндофитными грибами на цвет семенной оболочки, а также оценивали цветowych характеристики зерен для ряда генотипов пшеницы, отличающиеся высоким генетическим разнообразием. Обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ. Определялись такие характеристики формы, как площадь, периметр, округлость, соотноше-

ние главных осей, округлость и ряд других параметров. Цветовые признаки включали средние значения каналов цветовых моделей RGB, HSI, $L^*a^*b^*$. Анализ главных компонент, проведенный для зерен различных генотипов, показал, что цветовые признаки зерен вносят существенный вклад в первую главную компоненту дисперсии и относятся к важнейшим при классификации пшениц на разные генотипы.

A. Alemu с коллегами (2020) провели анализ полногеномных ассоциаций нуклеотидных замен (GWAS) в популяции 192 генотипов твердых пшениц *Triticum durum* из Эфиопии с характеристиками формы и цвета зерен. Параметрами формы являлись длина и ширина зерен, а цвета – средние значения компонент в системе кодировки $L^*a^*b^*$. Для цветовых признаков выявлено 11 локусов количественных признаков (QTL): 1 – для компоненты a^* (располагался на хромосоме 2A), 5 – для компоненты b^* (хромосомы 1B, 3A, 4B, 5A, 7B) и 5 – для компоненты L^* (хромосомы 1A, 2A, 7A и 7B).

Характеристики текстуры изображений в задаче анализа зерен

Текстура – составляющая изображения, отображающая визуальные свойства поверхностей или объектов (шероховатость, наличие регулярных узоров). Понятие текстуры сложно формализуется, так как оно в значительной степени зависит от масштаба и не имеет каких-либо ограничений паттернов, из которых состоит. Лист на изображении – это объект, а листва – уже текстура. Можно выделить простые текстуры, которые состоят из упорядоченных узоров или правильных элементов – текстонов (Форсайт, Понс, 2004). Отличительная черта простой текстуры – регулярность, повторяемые или частично воспроизводимые элементы на некоторой поверхности или объекте. Другие текстуры могут иметь значительно более сложную структуру.

Для описания текстуры изображения применяются более сложные подходы по сравнению с анализом цвета, поскольку текстура отличается взаимным пространственным расположением пикселей с различной интенсивностью цветовых компонент. Как и цветовые, текстурные характеристики могут быть определены на основе статистических методов, позволяющих оценить такие свойства гистограммы характеристик исходного изображения, как среднее, дисперсия, асимметрия, эксцесс.

Характеристики текстуры определяются для одного канала изображения, как правило, изображения в градациях серого, т. е. от описания цветовых характеристик пикселя (три компоненты) переходят к описанию лишь только общей его интенсивности (одна компонента, $I(x, y)$, где x, y – координаты пикселя).

Для описания совместной встречаемости интенсивностей соседних пикселей на изображении вычисляется матрица совпадения уровней серого (GLCM, Grey Level Co-occurrence Matrix) (Приложение: табл. 1, формула 1)¹, представляющая собой гистограмму второго порядка (Haralick et al., 1973). Второй порядок означает, что матрица описывает распределение интенсивностей для пар

различных пикселей на изображении. Таким образом, учитываются сочетания интенсивностей для этих пар. Пример расчета матрицы совместной встречаемости уровней серого можно найти в работе (Астафуров др., 2014). На основе матрицы GLCM вычисляются статистики распределения ее элементов, таких как однородность, гомогенность, моменты инерции, корреляция, различные средние значения, дисперсия и энтропия (см. Приложение: табл. 2) (Majumdar, Jayas, 1999).

Матрица длин серий уровней серого (GLRM, Gray Level Run-length Matrix) (см. Приложение: табл. 1, формула 2) строится на основе информации о длине серий пикселей, имеющих одинаковую интенсивность (Galloway, 1975). Эти серии могут быть заданы различными уровнями яркости и направлением движения от одного пикселя к другому. На основе матрицы GLRM рассчитываются такие статистики, как неоднородность уровня серого, неоднородность длин серий, коэффициент серий, энтропия, обратный разностный момент, второй угловой момент, неравномерность уровня серого, неравномерность длин серий и другие характеристики (Haralick, 1979).

Еще один способ описания характеристик текстуры основан на использовании авторегрессионной модели, в которой интенсивность пикселя прогнозируется как взвешенная сумма четырех интенсивностей соседних пикселей (Szczypiński et al., 2015). Параметрами такой модели являются вес и дисперсия ошибки предсказания интенсивности пикселя. Существуют также методы описания текстуры, основанные на преобразованиях Фурье, Габора или вейвлет-преобразования (преобразования всплесков), которые применяются для того, чтобы охарактеризовать пространственное расположение пикселей различной интенсивности на изображении на основе его частотных характеристик или вейвлет-компонентов (Szczypiński et al., 2009). Приведенные выше характеристики позволяют сформировать свыше сотни числовых признаков текстуры изображений. Как правило, используется лишь часть из приведенных характеристик.

Примером использования текстурных характеристик при анализе зерен служит работа (Pourgeza et al., 2012). Авторы анализировали изображения зерен девяти сортов пшеницы, располагавшихся в контейнере, в условиях искусственного освещения флуоресцентной лампой. Для описания текстуры вычисляли матрицы для изображений в градациях серого: матрица совпадений уровней серого (GLCM), матрица длин серий серого (GLRM), описанные выше. Дополнительно брали три характеристики, которые определяются тем, насколько интенсивность центрального пикселя отличается от интенсивности соседних пикселей в матрице 3×3 . Локальные паттерны сходства (LSP, Local Similarity Patterns) (см. Приложение: табл. 1, формула 3) вычисляются на основе разницы интенсивностей центрального и соседнего пикселей. Если она не превышает порога SRR, то значение LSP соседнего пикселя устанавливается равным 1, в противном случае – 0. В результате обхода по часовой стрелке 8 пикселей получается вектор из нулей и единиц, который характеризует соответствие интенсивности центрального пикселя и всех его соседей. Еще одним параметром в этой работе стали локальные бинарные паттерны (LBP, Local Binary Patterns)

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx3.pdf>

(см. Приложение: табл. 1, формула 4). Они определялись с учетом весовых коэффициентов соседних пикселей, умноженных на компоненты векторов LSP. Наконец, характеристикой текстуры в работе было также и число локального сходства (LSN, Local Similarity Number) (см. Приложение: табл. 1, формула 5). Это число пикселей, которые имеют сходную величину интенсивности с центральным пикселем квадрата размером $p \times p$.

Далее для элементов указанных признаков текстуры вычислялись различные статистики (среднее, стандартное отклонение, энтропия и др.), всего 131 признак. Результаты показали, что текстурные признаки обладали наивысшей эффективностью классификации сортов по сравнению с другими. Шесть из девяти сортов были определены со 100 % точностью, а два других классифицированы с более чем 96 % точностью. Использование характеристик, полученных на основе матриц LBP, LSP и LSN, повысило точность классификации по сравнению с предыдущими исследованиями. Пятьдесят четыре процента из 50 основных текстурных признаков были отобраны из групп признаков LBP, LSP и LSN; сделан вывод о том, что характеристики распределения указанных выше показателей внесли значительный вклад в идентификацию сорта пшеницы.

К. Sabanci с коллегами (2017) разработали систему для классификации зерен по принадлежности к растениям мягкой и твердой пшеницы на основе компьютерного зрения. Визуальные характеристики – размеры (длина, ширина, периметр и площадь), цвет (R, G и B) и текстура (контраст, корреляция, энергия, однородность и энтропия). В дополнение к этим основным показателям рассчитываются еще девять производных. В процессе тестирования упрощенный классификатор вычисляет тип зерна с точностью 99.46 % и сортирует зерна пшеницы с точностью 100 %. Для обучения и проверки классификатора изображения 200 зерен пшеницы (100 хлебных и 100 твердых сортов) были сняты камерой высокого разрешения.

Заключение

Спектрофотометры, спектрометры и гиперспектральные камеры – эффективные и надежные технологии анализа и оценки зерен злаковых. Однако они дорогостоящие, особенно камеры с высоким разрешением – пространственным и спектральным. Альтернативой является применение цифровых фотокамер, позволяющих получать высококачественные изображения с высоким пространственным и цветовым разрешением. Исследования показали, что их можно эффективно задействовать в качестве надежного и точного инструмента для решения множества практических задач. Высокое пространственное и цветовое разрешение таких камер дает возможность детализированно анализировать текстурные характеристики зерен злаковых. Дополняют текстурные признаки цветочные характеристики, представленные в различных цветовых моделях.

Таким образом, использование цветowych и структурных характеристик при анализе цифровых изображений зерен злаков позволяет эффективно решать ряд важных задач для их классификации, сортировки и определения заболеваний.

Список литературы / References

- Аджиева В.Ф., Бабак О.Г., Шоева О.Ю., Кильчевский А.В., Хлесткина Е.К. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(5):561-573. DOI 10.18699/VJ15.073. [Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Yu., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. Molecular-genetic mechanisms underlying fruit and seed coloration in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(5):561-573. DOI 10.18699/VJ15.073. (in Russian)]
- Астафуров В.Г., Евсюткин Т.В., Курьянович К.В., Скороходов А.В. Статистическая модель текстурных признаков перистой облачности по спутниковым снимкам MODIS. *Оптика атмосферы и океана*. 2014;27(07):640-646. [Astafurov V.G., Evsyutkin T.V., Kuriyanovich K.V., Skorokhodov A.V. Statistical model of cirrus cloud textural features based on MODIS satellite images. *Optika Atmosfery i Okeana = Atmospheric and Oceanic Optics*. 2014;27(07):640-646. (in Russian)]
- Домасев М.В., Гнатюк С.П. Цвет, управление цветом, цветочные расчеты и измерения. СПб.: Питер, 2009. [Domasev M.V., Gnatyk S.P. Color, Color Management, Color Calculations and Measurements. St. Petersburg: Piter Publ., 2009. (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Э.Ф., Удачин Р.А., Якубцинер М.М. Культурная флора СССР. Т. 1. Пшеница. Л.: Колос, 1979. [Dorofeev V.F., Filatenko A.A., Migushova E.F., Udachin R.A., Yakubtsiner M.M. The Cultural Flora of the USSR. Vol. 1. Wheat. Leningrad: Kolos Publ., 1979. (in Russian)]
- Крупнов В.А., Антонов Г.Ю., Дружинин А.Е., Крупнова О.В. Устойчивость к предуборочному прорастанию яровой мягкой пшеницы с *6Agⁱ(6D)*-хромосомой от *Agropyron intermedium*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(2):444-450. [Krupnov V.A., Antonov G.Yu., Druzhin A.E., Krupnova O.V. Preharvest sprouting resistance in spring bread wheat carrying chromosome *6Agⁱ(6D)* from *Agropyron intermedium*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(2):444-450. (in Russian)]
- Фисенко В.Т., Фисенко Т.Ю. Компьютерная обработка и распознавание изображений: учебное пособие. СПб.:СПбГУ ИТМО, 2008. [Fisenko V.T., Fisenko T.Yu. Computer Processing and Image Recognition: Tutorial. St. Petersburg, 2008. (in Russian)]
- Форсайт Д., Понс Ж. Компьютерное зрение. Современный подход. М.: Вильямс, 2004. [Forsyth D., Ponce J. Computer Vision: A Modern Approach. Prentice Hall, 2003. (Russ. ed. Forsayt D., Pons Zh. Komp'yuternoe Zrenie. Sovremennyy Podkhod. Moscow: Williams, 2004.)]
- Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014; 16(1):202-216. [Khlestkina E.K. Genes determining coloration of different organs in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;16(1):202-216. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Пшеничникова Т.А., Усенко Н.И., Отмахова Ю.С. Перспективные возможности использования молекулярно-генетических подходов для управления технологическими свойствами зерна пшеницы в контексте цепочки «зерно–мука–хлеб». *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(4):511-527. DOI 10.18699/VJ15.140. [Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Usenko N.I., Otmakhova Yu.S. Prospective applications of molecular genetic approaches to control technological properties of wheat grain in the context of the “grain–flour–bread” chain. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):511-527. DOI 10.18699/VJ15.140. (in Russian)]
- Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя.

- Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369.
- [Shoeva O.Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369. (in Russian)]
- Ahmad I.S., Reid J.F., Paulsen M.R., Sinclair J.B. Color classifier for symptomatic soybean seeds using image processing. *Plant Dis*. 1999;83(4):320-327. DOI 10.1094/PDIS.1999.83.4.320.
- Alemu A., Feyissa T., Tuberosa R., Maccaferri M., Sciara G., Letta T., Abeyo B. Genome-wide association mapping for grain shape and color traits in Ethiopian durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). *Crop. J.* 2020. DOI 10.1016/j.cj.2020.01.001.
- Berry J.C., Fahlgren N., Pokorny A.A., Bart R.S., Veley K.M. An automated, high-throughput method for standardizing image color profiles to improve image-based plant phenotyping. *PeerJ*. 2018;6:5727. DOI 10.7717/peerj.5727.
- Black C.K., Panozzo J.F. Accurate technique for measuring color values of grain and grain products using a visible-NIR instrument. *Cereal Chem.* 2004;81(4):469-474. DOI 10.1094/CCHEM.2004.81.4.469.
- Chaugule A., Mali S.N. Evaluation of texture and shape features for classification of four paddy varieties. *J. Engineer.* 2014. DOI 10.1155/2014/617263.
- Corrêa R.C.G., Garcia J.A.A., Correa V.G., Vieira T.F., Bracht A., Peralta R.M. Pigments and vitamins from plants as functional ingredients: Current trends and perspectives. *Adv. Food Nutr. Res.* 2019; 90:259-303. DOI 10.1016/bs.afnr.2019.02.003.
- Delwiche S.R., Yang I.C., Graybosch R.A. Multiple view image analysis of freefalling US wheat grains for damage assessment. *Comput. Electron. Agr.* 2013;98:62-73. DOI 10.1016/j.compag.2013.07.002.
- Draz I.S., El-Gremi S.M., Youssef W.A. Response of Egyptian wheat cultivars to kernel black point disease alongside grain yield. *Pak. J. Phytopathol.* 2016;28(1):15-17.
- ElMasry G., Mandour N., Al-Rejaie S., Belin E., Rousseau D. Recent applications of multispectral imaging in seed phenotyping and quality monitoring – An overview. *Sensors*. 2019;19(5):1090. DOI 10.3390/s19051090.
- Fakthongphan J., Graybosch R.A., Baenziger P.S. Combining ability for tolerance to pre-harvest sprouting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 2016;56(3):1025-1035. DOI 10.2135/cropsci.2015.08.0490.
- Flintham J., Adlam R., Bassoi M., Holdsworth M., Gale M. Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat. *Euphytica*. 2002; 126:39-45. DOI 10.1023/A:1019632008244.
- Galloway M.M. Texture analysis using grey level run lengths. *Comput. Graphics Image Process.* 1975;4:172-179.
- Garg M., Chawla M., Chunduri V., Kumar R., Sharma S., Sharma N.K., Kaur N., Kumar A., Munday J.K., Saini M.K., Singh S.P. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization. *J. Cereal Sci.* 2016;71:138-144. DOI 10.1016/j.jcs.2016.08.004.
- Genaev M.A., Komyshev E.G., Smirnov N.V., Kruchinina Y.V., Goncharov N.P., Afonnikov D.A. Morphometry of the wheat spike by analyzing 2D images. *Agronomy*. 2019;9(7):390.
- Glagoleva A.Y., Shmakov N.A., Shoeva O.Y., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Börner A., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. Pleiotropic effect of barley Blp locus: metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of near-isogenic lines. *BMC Plant Biol.* 2017; 17(Suppl. 1):182. DOI 10.1186/s12870-017-1124-1.
- Gong Z., Cheng F., Cheng F., Liu Z., Yang X., Zhai B., You Z. Recent developments of seeds quality inspection and grading based on machine vision. ASABE Annual International Meeting. 2015;1. DOI 10.13031/aim.20152188378.
- Goriewa-Duba K., Duba A., Wachowska U., Wiwart M. An evaluation of the variation in the morphometric parameters of grain of six *Triticum* species with the use of digital image analysis. *Agronomy*. 2018;8(12):296. DOI 10.3390/agronomy8120296.
- Haralick R.M. Statistical and structural approaches to texture. *Proc. IEEE*. 1979;67(5):786-804.
- Haralick R.M., Shanmugam K., Dinstein I.H. Textural features for image classification. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 1973;6:610-621.
- Huang M., Wang Q.G., Zhu Q.B., Qin J.W., Huang G. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. *Seed Sci. Technol.* 2015;43(3):337-366.
- Körnig F., Werner H. Die Arten und Varietäten des Getreides. In: Handbuch des Getreidebaus. Vol. 1. Berlin, 1885.
- Lachman J., Martinek P., Kotíková Z., Orsák M., Šulc M. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain – A review. *J. Cereal Sci.* 2017;74:145-154. DOI 10.1016/j.jcs.2017.02.007.
- Machálková L., Janečková M., Hřivna L., Dostálová Y., Hernandez J., Mrkvicová E., Vyhnaněk T., Trojan V. Impact of added colored wheat bran on bread quality. *Acta Univ. Agric. Silvic.* 2017;65(1): 99-104. DOI 10.11118/actaun201765010099.
- Majumdar S., Jayas D.S. Classification of bulk samples of cereal grains using machine vision. *J. Agric. Eng. Res.* 1999;73(1):35-47. DOI 10.1006/jaer.1998.0388.
- Majumdar S., Jayas D.S. Classification of cereal grains using machine vision: IV. Combined morphology, color, and texture models. *Trans. ASAE*. 2000;43(6):1689. DOI 10.13031/2013.3069.
- McCaig T.N., DePauw R.M., Williams P.C. Assessing seed-coat color in a wheat breeding program with a NIR/VIS instrument. *Can. J. Plant Sci.* 1993;73(2):535-539. DOI 10.4141/cjps93-073.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis*. 1997;81(12): 1340-1348. DOI 10.1094/PDIS.1997.81.12.1340.
- Olgun M., Onarcan A.O., Özkan K., Işık Ş., Sezer O., Özgişi K., Ayter N.G., Başçiftçi Z.B., Ardiç M., Koyuncu O. Wheat grain classification by using dense SIFT features with SVM classifier. *Comput. Electron. Agric.* 2016;122:185-190. DOI 10.1016/j.compag.2016.01.033.
- Pathare P.B., Opara U.L., Al-Said F.A.J. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food Bioprocess Technol.* 2013;6(1):36-60. DOI 10.1007/s11947-012-0867-9.
- Patrício D.I., Rieder R. Computer vision and artificial intelligence in precision agriculture for grain crops: A systematic review. *Comput. Electron. Agric.* 2018;153:69-81. DOI 10.1016/j.compag.2018.08.001.
- Pearson T. High-speed sorting of grains by color and surface texture. *Appl. Eng. Agric.* 2010;26(3):499-505. DOI 10.13031/2013.29948.
- Pearson T., Brabec D., Haley S. Color image based sorter for separating red and white wheat. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 2008;2(4):280-288. DOI 10.1007/s11694-008-9062-0.
- Pourreza A., Pourreza H.R., Abbaspour-Fard M.H., Sadriah H. Identification of nine Iranian wheat seed varieties by textural analysis with image processing. *Comput. Electron. Agric.* 2012;83:102-108. DOI 10.1016/j.compag.2012.02.005.
- Ram M.S., Dowell F.E., Seitz L., Lookhart G. Development of standard procedures for a simple, rapid test to determine wheat color class. *Cereal Chem.* 2002;79(2):230-237. DOI 10.1094/CCHEM.2002.79.2.230.
- Sabancı K., Ekinci S., Karahan A.M., Aydın C. Weight estimation of wheat by using image processing techniques. *J. Image Graph.* 2016; 4(1):51-54. DOI 10.18178/joig.4.1.51-54.
- Sabancı K., Toktas A., Kayabasi A. Grain classifier with computer vision using adaptive neuro-fuzzy inference system. *J. Sci. Food Agric.* 2017;97(12):3994-4000. DOI 10.1002/jsfa.8264.
- Septiningsih E.M., Prasetyono J., Lubis E., Tai T.H., Tjubyaryat T., Moeljopawiro S., McCouch S.R. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. *Theor. Appl. Genet.* 2003;107(8):1419-1432. DOI 10.1007/s00122-003-1373-2.

- Shen Y., Jin L., Xiao P., Lu Y., Bao J. Total phenolics, flavonoids, anti-oxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *J. Cereal Sci.* 2009;49(1):106-111. DOI 10.1016/j.jcs.2008.07.010.
- Souza F.H., Marcos-Filho J.Ú.L.I.O. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Braz. J. Bot.* 2001; 24(4):365-375. DOI 10.1590/S0100-84042001000400002.
- Szczypiński P.M., Klepaczko A., Zapotoczny P. Identifying barley varieties by computer vision. *Comput. Electron. Agric.* 2015;110:1-8. DOI 10.1016/j.compag.2014.09.016.
- Szczypiński P.M., Strzelecki M., Materka A., Klepaczko A. MaZda – a software package for image texture analysis. *Comput. Methods Prog. Biomed.* 2009;94(1):66-76. DOI 10.1016/j.cmpb.2008.08.005.
- Visen N.S., Paliwal J., Jayas D.S., White N.D.G. Ae – automation and emerging technologies: specialist neural networks for cereal grain classification. *Biosyst. Eng.* 2002;82(2):151-159. DOI 10.1006/bioe.2002.0064.
- Žilić S., Serpen A., Akıllıoğlu G., Gökmen V., Vančetović J. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60(5):1224-1231. DOI 10.1021/jf204367z.

ORCID ID

D.A. Afonnikov orcid.org/0000-0001-9738-1409

Благодарности. Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра Федерального исследовательского центра ИЦиГ СО РАН, соглашение с Министерством образования и науки РФ № 075-15-2019-1662.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 27.12.2019. После доработки 03.04.2020. Принята к публикации 07.04.2020.

NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя

И.В. Розанова^{1, 2} , Е.К. Хлесткина^{1, 2}

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

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

 e-mail: i.rozanova@vir.nw.ru

Аннотация. Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – один из важнейших видов злаковых растений, используемых в качестве продовольственной и кормовой культуры, а также для пивоварения и производства спирта. В конце прошлого столетия к традиционным методам селекции прибавились методы, основанные на применении ДНК-маркеров. Молекулярные маркеры также активно вовлекаются в процессы молекулярно-генетического картирования и анализа QTL (quantitative trait loci). В 2012 г. было завершено секвенирование генома ячменя, что выявило целый спектр новых возможностей – от более эффективного поиска генов-кандидатов хозяйственно ценных признаков до геномной селекции. В обзоре обобщены результаты работ периода после секвенирования генома ячменя, открывшего новые направления генетики и селекции этой культуры с применением высокопроизводительных методов секвенирования и генотипирования. В рассматриваемый период ведутся интенсивные исследования по идентификации геномных локусов ячменя, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками, появились и пополняются ресурсы для работы с геномными данными ячменя и для их депонирования. В последние годы для массового поиска ассоциаций между фенотипом и генотипом используется анализ GWAS (genome wide association studies), широкое применение которого на ячмене стало возможным с 2010 г. благодаря разработанным SNP-чипам, а также методам генотипирования, основанным на прямом NGS-секвенировании (next generation sequencing) выборочных фракций генома. К настоящему времени опубликовано более 80 работ, описывающих результаты GWAS-анализа на ячмене. Идентификация SNP, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками, и их преобразование в удобные для скрининга селекционного материала CAPS или KASP-маркеры существенно расширяют возможности маркер-ориентированной селекции ячменя. Кроме того, имеющаяся информация о потенциальных генах-мишенях и качество полногеномной последовательности ячменя представляют достаточную базу для применения технологий геномного редактирования с целью создания исходного материала для селекции сортов с заданными свойствами.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*; SNP; ячмень; геном; секвенирование; высокопроизводительное генотипирование; геномное редактирование.


Для цитирования: Розанова И.В., Хлесткина Е.К. NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):348-355. DOI 10.18699/VJ20.627

NGS sequencing in barley breeding and genetic studies

I.V. Rozanova^{1, 2} , E.K. Khlestkina^{1, 2}

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

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 e-mail: i.rozanova@vir.nw.ru

Abstract. Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the one of the most important cereal species used as food and feed crops, as well as for malting and alcohol production. At the end of the last century, traditional breeding techniques were complemented by the use of DNA markers. Molecular markers have also been used extensively for molecular genetic mapping and QTL analysis. In 2012, the barley genome sequencing was completed, which provided a broad range of new opportunities – from a more efficient search for candidate genes controlling economically important traits to genomic selection. The review summarizes the results of the studies performed after barley genome sequencing, which discovered new areas of barley genetics and breeding with high throughput screening and genotyping methods. During this period, intensive studies aimed at identification of barley genomic loci associated with economically important traits have been carried out; online databases and tools for working with barley genomic data and their deposition have appeared and are being replenished. In recent years, GWAS analysis has been used for large-scale phenotype-genotype association studies, which has been widely used in barley since 2010 due to the developed SNP-arrays, as well as genotyping methods based on direct NGS sequencing of selected fractions of the genome. To date, more than 80 papers have been published that describe the results of the GWAS analysis in barley. SNP identification associated with economically important traits and their transformation into CAPS or KASP markers convenient for screening

selection material significantly expands the possibilities of marker-assisted selection of barley. In addition, the currently available information on potential target genes and the quality of the whole barley genome sequence provides a good base for applying genome editing technologies to create material for the creation of varieties with desired properties. Key words: *Hordeum vulgare*; SNP; barley; genome; sequencing; throughput genotyping; genomic editing.

For citation: Rozanova I.V., Khlestkina E.K. NGS sequencing in barley breeding and genetic studies. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):348-355. DOI 10.18699/VJ20.627 (in Russian)

Введение

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, занимающая пятое место в мире после пшеницы, кукурузы, риса и сои по площади посевов (47 млн га), согласно данным 2017 г. (<http://www.fao.org/faostat/ru/>). Зерно ячменя идет в основном на кормопроизводство (до двух третей от всего урожая), пивоваренную промышленность и производство спирта (около одной трети) и лишь небольшой процент приходится на долю продовольственного, т. е. применяемого для пищи человека (в Российской Федерации, по данным 2017 г., – 0.12 %, <http://www.fao.org/faostat/ru/>). Кроме того, отмечен рост значимости ячменя как источника сырья для производства крахмала и крахмалопродуктов пищевого и технического назначения (Blennow et al., 2013).

По сравнению с основным хлебным злаком – пшеницей – ячмень неприхотлив, легче адаптируется к неблагоприятным условиям окружающей среды – холоду, засухе, лучше переносит защелачивание и засоление почвы, недостаток питательных веществ в ней. Раннее созревание в сочетании с высокой адаптивностью позволили ячменю как сельскохозяйственной культуре распространиться по всему миру – от экватора до северных и южных широт – более чем в 100 странах мира (<http://www.fao.org/faostat/ru/>). Благодаря ряду биологических особенностей ячменя (относительно короткий жизненный цикл, самоопыление, диплоидный геном) современные молекулярно-генетические и геномные исследования этой культуры продвигаются динамичнее, чем в случае других представителей Triticeae, в частности пшеницы и ржи (Hayes, Szucs, 2006; Schulte et al., 2009). Вследствие этого ячмень служит модельным растением, а полученные данные о его генах и геноме используются для продолжения генетических исследований на других представителях трибы Triticeae.

Развитие методов NGS-секвенирования позволило получить качественные полногеномные последовательности многих видов растений (Брагина и др., 2019), включая ячмень (International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012) и пшеницу (Appels et al., 2018). Секвенирование геномов, а вслед за этим секвенирование транскриптомов и микроРНКов вывели на новый этап исследования о функционировании наследственного материала. Получаемые сведения применяются для маркер-контролируемого отбора в селекционном процессе, а также для разработки принципиально новых технологий создания исходного селекционного материала с заданными свойствами на основе геномного редактирования (Хлесткина, Шумный, 2016; Korotkova et al., 2019).

Цель настоящего обзора – обобщить результаты генетико-селекционных работ, базирующихся на применении методов NGS-секвенирования.

Секвенирование генома ячменя и его структурная организация

Для секвенирования генома ячменя в 2006 г. был сформирован Международный консорциум (International Barley Genome Sequencing Consortium..., 2012), который изначально включал в себя исследователей из восьми научных организаций шести стран: Германии, США, Австралии, Японии, Финляндии и Шотландии. Позднее к консорциуму присоединились группы ученых из Великобритании, Израиля, Франции и Италии.

К 2009 г. был собран первый вариант последовательности генома ячменя (сорт Morex), которая была необходима для дальнейшего секвенирования генома, но вместе с тем оказалась полезной и широкому кругу исследователей, нацеленных на выделение отдельных генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки (Schulte et al., 2009). Основу физической карты составили более 83 тыс. ген-содержащих ВАС-клонов (bacterial artificial chromosome, бактериальных искусственных хромосом), которые исследовались методом гибридизации с применением избыточных зондов (метод overgo) (Madishetty et al., 2007). Данные были получены с помощью высокопроизводительного фингерпринтинга (fingerprinting) (Luo et al., 2003).

В 2012 г. создана референсная карта генома ячменя (International Barley Genome Sequencing Consortium..., 2012). Для этого были секвенированы и проанализированы последовательности 571 тыс. ген-содержащих ВАС-клонов из шести независимых геномных библиотек.

В дальнейшем работы по уточнению полногеномной физической карты были продолжены. В частности, использован метод МТР (minimum tiling path), основанный на принципе минимального количества составных частей карты при максимальной плотности покрытия (Ariyadasa et al., 2014). Кроме того, разработана ультраплотная генетическая карта. Для этого было проведено генотипирование на основе высокопроизводительного секвенирования потомства из 90 рекомбинантных инбредных линий (RILs) от скрещивания Morex*Barke (M × B) и 82 дигиплоидных линий (DH) из картирующей популяции Oregon Wolfe Barley (Cistué et al., 2011). Сконструированные генетические карты были соотнесены с физической картой сорта Morex, полученной в результате работы Консорциума (Mascher et al., 2013). Таким образом, генетические локусы были сопоставлены с положением на физической карте. Суммарная длина прочитанного и собранного генома ячменя составила 4.98 Гб – более 95 % генома, если учесть, что, согласно имеющимся оценкам, 100 % – это 5.1 Гб.

Полученный материал позволил создать ресурсы (Приложение 1)¹, ценные для дальнейших исследований, на-

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx4.pdf>

правленных на изучение функциональной организации генов и генома ячменя, и для прикладных работ, нацеленных на выведение новых улучшенных сортов, в том числе с применением методов селекции следующего поколения (next-generation breeding), а именно систем генетического редактирования.

Структурная организация генома ячменя

Согласно распределению уникальных последовательностей и повторов в хромосомах ячменя, выделяют три зоны. Зона 1 – дистальная – характеризуется большим количеством низкокопийных элементов (low-copy regions, LCRs), высоким содержанием генов и высокой частотой мейотических рекомбинаций. Зона 2, занимающая промежуточное положение на хромосомах, обладает средней плотностью генов. В третьей зоне, проксимальной, количество генов минимальное (Mascher et al., 2017).

Выделенные зоны различаются не только по количеству генов, но и по их специализации. Так, в проксимальных (прицентромерных) участках хромосом, расположены главным образом «гены домашнего хозяйства» – консервативные гены, важные для жизнедеятельности клетки, мутации по которым, как правило, летальные. Эта фракция генома не является материалом для искусственного отбора. Гены, потенциально интересные для селекционеров, например участвующие в защитном ответе и репродуктивных процессах, расположены преимущественно в дистальных районах (концевые участки хромосом), которые, в противоположность проксимальным, характеризуются высокой частотой рекомбинации (Mascher et al., 2017).

Большая часть генома растений состоит в основном из очень похожих копий повторяющихся элементов, таких как ДНК-транспозоны (MITE, miniature inverted-repeat transposable elements, САСТА-элементы) и ретротранспозоны, включая LTR (long terminal repeats – ретротранспозоны с длинными концевыми повторами) и LINE (long interspersed nuclear element – подтип с длинными диспергированными повторами). В настоящее время считается, что эти элементы играют значительную роль в функциональной организации и эволюции геномов растений. Сравнение с библиотекой повторов, специфичной для Triticeae, выявило, что 3.7 Гб (80.8 %) от собранного генома ячменя относится к мобильным элементам, причем только 10 % этих элементов потенциально активны (Mascher et al., 2017). Повторы MITEs и LINEs в основном представлены в богатых генами дистальных районах в зоне 1. Локализация LTR-ретротранспозонов зависит от их типа: *Ty3-Gypsy*-ретротранспозоны обнаружены в зоне 3, тогда как *Ty1-Copia* преимущественно располагаются в зонах 1 и 2.

Для генома ячменя характерно распределение разных мобильных элементов в зависимости от положения относительно генов. Мобильные элементы небольшого размера (например, транспозоны *Mariner*, относящиеся к семейству MITE) предпочтительно находятся в пределах 1 Кб, фланкируя кодирующие области генов, в то время как мобильные элементы более крупного размера (например, *Harbinger*, второе семейство MITE и LINEs) находятся на значительно более удаленном расстоянии от генов. Полученное распределение различных типов мобильных

элементов среди генов может отражать давление отбора, которое позволяет только небольшим элементам, а именно транспозонам *Mariners*, находиться ближе всего к генам (Mascher et al., 2017). На большем расстоянии от генов доминируют мобильные элементы большого размера, такие как LTR-ретротранспозоны и транспозоны семейства САСТА.

Пространственная организация генома ячменя

Полученная референсная последовательность генома ячменя также позволила исследовать пространственную организацию хроматина в ядре при помощи метода Hi-C (Mascher et al., 2017). Результаты подтвердили заключения, сделанные на основе более ранних исследований с применением методов микроскопии (Щапова, 1971; Künzel et al., 2000), о том, что хромосомы в ядрах ячменя принимают положение, известное в литературе под термином “Rabl orientation” (Cowan et al., 2001). Это конфигурация, при которой каждая хромосома в интерфазном ядре занимает место, во многом задаваемое позицией в анафазе предшествующего митоза. При этом хромосомы располагаются следующим образом: центромеры хромосом находятся на одном полюсе ядра, а теломеры ориентированы к противоположному.

После основополагающей работы А.И. Щаповой (1971) было уточнено, что описанная конфигурация сохраняется у таких видов растений, как ячмень, пшеница, рожь и овес, во всех клетках растения (Ananthawat-Jónsson, Heslop-Harrison, 1990), у риса – только в клетках ксилемы корня и в недифференцированных клетках пыльника (Prieto et al., 2004), у кукурузы и сорго подобной конфигурации хромосом не обнаружено (Dong, Jiang, 1998).

Ранее было также установлено (Щапова, 1971), что ячмень обладает сходными по размеру плечами хромосом, тогда как у большинства видов эукариот все плечи по длине различаются и местоположение каждой хромосомы определено размерами ее плеч. Благодаря поляризации хромосомы складываются, как книжка, сопоставляя длинные и короткие плечи, в результате чего короткое плечо одной хромосомы имеет возможность взаимодействовать с локусами, расположенными на относительно таком же расстоянии от центромеры на длинном плече. Была отмечена также более высокая частота контактов между прителомерными регионами. При этом не имеет значения, гомологичны хромосомы или нет, контакты между материнской и отцовской хромосомами имеют место так же часто, как и между негомологами (Mascher et al., 2017).

Методы NGS-секвенирования для анализа полиморфизма ДНК как инструмента повышения эффективности маркер-ориентированной селекции

В основе картирования и маркирования генов и идентификации различных аллельных вариантов и в разработке технологий ускоренного и направленного отбора селекционного материала (маркер-ориентированная и геномная селекция) лежит анализ полиморфизма ДНК. Методы анализа полиморфизма ДНК «эволюционировали» от трудоемких подходов, основанных на блот-гибридизации (например, restriction fragment length polymorphism,

RFLP – полиморфизм длины рестриционных фрагментов) (Botstein et al., 1980) до гораздо менее трудоемких методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Среди последних можно выделить такие ДНК-маркеры, как SSR – simple sequence repeats – простые повторяющиеся последовательности (Tautz, Renz 1984), STS – sequence tagged site – последовательности, характеризующие локус (Olson et al., 1989), и другие (Хлесткина, 2011). Позже появились высокопроизводительные методы с возможностью полной автоматизации процесса, такие как анализ SNP – single-nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм (Wang et al., 1998). Выявление SNP – результат работ по секвенированию и ресеквенированию сначала отдельных фракций, а затем и полных геномов.

Появление, быстрое развитие и удешевление технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) не только позволили секвенировать один за другим геномы хозяйственно значимых видов растений и животных (Хлесткина, 2013; Брагина и др., 2019), но и сделали возможными быстрое определение полиморфизма тысяч генов и разработку SNP-чипов для анализа генетического и селекционного материала. Для выявления SNP достаточно ресеквенировать небольшую выборку образцов. Полученные данные могут быть использованы для разработки SNP-чипов, пригодных к генотипированию больших выборок растений в относительно экономном режиме с большой пропускной способностью анализа.

Позже на основе NGS-секвенирования были разработаны методы высокопроизводительного генотипирования, основанные на прямом секвенировании выборочных фракций генома изучаемых образцов. Один из них – метод GBS (genotyping-by-sequencing), впервые описанный в 2011 г. (Elshire et al., 2011), был успешно применен для генотипирования 276 рекомбинантных инбредных линий кукурузы и 43 дигаплоидных линий ячменя из картирующей популяции Oregon Wolfe Barley. В настоящее время термин “GBS” используется уже как обобщающий для различных разрабатываемых методов высокопроизводительного генотипирования, основанного на NGS-секвенировании (Rasheed et al., 2017). Геномная ДНК при этом обрабатывается эндонуклеазами рестрикции, далее создается библиотека фрагментов, при секвенировании их получают короткие прочтения (~ 100 пар нуклеотидов), объединяемые в контиги, выравнивание которых позволяет обнаружить SNP (Davey et al., 2011). Преимущество метода заключается в том, что его можно применять для анализа образцов не только видов с уже расшифрованным геномом, но и менее изученных видов, для которых еще не выполнена полногеномная сборка. Похожий на GBS метод RAD-seq (restriction-site-associated DNA sequencing), схожий в основе с методом GBS (используется подобный протокол секвенирования, основанный на присутствии в геноме сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции), но отличающийся протоколом подготовки библиотек (Chutimanitsakun et al., 2011; Andrews et al., 2016).

Метод GBS применяется для выявления взаимосвязи между фенотипом и генотипом на основе анализа двуродительских картирующих популяций (QTL-анализ – quantitative trait loci) или выборок сортообразцов (GWAS-

анализ – genome wide association studies). Выявленные в результате этих работ геномные районы, ассоциированные с проявлением того или иного селекционно значимого свойства, сразу маркированы SNP-маркером. Если геном изучаемого вида уже секвенирован, то информация об обнаруженном районе генома, ассоциированного с признаком, может быстро привлекаться для поиска гена-кандидата, влияющего на изменчивость по данному признаку. Метод GBS только начинает применяться на ячмене (Fan et al., 2017; Darrier et al., 2019; Goddard et al., 2019), а результаты использования SNP-чипов уже применяются более 10 лет.

Высокопроизводительное генотипирование ячменя впервые апробировано в 2005 г. (Rostoks et al., 2005) на основе технологии Illumina GoldenGate (Fan et al., 2003). Первые коммерчески доступные чипы для генотипирования ячменя появились в 2009 г. (Close et al., 2009). Для его создания было выбрано и протестировано 4596 SNP на 576 ДНК-образцах для двух пилотных чипов OPA, POA1 и POA2, и на 480 ДНК-образцах для третьего пилотного чипа – POA3. Далее было выбрано 3072 SNP, которые прошли качественный контроль и были генетически информативны. Они составили две производные OPA – BOA1 и BOA2, которые планировалось использовать для дальнейших исследований генофонда ячменя. Из 3072 SNP, выбранных для изучения, 2279 были получены из библиотек EST, а 793 – путем секвенирования ПЦР-ампликонов. В результате в платформу для генотипирования, содержащую 3072 маркера, вошли два чипа, BOA1 и BOA2, каждый из которых содержал по 1536 маркеров SNP, и они имели различные дизайны генотипирования (Close et al., 2009). Следующий чип был разработан Illumina Infinium iSelect 9K Custom Genotyping BeadChip (Comadran et al., 2012) и включал в себя 2832 маркера, разработанных для предыдущей технологии GoldenGate, и 5010 дополнительных маркеров, основанных на обнаружении маркеров SNP в данных Illumina RNA-seq из 10 элитных сортов Великобритании (Bayer et al., 2017).

По мере снижения затрат на секвенирование постоянно росло число обнаруживаемых SNP. Поэтому на следующем этапе платформа 9K Infinium iSelect была расширена до 50K. Чип 50K включил около 6000 SNP из предыдущего чипа 9K и новые SNP, выявленные для ячменя на основе захвата экзона. Это эффективный метод, позволяющий проводить исследования генома по выбранным локусам, которые с большей вероятностью будут содержать полиморфизмы, сцепленные с интересующими признаками фенотипа (<https://ics.hutton.ac.uk/50k>; Bayer et al., 2017).

Методы анализа ассоциаций между геномными вариантами и фенотипическими признаками: QTL-анализ и GWAS

Первым методом поиска взаимосвязи генотипа с фенотипом, получившим широкое распространение, стал QTL-анализ, или метод анализа локусов количественных признаков при использовании двуродительских популяций. При этом для изучения признака исследуется популяция потомства от контрастных по признаку родителей (Kearsey, Farquhar, 1998). Такой анализ на ячмене осуществляется с 1989 г. (Jensen, 1989), для него применялись раз-

личные типы маркеров, начиная с RFLP. В 2003–2010 гг. преобладали исследования, в которых QTL-анализ двуродительских популяций ячменя проводился на основе данных генотипирования, полученных при помощи SSR-маркеров. С 2010 г. для QTL-анализа ячменя преимущественно применялись популяции, генотипированные с помощью SNP-маркеров. С 2014 г. начали использоваться методы прямого секвенирования: GBS и RAD (Andrews et al., 2016; Darrier et al., 2019). Картирование значимых локусов с применением QTL-анализа дает высокую статистическую значимость для определяемого QTL, но в то же время имеет низкое разрешение. Существенный недостаток метода – ограничение генетического разнообразия родителей выбранной популяции (Hyne, Kearsey, 1995).

В последние годы для массового поиска ассоциаций между фенотипом и генотипом используется GWAS-анализ. На ячмене он применяется с 2010 г. (Lorenz et al., 2010). Сравнительный анализ работ показывает, что на основе GWAS обнаруживается больше новых локусов, по сравнению с QTL-анализом двуродительских популяций (Pauli et al., 2014). Преимущество метода заключается в высоком разрешении, вплоть до одного нуклеотида. Ассоциированный с признаком аллель детектируется частотой его наличия в популяции. Однако в этом случае можно упустить редкий аллель, так как значимость определения локуса будет зависеть от той же частоты аллеля. Для выявления локусов методом GWAS изучаемая популяция должна быть как можно более разнородна. Метод чувствителен к структуре популяции. Неправильно сформированная популяция может привести к установлению ложноположительных ассоциаций.

Метод GWAS – достаточно новый, и, как видно по данным анализа публикаций, индексируемых в базе данных Scopus (рис. 1), в течение последних лет количество работ, выполненных с применением GWAS на ячмене, неуклонно возрастает. В настоящее время благодаря этому подходу обнаружены геномные районы, ассоциированные со многими признаками ячменя. Для нахождения компонентов урожайности и качества зерна ячменя с помощью GWAS изучаются агрономические признаки: высота растения, длина колоса, количество зерен в колосе, масса 1000 зерен, количество продуктивных побегов. Существует ~40 работ по исследованиям с использованием GWAS устойчивости ячменя к различным болезням и ~25 работ – по устойчивости к абиотическому стрессу – засухоустойчивости, устойчивости к засолению и др. Помимо этого, выполнены работы по изучению свойств крахмала, содержания белка, β-глюкана и микроэлементов в зерне. (Более подробно обзор работ представлен в Приложении 2.)

Таким образом, для метода GWAS чаще всего используются SNP-чипы; SSR и DA γ T применяются редко, они были актуальны до разработки SNP-чипов и GBS (DA γ T – это, по сути, аналог GBS, но с применением чипов, а не прямого секвенирования). Метод GBS только начинает применяться для анализа полиморфизмов ДНК ячменя, ожидается, что он получит дальнейшее распространение.

Как можно судить по публикациям, индексируемым в базе данных Scopus (рис. 2), работы по GWAS-анализу в равной мере направлены на проблемы устойчивости к фитопатогенам и вредителям (биотический стресс), толе-

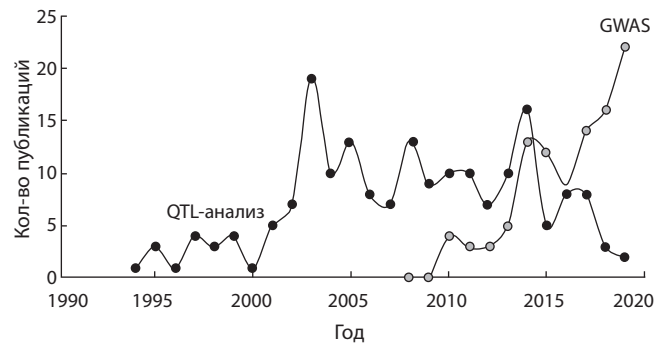


Рис. 1. Количество публикаций, описывающих проведение QTL и GWAS на ячмене, полученное на основе поиска статей по сочетаниям слов: “barley + genome-wide-association” и “barley + QTL-analysis” в базе данных Scopus (Website: <http://scopus.com>; доступ <28.08.2019>).

Обобщение данных о методах анализа полиморфизма ДНК и разных подходах (QTL и GWAS) для установления локусов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками ячменя

Метод анализа полиморфизма ДНК	QTL	GWAS
RFLP	56	0
SSR	83	5
DA γ T	41	16
SNP-чип	78	58
GBS	7	2
RAD	4	0

Примечание. Указано количество статей, найденное на основе поиска в базе данных Scopus; доступ <29.08.2019>.

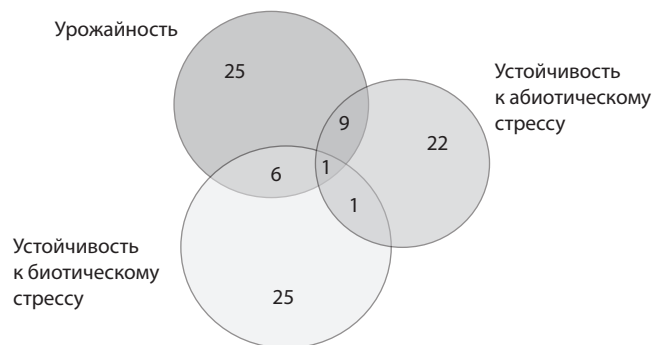


Рис. 2. Количество работ на ячмене, выполненных с помощью полногеномного анализа ассоциаций (GWAS).

Указано количество статей, выявленное на основе поиска в базе данных Scopus; доступ <29.08.2019> по пересечению ключевых слов.

рантности к неблагоприятным абиотическим факторам окружающей среды и на повышение продуктивности растений.

Селекция на устойчивость позволяет сокращать потери урожая, вызываемые фитопатогенами и вредителями. В настоящее время бóльший успех наблюдается в идентификации генетических маркеров для признаков

устойчивости к болезням, имеющих моно- или олигогенный контроль (ржавчинные болезни, головня, мучнистая роса). Сложнее идентифицировать генетические маркеры для устойчивости зерновых культур к фузариозу колоса, септориозам, гельминтоспориозным пятнистостям, корневым гнилям и другим болезням (Афанасенко, 2016). Часто уровень фенотипического проявления устойчивости зависит не от одного гена, а от суммарного эффекта всех генов устойчивости. Это ведет к постановке задачи перед исследователями – создать сорта с полигенной устойчивостью, обеспечивающей средний уровень устойчивости, что выражается в замедленном развитии болезней. Эта задача отягощается тем, что возникают новые патотипы (Ghazvini, Tekauz, 2007; Leng et al., 2016).

Как использовать данные, полученные с помощью GWAS, в дальнейших программах селекции? Исследования установленных геномных районов позволяют идентифицировать, валидировать и маркировать гены-кандидаты. Можно и без поиска генов-кандидатов преобразовать выявленные SNP в удобные KASP- или CAPS-маркеры (Konieczny, Ausubel, 1993; Kumpatla et al., 2012; Semagn et al., 2014; Shavrukov, 2015), проверить их на независимых выборках и, при успешной валидации, рекомендовать применять эти маркеры для отбора селекционного материала. Этот подход может быть эффективен в случае локусов, существенно влияющих на изменение фенотипа. Полученная в результате GWAS-анализа информация о локусах с малым эффектом или локусах, эффект которых существенно зависит от генотипа, не будет играть роли для программ по маркер-ориентированной селекции, однако она является основой для развития работ по геномной селекции.

Геномное редактирование

Наличие полногеномных последовательностей и известных последовательностей-мишеней для внесения заданных мутаций позволяет осуществлять редактирование целевых генов на основе систем ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas, изменяя тем самым свойства растений (Хлесткина, Шумный, 2016). Системы ZFNs и TALENs не получили широкого распространения из-за сложности исполнения. Система геномного редактирования CRISPR/Cas наоборот оказалась достаточно простой и значительно способствовала развитию геномного редактирования растений. Система CRISPR/Cas применяется на растениях более пяти лет. За это время она успешно апробирована на 24 культурах, для 16 из них, включая ячмень, получены модификации более 80 селекционно значимых генов (Короткова и др., 2017; Korotkova et al., 2019). Работы по редактированию генов ячменя ведутся преимущественно на модельном сорте Golden Promise. Редактированы несколько селекционно значимых генов ячменя. Так, в 2015 г. T. Lawrenson с коллегами (2015) сделали неработоспособными две копии гена *HvPM19*, кодирующего АВА-индуцируемый белок плазматической мембраны, что привело к сокращению продолжительности периода покоя семян. Полученные растения несут мутантные копии гена-мишени, но не являются при этом трансгенными. В 2018 г. N. Kumar с коллегами (2018) нокаутировали ген *MORC1* – негативный регулятор устойчивости к грибным

патогенам, а S.V. Gerasimova с коллегами (2018a) получили голозерные растения из пленчатых растений сорта Golden Promise, выведя из строя ген *Nud1*. Кроме того, при использовании метода трансфекции протопластов была впервые показана возможность успешной модификации генома немодельного сорта ячменя – сибирского сорта Алей (Gerasimova et al., 2018b).

Таким образом, существующая на сегодняшний день информация о потенциальных генах-мишенях и качество полногеномной последовательности ячменя представляют хорошую базу для применения технологий геномного редактирования с целью создания исходного материала для селекции сортов с заданными свойствами. Лимитирующим фактором для развития этого направления служит проблема получения растений-трансформантов других сортов ячменя, кроме модельного.

Изучение потомства от скрещивания сорта Golden Promise с сортами, обладающими низкой эффективностью трансформации, дало возможность выявить десять локусов, получивших наименования *TFA1–TFA10* (transformation amenability). H. Hisano с коллегами (2017) представили способ получения генотипов, на которых в дальнейшем планируется проведение геномного редактирования, при этом в качестве донора генов эффективности трансформации (*TFA1*, *TFA2* и *TFA3*) предложено использовать Golden Promise.

Заключение

Благодаря секвенированию генома ячменя, которое было завершено в 2012 г., произошла интенсификация генетических исследований, направленных на расшифровку механизмов формирования хозяйственно ценных признаков. Информация о последовательности генома оказалась полезной для широкого круга исследований. С помощью методов QTL и GWAS при применении SNP- и GBS-генотипирования выявлен ряд новых геномных районов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками. В настоящее время результаты секвенирования в совокупности с технологиями высокопроизводительного генотипирования можно использовать для эффективного направленного отбора нужных генотипов среди селекционных линий, что существенно ускорит создание новых сортов ячменя с заданными характеристиками.

Список литературы / References

- Афанасенко О.С. Генетическая защита растений: проблемы и перспективы. *Защита и карантин растений*. 2016;1:13-16. [Afanasenko O.S. Genetic plant protection: problems and prospects. *Zaschita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2016;1:13-16. (in Russian)]
- Брагина М.К., Афонников Д.А., Салина Е.А. Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(1):38-48. DOI 10.18699/VJ19.459.
- [Bragina M.K., Afonnikov D.A., Salina E.A. Progress in plant genome sequencing: research directions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1): 38-48. DOI 10.18699/VJ19.459. (in Russian)]
- Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2):250-258. DOI 10.18699/VJ17.244.

- [Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using CRISPR/Cas system. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(8):822-832. DOI 10.1134/S2079059717050124.]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2011;15(4):757-768.
- [Khlestkina E.K. Molecular methods of the analysis of the structural and functional organization of genes and genomes in higher plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2011;15(4):757-768. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2013;17(4/2):1044-1054.
- [Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013;17(4/2):1044-1054. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. *Генетика.* 2016;52(7):774-787. DOI 10.7868/s0016675816070055.
- [Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Russ. J. Genet.* 2016;52(7):676-687. DOI 10.1134/S102279541607005X.]
- Щапова А.И. О структуре кариотипа и порядке расположения хромосом в интерфазном ядре. *Цитология.* 1971;13(9):1157-1163.
- [Scharova A.I. On the karyotype structure and chromosome location order in the interphase nucleolus. *Tsitologiya = Cytology.* 1971;13(9):1157-1163. (in Russian)]
- Ananthawat-Jönsson K., Heslop-Harrison J.S. Centromeres, telomeres and chromatin in the interphase nucleus of cereals. *Caryologia.* 1990;43(3-4):205-213. DOI 10.1080/00087114.1990.10796999.
- Andrews K.R., Good J.M., Miller M.R., Luikart G., Hohenlohe P.A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17(2):81-92. DOI 10.1038/nrg.2015.28.
- Appels R., Eversole K., Feuillet C., Keller B., Rogers J., Stein N., Pozniak C.J., ..., Visendi P., Cui L., Du X., Feng K., Nie X., Tong W., Wang L. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science.* 2018;361(6403):eaar7191. DOI 10.1126/science.aar7191.
- Ariyadasa R., Mascher M., Nussbaumer T., Schulte D., Frenkel Z., Poursarebani N., Zhou R., Steuernagel B., Gundlach H., Taudien S., Felder M., Platzer M., Himmelbach A., Schmutzer T., Hedley P.E., Muehlbauer G.J., Scholz U., Koro A., Mayer K.F.X., Waugh R., Langridge P., Graner A., Stein N. A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms. *Plant Physiol.* 2014;164(1):412-423. DOI 10.1104/pp.113.228213.
- Bayer M.M., Rapazote-Flores P., Ganal M., Hedley P.E., Macaulay M., Plieske J., Ramsay L., Russell J., Shaw P.D., Thomas W., Waugh R. Development and evaluation of a barley 50k iSelect SNP array. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1792. DOI 10.3389/fpls.2017.01792.
- Blenow A., Jensen S.L., Shaik S.S., Skryhan K., Carciofi M., Holm P.B., Hebelstrup K.H., Tanackovic V. Future cereal starch bioengineering: cereal ancestors encounter gene technology and designer enzymes. *Cereal Chem.* 2013;90(4):274-287.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32:314-331.
- Chutimanitsakun Y., Nipper R.W., Cuesta-Marcos A., Cistué L., Corey A., Filichkina T., Johnson E.A., Hayes P.M. Construction and application for QTL analysis of a restriction site associated DNA (RAD) linkage map in barley. *BMC Genomics.* 2011;12(1):4. DOI 10.1186/1471-2164-12-4.
- Cistué L., Cuesta-Marcos A., Chao S., Echávarri B., Chutimanitsakun Y., Corey A., Filichkina T., Garcia-Mariño N., Romagosa I., Hayes P.M. Comparative mapping of the Oregon Wolfe Barley using doubled haploid lines derived from female and male gametes. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122(7):1399-1410.
- Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L., Druka A., Stein N., Svensson J.T., Wanamaker S., Bozdog S., Roose M.L., Moscou M.J., Chao S., Varshney R.K., Szücs P., Sato K., Hayes P.M., Matthews D.E., Kleinhofs A., Muehlbauer G.J., DeYoung J., Marshall D.F., Madishetty K., Fenton R.D., Condamine P., Graner A., Waugh R. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics.* 2009;10:582. DOI 10.1186/1471-2164-10-582.
- Comadran J., Kilian B., Russell J., Ramsay L., Stein N., Ganal M., Shaw P., Bayer M., Thomas W., Marshall D., Hedley P., Tondelli A., Pecchioni N., Francia E., Korzun V., Walther A., Waugh R. Natural variation in a homolog of antirrhinum CENTRORADIALIS contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat. Genet.* 2012;44(12):1388-1391. DOI 10.1038/ng.2447.
- Cowan C.R., Carlton P.M., Cande W.Z. The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rabl organization and the bouquet. *Plant Physiol.* 2001;125(2):532-538. DOI 10.1104/pp.125.2.532.
- Darrier B., Russell J., Milner S.G., Hedley P.E., Shaw P.D., Macaulay M., Ramsay L.D., Halpin C., Mascher M., Fleury D.L., Langridge P., Stein N., Waugh R. A comparison of mainstream genotyping platforms for the evaluation and use of barley genetic resources. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1-14. DOI 10.3389/fpls.2019.00544.
- Davey J.W., Hohenlohe P.A., Etter P.D., Boone J.Q., Catchen J.M., Blaxter M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 2011;12(7):499-510. DOI 10.1038/nrg3012.
- Dong F., Jiang J. Non-rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Res.* 1998;6(7):551-558. DOI 10.1023/A:1009280425125.
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One.* 2011;6(5):e19379. DOI 10.1371/journal.pone.0019379.
- Fan J.B., Oliphant A., Shen R., Kermani B.G., Garcia F., Gunder-son K.L., Hansen M.J., Steemers F., Butler S.L., Deloukas P., Galver L., Hunt S., McBride C., Bibikova M., Rubano T., Chen J., Wickham E., Doucet D., Chang W., Campbell D., Zhang B., Kruglyak S., Bentley D., Haas J., Rigault P., Zhou L., Stuelpnagel J., Chee M.S. Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2003;68:69-78. DOI 10.1101/sqb.2003.68.69.
- Fan X., Zhu J., Dong W., Sun Y., Lv C., Guo B., Xu R. Comparative mapping and candidate gene analysis of *SSIIa* associated with grain amylopectin content in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Front. Plant Sci.* 2017;8:1531. DOI 10.3389/fpls.2017.01531.
- Gerasimova S.V., Hertig C., Korotkova A.M., Otto I., Hiekel S., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. Converting hulled into naked barley through targeted knock-out of the *Nud1* gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2018a;54(Suppl. 1):S101. DOI 10.1007/s11627-018-9923-0.
- Gerasimova S.V., Korotkova A.M., Hertig C., Hiekel S., Hoffie R., Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018b;22(8):1033-1039. DOI 10.18699/VJ18.447.
- Ghazvini H., Tekauz A. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Dis.* 2007;91(7):814-821.
- Goddard R., Vos S., Steed A., Muhammed A., Thomas K., Griggs D., Ridout C., Nicholson P. Mapping of agronomic traits, disease resistance and malting quality in a wide cross of two-row barley cultivars. *Plos One.* 2019;14(7):e0219042. DOI 10.1371/journal.pone.0219042.

- Hayes P., Szucs P. Disequilibrium and association in barley: thinking outside the glass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(49): 18385-18386. DOI 10.1007/s00438-006.
- Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant Cell Rep.* 2017;36(4): 611-620. DOI 10.1007/s00299-017-2107-2.
- Hyne V., Kearsey M.J. QTL analysis: further uses of 'marker regression' regression. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91(3):471-476. DOI 10.1007/BF00222975.
- International Barley Genome Sequencing Consortium; Mayer K.F.X., Waugh R., Brown J.W.S., Schulman A., Langridge P., Platzer M., Fincher G.B., Muehlbauer G.J., Sato K., Close T.J., Wise R.P., Stein N. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. 2012;491(7426):711-716. DOI 10.1038/nature11543.
- Jensen J. Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci. *Theor. Appl. Genet.* 1989;78(5):613-618. DOI 10.1007/BF00262554.
- Kearsey M.J., Farquhar A.G.L. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity*. 1998;80(2):137-142. DOI 10.1038/sj.hdy.6885001.
- 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.
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):29-37. DOI 10.18699/vj19.458.
- Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(11):1892-1903. DOI 10.1111/pbi.12924.
- Kumpatla S.P., Buyyarapu R., Abdurakhmonov I.Y., Mammadov J.A. Genomics-assisted plant breeding in the 21st century: technological advances and progress. In: Abdurakhmonov I. (Ed). *Plant Breeding*. 2012;131-183.
- Künzel G., Korzun L., Meister A. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics*. 2000;154(1):397-412.
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* 2015;16(1):1-13. DOI 10.1186/s13059-015-0826-7.
- Leng Y., Wang R., Ali S., Zhao M., Zhong S. Sources and genetics of spot blotch resistance to a new pathotype of *Cochliobolus sativus* in the USDA National small grains collection. *Plant Dis.* 2016; 100(10):1988-1093. DOI 10.1094/PDIS-02-16-0152-RE.
- Lorenz A.J., Hamblin M.T., Jannink J.L. Performance of single nucleotide polymorphisms versus haplotypes for genome-wide association analysis in barley. *PLoS One*. 2010;5(11):e14079. DOI 10.1371/journal.pone.0014079.
- Luo M.C., Thomas C., You F.M., Hsiao J., Ouyang S., Buell C.R., Malandro M., McGuire P.E., Anderson O.D., Dvorak J. High-throughput fingerprinting of bacterial artificial chromosomes using the SNaPshot labeling kit and sizing of restriction fragments by capillary electrophoresis. *Genomics*. 2003;82(3):378-389. DOI 10.1016/S0888-7543(03)00128-9.
- Madhishetty K., Condamine P., Svensson J.T., Rodriguez E., Close T.J. An improved method to identify BAC clones using pooled overgos. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(1):1-5. DOI 10.1093/nar/gkl920.
- Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok S.O., Wicker T., Radchuk V., ..., Hansson M., Zhang G., Braumann I., Spannagl M., Li C., Waugh R., Stein N. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*. 2017; 544(7651):427-433. DOI 10.1038/nature22043.
- Mascher M., Muehlbauer G.J., Rokhsar D.S., Chapman J., Schmutz J., Barry K., Muñoz Amatriáin M., Close T.J., Wise R.P., Schulman A.H., Himmelbach A., Mayer K.F.X., Scholz U., Poland J.A., Stein N., Waugh R. Anchoring and ordering NGS contig assemblies by population sequencing (POPSEQ). *Plant J.* 2013;76(4): 718-727. DOI 10.1111/tpj.12319.
- Olson M., Hood L., Cantor C., Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*. 1989;245(4925): 1434-1435. DOI 10.1126/science.2781285.
- Pauli D., Muehlbauer G.J., Smith K.P., Cooper B., Hole D., Obert D.E., Ullrich S.E., Blake T.K. Association mapping of agronomic QTLs in US spring barley breeding germplasm. *Plant Genome*. 2014;7(3): 1-15. DOI 10.3835/plantgenome2013.11.0037.
- Prieto P., Santos A.P., Moore G., Shaw P. Chromosomes associate premeiotically and in xylem vessel cells via their telomeres and centromeres in diploid rice (*Oryza sativa*). *Chromosoma*. 2004;112(6): 300-307. DOI 10.1007/s00412-004-0274-8.
- Rasheed A., Hao Y., Xia X., Khan A., Xu Y., Varshney R.K., He Z. Crop breeding chips and genotyping platforms: progress, challenges, and perspectives. *Mol. Plant*. 2017;10(8):1047-1064. DOI 10.1016/j.molp.2017.06.008.
- Rostoks N., Mudie S., Cardle L., Russell J., Ramsay L., Booth A., Svensson J.T., Wanamaker S.L., Walia H., Rodriguez E.M., Hedley P.E., Liu H., Morris J., Close T.J., Marshall D.F., Waugh R. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*. 2005;274(5):515-527. DOI 10.1007/s00438-005-0046-z.
- Schulte D., Close T.J., Graner A., Langridge P., Matsumoto T., Muehlbauer G., Sato K., Schulman A.H., Waugh R., Wise R.P., Stein N. Update on the international barley sequencing consortium – at the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant Physiol.* 2009;149(1):142-147. DOI 10.1104/pp.108.128967.
- Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed.* 2014;33(1):1-14.
- Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(2):205-213. DOI 10.18699/VJ15.026.
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(10):4127-4138. DOI 10.1093/nar/12.10.4127.
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglu T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M.S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T.J., Lipshutz R., Chee M., Lander E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 1998;280(5366):1077-1082. DOI 10.1126/science.280.5366.1077.

ORCID ID

E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Благодарности. Статья подготовлена в рамках проекта РФФИ (№ 16-14-00086).**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.09.2019. После доработки 02.12.2019. Принята к публикации 05.12.2019.

Полегание пшеницы: генетические и экологические факторы и способы преодоления

Е.В. Агеева¹✉, И.Н. Леонова², И.Е. Лихенко¹

¹ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: elenakolomeec@mail.ru

Аннотация. Полегание является одной из основных проблем снижения урожайности и качества зерна озимой и яровой пшеницы. Устойчивость этой культуры к полеганию в значительной степени зависит от факторов внешней среды, биологических и морфологических особенностей стебля и корневой системы. Селекция сортов на устойчивость к полеганию актуальна во многих странах мира, и в данном направлении получен ряд достижений. Высота растений – важный морфологический признак, связанный с устойчивостью к полеганию. Основным направлением для снижения риска возникновения полегания стало выведение сортов, несущих гены короткостебельности (*Rht*). Гены *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht8*, *Rht11* получили широкое распространение во всем мире среди сортов мягкой пшеницы благодаря значительному влиянию на хозяйственно ценные признаки, включая полегание. Немаловажным оказалось изучение анатомо-морфологических особенностей и химического состава тканей стебля, которые дополняют оценку устойчивости к полеганию и позволяют более полно характеризовать изучаемый сортовой материал. Особенно большую роль в прочности стебля многие исследователи отводят толщине стенок междоузлий и их анатомическому строению. Диаметр соломины, ее толстостенность и вес, большое количество сосудистых пучков и широкое кольцо механических тканей коррелируют с устойчивостью к полеганию. Важными структурными компонентами, обеспечивающими прочность стебля у пшеницы, являются содержание лигнина, кремния и целлюлозы. Большое значение в выявлении генетической основы взаимоотношений между анатомическими и морфофизиологическими признаками стебля и корневой системы и полеганием имеют молекулярно-генетический анализ и картирование генов и локусов количественных признаков. Генетические факторы, отражающие корреляции между полеганием и толщиной стенки стебля, числом проводящих пучков и другими параметрами, были картированы в хромосомах 1A, 1B, 2A, 2D, 3A, 4B, 4D, 5A, 5D, 6D и 7D. Установлено, что локусы с высоким фенотипическим эффектом в отношении толерантности к полеганию локализируются с локусами, ответственными за высоту растения, диаметр и прочность стебля. Для повышения устойчивости к полеганию необходимы разработка комплекса агротехнических методов, снижающих влияние почвенно-климатических факторов, и создание толерантных к полеганию сортов.

Ключевые слова: пшеница; полегание; стебель; гены *Rht*; лигнин; анатомо-морфологические признаки.

Для цитирования: Агеева Е.В., Леонова И.Н., Лихенко И.Е. Полегание пшеницы: генетические и экологические факторы и способы преодоления. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):356-362. DOI 10.18699/VJ20.628

Lodging in wheat: genetic and environmental factors and ways of overcoming

E.V. Ageeva¹✉, I.N. Leonova², I.E. Likhenko¹

¹ 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

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: elenakolomeec@mail.ru

Abstract. Lodging is one of the main factors in reducing the yield and grain quality of winter and spring wheat varieties. The resistance of wheat cultivars to lodging largely depends on environmental factors, biological and morphological features of the stem and root systems. Selection of the varieties for resistance to lodging is relevant in many countries of the world and has a number of achievements. Plant height is one of the most important morphological characters associated with lodging resistance. Breeding of the varieties carrying the dwarfing genes (*Rht*) is the main direction to reduce the risk of lodging. The *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht8* and *Rht11* genes are widely used throughout the world due to their significant influence on agronomically valuable traits, including lodging. It turned out to be important to study the anatomical and morphological features and chemical composition of

stem tissues, which complement the assessment of resistance to lodging and allow the varietal material to be more fully characterized. The thickness of stem internodes and their anatomical structure play an important role in the stem strength. The diameter of the stem, its thickness and weight, a large number of vascular bundles and a wide ring of mechanical tissues correlate with resistance to lodging. The content of lignin, silicon and cellulose are important structural components and provide the stem strength of wheat plants. Molecular genetic analysis and mapping of genes and quantitative trait loci are of great importance in identifying the genetic basis of the relationship between the anatomical and morphophysiological characters of the stem and root system and lodging. Genetic factors reflecting correlations between the lodging and the thickness of the stem wall, the number of vascular bundles and other characters were mapped to chromosomes 1A, 1B, 2A, 2D, 3A, 4B, 4D, 5A, 5D, 6D and 7D. It has been found that loci with high phenotypic effects on lodging tolerance are colocalized with loci responsible for plant height, stem diameter and stem strength. To increase resistance to lodging, it is necessary to develop a set of agrotechnical methods that reduce the influence of soil and climatic factors and create wheat varieties tolerant to lodging.

Key words: wheat; lodging; stem; *Rht* genes; lignin; anatomical and morphological characters.

For citation: Ageeva E.V., Leonova I.N., Likhenko I.E. Lodging in wheat: genetic and environmental factors and ways of overcoming. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):356-362. DOI 10.18699/VJ20.628 (in Russian)

Введение

Полегание – один из главных факторов, влияющих на урожайность пшеницы, качество зерна и содержание в нем питательных веществ. При полегании понижается устойчивость растений к болезням, формируется щуплое зерно, возникают проблемы с уборкой урожая. Полегание пшеницы в предуборочный и уборочный периоды, сопровождающиеся неблагоприятными погодными условиями и частым выпадением дождей, влечет за собой прорастание зерна на корню и значительно снижает хлебопекарные качества. Формирование мелкого зерна с низкой массой 1000 зерен в результате нарушения транспортировки ассимилянтов в колос – частое явление при полегании, наступившем до налива зерна (Berry et al., 2004; Packa et al., 2015; Khobra et al., 2019). Потери зерна на полегающих посевах озимой и яровой пшеницы составляют в среднем от 20 до 50 %. Полегание посевов на стадиях колошения, молочной, восковой и полной спелости зерна приводит к снижению урожайности на 31, 25, 20 и 12 % соответственно (Weibel, Pendleton, 1964; Fischer, Stapper, 1987). Даже кратковременное полегание растений вызывает потери урожая (Иванов, Дохунаев, 1979). Исследования А.Н. Лубнина (2006) показали наличие прямой средней зависимости ($r = 0.346 \pm 0.08$) между устойчивостью к полеганию и урожайностью; при этом в годы со слабым увлажнением эта связь выражена слабее. Чем устойчивее стебель, тем лучше развит колос: он крупнее, лучше озернен и имеет большой вес зерен. В полеглом ценозе у растений активнее развиваются листовостеблевые болезни (мучнистая роса, бурая и стеблевая ржавчина, септориоз) и корневые гнили.

Анализ многочисленных работ (Носатовский, 1965; Терентьев, 1974; Иванов, Дохунаев, 1979; Лелли, 1980; Захаров и др., 2014; Packa et al., 2015; Shah et al., 2017; Khobra et al., 2019) позволяет сделать заключение, что полегание – это по существу физиологическая реакция растений на определенные условия внешней среды: недостаток света, структуру почвы, ее избыточную влажность, влажный с высокой температурой микроклимат воздуха, высокое содержание азота и других минеральных составляющих (Mavi et al., 2004; Dahiya et al., 2018). Перечисленные факторы внешней среды считаются основными причинами полегания зерновых культур. Немаловажную роль играют

климатические и погодные условия, в том числе скорость ветра, дожди и град. В подтверждение такого вывода говорят факты массового распространения полегания во влажных районах с обильными естественными осадками (Niu et al., 2016).

Устойчивость к полеганию зависит также от комплекса взаимосвязанных признаков, таких как анатомические и морфологические особенности стебля и корневой системы, биохимические и физиологические процессы, протекающие в организме растения. Согласно проведенным исследованиям, основными характеристиками, которые определяют устойчивость пшеницы к полеганию, являются: высота растения, длина и толщина стебля, размеры верхнего и нижнего междоузлий, число продуктивных побегов, диаметр и число проводящих пучков, содержание лигнина и целлюлозы в стебле, содержание растворимых сахаров, вес зерна в колосе (Kelbert et al., 2004; Ионова, 2009; Berry, 2012; Packa et al., 2015; Xiao et al., 2015; Khobra et al., 2019; Shah et al., 2019).

Последние достижения в разработке методов биотехнологии позволили идентифицировать ряд генов и локусов количественных признаков (QTL), контролирующих признаки, связанные с полеганием. С использованием двуродительских картирующих популяций были локализованы генетические факторы, ассоциированные с толерантностью к полеганию. Многие из них картированы в тех же геномных районах, где локализованы гены, отвечающие за высоту растения, диаметр и толщину стебля, урожайность (Verma et al., 2005; Kong et al., 2013; Berry P., Berry S., 2015). Сочетание методов полногеномного поиска ассоциаций и высокопроизводительного фенотипирования с использованием обширных коллекций сортов выявило новые геномные районы, коррелирующие с устойчивостью к полеганию (Kaur et al., 2017; Singh et al., 2019).

Селекция зерновых культур на продуктивность неразрывно связана с селекцией на устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды, включая устойчивость к полеганию. В настоящем обзоре рассмотрена роль различных факторов, влияющих на устойчивость пшеницы к полеганию, в том числе приведены результаты исследований по молекулярно-генетическому картированию генетических локусов, ассоциированных с проявлением данного признака.

Типы полегания

Под полеганием принято понимать смещение стебля или всего растения от его вертикального положения. На практике различают прикорневое и стеблевое полегание пшеницы (Носатовский, 1965; Захаров и др., 2014; Khobra et al., 2019). Проявление корневого или стеблевого типа полегания зависит от характеристик конкретного сорта и факторов внешней среды. Прикорневое полегание связано с недостаточной механической прочностью самих корней либо недостаточным сцеплением корневой системы с почвой (Paska et al., 2015; Shah et al., 2019). Архитектура корневой системы играет важную роль в поддержании устойчивости растения к полеганию. Известно, что глубина залегания корней, длина и плотность корневых волосков, угол расположения базальных корней и их изгиб влияют на устойчивость (Pinthus, 1967; Crook, Ennos, 1993). Одной из причин слаборазвитой корневой системы может быть дефицит влаги в почве в первую половину вегетации. Кроме того, прикорневое полегание встречается в районах с большим количеством осадков в фазы кущения и выхода в трубку, а также при орошении. Как правило, у генотипов с таким типом полегания прочный стебель, их анатомические показатели вполне соответствуют показателям соломины хорошо устойчивых к полеганию форм (Иванов, Дохунаев, 1979; Лелли, 1980). В результате переувлажнения верхнего слоя почвы под тяжестью надземной массы растений наблюдается смещение и растяжение корней, а иногда и их разрыв. Стебли растений теряют вертикальное положение и полегают. Более широкий угол распространения корневой системы снижает риск возникновения прикорневого полегания (Носатовский, 1965; Berry, 2012; Paska et al., 2015).

Стеблевое полегание пшеницы происходит под влиянием нагрузки на стебель, которая возрастает с увеличением веса на колос и удлинением соломины. Другими словами, происходит изгиб и даже слом соломины, преимущественно в районе второго и третьего междоузлия снизу (Терентьев, 1974; Zuber et al., 1999; Paska et al., 2015; Khobra et al., 2019). Особенно часто стеблевое полегание встречается у сортов с длинным и тонким стеблем. Наибольший вес колоса отмечается в конце спелости. Несмотря на то что третье нижнее междоузлие обладает меньшей устойчивостью соломины на излом, чем второе, в силу большей нагрузки, приходящейся на последнее, полегание пшеницы чаще всего отмечается именно во втором междоузлии. Увлажнение колоса увеличивает нагрузку на стебель, поэтому дожди в это время наиболее опасны для полегания пшеницы. Условия внешней среды приобретают особое значение во время формирования второго и третьего междоузлия.

Факторы, вызывающие полегание

Факторы, вызывающие полегание, можно подразделить на четыре группы: особенности самих растений (строение и свойства стебля, развитие и строение корней и др.); физические факторы (ветер, дождь, град, температура и световой режим и др.); агротехнические факторы (избыточное увлажнение и питание, в первую очередь азотное, недостаток фосфора и калия, завышенные нормы посева и др.); поражение пшеницы болезнями, которое в не-

малой степени связано с сортовыми особенностями и агротехникой.

Особое значение имеет выпадение осадков, а точнее не количество выпавших осадков, а интенсивность дождя и само его формирование. Как правило, сильный и порывистый ветер с дождем или после дождя является основной причиной полегания. Немаловажный фактор – загущенность посевов, которая приводит к возникновению взаимозатенения, в результате чего формируются тонкие и длинные стебли со слаборазвитой корневой системой (Иванов, Дохунаев, 1979; Foulkes et al., 2011).

Высокий уровень плодородия и структура почв тоже способствуют полеганию. Доступный для растения азот может поступать в него в результате минерализации растительных остатков или через минеральные удобрения (Berry et al., 2004). Применение минеральных удобрений ведет к мощному вегетативному росту пшеницы, к сильной кустистости, что влечет повышенную плотность агроценоза растений. Повышается конкуренция за пространство, свет и питательные вещества, что в конечном итоге приводит к формированию растений с более тонкими и длинными и более слабыми стеблями с меньшим количеством сухого вещества в нижней части междоузлия. Помимо удлинения стебля, наблюдается формирование тонких корней со слабой силой сцепления с почвой (Berry et al., 2004; Foulkes et al., 2011). Большое количество азота снижает также содержание целлюлозы и лигнина. Удобрения с калием, фосфором и микроэлементами оказывают меньшее воздействие на изменение прочности стебля, чем азотные, хотя эти данные неоднозначны (Mulder, 1954; Zhang et al., 2017; Khobra et al., 2019).

В современном производстве применяют интенсивные технологии возделывания пшеницы: внесение минеральных удобрений с целью получения высоких урожаев и повышения качества зерна. Поскольку применение минеральных удобрений может привести к полеганию, одним из способов решения данной задачи стало использование регуляторов роста (ретардантов), тормозящих процессы роста растения. Оказалось, что своевременное торможение роста вегетативных органов растений может способствовать развитию у них ряда полезных хозяйственных признаков: расширение пластинок листьев, повышение интенсивности их зеленой окраски, рост объема корневой системы, уменьшение продолжительности покоя семян, повышение всхожести и увеличение энергии прорастания. При этом важно, что сам ход физиологических процессов, определяющих продукционную способность обработанных растений, не должен претерпевать существенных изменений. Данные о влиянии ретардантов на физиологические функции растений противоречивы, однако большинство результатов свидетельствует, что регуляторы роста растений не оказывают отрицательного воздействия на фотосинтез, ограничивают чрезмерный расход воды и обеспечивают более благоприятный водный режим (Шапалов и др., 2010; Souza et al., 2010).

Анатомические и морфофизиологические параметры стебля

Длина стебля – один из наиболее важных морфологических признаков, коррелирующий с устойчивостью к по-

леганию. Значительная склонность к полеганию у пшеницы наблюдается при высоте растения свыше 120 см (Дорофеев и др., 1976; Packer et al., 2015). Генотипы, имеющие укороченную соломину, отличаются толерантностью к полеганию и большей урожайностью зерна. Активное выведение короткостебельных сортов началось в 1960–1970-х гг. при использовании в селекции различных аллелей генов *Rht* (Reduced height). Согласно каталогу генных символов, у пшеницы обнаружено более 40 аллелей генов *Rht*, локализованных в хромосомах второй и четвертой гомеологических групп и в хромосомах 5A, 5D, 6A, 7A, 7B (McIntosh et al., 2013, Supplements 2014–2017). Гены *Rht* условно делятся на две группы по их реакции на гиббереллиновую кислоту. Нечувствительные к гиббереллинам гены *Rht1* и *Rht2* картированы в коротких плечах хромосом 4B и 4D. Гены, чувствительные к гиббереллинам, были локализованы в хромосомах 2A, 2DS, 7BS и 5A. Кроме генов с постоянными символами, практически во всех хромосомах пшеницы картировано большое число QTL (Wurschum et al., 2017).

Несмотря на многочисленное число генов и аллелей *Rht*, только четыре из них – *Rht-B1b* (4BS), *Rht-D1b* (4DS), *Rht8* (2DL) и *Rht11* (*Rht-B1e*) – получили практическое применение при создании новых сортов (Knapf et al., 2008; Pearce et al., 2011; Xiao et al., 2015). Присутствие этих генов в сортах приводит к уменьшению числа и размеров междоузлий, сокращению длины колеоптиля, снижению длины стебля на 14–17 % и способствует увеличению урожайности до 20 % (Berry, 2012). Аллель *Rht-B1e* стимулирует существенно большее снижение высоты растений и увеличение урожайности по сравнению с аллелем *Rht-B1b* (Дивашук и др., 2012; Коршунова и др., 2014). На сегодняшний день более 70 % сортов в мире содержат по крайней мере один из этих *Rht* генов (Evans, 1998; Vorojevic, Vorojevic, 2005; Коршунова и др., 2014; Shah et al., 2019). Остальные локусы *Rht* не используются из-за негативных эффектов на урожайность и другие хозяйственно важные признаки (Daoura et al., 2014; Wang et al., 2014; Li et al., 2015).

В настоящее время известно, что гены *Rht-B1b* и *Rht-D1b* пшеницы кодируют мутантные белки DELLA, которые при образовании комплекса с гиббереллином и рецепторным белком репрессируют гиббереллиновый сигнал, влияя таким образом на рост и развитие растения (Peng et al., 1999; Yamaguchi, 2008; Pearce et al., 2011; Thomas, 2017). Мутации в структуре белков DELLA, снижающие чувствительность к действию гиббереллина, были выявлены у многих видов растений и детально изучены на примере арабидопсиса и риса (Билова и др., 2016; Vera-Sirera et al., 2016). Что касается пшеницы, то на данный момент молекулярные и биохимические функции мутантных белков DELLA недостаточно изучены, что серьезно затрудняет перспективы использования таких мутаций на практике.

Помимо длины, немаловажную роль играют другие параметры стебля. Установлено, что диаметр соломины, ее толстостенность и вес, количество сосудистых пучков и широкое кольцо механических тканей коррелируют с устойчивостью к полеганию (Емельянова, Резниченко, 1970; Иванов, Дохунаев, 1979; Shah et al., 2017). Особен-

ную роль в прочности стебля многие исследователи отводят толщине стенок междоузлий и их анатомическому строению. Увеличение диаметра и толщины стебля приводит к повышению его прочности (Packer et al., 2015; Shah et al., 2017). Толщину стенок соломины обеспечивают клетки основной и механической тканей, а также компоненты проводящей системы. Толщина стебля пшеницы является ценным признаком, маркирующим потенциальную продуктивность растений (Лазаревич, 1999; Packer et al., 2015). Увеличение диаметра стебля способствует снижению риска возникновения полегания. Достигается это за счет увеличения диаметра проводящих пучков паренхимы и толщины склеренхимной ткани, которая, в свою очередь, зависит от числа слоев клеток и их диаметра (Лазаревич, 1999).

Имеется ряд исследований по выявлению генетических локусов, ассоциированных с параметрами стебля. С использованием дигиплоидной (DH) популяции озимой мягкой пшеницы шесть QTL для признаков «прочность стебля», «толщина стенки стебля», «диаметр сердцевинь» и «диаметр стебля» идентифицированы в хромосомах 1A, 2D, 3B (Hui et al., 2005). В других работах генетические локусы, отражающие корреляции между полеганием и толщиной стенки стебля, были картированы в хромосомах 2A, 3A, 5A, 1B, 4B, 4D, 6D и 7D (Keller et al., 1999; Xiao et al., 2015). Для числа проводящих пучков были зарегистрированы QTL в хромосомах 1A, 2D, 5D и 7D (Shah et al., 2017). Результаты картирования также свидетельствуют, что локусы с высоким фенотипическим эффектом в отношении толерантности к полеганию колокализуются с QTL, которые ответственны за высоту растения, диаметр и прочность стебля (Berry P., Berry S., 2015; Li et al., 2015).

Для изучения генетической архитектуры такого сложного признака, как полегание, необходимы масштабные фенотипические и генотипические эксперименты с использованием популяций большого размера. По последним данным (Singh et al., 2019), генетическая основа полегания была исследована с помощью нового методического подхода высокопроизводительного фенотипирования (HTP, high-throughput phenotyping). Применение методов геномной селекции и геномного прогнозирования позволило идентифицировать ключевой геномный район в хромосоме 2A и минорные локусы в других хромосомах, совпадающие по локализации с QTL, картированными ранее в других исследованиях.

С помощью современной микроскопической техники установлено, что прочность стебля обеспечивается комплексом анатомических признаков: численностью и взаимным расположением проводящих пучков, топографическим положением в стебле механических тканей и их параметрами (Лазаревич, Мыхлык, 2014). Выполненная часть стебля представлена эпидермисом, первичной корой и центральным цилиндром, состоящим из периферического кольца склеренхимы, проводящих пучков и запасающей паренхимы. В сердцевине паренхимы у мягкой пшеницы имеется полость – медулярная лагуна, которая образуется в результате разрушения сердцевинки при удлинении стебля (Носатовский, 1965; Емельянова, Резниченко, 1970).

Проводящие пучки паренхимы и первичной коры вместе составляют проводящую систему растения и одно-

временно входят в состав механической ткани. При изгибе или ломкости стебля в результате полегания происходит повреждение сосудистых проводящих пучков. Несмотря на отсутствие однозначных достоверных корреляций между числом проводящих пучков и устойчивостью к полеганию, при изучении анатомической структуры стебля видов и сортов яровой пшеницы, различающихся по полеганию, отмечена разница в количестве сосудисто-волоконистых пучков в междоузлиях (Ageeva et al., 2019). Увеличенное число сосудистых пучков наблюдалось у сортов, устойчивых к полеганию.

По мнению С.В. Лазаревича (1999), устойчивости к полеганию способствует ритмическое чередование крупных и малых пучков и наличие у крупных пучков склеренхимных обкладок. В случае узкого слоя склеренхимы формируются растения с тонким и ломким стеблем.

Устойчивость к полеганию представляет собой комплекс тесно взаимодействующих между собой признаков, поэтому важен не только широкий слой склеренхимной ткани, но и большое содержание в нем лигнина и целлюлозы (Shah et al., 2017). На сегодняшний день отсутствует достаточная информация о генетическом контроле содержания целлюлозы у пшеницы, за исключением результатов S. Kaur с коллегами (Kaur et al., 2017), которые с помощью полногеномного поиска ассоциаций выявили девять маркеров SNP, с высокой достоверностью связанных с генами, кодирующими β -тубулин, ауксин-индуцируемый белок и трансмембранный белок с неизвестной функцией. Предполагается, что эти гены могут быть вовлечены в биосинтез целлюлозы и влиять на прочность стебля.

Лигнин – важный структурный компонент вторичной клеточной стенки, который связан и с ростом растения, и с прочностью стебля. У пшеницы наблюдается значительная корреляционная связь между устойчивостью к полеганию и содержанием лигнина в стебле. D. Peng с коллегами в своем исследовании установили, что сорта с высоким содержанием лигнина могут быть использованы в качестве источников с целью создания образцов, толерантных к полеганию (Peng et al., 2014). Кроме того, в совокупности увеличение содержания лигнина и гемицеллюлозы увеличивает прочность стебля. Сорта с низким содержанием этих компонентов более склонны к полеганию (Zheng et al., 2017).

Еще одним важным структурным компонентом, обеспечивающим прочность стебля у пшеницы, является кремний (Иванченко, Резанова, 2016; Shah et al., 2017). Биологический активный кремний укрепляет эпидермис, кору и сосудисто-проводящие ткани, тем самым существенно повышая пластичность, упругость, прочность стебля, листьев и защитные функции растений (Иванченко, Резанова, 2016). Это происходит за счет того, что кремний значительно увеличивает содержание целлюлозы и лигнина в клетках склеренхимы. Он накапливается в эпидермальных тканях и коронарных клетках, обеспечивая их механическую прочность и жесткость (Shah et al., 2017; Zhang et al., 2017; Khobra et al., 2019). В тканях зерновых культур двуокись кремния составляет более половины остальных микроэлементов, поглощаемых из почвы. Зерновые поглощают кремния в 10–20 раз больше, чем бобовые. В течение вегетационного периода количество

кремния растет, достигая максимума к его завершению (Козлов и др., 2015; Walsh et al., 2018).

Отсутствие необходимого количества других микроэлементов также может оказывать влияние на прочность стебля. Дефицит фосфора вызывает снижение толщины стенки и физической прочности стебля. Этот элемент способствует укреплению корневой системы, играет главную роль в переносе энергии, в дыхании и фотосинтезе. Недостаток калия приводит к уменьшению диаметра стебля, поскольку он участвует в лигнификации клеточной стенки и колленхимы (Емельянова, Резниченко, 1970; Shah et al., 2017).

Заключение

Таким образом, степень устойчивости к полеганию растений зависит от многих внешних и внутренних факторов. Для снижения риска возникновения полегания необходимо учитывать не только анатомо-морфологические и физиологические особенности сорта, такие как длина и толщина стебля, длина междоузлий, содержание лигнина и целлюлозы и др., но и климатические особенности регионов, на территории которых культивируются генотипы. Немаловажно учитывать такие параметры, как время и плотность посева, внесение удобрений и регуляторов роста растений. Связь полегания с высотой стебля и другими анатомо-морфологическими параметрами констатируется во многих научных работах, однако влияние большинства параметров пока до конца не изучено. В свете использования новых биотехнологических методов и результатов секвенирования генома пшеницы и других злаков необходимо продолжать работы по идентификации целевых локусов для установления более точной взаимосвязи между полеганием и другими агрономическими признаками. При осуществлении селекционного процесса, начиная с оценки и подбора родительских пар и заканчивая исследованием новых гибридных форм, следует комплексно подходить к проблеме, решая ее с применением всех возможных подходов в зависимости от особенностей места выращивания и уровня требований к получаемой продукции.

Список литературы / References

- Былова Т.Е., Рябова Д.Н., Анисимова И.Н. Молекулярные основы формирования карликовости у культурных растений. Сообщение I. Нарушения роста из-за мутаций генов метаболизма и сигналинга гиббереллинов. *С.-х. биология*. 2016;51(1):3-16. DOI 10.15389/agrobiology.2016.1.3rus.
[Bilova T.E., Ryabova D.N., Anisimova I.N. Molecular basis of the dwarfism character in cultivated plants. I. Growth distortions due to mutations of gibberellin metabolism and signaling. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2016;51(1):3-16. DOI 10.15389/agrobiology.2016.1.3eng.]
- Дивашук М.Г., Васильев А.В., Беспалова Л.А., Карлов Г.И. Идентичность генов короткостебельности *Rht-11* и *Rht-B1e*. *Генетика*. 2012;48(7):897-900.
[Divashuk M.G., Vasilyev A.V., Bepalova L.A., Karlov G.I. Identity of the *Rht-11* and *Rht-B1e* reduced plant height genes. *Russ. J. Genet.* 2012;48(7):761-763. DOI 10.1134/S1022795412050055.]
- Дорофеев В.Ф., Якубцинер М.М., Руденко М.И., Мигушова Э.Ф., Удачин Р.А., Мережко А.Ф., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчаннинова О.Д., Шитова И.П. Пшеницы мира. Л.: Агротром-издат, 1976.

- [Dorofeev V.F., Yakubciner M.M., Rudenko M.I., Migushova E.F., Udachin R.A., Merezko A.F., Semenova L.V., Novikova M.V., Gradchaninova O.D., Shitova I.P. W heats of the World. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1976. (in Russian)]
- Емельянова Н.А., Резниченко Н.М. Пшеница и ее улучшение. М.: Колос, 1970.
[Emelyanova N.A., Reznichenko N.M. Wheat and Wheat Improvement. Moscow: Kolos Publ., 1970. (in Russian)]
- Захаров В.Г., Сюков В.В., Яковлева О.Д. Сопряженность анатомо-морфологических признаков с устойчивостью к полеганию яровой мягкой пшеницы в условиях Среднего Поволжья. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(3):506-510.
[Zakharov V.G., Syukov V.V., Yakovleva O.D. Correlation of morphoanatomical traits with lodging resistance in spring wheat in the middle Volga region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(3):506-510. (in Russian)]
- Иванов Б.И., Дохунаев В.Н. Биологические особенности яровой пшеницы в Якутии. Новосибирск: Наука, 1979.
[Ivanov B.I., Dokhunaev V.N. Biologic Features of Spring Wheat in Yakutia. Novosibirsk: Nauka Publ., 1979. (in Russian)]
- Иванченко Т.В., Резанова Г.И. Перспектива использования кремний-ауксинового биостимулятора на зерновых культурах. *Науч.-агр. журн.* 2016;1(98):29-32.
[Ivanchenko T.V., Rezanova G.I. Prospects of silicon auxin biostimulation of grain crops. *Nauchno-Agronomicheskii Zhurnal = Scientific Agronomy Journal*. 2016;1(98):29-32. (in Russian)]
- Ионова Е.В. Устойчивость к полеганию растений озимой твердой пшеницы. *Аграр. вестн. Урала*. 2009;8(62):56-57.
[Ionova E.V. Lodging resistance of winter wheat. *Agrarnii Vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2009;8(62):56-57. (in Russian)]
- Козлов А.В., Уромова И.П., Фролов Е.А., Мозолева К.Ю. Физиологическое значение кремния в онтогенезе культурных растений и при их защите от фитопатогенов. *Международ. студ. науч. вестн.* 2015;1:39.
[Kozlov A.V., Uromova I.P., Frolov E.A., Mozoleva K.Yu. The physiological role of silicon in the development of crops and their protection against plant pathogens. *Mezhdunarodnyy Studencheskiy Nauchnyy Vestnik = International Student Scientific Herald*. 2015; 1:39. (in Russian)]
- Коршунова А.Д., Дивашук М.Г., Даебл И.А., Карлов Г.И., Соловьев А.А. Валидация ДНК-маркеров генов короткостебельности у тритикале (*Triticosecale* Wittm.). *Изв. ТСХА*. 2014;3:21-31.
[Korshunova A.D., Divashuk M.G., Daebel I.A., Karlov G.I., Soloviev A.A. Validation of DNA markers for semi-dwarf genes in intritcale (*Triticosecale* Wittm.). *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2014;3:21-31. (in Russian)]
- Лазаревич С.В. Эволюция анатомического строения стебля пшеницы. Минск: БИТ «Хата», 1999.
[Lazarevich S.V. Evolution of the Anatomical Structure of the Wheat Stem. Minsk: Hata Publ., 1999. (in Russian)]
- Лазаревич С.В., Мыхлык А.И. Разнокачественность сортов овса посевного по развитию механических тканей стебля. *Вестн. БГСХА*. 2014;3:73-77.
[Lazarevich S.V., Mykhlyk A.I. Variety of oat cultivars for the development of mechanical tissues of the stem. *Vestnik BGSHA = Bulletin of the Belarussian State Agricultural Academy*. 2014;3:73-77. (in Russian)]
- Лелли Я. Селекция пшеницы: теория и практика. М.: Колос, 1980.
[Lelley J. Wheat Breeding: Theory and Practice. Budapest: Akad. Kiado, 1976. (Russ. ed.: Seleksiya Pshenitsy. Teoriya i Praktika. Moscow: Kolos Publ., 1980.)]
- Лубнин А.Н. Селекция мягкой яровой пшеницы в Сибири. Новосибирск, 2006.
[Lubnin A.N. Spring Wheat Breeding in Siberia. Novosibirsk, 2006. (in Russian)]
- Носатовский А.И. Пшеница. Биология. М.: Колос, 1965;281-291.
[Nosatovsky A.I. Wheat. Biology. Moscow: Kolos Publ., 1965;281-291. (in Russian)]
- Терентьев В.М. Физиология устойчивости растений к полеганию и методы ее оценки. В: Физиология растений – в помощь селекции. М.: Наука, 1974;108-123.
[Terentyev V.M. Physiology of plant resistance to lodging and methods for its assessment. In: Plant Physiology in Aid of Breeding. Moscow: Nauka Publ., 1974;108-123. (in Russian)]
- Шаповал О.А., Вакуленко В.В., Можарова И.П. Ретарданты. *Защита и карантин растений*. 2010;8:4-7.
[Shapoval O.A., Vakulenko V.V., Mozharova I.P. Retardants. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2010;8:4-7. (in Russian)]
- Агеева Е.В., Леонова И.Н., Салина Е.А., Лихенко И.Е. Анатомо-морфологические признаки стеблей весенней пшеницы. In: Proc. 5th Int. Conf. PlantGen2019. Novosibirsk, 2019;26. DOI 10.18699/PlantGen2019-008.
- Berry P.M. Lodging resistance in cereals. In: Encyclopedia of Sustainability Science and Technology. Springer, NY, 2012. DOI 10.1007/978-1-4419-0851-3_228.
- Berry P.M., Berry S.T. Understanding the genetic control of lodging-associated plant characters in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 2015;205:671-689. DOI 10.1007/s10681-015-1387-2.
- Berry P.M., Sterling M., Spink J.H., Baker C.J., Sylvester-Bradley R., Mooney S.J., Tams A.R., Ennos A.R. Understanding and reducing lodging in cereals. *Adv. Agron.* 2004;84:217-271. DOI 10.1016/S0065-2113(04)84005-7.
- Borojevic K., Borojevic K. The transfer and history of “reduced height genes” (*Rht*) in wheat from Japan to Europe. *Heredity*. 2005;96(4): 455-459. DOI 10.1093/jhered/esi060.
- Crook M.J., Ennos A.R. The mechanics of root lodging in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Exp. Bot.* 1993;44:1219-1224.
- Dahiya S., Kumar S., Harender, Chaudhary C. Lodging: significance and preventive measures for increasing crop production. *Int. J. Chem. Studies*. 2018;6(1):700-705.
- Daoura B.G., Chen L., Du Y., Hu Y.-G. Genetic effects of dwarfing gene *Rht-5* on agronomic traits in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and QTL analysis on its linked traits. *Field Crops Res.* 2014;156: 22-29. DOI 10.1016/j.fcr.2013.10.007.
- Evans L.T. Crop evolution, adaptation and yield. *Photosynthetica*. 1998;34:56-60. DOI 10.1023/A:1006889901899.
- Fischer R.A., Stapper M. Lodging effects on high yielding crops of irrigated semi-dwarf wheat. *Field Crops Res.* 1987;17:245-248.
- Foulkes M.J., Slafer G.A., Davies W.J., Berry P.M., Sylvester-Bradley R., Martre P., Calderini D.F., Griffiths S., Reynolds M.P. Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *J. Exp. Bot.* 2011;62(2):469-486. DOI 10.1093/jxb/erq300.
- Hai L., Guo H., Xiao S., Jiang G., Zhang X., Yan C., Xin Z., Jia J. Quantitative trait loci (QTL) of stem strength and related traits in a doubled-haploid population of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 2005;141:1-9. DOI 10.1007/s10681-005-4713-2.
- Kaur S., Zhang X., Mohan A., Dong H., Vikram P., Singh S., Zhang Z., Gill K.S., Dhugga K.S., Singh J. Genome-Wide Association Study reveals novel genes associated with culm cellulose content in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 2017;8:1913. DOI 10.3389/fpls.2017.01913.
- Kelbert A.J., Spaner D., Briggs K.G., King J.R. The association of culm anatomy with lodging susceptibility in modern spring wheat genotypes. *Euphytica*. 2004;136:211-221. DOI 10.1023/B:EUPH.0000030670.36730.a4.
- Keller M., Karutz C., Schmid J.E., Stamp P., Winzler M., Keller B., Messner M.M. Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat × spelt population. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98: 1171-1182.
- Khobra R., Sareen S., Meena B.K., Kumar A., Tiwari V.K., Singh G.P. Exploring the traits for lodging tolerance in wheat genotypes. *Phy-*

- siol. Mol. Biol. Plants.* 2019;25(3):589-600. DOI 10.1007/s12298-018-0629-x.
- Knopf C., Becker H., Ebmeyer E., Korzun V. Occurrence of three dwarfing *Rht* genes in German winter wheat varieties. *Cereal Res. Commun.* 2008;36(4):553-560. DOI 10.1556/CRC.36.2008.4.4.
- Kong E., Liu D., Guo X., Yang W., Sun J., Li X., Zhan K., Cui D., Lin J., Zhang A. Anatomical and chemical characteristics associated with lodging resistance in wheat. *Crop J.* 2013;1:43-49. DOI 10.1016/j.cj.2013.07.012.
- Li C., Bai G., Carver B.F., Chao S., Wang Z. Mapping quantitative trait loci for plant adaptation and morphology traits in wheat using single nucleotide polymorphisms. *Euphytica.* 2015;208:299-312. DOI 10.1007/s10681-015-1594-x.
- Mavi G.S., Nanda G.S., Sohu V.S. Screening bread wheat genotypes for lodging resistance. *Crop Improv. (India).* 2004;31(1):113-118.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2013, Supplement 2014–2017. Available at: www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/
- Mulder E.G. Effect of mineral nutrition on lodging of cereals. *Plant Soil.* 1954;5(3):246-306.
- Niu L., Feng S., Ding W., Li G. Influence of speed and rainfall on large-scale wheat lodging from 2007 to 2014 in China. *PLoS One.* 2016; 11(7):e0157677. DOI 10.1371/journal.pone.0157677.
- Packa D., Wiwart M., Suchowilska E., Dienkowska T. Morpho-anatomical traits of two lowest internodes related to lodging resistance in selected genotypes of *Triticum*. *Int. Agrophys.* 2015;29:475-483. DOI 10.1515/intag-2015-0053.
- Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Ka N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat. *Plant Physiol.* 2011;157:1820-1831. DOI 10.1104/pp.111.183657.
- Peng D., Chen X., Yin Y., Lu K., Yang W., Tang Y., Wang Z. Lodging resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) lignin accumulation and its related enzymes activities due to the application of paclobutrazol or gibberellin acid. *Field Crops Res.* 2014;157:1-7. DOI 10.1016/j.fcr.2013.11.015.
- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintam J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 1999;400(6741):256-261.
- Pinthus M.J. Spread of the root system as indicator for evaluating lodging resistance of wheat. *Crop Sci.* 1967;7:107-110.
- Shah A.N., Tanveer M., Rehman A.U., Anjum S.A., Iqbal J., Ahmad R. Lodging stress in cereal – effects and management: an overview. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017;24:5222-5237. DOI 10.1007/s11356-016-8237-1.
- Shah L., Yahya M., Shah S., Nadeem M., Ali A., Ali A., Wang J., Riaz M.W., Rehman S., Wu W., Khan R.M., Abbas A., Riaz A., Anis G.B., Si H., Jiang H., Ma C. Improving lodging resistance: using wheat and rice as classical examples. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4211. DOI 10.3390/ijms20174211.
- Singh D., Wang X., Kumar U., Gao L., Noor M., Imtiaz M., Singh R.P., Poland J. High-throughput phenotyping enabled genetic dissection of crop lodging in wheat. *Front. Plant Sci.* 2019;10:394. DOI 10.3389/fpls.2019.00394.
- Souza L.T., Espindula M.C., Rocha V.S., Fernandes D.C., Souza M.A. Growth retardants in wheat and its effect in physiological quality of seeds. *Ciência Rural.* 2010;40(6):1431-1434. DOI 10.1590/S0103-84782010000600031.
- Thomas S.G. Novel *Rht-1* dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* 2017;68(3): 354-358. DOI 10.1093/jxb/erw509.
- Vera-Sirera F., Gomez M.D., Perez-Amador M.A. DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. In: Gonzalez D.H. (Ed.). *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects.* Acad. Press; Elsevier, 2016;313-328. DOI 10.1016/B978-0-12-800854-6.00020-8.
- Verma V., Worland A., Savers E., Fish L., Caligari P., Snape J. Identification and characterization of quantitative trait loci related to lodging resistance and associated traits in bread wheat. *Plant Breed.* 2005;124:234-241. DOI 10.1111/j.1439-0523.2005.01070.x.
- Walsh O.S., Shafian S., McClintick-Chess J.R., Belmont K.M., Blanscet S.M. Potential of silicon amendment for improved wheat production. *Plants.* 2018;7(2):26. DOI 10.3390/plants7020026.
- Wang Y., Chen L., Du Y., Yang Z., Condon A.G., Hu Y.-G. Genetic effect of dwarfing gene *Rht13* compared with *Rht-D1b* on plant height and some agronomic traits in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Res.* 2014;162:39-47. DOI 10.1016/j.fcr.2014.03.014.
- Weibel R.O., Pendleton J.W. Effect of artificial lodging on winter wheat grain yield and quality. *Agron. J.* 1964;56:487-488.
- Wurschum T., Langer S.M., Longin C.F.H., Tucker M.R., Leiser W.L. A modern Green Revolution gene for reduced height in wheat. *Plant J.* 2017;92:892-903. DOI 10.1111/tj.13726.
- Xiao Y., Liu J., Li H., Cao X., Xia X., He Z. Lodging resistance and yield potential of winter wheat: effect of planting density and genotype. *Front. Agr. Sci. Eng.* 2015;2(2):168-178. DOI 10.15302/J-FASE-2015061.
- Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008;59:225-251. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.
- Zhang M., Wang H., Yi Y., Ding J., Zhu M., Li C. Effect of nitrogen levels and nitrogen ratios on lodging resistance and yield potential of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One.* 2017;12(11): e0187543. DOI 10.1371/journal.pone.0187543.
- Zheng M., Chen J., Shi Y., Li Y., Yin Y., Yang D., Luo Y., Pang D., Xu X., Li W., Ni J., Wang Y., Wang Z., Li Y. Manipulation of lignin metabolism by plant densities and its relationship with lodging resistance in wheat. *Sci. Rep.* 2017;7:41805. DOI 10.1038/srep41805.
- Zuber U., Winzeler H., Messmer M.M., Keller M., Keller B., Schmid J.E., Stamp P. Morphological traits associated with lodging resistance of spring wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 1999;182:17-24.

ORCID ID

E.V. Ageeva orcid.org/0000-0002-7714-5609
I.N. Leonova orcid.org/0000-0002-6516-0545

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-16-00011-П.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.01.2020. После доработки 30.03.2020. Принята к публикации 17.04.2020.

Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России

А.В. Хютти^{1,3} ✉, Д.А. Рыбаков², Т.А. Гавриленко^{2,3}, О.С. Афанасенко^{1,3}

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

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

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: khiutti@mail.ru

Аннотация. Активная экспансия зарубежных сортов картофеля на территорию Российской Федерации привела к смене доминирующих видов патогенов этой культуры и появлению новых патотипов возбудителей вредоносных болезней. Целью работы была оценка устойчивости к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента картофеля и определение поражаемости возделываемых сортов картофеля грибными и оомицетными болезнями в различных агроклиматических зонах России. Проведена оценка устойчивости 41 сорта зарубежной селекции, разрешенного к использованию на территории РФ, к патотипу Ro1 *Globodera rostochiensis* и к изоляту VZR17 *Phytophthora infestans*, включающего гены вирулентности 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11. Устойчивыми к золотистой картофельной нематодой оказались 38 сортов. У 96.6 % изученных нематодоустойчивых сортов выявлен маркер гена *H1* устойчивости к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*, восприимчивые сорта этим маркером не обладали. Абсолютной устойчивостью к возбудителю фитофтороза отличались сорта Alouette и Sarpo Mira (балл 9); высоким уровнем устойчивости (баллы 6 и 7) характеризовались сорта Evolution, Red Fantasy и Ricarda. Сорта Baltic Rose, Damaris, Desiree, Gala, Labella, Laperla, Mia, Sanibel, Zekura, Queen Anne, Red Lady и 7 for 7 были отнесены к восприимчивым, хотя в характеристиках оригинаторов указана средняя устойчивость к фитофторозу. Фитопатологическая экспертиза проведена для 92 образцов 39 сортов семенного картофеля из четырех федеральных округов РФ: Приволжского, Северо-Западного, Центрального и Северо-Кавказского. Наибольшее распространение на всех сортах получили ризоктониоз, сухая фузариозная гниль и серебристая парша. Стопроцентное поражение клубней серебристой паршой отмечено в различных регионах на сортах элитных репродукций Red Scarlett, Evolution, Labella, Colombo, Gala, Невский. Широко распространен антракноз картофеля; сильнее всего были поражены клубни элитной и второй репродукции сорта Red Scarlett – от 50.0 до 71.4 % в Центральном федеральном округе.

Ключевые слова: распространенность болезней картофеля; *Phytophthora infestans*; *Globodera rostochiensis*; серебристая парша; антракноз; сорта картофеля; устойчивость; ДНК-маркеры.

Для цитирования: Хютти А.В., Рыбаков Д.А., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):363-375. DOI 10.18699/VJ20.629

Resistance to causal agents of late blight and golden potato nematode of the modern cultivars of seed potatoes and their phytosanitary status in various agroclimatic zones of the European part of Russia

A.V. Khiutti^{1,3} ✉, D.A. Rybakov², T.A. Gavrilenko^{2,3}, O.S. Afanasenko^{1,3}

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

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

³ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: khiutti@mail.ru

Abstract. The active expansion of foreign potato cultivars on the territory of the Russian Federation has led to a change in the dominant pathogen species and to the emergence of new pathotypes of causal agents of harmful potato diseases. The aim of the study was to evaluate resistance to *Phytophthora infestans* and *Globodera rostochiensis* of modern potato cultivars and determine the distribution of fungal and oomycetous diseases on potato cultivars in various

agroclimatic zones of Russia. The resistance of 41 foreign cultivars was evaluated to pathotype Ro1 *G. rostochiensis* and to isolate VZR17 *P. infestans* with virulence genes 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11. Resistant to *G. rostochiensis* were 38 cultivars. 57R marker of the H1 gene conferring resistance to the Ro1 pathotype of *G. rostochiensis* was detected in 96.6 % of the nematode resistant cultivars studied; susceptible varieties did not possess this marker. Absolute resistance to the causative agent of late blight was demonstrated by the cultivars Alouette and Sarpo Mira (score 9); high levels of resistance (score 6 and 7) were determined for the cultivars Evolution, Red Fantasy and Ricarda. The cultivars Baltic Rose, Damaris, Desiree, Gala, Labella, Laperla, Mia, Sanibel, Zekura, Queen Anne, Red Lady and '7 for 7' were classified as susceptible, although the characteristics of originators indicated average resistance to late blight. A phytopathological test was conducted on 92 samples of 39 varieties of seed potatoes from four federal districts of the Russian Federation: Volga, North-West, Central and North Caucasus. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. and *Helminthosporium solani* are most common on all varieties. 100 % defeat of tubers by *H. solani* was recorded in various regions on the cultivars Red Scarlett, Evolution, Labella, Colombo, Gala and Nevsky. Widespread *Colletotrichum coccodes* on tubers of the elite and 2nd reproductions of the potato cultivar Red Scarlett (50.0–71.4 %) was recorded in the Central District.

Key words: distribution of potato diseases; *Phytophthora infestans*; *Globodera rostochiensis*; potato cultivars; resistance to diseases; *Helminthosporium solani*; *Colletotrichum coccodes*; DNA markers.

For citation: Khiutti A.V., Rybakov D.A., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Resistance to causal agents of late blight and golden potato nematode of the modern cultivars of seed potatoes and their phytosanitary status in various agroclimatic zones of the European part of Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):363-375. DOI 10.18699/VJ20.629 (in Russian)

Введение

В 2015 г. в Берлине, на Международном конгрессе по защите растений (IPPC 2015) были представлены данные о том, что на картофеле даже при применении химических средств защиты потери от болезней составляют 25–30 % (Oerke, 2006).

Российская Федерация является лидером по выращиванию зарубежных сортов картофеля: из 455 сортов, включенных в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» в 2019 г., 182 (40.0 %) – селекции стран дальнего зарубежья, 34 (7.5 %) – стран СНГ, и только 239 (52.5 %) сортов созданы российскими селекционерами (www.gossortrf.ru). Отметим также, что в большинстве картофелеводческих хозяйств представленность зарубежных сортов достигает 100 %.

Активная экспансия зарубежных сортов и несоблюдение регламента по их агротехнике привели к плачевному результату: на территории РФ распространились новые патотипы, относящиеся как к оомицетам и грибам, так и к вирусам, бактериям и нематодам (Еланский, 2015; Кузнецова и др., 2016). Кроме того, появляются новые патогены, например возбудители черной ножки и мокрой гнили *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. parmentieri*, новый для России вирус P (PVP), возбудитель розового фитофтороза *Phytophthora erythroseptica* Pethybr. (Игнатов и др., 2019; Yanagisawa et al., 2019).

Наиболее вредоносными в России являются следующие оомицетные и грибные болезни картофеля: фитофтороз (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), потери урожая от которого без применения химических средств защиты варьируют от 80 до 100 %; комплекс паршей картофеля, включающий ризоктониоз (*Rhizoctonia solani* Kühn), серебристую (*Helminthosporium solani* Durieu et Mont.), обыкновенную (*Streptomyces* spp.), бугорчатую (*Polyscytalum pustulans* (Owen & Wakef.) Ellis) и порошистую (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* Toml.) паршу, потери от которых достигают 30 %; а также антракноз (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes) – потери до 20–

30 %, сухая фузариозная гниль (грибы рода *Fusarium* spp.) и фомоз (*Phoma* spp.) – потери не менее 20 %, и объект как внутреннего, так и внешнего карантина – золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959), вредоносность которой достигает 80–90 % (Winslow, Willis, 1972; Dillard, 1992; Johnson, Miliczky, 1993; Johnson, 1994; Tsror et al., 1999; Collins, 2000; Lees, Hilton, 2003; Judelson, Blanco, 2005; Haldar et al., 2006; Gudmestad et al., 2007; Haverkort et al., 2009; Tsror, 2010; Abbas et al., 2013).

Конкурентоспособность сортов картофеля определяется главным образом устойчивостью к наиболее вредоносным в зоне возделывания болезням. В связи с этим создание сортов картофеля, устойчивых к основным болезням, является приоритетным направлением селекции. Доля устойчивых к болезням сортов картофеля, зарегистрированных в Госреестре селекционных достижений, с каждым годом увеличивается. Наиболее существенные результаты получены при селекции картофеля на устойчивость к карантинным болезням. Все новые сорта, внесенные в Госреестр, отличаются устойчивостью к возбудителю рака картофеля, кроме четырех старых сортов (Волжанин, Ермак улучшенный, Лорх и Приобский), доля которых составляет 0.6 %. К настоящему времени 55.4 % сортов, включенных в Госреестр, устойчивы к золотистой картофельной нематоде (ЗКН) (www.gossortrf.ru). Зарегистрированные в Госреестре в 2019 г. 22 сорта картофеля охарактеризованы оригинаторами и Госсортокомиссией по устойчивости только к четырем возбудителям: раку (все устойчивы), золотистой картофельной нематоде (устойчивы 15 сортов) и морщинистой и полосчатой мозаике, возбудителем которых является PVY (устойчивы 8 сортов). Между тем ни отечественные, ни зарубежные сорта в Госреестре не охарактеризованы на устойчивость к таким вредоносным заболеваниям, как фитофтороз, ризоктониоз, обыкновенная и серебристая парша, антракноз, а также к другим вирусным болезням. Информацию по устойчивости некоторых новых отечественных сортов можно найти в издании «Сорта картофеля российской селекции» (2018).

На сайтах зарубежных селекционных фирм приводятся характеристики устойчивости к наиболее экономически значимым болезням, в частности к цистообразующим нематодам, вирусу картофеля Y (PVY) и к фитофторозу. Однако возможны расхождения в оценках, сделанных за рубежом и в условиях разных агроклиматических зон России. Связано это прежде всего с различным составом популяций патогенов и особенностями экологических условий. В этом плане большое значение имеет информация о генах устойчивости сортов, особенно тех, что обладают устойчивостью к различным патотипам и видам цистообразующих нематод, поскольку фитопатологические тесты длительны, трудоемки и не всегда возможны для карантинных объектов. В зарубежных селекционных центрах давно и успешно используются методы ДНК-маркирования для оценки генетической защищенности сортового генофонда. В последнее время такие данные появляются и для отечественных сортов. Так, сотрудниками ВИР проведен скрининг 225 отечественных сортов картофеля, 114 из которых входят в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» (Антонова и др., 2016; Клименко и др., 2017; Гавриленко и др., 2018). Наиболее эффективный маркер 57R гена *H1* выявлен лишь у 28 % изученных сортов (и у 26 %, входящих в Госреестр); эти сорта по данным госсортоиспытаний являются устойчивыми к патотипу Ro1 золотистой картофельной нематоды.

В связи с экономической значимостью особо опасных болезней, характеристика поражаемости современных сортов возбудителями этих болезней имеет важное значение для селекции и семеноводства, а также для выбора сортов для возделывания, особенно семенного картофеля, в эпидемиологически опасных зонах. Целью работы была оценка устойчивости к возбудителям фитофтороза и глободероза и определение поражаемости возделываемых сортов картофеля грибными и оомицетными болезнями в различных агроклиматических зонах России.

Материалы и методы

Растительный материал. Экспериментальной выборкой для изучения устойчивости к патогенам послужили 42 сорта зарубежной и 1 сорт (восприимчивый контроль) отечественной селекции. Для 21 сорта из выборки была проведена фитопатологическая экспертиза образцов семенного картофеля из различных регионов РФ.

Оценка на устойчивость к ЗКН. Оценка на устойчивость сеянцев картофеля к *G. rostochiensis* проводили по методике, рекомендованной Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений, с небольшими модификациями (ОЕПР/ЕРРО, 2006). Исследуемые сорта высаживали в пластиковые горшки объемом 500 см³, наполовину наполненные почвой (по одному клубню в каждый горшок). В качестве инфекционного материала для инокуляции сортов использовали популяцию золотистой картофельной нематоды, отобранную в Ленинградской области из известного очага *G. rostochiensis* и типированную до патотипа Ro1 (Limantseva et al., 2014).

В каждый горшок вносили инокулом ЗКН из расчета 1500 яиц и личинок в 100 см³ почвы. Яйца и личинки получали методом раздавливания цист ЗКН в капле воды

на предметном стекле. После инокуляции клубней дополнительно досыпали почву до верха горшка. Горшки оставляли в контролируемых условиях при температуре 22 °С. В качестве восприимчивого контроля использовали сорт Невский, в качестве устойчивого контроля – сорт Red Scarlett. Сорта высаживали в десятикратной повторности и двукратной аналитической. Учет результатов заражения проводили через три месяца, что является достаточным промежутком времени для развития цист ЗКН. Экстракцию цист из почвы осуществляли методом флотации (Turner, 1998). Экстрагированные цисты переносили на покровные стекла в каплю воды, раздавливали и подсчитывали количество яиц и личинок в них.

Оценку результатов заражения проводили по шкале с подразделением образцов на группы: балл 9 (относительная восприимчивость <1 %) – Very high; балл 8 (1.1–3 %) – High/very high; балл 7 (3.1–5 %) – High; балл 6 (5.1–10 %) – Moderate/high; балл 5 (10.1–15 %) – Moderate; балл 4 (15.1–25 %) – Moderate/low; балл 3 (25.1–50 %) – Low; балл 2 (50.1–100 %) – Low/very low; балл 1 (>100 %) – Very low. К классу устойчивых (R) относили растения, тип реакции которых соответствовал 7–9 баллам, среднеустойчивых (RS) – 4–6 баллам, восприимчивых (S) – 1–3 баллам. Относительную восприимчивость определяли по формуле: количество яиц и личинок исследуемого образца делили на количество яиц и личинок эталонного восприимчивого сорта и умножали на 100 %.

Оценка на устойчивость к фитофторозу. Лабораторный скрининг сортов картофеля на устойчивость к фитофторозу проводили по стандартной методике (Brylińska, Śliwka, 2017). В качестве инфекционного материала использовали изолят VZR17, включающий все гены вирулентности 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11.

Отделенные листья помещали в поддоны (45 × 35 см) на влажную фильтровальную бумагу, абаксиальной стороной вниз: по 3 листа каждого образца, по 3 листа восприимчивого сорта Bintje и по 3 листа устойчивого контроля сорта Sagro Mira, в двукратной биологической повторности. Для заражения использовали инокулом, выдержанный в течение 30 мин при температуре 10–12 °С для стимуляции выхода зооспор. Инфекционная нагрузка составляла 50000 спорангиев/мл. Инокулом наносили по одной капле по центру каждого листа между центральной и отходящей жилками. Объем капли составлял 30 мкл. Инокулированные листья выдерживали в течение 24 ч в темноте при температуре 16 °С. На протяжении всего эксперимента поддоны были закрыты стеклянными крышками для поддержания постоянной влажности (80–100 %). Через сутки после инокуляции листья переворачивали абаксиальной стороной вверх, после чего кюветы переносили в климатический бокс с температурой 16 °С, интенсивностью освещения 1600 лк и 16-часовым фотопериодом.

Учет результатов заражения проводили на 6-е сутки после инокуляции, по стандартной шкале с подразделением образцов на группы: балл 9 (0 % пораженной площади) – Very high; балл 8 (3 %) – High/very high; балл 7 (3.1–10 %) – High; балл 6 (10.1–25 %) – Moderate/high; балл 5 (25.1–75 %) – Moderate; балл 4 (75.1–90 %) – Moderate/

Таблица 1. Праймеры, использованные для детекции гена *HI*, контролирующего устойчивость к *G. rostochiensis* (патотипы Ro1, Ro4) у сортов картофеля

Хромосома	Ген	Маркер	T ^m	Размер диагностического фрагмента, п. н.	Лит. источник
V	<i>HI</i>	57R	60	450	Schultz et al., 2012
		239E4left/AluI	52	120 + 230	Bakker et al., 2004

low; балл 3 (90.1–97 %) – Low; балл 2 (97.1–99 %) – Low/very low; балл 1 (100 %) – Very low. Растения с типом реакции, соответствующим баллам 7–9, относили к классу устойчивых (R), 4–6 – среднеустойчивых (RS), 1–4 – восприимчивых (S).

Молекулярный скрининг. ДНК выделяли из листьев тепличных растений методом модифицированной СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013). Скрининг проводили на наличие маркеров гена *HI*, контролирующего устойчивость к патотипам Ro1 и Ro4 *G. rostochiensis* (Dalmu et al., 2012). Для маркеров гена *HI* показана различная эффективность в молекулярном скрининге. Высокий уровень специфичности демонстрировал SCAR-маркер 57R и низкую эффективность – CAPS-маркер этого гена, 239E4left/AluI (Антонова и др., 2016). В то же время в исследованиях зарубежных коллег сообщалось о высокой частоте встречаемости CAPS-маркера 239E4left/AluI гена *HI* у нематодоустойчивых зарубежных сортов. Поэтому в данной работе использовали оба эти маркера. Праймеры для работы подбирали по литературным источникам (табл. 1). Использовали SCAR-маркер 57R, интегрированный в ассоциированную с устойчивостью область ‘341 Kb’ локуса *HI*, и CAPS-маркер 239E4left/AluI, расположенный на расстоянии 2.1 сМ от ассоциированного с устойчивостью локуса (Finkers-Tomczak et al., 2011).

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси состава: 40 нг тотальной ДНК, 1× реакционный буфер, 2.5 мМ MgCl₂, 0.4 мМ каждого из dNTP, по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы («Диалат», Москва). Условия реакции соответствовали указанным в литературе.

В качестве положительных контролей для маркера 57R использовали сорта Живица, Сударыня и Sante, для которых наличие диагностического фрагмента было установлено нами ранее; контролем для маркера 239E4left/AluI служил сорт Sante (Антонова и др., 2016). Рестриктию осуществляли ферментом AluI («СибЭнзим»), используя протокол фирмы-изготовителя. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 2 % агарозных гелях с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

Фитопатологический анализ. Отбор клубневых проб и диагностику осуществляли в соответствии с методиками, приведенными в ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества» (2017), и международным стандартом по семенному картофелю UNECE S-1 (2018). Для каждого анализируемого образца отбиралось по 10 точечных проб, составлявших в совокупности не менее 250 клубней. Однако для образцов, датированных 2018 г., количество анализируемых клубней варьировало от 20 до 100 шт.

Экспериментальная выборка при фитопатологической экспертизе семенного картофеля состояла из 92 образцов 39 сортов из четырех федеральных округов РФ: 24 образца из Приволжского, 35 – из Северо-Западного, 8 – из Центрального, 9 – из Северо-Кавказского.

Диагностику оомицетных, грибных и бактериальных болезней выполняли, руководствуясь информацией, представленной в специализированных компендиумах (Compendium..., 1981, 2001; Diseases..., 2008), а также с использованием определителей UNECE (2014) и AHDB (2018).

Анализировали каждый клубень изучаемого образца. Клубни с нетипичной симптоматикой или малозаметными патологическими изменениями помещали во влажные камеры. Поверхность клубней предварительно дезинфицировали 70 % этиловым спиртом с последующей промывкой дистиллированной водой. При необходимости клубни разрезали на небольшие ломтики размером не менее 1 см. Инкубационный период составлял от 3 до 14 дней, в зависимости от возбудителя, при постоянной температуре 20 °С и 100 % влажности.

Выделение в чистую культуру возбудителей болезней осуществляли с использованием картофельной (картофель 200 г, агар-агар 20 г, H₂O 1000 мл) и ржаной (рожь 60 г, сахароза 20 г, агар-агар 15 г, H₂O 1000 мл) сред.

Результаты

Устойчивость сортов картофеля к золотистой картофельной нематодe

Согласно полученным данным, из 41 сорта зарубежной селекции только три сорта (или 7.3 % от всех изученных) оказались восприимчивыми к ЗКН: Bintje, Desiree и Sarpo Mira; остальные проявили себя как устойчивые. Промежуточных групп устойчивости не было выявлено (табл. 2).

Среди 29 изученных нематодоустойчивых сортов частота встречаемости генотипов со SCAR-маркером 57R гена *HI*, определяющего устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*, очень высокая – 96.6 % (28 из 29 устойчивых сортов). Исключением является устойчивый (по данным фитопатологических тестов) сорт Red Fantasy, у которого не выявлены маркеры гена *HI* (рис. 1, см. табл. 2).

Коэффициент корреляции Пирсона между наличием маркера 57R и данными об устойчивости сортов к патотипу Ro1 составил +0.88 ($n = 33$, вместе с контролем – сорт Невский). Другой маркер гена *HI* – CAPS-маркер 239E4Left/AluI – обнаруживался гораздо реже. Этот маркер наряду с 57R был детектирован только у трех сортов (Armada, Estrella, Gala), все они проявляли устойчивость к ЗКН (см. табл. 2).

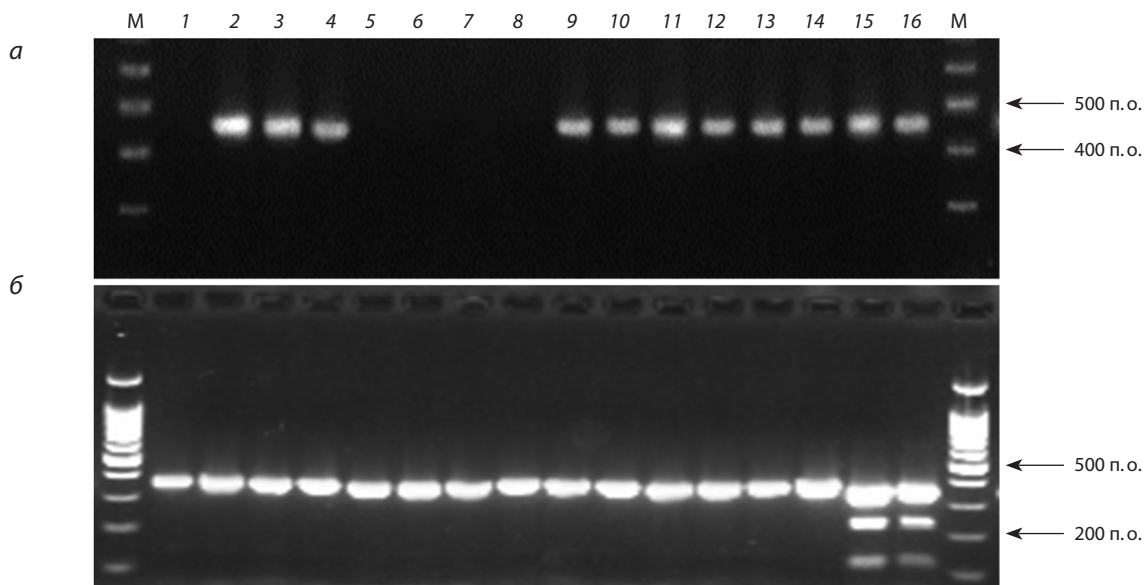


Рис. 1. Молекулярный скрининг сортов картофеля изученной выборки при помощи маркеров 57R (а) и 239E4left (б) гена *H1*. Сорта: 1 – Невский, 2 – Alouette, 3 – Baltic Rose, 4 – Nandina, 5 – Sarpo Mira, 6 – Bintje, 7 – Desiree, 8 – Red Fantasy, 9 – Christel, 10 – Madeira, 11 – Ramos, 12 – Queen Anne, 13 – Delphine, 14 – Labella, 15 – Armada, 16 – Estrella. М – маркер молекулярного веса «100 b.p.+1500» («СибЭнзим»).

Устойчивость сортов картофеля к возбудителю фитофтороза

Только два сорта зарубежной селекции оказались абсолютно устойчивыми к возбудителю фитофтороза картофеля: Alouette и Sarpo Mira (см. табл. 2). Остальные 39 сортов показали разный уровень устойчивости или восприимчивости. Из них можно отметить три сорта: Evolution, Red Fantasy и Ricarda, которые выделялись достаточно высоким уровнем устойчивости (средний балл 7.3, 6.8 и 6.4 соответственно).

Оценка фитосанитарного состояния семенного картофеля различных сортов в регионах РФ

Результаты фитопатологического анализа партий элитного и репродукционного семенного картофеля свидетельствуют, что во всех регионах на семенном картофеле выявлены: *Ph. infestans*, *R. solani*, *H. solani*, *Streptomyces* spp., *P. pustulans*, *C. coccodes*, *Fusarium* spp., *Phoma* spp. (табл. 3). Бугорчатая парша *P. pustulans* отмечена повсеместно, кроме Северо-Кавказского федерального округа. Порошистая парша *S. subterranea* f. sp. *subterranea* отмечена только в одном образце сорта Вектор в Приволжском федеральном округе.

Наибольшее распространение на всех сортах получили ризоктониоз и серебристая парша (рис. 2). Стопроцентное поражение клубней серебристой паршой отмечено в различных регионах на сортах Red Scarlett (СЭ, Э и PC1-2), Evolution (Э, PC1), Labella (Э), Colomba (Э), Gala (Э), Невский (Э). В Северо-Кавказском ФО серебристая парша была отмечена только на 6.0 % образцов сорта Невский (СЭ). Широкое распространение получил антракноз картофеля. Сильнее всего были поражены клубни сорта Red Scarlett (Э и PC2) – от 50 до 71.4 % в Центральном федеральном округе. Максимальное поражение фитофторозом отмечено на сорте Невский (Э) – 63.1 %.

Обсуждение

Одним из приоритетных направлений селекции является создание сортов, сочетающих в себе групповую устойчивость, в первую очередь к таким опасным заболеваниям, как фитофтороз, ризоктониоз, комплекс паршей, вирусные, бактериальные и нематодные болезни. В «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию» на территории Российской Федерации (2019), данные по устойчивости сортов картофеля к комплексу заболеваний отсутствуют. Среди обязательных характеристик приведены показатели устойчивости к раку, золотистой картофельной нематоды и вирусу Y. Для некоторых сортов указана их устойчивость/восприимчивость к фитофторозу. Наши результаты свидетельствуют, что патогенный комплекс на современных сортах картофеля значительно шире и может быть определяющим для конкурентоспособности сорта на отечественном рынке сортов.

Для сортов зарубежной селекции на англоязычных интернет-ресурсах в полной мере отражены все сортовые особенности, включая устойчивость к основным заболеваниям по 9-балльной шкале. Стоит отметить, что для большинства сортов приведена информация по устойчивости к фитофторозу ботвы и клубней и к вирусу картофеля Y (PVY). Наличие остальной информации по устойчивости/восприимчивости к болезням варьирует в зависимости от семеноводческой компании и страны-производителя. Общеизвестно, что оценка сорта на устойчивость к заболеваниям проводится на территории страны-оригинатора к местным популяциям или расам патогенов, которые могут значительно отличаться от представленных в России. Например, при фитопатологическом анализе сорта Sifra, который по данным оригинатора высокоустойчив к фитофторозу по клубням (8 баллов, где 9 – абсолютная устойчивость) (см. табл. 3), количе-

Таблица 2. Характеристика устойчивости современных сортов картофеля к *G. rostochiensis* и *Ph. infestans*

Номер п/п	Сорт	Год регистрации	Страна происхождения, оригинал	Устойчивость по данным фитопатологического теста	Маркеры гена <i>H1</i> устойчивости к патогенам Ro1 и Ro4 <i>G. rostochiensis</i> («+/-») – наличие/отсутствие маркера)	Устойчивость, данные оригинаторов сортов				
				<i>G. rostochiensis</i> , патотип Ro1	<i>Ph. infestans</i> , 57R	239E4left/Alul	<i>G. rostochiensis</i> , патотипам к патотипам	<i>Ph. infestans</i> , патотипам к патотипам	листья	клубни
1	Alouette	2018	AGRICO, UK	9.0 R	9.0 R	+	-	R, Ro1-3	R	R
2	Armada	-		9.0 R	5.0 RS	+	+	R, Ro1,4	S	RS
3	Bafana	2013	Нидерланды, STET	9.0 R	3.0 S	Нет данных	Нет данных	R, Ro1	S	S
4	Baltic Rose	2019	Германия, Norika	9.0 R	3.0 S	+	-	R, Ro1	RS	S
5	Binje	-	Нидерланды, -	1.0 S	1.0 S	-	-	S, -	S	S
6	Saptiva	2018	Германия, Europlant	9.0 R	5.9 RS	Нет данных	Нет данных	R, Ro1-5	-	-
7	Christel	2017	Германия, Norika	9.0 R	2.4 S	+	-	R, Ro1,4	S-RS	S-RS
8	Damaris	2014		9.0 R	1.4 S	+	-	R, Ro1-5	RS	RS
9	Delphine	2011		9.0 R	3.4 S	+	-	R, Ro1,4	S	S
10	Desiree	-	Нидерланды, STET/HZPC	1.0 S	1.0 S	-	-	S, -	RS	R
11	Estrella	2011	Германия, Norika	9.0 R	1.8 S	+	+	R, Ro1-5	S	S
12	Evolution	2015	Нидерланды, AGRICO	9.0 R	7.3 R	+	-	R, Ro1,4	RS	-
13	Fidelia	2014	Германия, Norika	9.0 R	2.0 S	+	-	R, Ro1,4	S-RS	S
14	Gala	2008		9.0 R	2.3 S	+	+	R, Ro1,4	RS	S
15	Giosonda	2018	Нидерланды, HZPC	9.0 R	4.1 RS	Нет данных	Нет данных	R, Ro1	RS	RS
16	Impala	1995	Нидерланды, AGRICO	9.0 R	4.1 RS	+	-	R, Ro1,4	RS	S
17	Inara	2013	Нидерланды, Norika	9.0 R	1.9 S	+	-	R, Ro1	-	-
18	Juwel	-	Германия, Bavaria Saat	9.0 R	4.3 RS	+	-	R, Ro1,4	RS	-
19	Labadia	2010	Нидерланды, STET	9.0 R	2.0 S	+	-	R, Ro1	RS	S

20	Labella	2011	Германия, Solana	9.0	R	1.3	S	+	-	R, Ro1,4	RS	R
21	Laperla	2015		9.0	R	2.1	S	+	-	R, Ro1	RS	R
22	Madeira	2017	Германия, Europlant	9.0	R	1.8	S	+	-	R, Ro1,4	-	-
23	Манифест	2014	Республика Беларусь	9.0	R	1.0	S	+	-	R, -	-	-
24	Mia	2019	Германия, Norika	9.0	R	3.0	S	Нет данных	Нет данных	R, Ro1,4	RS	S
25	Nandina	2015	Германия, Europlant	9.0	R	4.1	RS	+	-	R, Ro1	-	-
26	Paroli	2019	Германия, Norika	9.0	R	4.0	RS	+	-	R, Ro1	RS	S
27	Prada	-	Германия, Solana	9.0	R	3.8	S	+	-	R, Ro1,4	RS	RS
28	Primabelle	-	Нидерланды, HZPC	9.0	R	1.1	S	Нет данных	Нет данных	R, Ro1	RS	RS
29	Queen Anne	2015	Германия, Solana	9.0	R	1.6	S	+	-	R, Ro1,4	RS-R	R
30	Ramos	2006	Нидерланды, STET	9.0	R	1.0	S	+	-	R, Ro1	S	R
31	Rapomi	2018	Нидерланды, AGRICO	9.0	R	4.4	RS	Нет данных	Нет данных	R, Ro1,4	S	S
32	Red Fantasy	2011	Германия, Europlant	9.0	R	6.8	RS-R	-	-	R, Ro1,4	R	-
33	Red Lady	2008	Германия, Solana	9.0	R	2.5	S	+	-	R, Ro1	RS-R	R
34	Red Scarlett	2000	Нидерланды, HZPC	9.0	R	2.3	S	+	-	R, Ro1	RS	RS
35	Ricarda	2019	Германия, Europlant	9.0	R	6.4	RS-R	Нет данных	Нет данных	R, Ro1,4	RS-R	R
36	Rosara	1996	Германия, Solana	9.0	R	5.8	RS	+	-	R, Ro1	RS	R
37	Sanibel	2019	Германия, Europlant	9.0	R	3.0	S	Нет данных	Нет данных	R, Ro1	RS-R	R
38	Sarpro Mira	-	Венгрия, -	1.0	S	9.0	R	-	-	S	R	R
39	VR 808	2013	Нидерланды, STET	9.0	R	3.1	S	Нет данных	Нет данных	R, Ro1	-	R
40	Zekura	1997	Германия, Solana	9.0	R	1.0	S	+	-	R, -	R	R
41	7 for 7	2017		9.0	R	2.3	S	+	-	R, Ro1,4	RS	R
42	Невский (контроль восприимчивости)	1982	Россия, ЗАО «ВСС» и др.	1.0	S	2.1	S	-	-	S	RS	RS

Примечание. Группы устойчивости указаны на основании данных, приведенных на интернет-порталах оригинаторов, в Госреестре селекционных достижений (2019) и каталогах: R – устойчив, RS – среднеустойчив, S – восприимчив. Прочерк – отсутствие данных.

Таблица 3. Результаты фитопатологического анализа семенного картофеля из различных регионов РФ

Год	Сорт	Распространенность возбудителя болезни, %									Механические повреждения
		<i>R. solani</i>	<i>H. solani</i>	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>C. coccodes</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phoma</i> spp.	<i>Ph. infestans</i>	<i>P. pustulans</i>	<i>S. subterranea</i> f. sp. <i>subterranea</i>	
Приволжский федеральный округ											
2019	Colomba Э	36.0	100.0	6.0	7.0	43.0	5.0	0.0	0.0	0.0	75.0
2019	Evolution Э	0.0	100.0	18.0	30.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0
2019	Gala Э	70.4	96.7	8.1	32.7	57.3	1.6	0.0	0.0	0.0	27.8
		18.0	69.0	0.0	13.0	21.0	0.0	5.0	0.0	0.0	47.0
		0.0	20.0	5.7	5.7	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.5
2018	Gala PC1	3.4	58.6	20.7	0.0	10.3	0.0	20.7	0.0	0.0	0.0
2019	Gala PC2	76.0	74.0	16.0	22.0	20.0	2.0	0.0	0.0	0.0	26.0
2019	Gala PC5	0.0	73.3	6.6	30.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3
2019	Granada Э	0.0	100.0	20.0	15.0	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0
2018	Granada PC1	25.0	55.0	45.0	0.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Juwel PC1	0.0	83.3	6.6	33.0	13.3	0.0	0.0	3.3	0.0	43.3
2019	Labella Э	0.0	100.0	10.0	10.0	30.0	0.0	0.0	0.0	0.0	60.0
2019	Madeira PC1	92.0	100.0	12.0	46.0	30.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Nandina PC1	80.0	90.0	12.0	32.0	46.0	2.0	0.0	0.0	0.0	6.0
2019	Queen Anne PC	24.0	74.0	20.0	12.0	62.0	0.0	0.0	0.0	0.0	42.0
2019	Ramos Э	33.0	100.0	8.0	29.0	15.0	2.0	0.0	0.0	0.0	59.0
2019	Rozara PC1	34.0	98.0	10.0	48.0	22.0	0.0	0.0	4.0	0.0	14.0
2018	Sifra Э	15.0	55.0	90.0	0.0	10.0	0.0	15.0	0.0	0.0	0.0
2019	Vineta Э	0.0	50.0	50.0	40.0	30.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
2019	Wega Э	0.0	86.1	13.8	16.6	22.2	2.7	0.0	0.0	0.0	50.0
2019	Zekura PC1	94.0	100.0	12.0	50.0	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0
2018	Вектор Э	30.9	0.0	11.9	28.5	23.8	4.7	2.3	0.0	9.5	0.0
2018	Невский Э	57.8	15.7	5.2	0.0	10.5	0.0	63.1	0.0	0.0	0.0
2018	Невский PC1	23.0	57.7	15.4	0.0	3.8	0.0	23.0	0.0	0.0	0.0
Северо-Западный федеральный округ											
2018	Alouette Э	14.0	66.0	3.0	32.0	38.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Arrow CCЭ	1.5	9.5	4.0	1.5	6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0
2019	Asterix CЭ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2018	Colomba PC2	23.0	15.3	23.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Delphine PC1	0.0	100.0	60.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Evolution PC1	0.0	100.0	80.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Gala Э	7.5	100.0	2.5	5.0	3.5	1.5	0.0	0.0	0.0	16.0
2019	Labadia Э	7.0	61.0	59.0	20.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0
		0.0	30.4	11.6	3.5	6.4	0.0	0.0	5.8	0.0	0.0
2018	Labella Э	16.6	88.9	38.8	0.0	16.6	0.0	5.5	0.0	0.0	0.0
2018	Mondeo Э	50.0	50.0	66.6	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0
2018	Ramos Э	0.0	71.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Red Scarlett CCЭ	0.0	19.0	0.0	4.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
2019	Red Scarlett CЭ	0.0	45.5	0.5	10.0	8.5	1.0	3.5	0.0	0.0	1.0
		0.0	100.0	60.0	0.0	30.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0

Окончание табл. 3

Год	Сорт	Распространенность возбудителя болезни, %									Механические повреждения
		<i>R. solani</i>	<i>H. solani</i>	<i>Streptomyces spp.</i>	<i>C. coccodes</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Phoma spp.</i>	<i>Ph. infestans</i>	<i>P. pustulans</i>	<i>S. subterranea</i> f. sp. <i>subterranea</i>	
2019	Red Scarlett Э	0.0	100.0	0.0	58.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2018		31.5	63.1	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		50.0	50.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		64.7	58.8	0.0	23.5	47.0	11.7	0.0	0.0	0.0	0.0
2019		2.5	100.0	2.0	4.5	4.0	0.5	0.0	0.0	0.0	10.0
		1.0	48.5	2.5	9.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
2018	Red Scarlett PC1	0.0	100.0	17.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Romano Э	25.0	31.0	28.0	18.0	4.5	1.5	0.0	0.0	0.0	13.5
2018	Wega Э	45.4	27.2	9.1	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Zekura CCЭ	0.0	29.5	3.0	5.5	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	5.0
2018	Бриз Э	10.5	5.2	5.2	0.0	10.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2018	Евразия Э	55.0	25.5	5.0	19.0	2.5	0.0	0.0	1	0.0	0.5
2018	Зорачка Э	0.0	100.0	20.0	0.0	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2018	Ломоносовский Э	78.0	43.0	16.0	8.0	10.0	0.0	54.0	0.0	0.0	0.0
2019	Невский Э	45.0	100.0	75.0	5.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	15.0
2018	Скарб Э	37.5	0.0	12.5	0.0	25.0	0.0	37.5	0.0	0.0	0.0
2018	Сударыня Э	67.5	57.0	4.0	23.0	3.0	0.0	0.5	0.0	0.0	3.0
2019	Чародей Э	45.0	100.0	100.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0
2018		56.0	100.0	76.0	43.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2019	Чароит CCЭ	4.0	4.0	58.0	1.0	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0
Центральный федеральный округ											
2019	Evolution Э	0.0	16.0	30.0	27.5	45.5	0.0	0.0	0.0	0.0	61.0
2018	Red Fantasy Э	3.5	71.4	38.0	0.0	38.0	0.0	28.5	0.0	0.0	0.0
2018	Red Scarlett Э	15.7	78.9	0.0	0.0	5.2	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0
2018	Red Scarlett PC2	71.4	100.0	0.0	71.4	28.5	0.0	0.0	14.2	0.0	0.0
		42.8	100.0	28.5	71.4	14.2	0.0	14.2	0.0	0.0	0.0
		50.0	83.3	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		50.0	33.3	0.0	66.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2018	Rodrigo Э	0.0	7.6	23.0	0.0	15.3	0.0	0.0	7.6	0.0	0.0
Северо-Кавказский федеральный округ											
2018	Colomba СЭ	0.0	0.0	5.2	0.0	31.5	0.0	15.7	0.0	0.0	0.0
2018	Desiree Э	20.6	31.0	18.9	0.0	32.7	3.4	18.9	0.0	0.0	0.0
2018	Gala СЭ	2.2	0.0	29.5	0.0	9.0	0.0	13.6	0.0	0.0	0.0
2019	Impala СЭ	0.0	100.0	0.0	40.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2018	Labella CCЭ	3.5	0.0	92.8	0.0	57.1	3.5	25.0	0.0	0.0	0.0
2018	Queen Anne СЭ	6.3	0.0	48.9	0.0	23.4	2.1	6.3	0.0	0.0	0.0
2018	Ramona Э	16.3	22.4	22.4	12.2	18.3	0.0	16.3	0.0	0.0	0.0
2018	Red Scarlett CCЭ	3.4	0.0	100.0	0.0	31.0	0.0	6.8	0.0	0.0	0.0
2018	Невский СЭ	9.0	6.0	100.0	0.0	9.0	0.0	12.1	0.0	0.0	0.0

Примечание. Элитный семенной картофель: CCЭ – супер-суперэлита, СЭ – суперэлита, Э – элита. Репродукционный семенной картофель: PC1 – первая репродукция, PC2 – вторая репродукция и т. д.

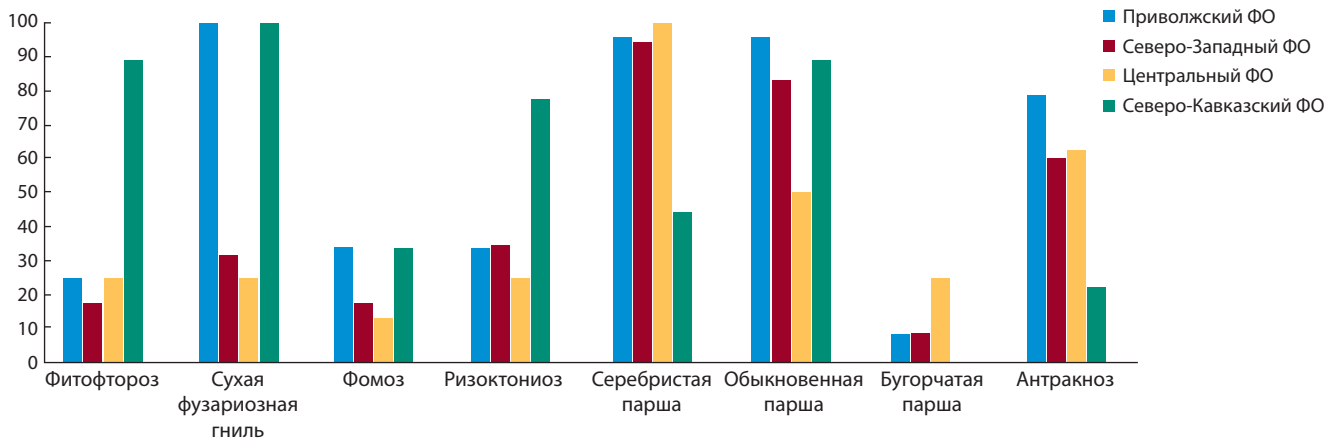


Рис. 2. Распространенность грибных и оомицетных болезней на семенном картофеле в различных агроклиматических зонах РФ (среднее по 92 образцам).

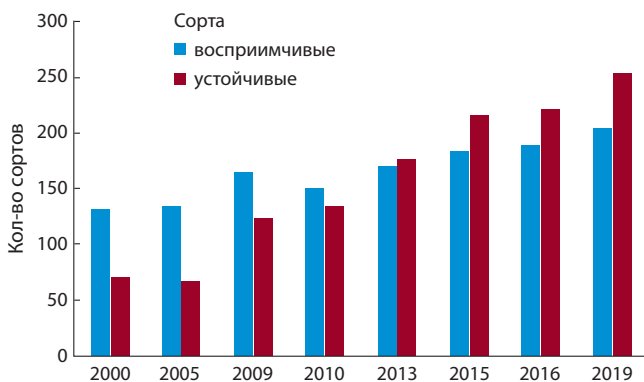


Рис. 3. Число устойчивых и восприимчивых к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) сортов картофеля, районированных с 2000 по 2019 г.

ство пораженных клубней в Приволжском федеральном округе составило 15 %. У сорта Labella, который тоже высокоустойчив к фитофторозу по клубням, в Северо-Западном федеральном округе выявлено 5.5 % пораженных клубней, а в Северо-Кавказском – 25.0 %.

Такая же ситуация наблюдается и по вирусу картофеля Y. По данным оригинатора, сорт Alouette является иммунным к этому виду вируса, но нами было выявлено три пораженных клубня из четырех (Yanagisawa et al., 2019). Клубни высокоустойчивых к вирусу Y сортов Queen Anne, Rozara и Adretta, районированных в Дальневосточном федеральном округе, были поражены этим вирусом с частотой 1 из 22, 1 из 4 и 3 из 4 соответственно. Сорт Red Lady, по сведениям оригинатора, среднеустойчив к вирусу Y и высокоустойчив к штамму PVY^{NTN}, однако все 29 клубней (100 %) этого сорта были поражены штаммами PVY^{NTN}(A), PVY^{NTN}(B), PVY^{NW}(A), PVY^{NW}(B) (Yanagisawa et al., 2019).

Полученные данные по устойчивости сортов к ЗКН полностью коррелируют с информацией, приведенной фирмами-производителями и в Государственном реестре селекционных достижений (2019). Все изученные современные зарубежные сорта картофеля, кроме трех (Bintje, Desiree и Sarpo Mira, которые часто используются в ка-

честве контроля восприимчивости), являются полностью иммунными к патотипу Ro1 ЗКН. Остальные зарубежные сорта картофеля, включенные в Госреестр и разрешенные к выращиванию на территории РФ, также отличаются высокой устойчивостью к этому патотипу ЗКН.

По данным Госреестра селекционных достижений, 254 из 455 сортов картофеля устойчивы к ЗКН (рис. 3). Тенденция превалирования устойчивых сортов над восприимчивыми наблюдается начиная с 2013 г. Однако это связано с включением в Госреестр многочисленных иностранных сортов, которые высокоустойчивы не только к Ro1 патотипу ЗКН, но и к другим, включая групповую устойчивость к бледной картофельной нематоде (например, сорта Laperla и Prada, фирма-оригинатор Solana). Свыше половины (124 из 216, или 57.4 %) отечественных сортов селекции РФ и стран СНГ, включенных в Госреестр, к сожалению, по большей части являются восприимчивыми, несмотря на то что признак нематодоустойчивости считается одним из важнейших при создании новых сортов картофеля.

Устойчивость к ЗКН является моногенной и обусловлена наличием генов *H1* или *Gro1-4* устойчивости, локализованных на хромосомах V и VII соответственно. Нематодоустойчивые сорта, созданные селекционерами разных стран, чаще всего несут ген *H1* (Shultz et al., 2012). Подобная закономерность выявлена и для отечественных нематодоустойчивых сортов, 98 % которых обладали маркерами гена *H1* и только 2 % – маркерами гена *Gro1-4* (Клименко и др., 2017). Зарубежные сорта картофеля активно используются отечественными селекционерами в программах по выведению новых сортов; приведенная авторами (Клименко и др., 2017) информация об устойчивости зарубежных сортов, а также о наличии маркера 57R гена *H1* важна при подборе пар для скрещиваний и в программах по пирамидированию генов устойчивости, особенно к карантинным объектам.

Сорта Alouette и Sarpo Mira, по данным оригинаторов, являются иммунными к фитофторозу и в наших экспериментах подтвердили этот статус. Устойчивость сорта Alouette обусловлена наличием генов *Rpi-R3a*, *Rpi-R3b*, *Rpi-vnt1* (Armstrong et al., 2019), а у сорта Sarpo Mira детерминирована генами *R3a*, *R3b*, *R4*, *R8*, *Rpi-Smira1* и

Rpi-Smira2 (Rietman et al., 2012). Сорт Evolution считается среднеустойчивым (RS), однако в проведенном эксперименте был оценен как устойчивый (балл 7.3).

Сорта Baltic Rose, Damaris, Desiree, Gala, Labella, Laperla, Mia, Sanibel, Zekura и 7 for 7 отнесены нами к восприимчивым, хотя в характеристиках оригинаторов указывалась средняя устойчивость к фитофторозу. Восприимчивыми оказались и сорта Queen Anne и Red Lady, которые по данным оригинатора имеют устойчивость выше средней. При проведении фитопатологического анализа семенного картофеля пораженные фитофторозом клубни были обнаружены у сортов Desiree, Labella, Queen Anne и Red Fantasy, которые по данным оригинаторов считаются устойчивыми к клубневой форме фитофтороза.

По групповой устойчивости к обоим возбудителям, золотистой картофельной нематодой и фитофторозу, выделились четыре районированных зарубежных сорта: Alouette, Evolution, Red Fantasy, Ricarda.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что распространенность болезней на картофеле варьировала в зависимости от сорта, репродукции семенного материала и зоны выращивания. Зональные различия по распространенности болезней на семенном картофеле отчетливо проявились только по Северо-Кавказскому ФО. В отличие от других регионов РФ, в Северо-Кавказском ФО отсутствовало поражение картофеля антракнозом и только в одном образце сорта Невский (СЭ) обнаружено поражение серебристой паршой.

Повсеместное сильное поражение клубней ризоктониозом выявлено во всех исследованных регионах. Максимальное распространение болезнь получила на сортах Gala (70.4 %), Red Scarlett (64.7 %), Невский (57.8 %), относящихся к категории «элита».

Серебристая парша отмечена в различных регионах на всех изученных сортах картофеля, кроме некоторых из Северо-Кавказского ФО. Вредоносность этого заболевания состоит в поражении глазков, в результате чего клубни теряют всхожесть или дают ослабленные побеги, а также в поражении корневой системы и столонов, вследствие чего образуются невыравненные по размеру клубни, часто уродливые. Пораженные клубни чаще подвергаются развитию вторичной инфекции – фитофтороза и грибов *Fusarium* spp.

Неожиданно сильное распространение получил антракноз картофеля. Сильнее всего были поражены клубни сорта Red Scarlett (Э и РС2) (50.0–71.4 %) в Центральном федеральном округе. Устойчивость к антракнозу никогда не входила в параметры хозяйственно ценных признаков сортов картофеля. Это заболевание отсутствует в актуальном ГОСТ 33996-2016, что отчасти и способствует его распространению. Сильное поражение вегетирующих растений картофеля антракнозом отмечено нами в Северо-Западном и Дальневосточном федеральных округах на сортах Labadia, Labella, Невский и др. Вредоносность болезни состоит в преждевременном отмирании ботвы и гниении клубней во время вегетации и хранения. При диагностике основным признаком является наличие склероциального уплотнения мицелия под кожурой клубня, с выходом на поверхность и образованием щетинок. Широкое распространение антракноза и серебристой парши

и очевидная их вредоносность стали новым вызовом для селекции картофеля.

Все проанализированные образцы были поражены комплексом грибов *Fusarium* spp. На сорте Gala их распространенность достигала 100 % в Приволжском ФО. Отчасти это связано с тем, что именно в этом округе зафиксировано наибольшее количество механически поврежденных клубней (от 2 до 75 % в зависимости от образца), что, по нашему мнению, способствовало такому сильному распространению сухой фузариозной гнили.

ГОСТ 33996-2016 устанавливает жесткие нормативные требования, предъявляемые к категориям картофеля по пораженности сухими гнилями, в частности фузариозом: 0.5 % для категорий элитного и 1.0 % для репродукционного семенного картофеля. Ни один проанализированный образец, вне зависимости от репродукции, не соответствовал предъявляемым требованиям, что свидетельствует о неудовлетворительном фитосанитарном состоянии семенного картофеля. Отсутствие поражения фузариозной инфекцией таких сортов, как Mondeo, Asterix, Delphine, Чародей, Зорачка, не может быть доказательством устойчивости к патогену, необходимо их дальнейшее изучение.

Возбудитель фитофтороза картофеля был выявлен во всех федеральных округах, причем наибольшее распространение на районированных сортах получил в Северо-Кавказском ФО (88.8 %). С 2018 г. фитофтороз картофеля отсутствует в регламенте контроля при проведении сертификации семенного материала по новому ГОСТ 33996-2016 (2017), поэтому в настоящее время отсутствуют допустимые критерии по пораженности клубней семенного картофеля. Однако, согласно ЭПВ (Алехин и др., 2016), не допускается присутствия пораженных клубней в семенном материале. Не выявлено корреляционной зависимости по поражению различных категорий сортов картофеля заболеваниями, скорее наоборот: именно элитный семенной картофель был поражен болезнями сильнее, чем репродукционный (см. табл. 3).

Наиболее представленными во всех федеральных округах оказались сорта картофеля, включенные в Госреестр (2019) много лет назад: Невский (год включения 1982), Red Scarlett (2000) и Gala (2008), менее представленными – сорта Evolution (2015), Colomba (2013) и Labella (2010). Все перечисленные сорта районированы в Северо-Западном ФО, остальные сорта присутствовали в трех регионах в разных соотношениях (см. табл. 3).

Закключение

Все зарубежные сорта картофеля, внесенные в Госреестр селекционных достижений, отличаются высокой устойчивостью к распространенному на территории Российской Федерации патотипу Ro1 *G. rostochiensis*. Часть из них генетически защищена и против других патотипов ЗКН. Это косвенно свидетельствует об эффективном использовании молекулярных маркеров генов устойчивости, так как фитопатологические тесты длительные и трудоемкие и могут быть проведены только в контролируемых условиях карантинных лабораторий. У 96.6 % изученных нематодоустойчивых сортов выявлен маркер гена *H1* устойчивости к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*, восприимчивые сорта этим маркером не обладали. Подтверждена высоко-

кая устойчивость сортов зарубежной селекции Alouette и Sarpo Mira к возбудителю фитофтороза. Обнаружены расхождения в характеристике устойчивости сортов картофеля к фитофторозу, представленной зарубежными оригинаторами и полученной нами при оценке устойчивости и фитопатологической экспертизе семенного картофеля, возделываемого на территории РФ. Сорт Alouette компании Agrico, UK отличается групповой устойчивостью к ЗКН и фитофторозу.

Во всех регионах изучения на семенном картофеле выявлен комплекс оомицетных и грибных болезней, среди которых преобладали ризоктониоз, сухая фузариозная гниль и серебристая парша. Отмечено неожиданно широкое распространение антракноза картофеля. По-видимому, назрела необходимость определить наличие устойчивости к этим болезням как важный хозяйственно ценный признак и направить усилия фитопатологов и селекционеров на создание генетически охарактеризованного исходного материала для селекции на устойчивость. Большая часть районированных сортов не удовлетворяет даже минимальным требованиям, предъявляемым к семенному материалу. Практически весь семенной материал не соответствует требованиям ГОСТ и ЭПВ, что свидетельствует о нарушении технологии возделывания и защиты.

Список литературы / References

- Алехин В.Т., Михайликова В.В., Михина Н.Г. Экономические пороги вредоносности вредителей, болезней и сорных растений в посевах сельскохозяйственных культур. М.: Росинформагротех, 2016.
- [Alekhin V.T., Mikhaylikova V.V., Mikhina N.G. Economic Harmfulness Thresholds of Pests, Diseases, and Weeds in Crop Fields. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2016. (in Russian)]
- Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181.
- [Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and its neighboring countries based on the polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance R-genes. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017; 7(5):489-500. DOI 10.1134/S2079059717050021.]
- Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеева Н.М., Мамadbokirova Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329.
- [Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329. (in Russian)]
- ГОСТ 33996-2016. Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества. Межгосударственный стандарт картофеля семенной. 2017.
- [State Standard 33996-2016. Seed Potatoes. Specifications and methods of determining the quality. 2017. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (офиц. изд.). М.: Росинформагротех, 2019.
- [The State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2019. (in Russian)]
- Еланский С.Н. Особенности развития фитофтороза в России. *Защита картофеля*. 2015;1:8-11.
- [Elansky S.N. Features of the development of late blight in Russia. *Zashhita Kartofelya = Potato Protection*. 2015;1:8-11. (in Russian)]
- Игнатов А.Н., Панычева Ю.С., Воронина М.В., Васильев Д.М., Джалилов Ф.С.-У. Динамика видового состава патогенов картофеля в европейской части РФ. *Картофель и овощи*. 2019;9: 28-32. DOI 10.25630/PAV.2019.57.62.003.
- [Ignatov A.N., Panycheva Yu.S., Voronina M.V., Vasiliev D.M., Dzhililov F.S.-U. Dynamics of species composition of potato pathogens in the European part of the Russian Federation. *Kartofel i Ovoshchi = Potatoes and Vegetables*. 2019;9:28-32. DOI 10.25630/PAV.2019.57.62.003. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамadbokirova Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоды (патотип Ro1). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75.
- [Klimenko N.S., Antonova O.Y., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-associated selection of Russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75. (in Russian)]
- Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Малюченко О.П., Алексеев Я.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Фитопатологическая и молекулярная характеристика изолятов *Phytophthora infestans*, собранных с устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля. *Микология и фитопатология*. 2016; 50(3):175-184.
- [Kuznetsova M.A., Kozlovsky B.E., Beketova M.P., Sokolova E.A., Malyuchenko O.P., Alekseev Y.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Phytopathological and molecular characterization of *Phytophthora infestans* isolates collected on resistant and susceptible potato genotypes. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2016;50(3):175-184. (in Russian)]
- Сорта картофеля российской селекции. Под ред. Е.А. Симакова. М., 2018.
- [Simakov E.A. (Ed.). Potato Varieties Bred in Russia. Moscow, 2018. (in Russian)]
- Abbas M.F., Naz F., Irshad G. Important fungal diseases of potato and their management – a brief review. *Mycopath.* 2013;11(1):45-50.
- AHDB. Agriculture and Horticulture Development Board. 2018. Available at: <https://potatoes.ahdb.org.uk/agronomy/plant-health-weed-pest-disease-management>
- Armstrong M.R., Vossen J., Lim T.Y., Hutten R.C.B., Xu J., Strachan S.M., Harrower B., Champouret N., Gilroy E.M., Hein I. Tracking disease resistance deployment in potato breeding by enrichment sequencing. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17:540-549. DOI 10.1111/pbi.12997.
- Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Bakker J., Goverse A. A high-resolution map of the H1 locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(1):146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.
- Brylińska M., Śliwka J. Laboratory assessment of potato resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Breed. Seed Sci.* 2017;76:17-23. DOI 10.1515/plass-2017-00016.
- Collins W.W. The global initiative on late blight – alliance for the future. In: Khurana S.M.P., Shekhawat G.S., Singh B.P., Pandey S.K.

- (Eds.). Potato Global Research and Development. Indian Potato Association. CPRI, Shimla, India, 2000;1:513-524.
- Compendium of Potato Diseases. Hooker W.J. (Ed.). The Disease Compendia Series by the American Phytopathological Society. Publ. by the Am. Phytopathol. Soc., USA, 1981.
- Compendium of Potato Diseases, Second Edition. Stevenson W.R., Loria R., Franc G.D., Weingartner D.P. (Eds.). St. Paul, USA: Am. Phytopathol. Soc. Press, 2001.
- Dalamu, Bhardwaj V., Umamaheshwari R., Sharma R.P., Kaushik S.K., Joseph T.A., Singh B.P., Gebhardt C. Potato cyst nematode (PCN) resistance: genes, genotypes and markers – an update. *SABRAO J. Breed. Genet.* 2012;44(2):202-228.
- Dillard H.R. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. In: Bailey J.A., Jeger M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Oxford, 1992;225-236.
- Diseases, Pests and Disorders of Potatoes: A Color Handbook. Wale S.J., Platt H.W., Cattlin N.D. Elsevier, 2008.
- Finkers-Tomczak A., Bakker E., Boer J., Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Govers A. Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus *H1* reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.). *Theor. Appl. Genet.* 2011;122: 595-608. DOI 10.1007/s00122-010-1472-9.
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D.M., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013;60(7):1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.
- Gudmestad N.C., Taylor R.J., Pasche J.S. Management of soilborne diseases of potato. *Australas. Plant Pathol.* 2007;36:109-115.
- Haldar K., Kamoun S., Hiller N.L., Bhattacharje S., van Ooij C. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006;4:922-931.
- Haverkort A.J., Struik P.C., Visser R.G.F., Jacobsen E. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 2009;52:249-264. DOI 10.1007/s11540-009-9136-3.
- Johnson D.A. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. *Plant Dis.* 1994;78(11): 1075-1078.
- Johnson D.A., Miliczky E.R. Effects of wounding and wetting duration on infection of potato foliage by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis.* 1993;77:13-17.
- Judelson H.S., Blanco F.A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3:47-57.
- Lees A.K., Hilton A.J. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. *Plant Pathol.* 2003;52:3-12.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breed.* 2014;133(5):660-665.
- OEPP/EPPO. Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *OEPP/EPPO Bull.* 2006; 36:419-420.
- Oerke E.-C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 2006;144:31-43. Available at: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-agricultural-science/article/crop-losses-to-pests/AD61661AD6D503577B3E73F2787FE7B2>
- Rietman H., Bijsterbosch G., Cano L.M., Lee H.-R., Vossen J.H., Jacobsen E., Visser R.G.F., Kamoun S., Vleeshouwers V.G.A.A. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *MPMI.* 2012;25(970):910-919. DOI 10.1094/MPMI-01-12-0010-R.
- Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.N.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Breed.* 2012; 131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.
- Tsrör L. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. *J. Phytopathol.* 2010;158:649-658. DOI 10.1111/j.1439-0434.2010.01671.x.
- Tsrör L., Erlich O., Hazanovsky M. Effect of *Colletotrichum coccodes* on potato yield, tuber quality and stem colonization during spring and autumn. *Plant Dis.* 1999;83(6):561-565.
- Turner S.J. Sample preparation, soil extraction and laboratory facilities for the detection of potato cyst nematodes. In: Marks R.J., Brodie B.B. (Eds.). *Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control*. CAB International, Wallingford, 1998;75-90.
- UNECE Standard S-1 concerning the marketing and commercial quality control of seed potatoes: UNECE Guide to Seed Potato Diseases, Pests and Defects. United Nations, New York; Geneva, 2014.
- UNECE Standard S-1 concerning the marketing and commercial quality control of seed potatoes. United Nations, New York; Geneva, 2018.
- Winslow R.D., Willis R.J. Nematode diseases of potatoes. II. Potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis*. In: Webster J. (Ed.). *Economic Nematology*. N.Y.: Acad. Press, 1972;18-34.
- Yanagisawa H., Yosuke M., Khiutti A., Mironenko N., Yasuo O., Afanasenko O. Complete genome sequence of a divergent strain of potato virus P isolated from *Solanum tuberosum* in Russia. *Arch. Virol.* 2019;164:2891-2894. DOI 10.1007/s00705-019-04397-5.

ORCID ID

T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569

Благодарности. Исследования поддержаны грантом РФ № 16-16-04073. Выражаем благодарность за помощь в предоставлении клубневых проб сотрудникам АО Фирма «Август»: начальнику отдела развития продуктов Д.А. Белову и менеджеру по ключевым клиентам А.П. Особлиову; а также исполнительному директору СПССК «Устюженский картофель» А.А. Кузнецову.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.12.2019. После доработки 24.12.2019. Принята к публикации 24.12.2019.

Комплексный метод таксономической идентификации микроорганизмов

Ю.Е. Уварова^{1,2}✉, А.В. Брянская^{1,2}, А.С. Розанов^{1,2}, В.Н. Шляхтун^{1,2}, Е.А. Демидов^{1,2}, К.В. Старостин^{1,2}, Т.Н. Горячкова^{1,2}, С.В. Шеховцов^{1,2}, Н.М. Слынько^{1,2}, С.Е. Пельтек^{1,2}

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

² Курчатовский геномный центр Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: uvarovaye@bionet.nsc.ru

Аннотация. Для точной видовой идентификации микроорганизмов сегодня все чаще применяют сочетание стандартных микробиологических методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, помогающими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул ДНК или РНК. Целью данной работы было проведение идентификации микроорганизмов из Коллекции ИЦиГ СО РАН с помощью комплексного подхода, сочетающего использование широкого спектра фенотипических и генотипических признаков. Для 93 штаммов микроорганизмов Коллекции ИЦиГ СО РАН описаны ключевые молекулярно-генетические и фенотипические свойства. Рассмотрены морфологические, физиологические, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические характеристики штаммов. Установлены особенности роста штаммов на разных средах, изучена морфология клеток. Штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты. Обнаружено, что исследованные штаммы значительно различались по своим биохимическим признакам. Определены физиологические особенности штаммов коллекции: отношение к кислороду, тип питания, диапазон температур и pH, отношение к NaCl и др. Исследованные микроорганизмы объединены в отдельные группы на основании сходства их фенотипических характеристик, что может при дальнейшей доработке и расширении спектра таксонов и их метаболических карт послужить основой для создания «искусственной» классификации, которая может быть использована в качестве ключа для упрощенной и более быстрой идентификации и распознавания микроорганизмов в рамках как Коллекции ИЦиГ СО РАН, так и других коллекций.

Ключевые слова: идентификация микроорганизмов; биохимические характеристики бактерий; хемосистематика; масс-спектрометрический анализ.

Для цитирования: Уварова Ю.Е., Брянская А.В., Розанов А.С., Шляхтун В.Н., Демидов Е.А., Старостин К.В., Горячкова Т.Н., Шеховцов С.В., Слынько Н.М., Пельтек С.Е. Комплексный метод таксономической идентификации микроорганизмов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):376-382. DOI 10.18699/VJ20.630

An integrated method for taxonomic identification of microorganisms

Yu.E. Uvarova^{1,2}✉, A.V. Bryanskaya^{1,2}, A.S. Rozanov^{1,2}, V.N. Shlyakhtun^{1,2}, E.A. Demidov^{1,2}, K.V. Starostin^{1,2}, T.N. Goryachkovskaya^{1,2}, S.V. Shekhovtsov^{1,2}, N.M. Slynko^{1,2}, S.E. Peltek^{1,2}

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

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: uvarovaye@bionet.nsc.ru

Abstract. For accurate species-level identification of microorganisms, researchers today increasingly use a combination of standard microbiological cultivation and visual observation methods with molecular biological and genetic techniques that help distinguish between species and strains of microorganisms at the level of DNA or RNA molecules. The aim of this work was to identify microorganisms from the ICG SB RAS Collection using an integrated approach that involves a combination of various phenotypic and genotypic characteristics. Key molecular-genetic and phenotypic characteristics were determined for 93 microbial strains from the ICG SB RAS Collection. The strains were characterized by means of morphological, physiological, molecular-genetic, and mass-spectrometric parameters. Specific features of the growth of the strains on different media were determined, and cell morphology was evaluated. The strains were tested for the ability to utilize various substrates. The strains studied were found to significantly differ in their biochemical characteristics. Physiological characteristics of the strains from the collection were identified too, e.g., the relationship with oxygen, type of nutrition, suitable temperature and pH ranges, and NaCl tolerance. In this work, the microorganisms analyzed were combined into separate groups based on the similarities of their phenotypic characteristics. This categorization, after further refinement and expansion of the

spectrum of taxa and their metabolic maps, may serve as the basis for the creation of an "artificial" classification that can be used as a key for simplified and quicker identification and recognition of microorganisms within both the ICG SB RAS Collection and other collections.

Key words: identification of microorganisms; biochemical characteristics of bacteria; chemosystematics; mass spectrometric analysis.

For citation: Uvarova Yu.E., Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Shlyakhtun V.N., Demidov E.A., Starostin K.V., Goryachkovskaya T.N., Shekhovtsov S.V., Slynko N.M., Peltek S.E. An integrated method for taxonomic identification of microorganisms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):376-382. DOI 10.18699/VJ20.630

Введение

Идентификация прокариот, которые морфологически менее разнообразны, чем эукариоты, основана на использовании широкого спектра фенотипических, а во многих случаях и генотипических признаков. При описании и идентификации бактерий изучают их культуральные свойства, морфологию, организацию клетки, физиолого-биохимические особенности, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина в ДНК, последовательность нуклеотидов в гене, кодирующем синтез 16S рРНК, и другие фено- и генотипические признаки.

Фенотипические методы идентификации широко распространены в основном благодаря их относительно низкой стоимости. Фенотипические реакции обычно включают реакции на различные химические вещества или различные биохимические маркеры. Однако проявление фенотипических признаков микроорганизма (размер и форма клетки, споруляция, клеточный состав, антигенность, биохимическая активность, чувствительность к антимикробным средствам и т. д.) часто зависит от используемых питательных сред и условий культивирования. Поэтому с целью улучшения классических методов биохимической идентификации в последние годы были созданы современные методы биохимической идентификации (Church, 2016; Reyes, 2018).

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. Морфологическая характеристика и организация клеток бактерий включают такие признаки, как форма и размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Первостепенное значение в систематике бактерий придается окраске клеток по Граму и строению их клеточных стенок.

Изучение физиолого-биохимических свойств включает, прежде всего, установление способа питания исследуемой бактерии (фото/хемо-, авто/гетеротрофия) и типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному или анаэробному дыханию или фотосинтезу). Важно определить такие признаки, как отношение бактерии к молекулярному кислороду, температуре, рН среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входят также перечень субстратов, утилизируемых в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в витаминах и других факторах роста, образование характерных продуктов метаболизма, наличие некоторых ферментов. Для этого часто используют специальные тесты.

Многие тесты, применяемые для обнаружения перечисленных признаков (иногда их называют рутинными

тестами), важны для диагностики и широко используются в медицинской микробиологии. Их постановка требует значительных затрат времени, большого количества сложных сред и реактивов, соблюдения стандартных условий проведения, аккуратности выполнения. Для ускорения и облегчения процесса идентификации некоторых микроорганизмов, имеющих главным образом медицинское значение, разработаны различные тест-системы, например MIKROLATEST® ID | Erba Lachema s.r.o., BioLog и др. Так, система MIKROLATEST® ID предназначена для идентификации энтеробактерий, представляет собой пластиковую камеру с ячейками, содержащими окрашенные диагностические среды. О положительном или отрицательном результате теста судят по изменению цвета среды или после введения специальных реактивов (тест на образование индола, реакция Фогес–Проскауэра).

Передовая фенотипическая технология BioLog предоставляет ценную информацию о свойствах штаммов в дополнение к идентификации на уровне вида. Молекулярные методы, такие как секвенирование 16S рРНК и MALDI-TOF, не дают информации о свойствах штамма. Технология утилизации источника углерода в системе BioLog позволяет идентифицировать микроорганизмы окружающей среды и патогенные микроорганизмы путем создания характерного рисунка или «метаболического отпечатка пальца» в результате отдельных тестовых реакций, проводимых в микропланшете. Культуральные суспензии тестируют с помощью панели предварительно выбранных анализов, затем инкубируют, считывают и сравнивают с базами данных.

К современным методам биохимической идентификации относят также матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS), которая является одной из новейших систем идентификации микроорганизмов. Несмотря на то что это «фенотипическая» система, она в некотором смысле устраняет пробел в достоверности результатов испытаний, полученных с помощью биохимических систем фенотипирования и идентификационных систем генотипирования. Система очень быстра, что делает ее хорошим примером «микробиологического экспресс-метода» (Gaudreau et al., 2018).

Идентификация бактерий по знаниям о составе клеток бактерий известна как хемосистематика. Хемотаксономические методы могут быть важными, в частности у тех групп бактерий, чьи морфологические и физиологические характеристики широко варьируют и недостаточны для их удовлетворительной идентификации. Состав клеточной стенки определяет и серологические свойства бактерий,

это лежит в основе иммунохимических методов их идентификации.

Иногда в качестве хемотаксономического маркера используют липидный и жирнокислотный состав клеток бактерий. Интенсивное изучение жирных кислот стало возможным с развитием метода газохроматографического анализа. Различия в составе липидов используют при идентификации бактерий на уровне рода и даже вида. Этот метод, однако, имеет определенные ограничения, поскольку содержание жирных кислот в клетках может зависеть от условий культивирования и возраста культуры.

Для идентификации бактерий и создания филогенетической системы их классификации наиболее широкое распространение и значение получил метод анализа нуклеотидных последовательностей в рибосомальных РНК.

Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения, созданная в ФИЦ ИЦиГ СО РАН в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для задач биотехнологии и биоинженерии, исследования их генетики и метаболизма, включает более 1500 штаммов, культур микроорганизмов и образцов ДНК. В коллекционный фонд вошли представители всех основных надцарств (грибы, бактерии, археи, водоросли) и физиологических групп (в том числе анаэробы и экстремофилы). Большинство штаммов выделено из ранее не изученных уникальных экстремальных экосистем: соленых озер, горячих источников, а также из почвы, морских акваторий, пресноводных водоемов.

С целью точной видовой идентификации микроорганизмов сегодня все чаще применяют сочетание стандартных микробиологических методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, помогающими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул ДНК или РНК (Кардымон, Кудрявцева, 2016). Для биотехнологии важной является информация не только о видовой принадлежности штаммов, но и об их субстратной специфичности, полноте реализации метаболических путей и активности метаболических реакций, возможности их регуляции. Поэтому комплексный подход к идентификации природных микроорганизмов упрощает задачу поиска биотехнологически перспективных штаммов.

Целью данной работы было проведение идентификации микроорганизмов из коллекции ИЦиГ СО РАН с помощью комплексного подхода, сочетающего использование широкого спектра фенотипических и генотипических признаков.

Методы

Фенотипическая характеристика. Форму и размер живых и окрашенных клеток определяли с применением световых и электронных микроскопов Axioskop 2 Plus, Axioskop A1, LIBRA 120 фирмы Carl Zeiss ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты готовили стандартными методами (Нетрусов и др., 2005). Окрашивание по Граму проводили набором Gram stain kit (Sintakon, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Температурные и pH оптимумы роста, устойчивость к NaCl, каталазную, уреазную, оксидазную активности,

анаэробный рост, амилалитическую и казеиназную и другие активности, а также способность использовать различные субстраты определяли по (Нетрусов и др., 2005; Logan, De Vos, 2009). Большинство тестов проведено на основе реактивов и китов систем LACHEMA и BioLog.

Секвенирование генов 16S рРНК. Таксономическую принадлежность (филогенетическое положение) штаммов определяли по последовательности гена 16S рРНК. Для этого ДНК бактерий выделяли стандартным фенольным методом (Маниатис и др., 1984). Амплификацию гена 16S рРНК проводили при помощи универсальных бактериальных праймеров 16S-8-f-B (5'-AGRGTGTTGAT CCTGGCTCA-3') и 16S-1350-r-B (5'-GACGGCGGGTGTGTACAAG-3'). Реакционная смесь содержала 1.5 mM MgCl₂, 65 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0.05 % Tween-20, 0.2 mM dNTP, 0.3 mM праймеров и 1 е. а. рекомбинантной Taq-полимеразы (SibEnzyme, Новосибирск). Секвенирование ДНК выполнялось в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Поиск сходных последовательностей в нуклеотидных базах данных проводили при помощи программ серии Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), выравнивание – при помощи программы ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

Хемотаксономические свойства. Для анализа жирнокислотного состава клеток штаммы выращивали при оптимальных значениях температуры до достижения экспоненциальной фазы роста. Полученный биоматериал обрабатывался по (Jenkins, Tanner, 1977), после щелочно-гидролиза жиров кислоты экстрагировали гексаном и метилировали метанольным раствором HCl по (Schäffer et al., 2002). Смесь метиловых эфиров жирных кислот анализировали методом газовой хроматографии на хроматографе Agilent Technologies 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973N, колонка кварцевая DB-1. Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1 мл/мин. Температура инжектора 250 °C. Ввод пробы осуществляли с помощью микрошприца, объем вводимой пробы 1 мкл. Ионизация электронным ударом (70 эВ). Хромато-масс-спектрометрический анализ исследуемых растворов проводили по полному ионному току в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 10 до 800 а. е. м., в режиме мониторинга селективных ионов (SIM) по молекулярному иону анализируемого соединения. Метиловые эфиры жирных кислот идентифицировали сравнением с базой The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0a, build Jul 2002.

Масс-спектрометрический анализ выполняли на масс-спектрометре Ultraflex III MALDI TOF/TOF (BrukerDaltonics). Спектры снимали в линейном позитивном режиме с частотой лазера 100 Гц в диапазоне масс 2000–20000 Да. Напряжение на ускоряющем электроде 25 кВ, напряжение IS2 23.45 кВ, напряжение на линзе 6 кВ, без задержки экстракции. Для каждой пробы получали по три спектра суммированием 500 лазерных импульсов (5 × 100 импульсов с разных позиций ячейки мишени). Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков *Escherichia coli*: RL36 – 4365.3 Да, RS22 – 5096.8, RL34 – 5381.4, RL32 –

6315.0, RL29 – 7274.5, RS19 – 10 300.1 Да. Полученные серии спектров каждого штамма использовались в программе Biotyper 3.0 при создании характеристичных спектров, представляющих собой список пиков масс с усредненными значениями m/z и относительных интенсивностей пиков.

Для идентификации микроорганизмов из коллекции ИЦиГ СО РАН полученные фенотипические и генотипические признаки обрабатывали в программе Statistica 6.0. Дендрограммы были построены по методу невзвешенного попарного арифметического среднего, а двумерные графики – по методу многомерного шкалирования. Многофакторный анализ выполнен в программе Past 3, версия 3.25 (Hammer et al., 2001). В соответствии с требованиями программы, полуколичественные данные по 95 субстратам системы BioLog были переведены в цифровые значения: данные об отсутствии/присутствии закодированы как 0 или 1 соответственно, не определенные значения закодированы как «?».

Результаты

В работе по проведению идентификации микроорганизмов было использовано 93 штамма из коллекции ИЦиГ СО РАН. География мест отбора проб для изоляции микробных культур обширная – от виноградников Крыма до гейзеров Камчатки и Курил. По экологии места обитания варьируют от пресных водоемов до засоленных почв. Температурные условия холодные и термальные; реакция среды (рН) нейтральная, кислая или щелочная. Пробы отобраны как из чистых природных акваторий, так и из антропогенно загрязненных пород.

Штаммы выделяли на различных средах: LB, МПА, МПБ, среде Пфеннига с добавками и др. Культивирование проводили при температурах от 32 до 55 °С. Каждому штамму была дана филогенетическая, фенотипическая и масс-спектрометрическая характеристика.

Морфология и биохимические свойства

Большинство штаммов образовывали округлые колонии белого, кремового или желтого цвета. Края колоний ровные или волнистые, профиль – плоский или выпуклый. Размеры колоний варьировали от точечных (менее 1 мм) до более чем 5 мм. Клетки штаммов палочковидные. У 17 штаммов наблюдалось выделение пигмента в среду. Клеточная стенка грамположительная. Рост по штриху у штаммов варьировал от нерасплывающегося до сильно расплывающегося, от четковидного до сплошного. Для 75 штаммов отмечено спорообразование.

Исследованные температурные диапазоны роста – от 8 до 70 °С, рН – от 2 до 10. Диапазон температур для роста термофильных микроорганизмов был 40–70 °С с оптимумом при 60 °С, для мезофильных – от 25 до 40, 50 и 55 °С с оптимумом преимущественно при 35 °С. Интенсивный рост штаммов наблюдался при концентрации NaCl 1 г/л. Часть штаммов не росла или росла слабо при концентрации в среде NaCl 5 г/л.

Все исследованные штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты с помощью систем LACHEMA и BioLog. Было определено, что штаммы являются аэробами и/или факультативными анаэробами,

а по типу питания – гетеротрофами и хемоорганогетеротрофами. Большинство штаммов хорошо росли на средах с казеином, крахмалом и твином в качестве единственного источника углерода. Выраженной казеиназной активностью, характеризовавшейся наличием зон просветления вокруг колоний при обработке их уксусной кислотой, обладали 73 штамма (Нетрусов и др., 2005). Также 81 штамм демонстрировал хорошую амилολитическую активность, выявлявшуюся по зонам просветления. При реакции с йодом помимо обычного обесцвечивания в ряде случаев наблюдалось покраснение среды вокруг колоний, свидетельствующее об образовании декстринов.

Установлено, что 40 штаммов обладали β-галактозидазной активностью. Практически все штаммы не деградировали малонат, цитрат, орнитин и серосодержащие соединения (отрицательный тест на H₂S). Все штаммы, кроме одного, не использовали лизин. Уреазной активностью обладали 17 штаммов. Все штаммы не проявляли β-глюкоронидазной активности. Штаммы имели разное отношение к манниту, трегалозе и лактозе, целлобиозе, аргинину, мелибиозе, сорбитолу, салицину, раффинозе, инозитолу, арабитолу, адонитолу, дульциту. Двадцать штаммов имели β-ксилозидазную активность.

Большинство исследованных штаммов не использовали следующие соединения: D-туранозу, N-ацетилнейраминную кислоту, п-гидроксибензилуксусную кислоту, метилпируват, D-фукозу, L-фукозу, L-рамнозу, D-аспарагиновую кислоту, D-серин, глицил-L-пролина глюкуронамид, муциновую, хинную, D-сахарную, α-гидроксимасляную кислоты, β-гидрокси-D, L-масляную кислоту, α-кетомасляную кислоту и бутират натрия.

Выявлено, что большая часть штаммов относится к роду *Bacillus*, остальные – к родам *Anoxybacillus*, *Lysinibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*.

Для 83 штаммов коллекции созданы характеристичные масс-спектры белковых профилей. Филопротеомные данные находились в соответствии с таксономической принадлежностью штаммов, определенной с помощью секвенирования генов 16S рРНК. Результаты масс-спектрометрического анализа дополнили базу характеристичных масс-спектров и могут быть использованы в дальнейшей идентификации микроорганизмов в тех случаях, когда затруднено получение качественного препарата ДНК для секвенирования.

При анализе жирнокислотного состава клеточной стенки были обнаружены следующие жирные кислоты: насыщенные неразветвленные – миристиновая (C14:0); кислоты с разветвленной цепочкой – изомиристиновая (isoC14:0), изопентадекановая (isoC15:0), антеизопентадекановая (aC15:0), изопальмитиновая (isoC16:0), антеизопальмитиновая (aC16:0); мононенасыщенные – пальмитолеиновая (C16:1). Состав и соотношение жирных кислот в составе клеточной стенки бактерий являются важной характеристикой при идентификации микроорганизмов.

Обсуждение

По последовательности 16S рибосомальной РНК было построено филогенетическое дерево, которое отражает кластеризацию штаммов бактерий по видовой принад-

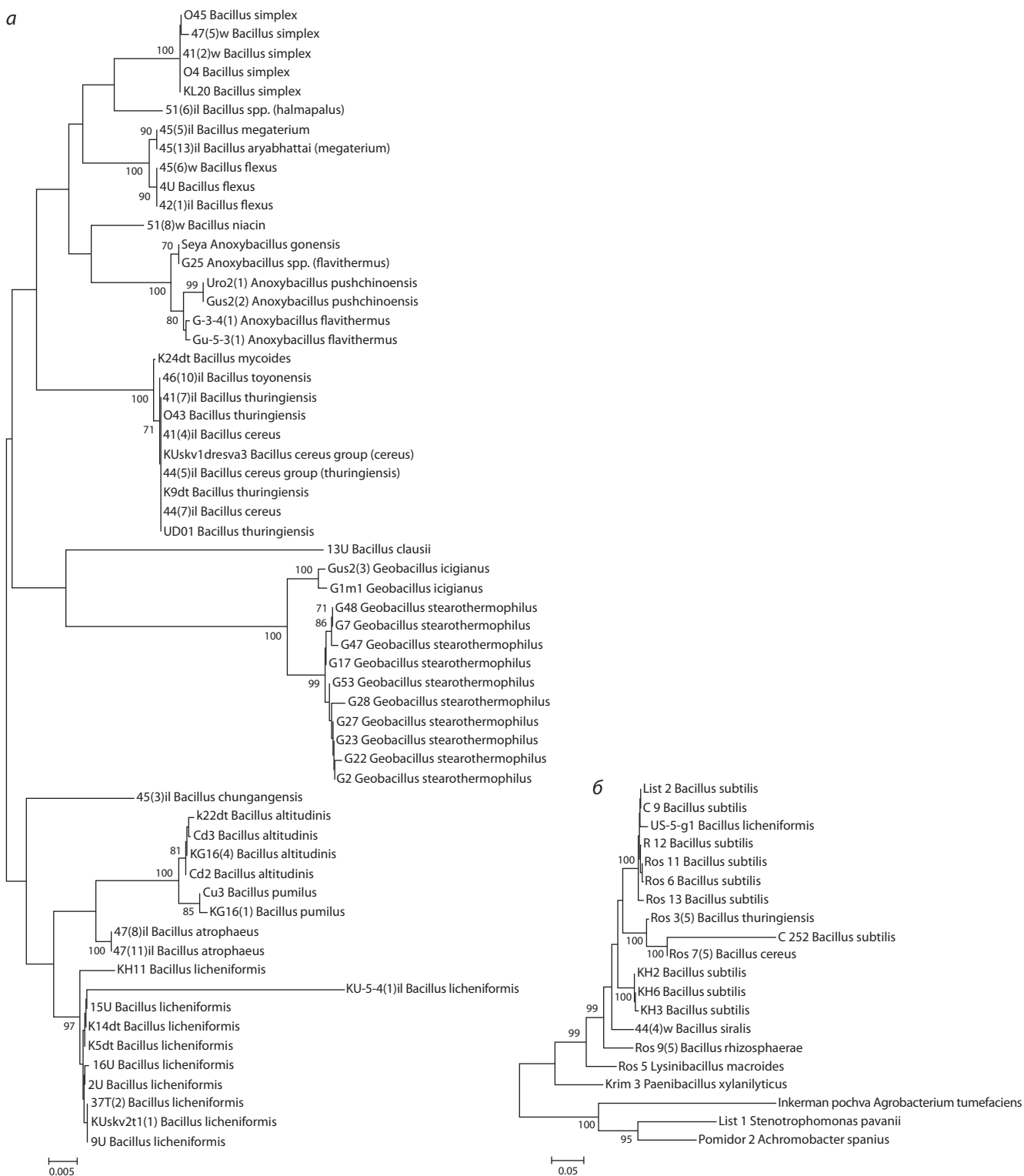


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом минимальной эволюции на основании последовательностей 16S рРНК штаммов, для которых получены биохимические данные тестами LaChema (а) и BioLog (б).

Цифры возле ветвей – бутстрепная поддержка.

лжности (рис. 1). Статистический анализ 21 штамма по 96 формализованным биохимическим параметрам, полученным при помощи тестов BioLog Omnilog, не выявил четкой кластеризации (рис. 2). Это хорошо видно на примере штаммов *Bacillus subtilis*. Из 21 проанализиро-

ванного образца к виду *B. subtilis* относятся 10 штаммов. Шесть из них (№ 10, 13, 14, 19, 20, 21) входят в относительно рыхлый кластер, который образуют представители группы *B. subtilis* и группы *B. cereus*. В этот же кластер попадает *Lysinibacillus macrolides* (штамм № 6). Другие

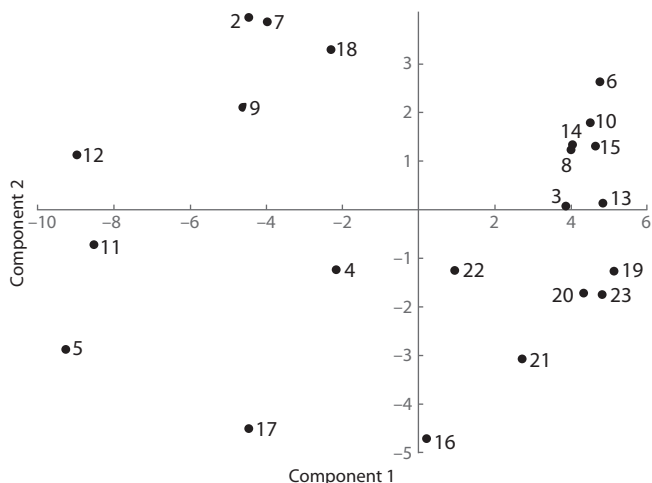


Рис. 2. Результаты статистического анализа данных о таксономическом составе микроорганизмов и их особенностях метаболизма по первой паре главных компонент.

Анализ по 96 параметрам.

штаммы *B. subtilis* (№ 2, 7, 11, 17) не кластеризуются со своим видом (см. рис. 2).

В систематике прокариот для определения вида используют такие параметры, как последовательность рибосомальной РНК, строение клеточной мембраны и некоторые особенности метаболизма, например метаногенез или бактериородопсинзависимый фотосинтез (DasSarma et al., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные особенности метаболизма не являются видоопределяющими, но могут играть главную роль при определении ценности того или иного штамма для целей биотехнологии, так как учитывают возможность разложения разных субстратов.

Результаты кластеризации 61 штамма по 29 параметрам метаболизма, полученным в результате анализа тестов Microplate LaChema, приведены на рис. 3. Были выбраны такие параметры, как способность бактерий утилизиро-

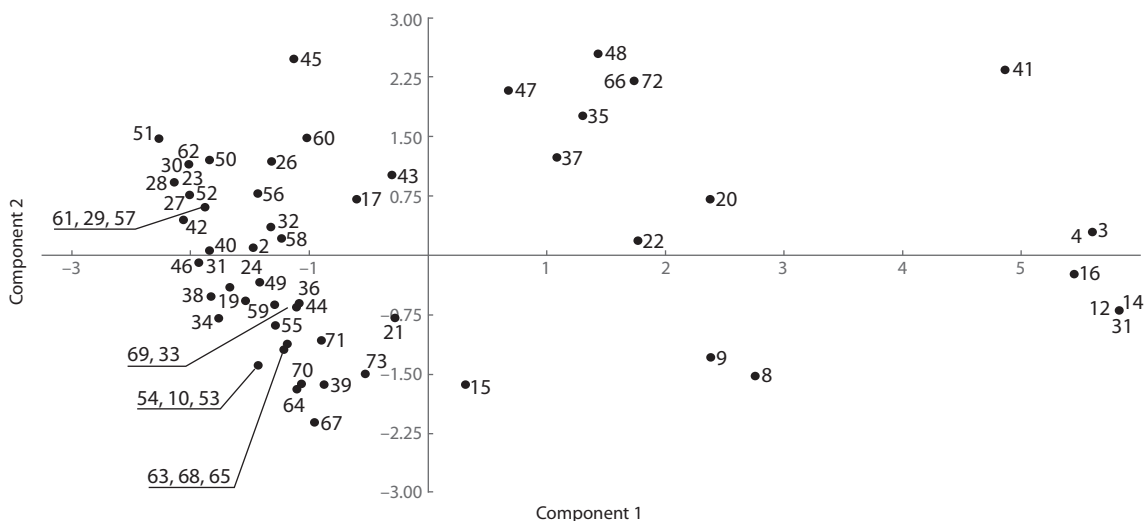


Рис. 3. Результаты статистического анализа данных о таксономическом составе микроорганизмов и их особенностях метаболизма по первой паре главных компонент.

Анализ по 29 параметрам.

вать некоторые сахара (например, маннитол, трегалозу, лактозу, целлобиозу, сахарозу, раффинозу, глюкозу), наличие уреазной активности, продукции сероводорода и др. В анализ вошли штаммы 3 видов *Anoxybacillus*, 17 видов *Bacillus* и 2 видов *Geobacillus*. Основная масса изученных штаммов образует достаточно плотный кластер, независимо от вида микроорганизма, что говорит о сходстве используемых для роста субстратов. Способность к росту при наличии различных сахаров и органических кислот, которыми в основном представлены субстраты, характерна для представителей разных таксономических групп царства бактерий вне зависимости от их происхождения. Второй кластер (меньшего размера) образован некоторыми штаммами бактерий, относящихся к видам *B. simplex*, *Anoxybacillus* spp. (*flavithermus*), *G. stearothermophilus*, *B. mycoides*, *A. pushchinoensis* и *B. licheniformis*. К этим видам относилось несколько анализируемых штаммов, однако по метаболическим признакам остальные штаммы перечисленных видов попадают в большой кластер. Объединение штаммов в малом кластере по метаболическим признакам свидетельствует о сходстве потребляемых субстратов или, возможно, о потере способности утилизировать часть исследованных субстратов. Кластеризация в данном случае отражает не общность эволюционного происхождения, а субстратную специфичность, сформировавшуюся в результате конвергентных процессов, возможно, при адаптации к субстратам. Попавшие в малый кластер штаммы различались также по местам выделения.

По морфологическим признакам тоже наблюдается формирование кластеров. Например, в небольшой кластер объединены штаммы микроорганизмов, образующих достаточно крупные колонии (рис. 4).

Очевидно, что при дальнейшей доработке и расширении спектра таксонов и их метаболических карт возможно создать основу «искусственной» классификации, которая может быть использована в качестве ключа для упрощенной и более быстрой идентификации и распознавания микроорганизмов.

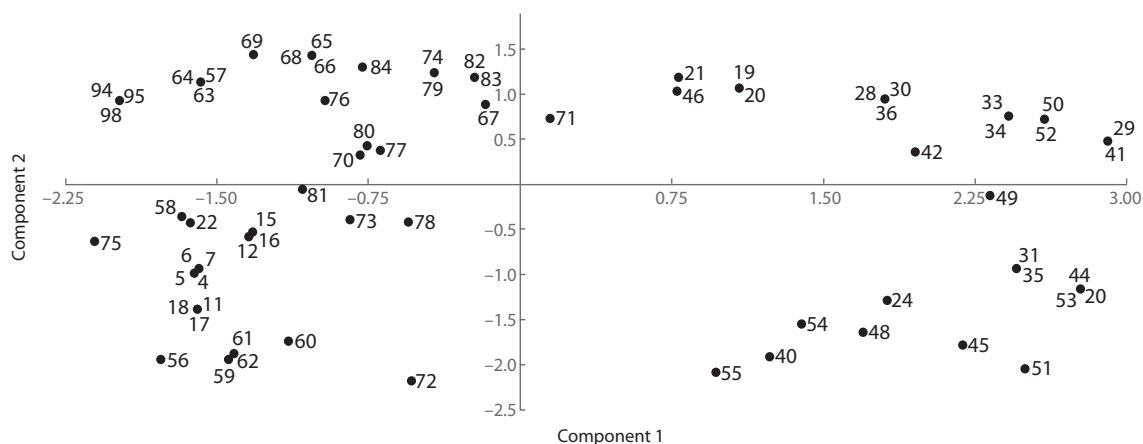


Рис. 4. Результаты статистического анализа данных о морфологических признаках по первой паре главных компонент.

Заключение

Описаны ключевые молекулярно-генетические и фенотипические признаки для 93 штаммов микроорганизмов коллекции ИЦиГ СО РАН. Штаммы охарактеризованы по морфологическим, физиологическим, молекулярно-генетическим и масс-спектрометрическим параметрам. Выявлены особенности роста штаммов на разных средах, изучена морфология клеток. Штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты. Исследованные штаммы значительно различались по своим биохимическим свойствам. Определена физиология штаммов коллекции: отношение к кислороду, тип питания, диапазон температур и рН, отношение к NaCl и др.

Применение комплексного подхода к идентификации микроорганизмов необходимо при решении задач прицельного поиска биотехнологически перспективных штаммов. В настоящей работе проведено объединение организмов в отдельные группы/кластеры на основании сходства их фенотипических характеристик, что может при дальнейшей доработке и расширении спектра таксонов и их метаболических карт послужить базой для создания «искусственной» классификации, которая может быть использована в качестве ключа для упрощенной и более быстрой идентификации и распознавания микроорганизмов в рамках как Коллекции ИЦиГ СО РАН, так и других коллекций.

Список литературы / References

Кардымон О.Л., Кудрявцева А.В. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника. *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016; 26(4):4-13. DOI 10.22416/1382-4376-2016-26-4-4-13.
[Kardymon O.L., Kudryavtseva A.V. Molecular genetic methods for intestinal microbiome investigation. *Rossiiskiy Zhurnal Gastroenterologii, Gepatologii, Koloproktologii = Russian Journal of Gas-*

troenterology, Hepatology, Coloproctology. 2016;26(4):4-13. DOI 10.22416/1382-4376-2016-26-4-4-13. (in Russian)]
Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
[Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor lab., 1982. (Russ. ed. Maniatis T., Frich E., Sembruk D. *Metody Geneticheskoy Inzhenerii. Molekulyarnoe Klonirovanie*. Moscow: Mir Publ., 1984. (in Russian)]
Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005.
[Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. *Workshop on Microbiology*. Moscow: Academy Publ., 2005. (in Russian)]
Church D.L. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. In: Leber A. (Ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Fourth Edn. AMS Press, Washington, 2016;3.17.1.1-3.17.48.3. DOI 10.1128/9781555818814.ch3.17.
DasSarma P., Capes M.D., DasSarma S. Comparative genomics of *Halobacterium* strains from diverse locations. In: Das S., Dash H.R. (Eds.). *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Acad. Press, 2019; 285-322. DOI 10.1016/B978-0-12-814849-5.00017-4.
Gaudreau A.M., Labrie J., Goetz C., Dufour S., Jacques M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms. *J. Microbiol. Methods*. 2018;145:79-81. DOI 10.1016/j.mimet.2018.01.003.
Hammer O., Harper D.A., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentol. Electronica*. 2001;4(1):9.
Jenkins R.E., Tanner M.J.A. The structure of the major protein of the human erythrocyte membrane. Characterization of the intact protein and major fragments. *Biochem. J*. 1977;161(1):139-147. DOI 10.1042/bj1610139.
Logan N.A., De Vos P. Genus I. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. The *Firmicutes*. Springer, 2009;21-128.
Reyes A.T. Morpho-biochemical aided identification of bacterial isolates from Philippine native pig. *Adv. Pharmacol. Clin. Trials*. 2018; 3(5):000148. DOI 10.23880/apct-16000148.
Schäffer C., Wugeditsch T., Kählig H., Scheberl A., Zayni S., Messner P. The surface layer (S-layer) glycoprotein of *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a: analysis of its glycosylation. *J. Biol. Chem*. 2002;277(8):6230-6239. DOI 10.1074/jbc.M108873200.

ORCID ID

S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания КГЦ ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2019. После доработки 26.03.2020. Принята к публикации 01.04.2020.

Геномика и протеомика возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*

В.А. Мордвинов , Н.И. Ершов, О.Г. Запарина, М.Ю. Пахарукова 

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

 e-mail: mordvin@bionet.nsc.ru; pmaria@yandex.ru

Аннотация. Возбудитель описторхоза, печеночный сосальщик *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) – один из наиболее распространенных видов гельминтов человека и животных на территории России. Вместе с близкородственными видами печеночных трематод *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907), ареалы которых расположены в Юго-Восточной Азии и на Дальнем Востоке, *O. felineus* составляет триаду эпидемиологически значимых трематод семейства Opisthorchiidae. Половозрелые особи (мариты) *O. felineus* паразитируют в гепатобилиарной системе теплокровных и при длительной инвазии провоцируют развитие тяжелых осложнений, включая малигнизацию эпителия желчных протоков. Высокая медицинская значимость *O. felineus* привлекает внимание исследователей, работающих в различных областях биологии и медицины. Так, в последнее время активно проводятся исследования молекулярной биологии этого представителя паразитических плоских червей. В настоящем обзоре кратко суммированы результаты исследований геномики и протеомики *O. felineus*, являющиеся, на наш взгляд, существенным вкладом в решение вопросов структурно-функциональной организации геномов многоклеточных паразитов со сложным жизненным циклом и изучение молекулярных механизмов взаимодействия паразит–хозяин. Приведены сравнительные данные по количеству генов и размерам ядерных геномов ряда плоских червей, распределению длин интронов, а также анализу синтении геномов описторхид *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Отдельное внимание уделено обсуждению особой формы процессинга РНК, известной как транс-сплайсинг, широко представленной в геноме *O. felineus*. В статье приводятся анализ литературных данных по генам системы метаболизма ксенобиотиков, сравнению представленности генов этой системы между различными видами паразитических и свободноживущих плоских червей и обзор литературы по наличию и уровню экспрессии генов гранулинов – потенциальных промоторов неоплазии холангиоцитов. Данные по геномике и протеомике *O. felineus* пополняют базу знаний, обеспечивающую исследование проблем эволюции трематод, патогенеза печеночных гельминтозов и гельминт-ассоциированного канцерогенеза.


Ключевые слова: геномика; трематоды; *Opisthorchis felineus*; транс-сплайсинг; микроинтроны; протеомика; опероны; экспрессия генов.

Для цитирования: Мордвинов В.А., Ершов Н.И., Запарина О.Г., Пахарукова М.Ю. Геномика и протеомика возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):383-390. DOI 10.18699/VJ20.44-0

Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felineus*

V.A. Mordvinov , N.I. Ershov, O.G. Zaparina, M.Y. Pakharukova 

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

 e-mail: mordvin@bionet.nsc.ru; pmaria@yandex.ru

Abstract. The causative agent of opisthorchiasis, the liver fluke *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) is one of the helminths of humans and animals in Russia. Together with closely related species of trematodes *O. viverrini* (Poirier, 1886) and *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907), *O. felineus* is a part of a triad of epidemiologically important trematodes in the family Opisthorchiidae. Adult *O. felineus* worms infest the hepatobiliary system of warm-blooded animals and might provoke the development of severe pathologies, including malignancy of bile duct epithelium. The high medical importance of *O. felineus* attracts the attention of researchers. This review briefly summarizes the data about *O. felineus* genomics and proteomics. The review provides a comparative analysis of the number of genes and sizes of nuclear genomes of a number of flatworms, the distribution of intron lengths, as well as results of synteny between the *O. felineus*, *O. viverrini* and *C. sinensis* genomes. Special attention is paid to a particular form of RNA processing known as trans-splicing, widely presented in the opisthorchiid genomes. We also provide the results of a comparative analysis of the xenobiotic metabolizing system between parasitic

and free-living flatworms. Moreover, data on parasitic granulins, which are potential promoters of cholangiocyte neoplasia, are also presented. Data on the *O. felineus* genomics and proteomics provide first insights into the structural and functional organization of the genome of this parasitic flatworm with a complex life cycle as well as provide a significant contribution to our understanding of "host-parasite" interaction and evolution of this group of parasitic flatworms.

Key words: genomics; trematodes; *Opisthorchis felineus*; trans-splicing; microintrones; proteomics; operons; gene expression.

For citation: Mordvinov V.A., Ershov N.I., Zaparina O.G., Pakharukova M.Y. Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(4):383-390. DOI 10.18699/VJ20.44-o

Введение

В 1884 г. итальянский ученый С. Риволта описал новый вид гельминтов *Distomum felineum* (син. *Opisthorchis felineus*, *D. sibiricum* – двуустка кошачья, двуустка сибирская), паразитирующих в желчных протоках печени кошки. В 1891 г. профессор Томского университета К.Н. Виноградов обнаружил этот вид печеночных трематод у человека (Pozio et al., 2013).

Печеночный сосальщик *O. felineus* обладает сложно организованным жизненным циклом с чередованием двух промежуточных и окончательного хозяев. Общий перечень окончательных хозяев этого паразита включает 33 вида и подвида млекопитающих, в первую очередь из отряда хищных: домашняя кошка, собаки, волки, лисы, медведи, барсуки. Человек чрезвычайно легко восприимчив к инвазии *O. felineus* (Безр, 2005).

Инфицирование животных и человека происходит в результате употребления в пищу сырой рыбы, инвазированной метацеркариями *O. felineus*. После попадания в пищеварительный тракт окончательного хозяина оболочка цисты метацеркарий разрушается и эксцистированные описторхи проникают в желчные протоки печени. По достижении половой зрелости паразиты производят в большом количестве яйца, содержащие мирацидии – инвазивную форму *O. felineus* для первого промежуточного хозяина, моллюсков сем. *Bithyniidae*. С экскрементами млекопитающих яйца попадают в водоем, где поглощаются этими моллюсками. В тканях первого промежуточного хозяина трематоды *O. felineus* последовательно проходят этапы развития с бесполом размножением – спороцисты, редии и церкарии. Последние покидают улитку и инфицируют второго промежуточного хозяина – рыб семейства карповых. В рыбе церкарии инкапсулируются и превращаются в метацеркарии – единственную инфекционную для плотоядных стадию развития *O. felineus*.

У человека инвазия *O. felineus*, описторхоз, отличается длительностью, протекает с частыми обострениями и может способствовать возникновению первичного рака печени. Описторхоз относится к природно-очаговым заболеваниям и, как правило, распространен в равнинных областях, расположенных в руслах рек. Наиболее показательна в этом смысле Западно-Сибирская низменность – одна из самых больших низменных равнин земного шара. Именно здесь, в Обь-Иртышском бассейне, расположен самый большой в мире очаг описторхоза, обусловленного инвазией *O. felineus* (Pakharukova, Mordvinov, 2016).

Помимо Западной Сибири, ареал *O. felineus* распространяется также на Восточную, Западную и Южную

Европу. Этот вид гельминтов обнаружен на территории Центральной России, Белоруссии и Украины, в странах Балтии, Германии (Schuster et al., 1999), Италии (Pozio et al., 2013), на Балканском и Пиренейском полуостровах (Petney et al., 2013). По предварительным оценкам, в мире не менее 1.6 млн человек инфицированы *O. felineus* (Keiser, Utzinger, 2009). В Российской Федерации ежегодно выявляется до 40 тыс. случаев описторхоза (Роспотребнадзор..., 2015). Однако эти цифры, скорее всего, не отражают реального уровня заболеваемости. Первые этапы развития описторхоза и переход заболевания в хроническую стадию часто проходят незаметно, а постепенно появляющиеся симптомы не обладают специфичностью. Вследствие этого истинное число больных описторхозом может значительно превышать данные официальной статистики.

Существующая терапия описторхоза не гарантирует полного освобождения от паразитов и не препятствует повторной инвазии. Кроме того, химиотерапия этого заболевания обладает побочными эффектами и может иметь негативные последствия для пациентов. В связи с этим весьма актуален вопрос о возможности создания новых эффективных и безопасных средств для лечения описторхоза. Глубокое изучение молекулярной биологии *O. felineus* дает ключ к пониманию молекулярных механизмов взаимодействия паразит–хозяин и определению потенциальных фармакологических мишеней для терапии описторхоза.

Настоящий обзор посвящен исследованиям геномики и протеомики *O. felineus*, результаты которых существенно пополняют наши знания в области фундаментальных проблем молекулярной паразитологии и генетики, а также развитие прикладных работ, связанных с диагностикой, профилактикой и лечением описторхоза.

Геномика *Opisthorchis felineus*

Ядерный геном

Размер существующей сборки ядерного генома *O. felineus* составляет 684 млн пар оснований, 30.3 % генома представлено повторяющимися элементами, в основном ретротранспозонами. По этим характеристикам, геном *O. felineus* очень близок к геномам двух других эпидемиологически значимых представителей семейства *Opisthorchiidae*, печеночных сосальщиков *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis*, и существенно отличается от геномов представителей семейств *Schistosomatidae* и *Fasciolidae*, трематод *Schistosoma mansoni* и *Fasciola hepatica* (табл. 1). В геноме

Таблица 1. Характеристики геномов пяти видов трематод

Вид	Размер генома	Число генов	Повторяющиеся элементы, %
<i>O. felineus</i> (Ershov et al., 2019)	680.0 Мб	11455	30.3
<i>C. sinensis</i> (Wang et al., 2011)	516 Мб	16000	29.6
<i>O. viverrini</i> (Young et al., 2014)	634.5 Мб	16379	30.9
<i>S. mansoni</i> (Berriman et al., 2009)	364.5 Мб	11809	40
<i>F. hepatica</i> (Cwiklinski et al., 2015)	1.3 Гб	11700	54.2

O. felineus аннотировано 11455 белок-кодирующих генов (Ershov et al., 2019), а также 55 генов, кодирующих микроРНК (Ovchinnikov et al., 2015). Суммарное число генов *O. felineus* почти на одну треть меньше, чем у *O. viverrini* и *C. sinensis*, и практически совпадает с числом генов *S. mansoni* и *F. hepatica*.

При анализе синтении геномов описторхид *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* обнаружена существенная структурная вариабельность. Установлено, что по расположению гомологичных локусов степень сходства геномов *O. felineus* и *C. sinensis* выше, чем у *O. viverrini* с *O. felineus* и *C. sinensis* (Ershov et al., 2019). Эти данные хорошо коррелируют с результатами кариологического анализа: *O. felineus* и *C. sinensis* обладают семью, *O. viverrini* – шестью парами хромосом (Zadesenets et al., 2012).

Результаты анализа синтении геномов подтверждаются также данными филогенетических исследований с использованием отдельных генетических маркеров и полногеномных данных трех видов описторхид. Эти исследования указывают на принадлежность *C. sinensis* к роду *Opisthorchis* и не поддерживают выделение этого вида в отдельный род *Clonorchis* (Shekhovtsov et al., 2009; Cai et al., 2012; Pomaznoy et al., 2016; Ershov et al., 2019). Таким образом, согласно выводам молекулярно-биологических исследований, таксономическое положение *C. sinensis* должно быть пересмотрено.

При исследовании генома и транскриптома *O. felineus* было обнаружено, что регуляция экспрессии почти 50 % генов осуществляется с участием транс-сплайсинга (Ershov et al., 2019). Эта особая форма процессинга РНК довольно часто встречается у плоских червей, однако столь широкое вовлечение транс-сплайсинга у трематод – явление необычное. Например, у *Schistosoma mansoni* транс-сплайсинг участвует в регуляции транскрипции только 11 % генов (Protasio et al., 2012).

Транс-сплайсинг, регулирующий экспрессию генов *O. felineus*, относится к лидер-зависимому типу. В результате этого процесса 5'-участок новосинтезированной пре-мРНК меняется на короткую последовательность сплайс-лидера, кодируемого отдельным геном. У плоских червей эта встраиваемая последовательность оканчивается консервативным триплетом AUG. Вполне вероятно, что этот триплет может выступать в роли старт-кодона

при трансляции зрелой мРНК, подвергшейся транс-сплайсингу. С другой стороны, причиной экспансии транс-сплайсинга у *O. felineus* может быть его роль в удалении длинных 5'-некодирующих областей из пре-мРНК, что необходимо для эффективной трансляции зрелых транскриптов.

Еще одна гипотеза заключается в том, что транс-сплайсинг необходим для регуляции экспрессии отдельных генов в оперонах. В геноме *O. felineus* найдено 355 потенциальных оперонов, объединяющих 736 генов, разделенных сайтами транс-сплайсинга (Ershov et al., 2019). Предсказанные опероны содержат от двух до четырех генов, демонстрирующих различные уровни экспрессии. Не исключено, что стабильность уровней экспрессии генов оперонов достигается тем, что процессинг пре-мРНК, синтезированных под контролем одного и того же промотора, регулируется при помощи транс-сплайсинга.

Большинство генов *O. felineus*, экспрессия которых контролируется этим механизмом, кодирует белки базовых клеточных процессов (Ershov et al., 2019). Подобные данные были получены при анализе генома *Caenorhabditis elegans* – наиболее консервативные сайты транс-сплайсинга были найдены в рибосомальных генах этого вида нематод (Sleumer et al., 2010). При анализе геномных данных *O. viverrini* и *C. sinensis* также обнаружена высокая консервативность мишеней транс-сплайсинга, вовлеченного в посттранскрипционную регуляцию по большей части генов «домашнего хозяйства». Очевидно, этот механизм играет важную роль в жизнедеятельности плоских и круглых червей, хотя в настоящее время функциональное значение транс-сплайсинга окончательно не установлено.

В результате анализа длин интронов в геноме *O. felineus* обнаружено (Ershov et al., 2019), что распределение длин этих элементов характеризуется наличием большого пика на 3000 п. н. и двух дополнительных пиков с максимумами 37 и 90 п. н. Ультракороткие интроны или микроинтроны длиной менее 75 п. н. составляют порядка 34 % от всех аннотированных интронов и входят в структуру 4997 (44 %) генов. Микроинтроны также широко представлены в генах *O. viverrini* и *C. sinensis*. Наличие двух пиков коротких интронов ранее было описано у ленточных червей, причем предполагалось, что бимодальное распределение микроинтронов является отличительной чертой этой группы гельминтов (Tsai et al., 2013). Однако такое своеобразие прослеживается, хоть и менее выражено, и у трематод семейства Opisthorchiidae.

Распределение микроинтронов в геноме *O. felineus* имеет некоторые особенности (Ershov et al., 2019). Во-первых, при наличии нескольких микроинтронов в гене они, как правило, формируют кластеры. Во-вторых, микроинтроны чаще расположены в начале экзонной порции гена, т. е. тяготеют к старту транскрипции (Ershov et al., 2019). Эти факты указывают на обособленную функциональную значимость данного класса интронов в механизмах транскрипции и процессинга. Так, кластеризация может быть связана с распознаванием интрон-экзонной структуры сплайсосомой (intron-definition mechanism), а небольшой размер интронов способствует повышению транскрипционной эффективности (Urrutia, Hurst, 2003; Belshaw, Bensasson, 2006).

Митохондриальный геном

Размер митохондриального генома *O. felineus* составляет 13 875 п. н., он содержит 36 генов: 12 белок-кодирующих генов, два гена рибосомальных РНК и 22 гена транспортных РНК. Митохондриальные гены *O. felineus*, *C. sinensis*, *F. hepatica* и *Paragonimus westermani* идентичны, но отличаются от генов шистосоматид (Shekhovtsov et al., 2010).

Протеомика и система метаболизма ксенобиотиков *O. felineus*

Жизненный цикл трематод сопровождается сменой репертуара генов, экспрессирующихся на определенной стадии развития паразитов. Недавно были опубликованы результаты сравнительного исследования транскриптомов метацеркарии и взрослой особи *O. felineus* (Pomaznou et al., 2016; Ershov et al., 2019). Показано, что транскриптомные профили двух стадий развития кошачьей двуустки существенно различаются: экспрессия 903 и 648 генов зарегистрирована только в марите или метацеркарии соответственно (Pomaznou et al., 2016). У взрослых червей наиболее высокую экспрессию демонстрируют гены, кодирующие протеазы, миоглобин, белок оболочки яиц, глутатион S-трансферазы, а также белки, модулирующие процессинг антигена клетками иммунной системы хозяина. В метацеркарии же наибольшей экспрессией обладают гены, кодирующие белки домашнего хозяйства, например рибосомальные белки, убиквитин и белки теплового шока.

При сравнении между собой транскриптомов взрослых особей *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* было установлено, что уровни экспрессии подавляющего большинства генов у трех видов описторхид отличаются незначительно (Ershov et al., 2019). Это указывает на высокое сходство организации биологических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность гельминтов в организме окончательного хозяина. Тем не менее из всего множества генов в геноме экспрессия нескольких десятков генов обладала видовой специфичностью. Важно, что большинство таких генов кодирует белки экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) описторхид. Не исключено, что видоспецифическая экспрессия белков ЭСП может отражать особенности эволюции трематод в контексте развития механизмов взаимодействия паразит–хозяин.

В состав ЭСП *O. felineus* входят белки, обладающие различными свойствами: белки защиты от активных форм кислорода, протеолитические ферменты и ферменты углеводного обмена, белки защиты гельминтов от иммунной системы хозяина, белки цитоскелета и др. (Львова и др., 2014). Наиболее представленный компонент ЭСП *O. felineus* – глутатион S-трансфераза σ (ГСТ- σ). Этот фермент сохраняет свою активность в среде инкубации *in vitro* и присутствует в тканях печени инфицированных животных и пациентов, страдающих описторхозом. Согласно данным сравнительного анализа транскриптомов взрослых особей *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, представленность мРНК ГСТ- σ в транскриптоме *O. felineus* многократно выше, чем в транскриптомах других описторхид. Вполне вероятно, что этот фермент выполняет важную функцию в системе взаимодействий паразит–хозяин и может опосредовать видоспецифические проявления патогенеза описторхоза, вызванного *O. felineus*. Важно от-

метить, что ГСТ- σ входит в состав большой группы ферментов, принимающих участие в метаболизме эндогенных субстратов и ксенобиотиков (экзогенных субстратов), включая лекарственные препараты.

Система метаболизма ксенобиотиков *O. felineus*

В настоящее время отсутствуют вакцины или какие-либо другие средства специфической профилактики описторхоза, а имеющиеся препараты для химиотерапии этого заболевания вызывают много нареканий (Prichard et al., 2012). В связи с этим исследование системы метаболизма ксенобиотиков печеночных сосальщиков, компоненты которой представляют собой перспективные фармакологические мишени (Bartley et al., 2012; Prichard et al., 2012), имеет особое значение.

За очень немногими исключениями экзогенные субстраты, попадающие в живые организмы, подвергаются одному или нескольким этапам биотрансформации, которые выполняют ферментативные системы трех фаз метаболизма ксенобиотиков. Ферменты фазы 1, среди которых наиболее представлены белки семейства P450 (CYPs), осуществляют окисление, восстановление или гидролитические реакции. В результате анализа доступных геномных и транскриптомных данных паразитических и свободноживущих плоских червей было установлено, что состав CYPs у этих групп животных кардинально различается. У свободноживущих видов, как и у большинства изученных организмов, обнаружены десятки слабо гомологичных друг другу дивергировавших форм CYPs (табл. 2). Однако у паразитических видов семейств Opisthorchiidae, Schistosomatidae, Taeniidae и Fasciolidae выявлен всего один ген, кодирующий цитохром P450 (Pakharukova et al., 2012, 2015). Показано, что продукт этого гена, *O. felineus* CYP, участвует в метаболизме экзогенных субстратов, важен для выживаемости взрослых особей и представляет собой перспективную мишень для антигельминтной терапии (Pakharukova et al., 2015; Mordvinov et al., 2017b).

Помимо гена, кодирующего CYP, в составе генома кошачьей двуустки найдены и другие гены, кодирующие ферменты фазы 1 метаболизма ксенобиотиков, в частности гены альдо-кето редуктазы, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы (Ershov et al., 2019). Однако гены флаavin-монооксигеназ, также относящихся к ферментам фазы 1, в геноме *O. felineus* не найдены. Интересно, что последовательности этих генов не обнаружены также в доступных геномных базах данных паразитических плоских червей.

В реализации фазы 2 метаболизма ксенобиотиков активно задействованы глутатион-пероксидазы и глутатион-S-трансферазы. В геноме *O. felineus* представлено девять генов глутатион S-трансфераз, наиболее высоко экспрессируемых среди всех генов системы метаболизма ксенобиотиков этого печеночного сосальщика. Особенно активен ген, кодирующий ГСТ- σ , его экспрессия у взрослых червей на два-три порядка превышает экспрессию других генов системы метаболизма ксенобиотиков. Как уже упомянуто выше, ГСТ- σ входит в состав ЭСП гельминтов и попадает в ткани окончательного хозяина *O. felineus* (Pakharukova et al., 2017). Важно упомянуть, что

Таблица 2. Число генов СУР у паразитических и свободноживущих плоских червей

Вид	Класс	Семейство	Число генов СУР
<i>Opisthorchis felineus</i>	Trematoda	Opisthorchiidae	1
<i>Clonorchis sinensis</i>	Trematoda	Opisthorchiidae	1
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Trematoda	Opisthorchiidae	1
<i>Schistosoma mansoni</i>	Trematoda	Schistosomatidae	1
<i>Schistosoma japonicum</i>	Trematoda	Schistosomatidae	1
<i>Fasciola hepatica</i>	Trematoda	Fasciolidae	1
<i>Fasciola gigantica</i>	Trematoda	Fasciolidae	1
<i>Taenia solium</i>	Cestoda	Taeniidae	1
<i>Schmidtea mediterranea</i>	Rhabditophora	Dugesiiidae	35
<i>Macrostomum lignano</i>	Turbellaria	Macrostomidae	39

помимо трансферазной активности, ГСТ-σ обладает свойствами простагландин-синтазы, участвует в продукции простагландинов в клетках гельминтов и, вероятно, сохраняет эту энзиматическую активность в тканях хозяина (Morphew et al., 2007).

Еще одна группа ферментов, обычно участвующих в реализации фазы 2 метаболизма ксенобиотиков у эукариота, – УДФ-глюкуроилтрансферазы (УГТ). Функции этих белков – повышение гидрофильности субстратов и их доступности для белков-транспортёров заключительного этапа метаболизма, фазы 3. Надсемейство УГТ состоит из двух семейств, УГТ1 и УГТ2, объединяющих более 20 изоферментов. В геномах паразитических и свободноживущих нематод обнаружено от 30 до 70 генов, кодирующих УГТ (Matouskova et al., 2016). Установлено, что эти ферменты играют важную роль в формировании устойчивости паразитов к антигельминтикам (Lindblom et al., 2006; Laing et al., 2013; Matouskova et al., 2016). Однако ни в геноме *O. felineus*, ни в геномах других видов Opisthorchiidae и Schistosomatidae гены, кодирующие УГТ, не найдены. Кроме того, в геномах описторхид и шистосоматид не обнаружены гены ариламин N-ацетилтрансфераз, ферментов фазы 2 метаболизма ксенобиотиков у позвоночных (Ershov et al., 2019).

Белки фазы 3 метаболизма ксенобиотиков отвечают за выведение из клеток во внеклеточное пространство соединений, образовавшихся в результате действия ферментов фаз 1 и 2. Выведение осуществляют белки, принадлежащие к пяти семействам мембранных транспортёров. Наиболее хорошо изучены АВС транспортёры, поскольку эти белки участвуют в механизмах лекарственной устойчивости клеток эукариот и прокариот (Saier et al., 2014; Wong et al., 2014). В геноме *O. felineus* обнаружено 23 гена, кодирующих АВС транспортёры (Mordvinov et al., 2017a). Интересно, что 4 из них, P1–P4, обладают большим сходством с однокопийным геном Р-гликопротеина человека. Продукт этого гена известен также как белок множественной лекарственной устойчивости 1 (Saier et al., 2014; Wong et al., 2014). Установлено, что у двух генов Р-гликопротеинов *O. felineus* уровень экспрессии зависит от стадии развития паразита. Так, у взрослых гельминтов экспрессия генов P1 и P4 в 20–30 раз выше, чем у метациркий и у недавно эксцистированных личинок. Вероятно,

именно эти белки наиболее значимы для метаболизма ксенобиотиков у взрослых особей паразитов.

В заключение следует подчеркнуть, что система метаболизма ксенобиотиков *O. felineus*, как, вероятно, и ряда других видов паразитических плоских червей, имеет четкие структурные и функциональные особенности. Прежде всего, она существенно отличается от системы метаболизма экзогенных субстратов хозяев этих паразитов. Детальное изучение системы метаболизма ксенобиотиков *O. felineus* и других описторхид позволит расширить наши представления о формировании механизмов паразитизма и эволюции трематод. Знания о структуре и функциях этой системы метаболизма могут быть применены в работах по идентификации фармакологических мишеней и созданию новых лекарств для терапии описторхоза.

Продуктами системы метаболизма ксенобиотиков *O. felineus* и других трематод могут быть метаболиты экзогенных и эндогенных соединений, входящие в ЭСП паразитов. Из низкомолекулярных компонентов ЭСП *O. felineus* в настоящее время известны паразит-специфические метаболиты холестерина (Gouveia et al., 2017) Эти оксистерол-подобные соединения обладают генотоксическими свойствами и могут вызывать повреждения ДНК клеток хозяина. Накопление таких повреждений ведет к злокачественной трансформации тканей желчных протоков. Не исключено, что специфические оксистеролы *O. felineus* участвуют в запуске механизмов холангиокарциногенеза при описторхозе.

Синтез паразит-специфических оксистеролов могут осуществлять СУР и другие ферменты *O. felineus*, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, такие как глутатион-S-трансферазы, тиоредоксинпероксидазы и др. Поиск белков, вовлеченных в ферментативный путь генерации специфических генотоксических оксистеролов гельминтов, остается приоритетной задачей молекулярной паразитологии.

Гранулины – потенциальные промоторы неоплазии холангиоцитов

Существует гипотеза, что в канцерогенных процессах, связанных с заражением гельминтами, может участвовать гранулин – белок, входящий в состав ЭСП описторхид (Smout et al., 2015). Гранулины канцерогенных описторхид

O. felineus, *O. viverrini* и *C. sinensis*, являются консервативными белками и обладают гомологией с гранулином человека. Гранулины человека и гельминтов стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток, включая холангиоциты (Smout et al., 2015), однако используют для этого различные клеточные сигнальные пути. Гранулин человека взаимодействует с рецепторами фактора некроза опухоли (ФНО) и действует как антагонист пути передачи сигнала ФНО. Клеточный рецептор гранулина гельминтов неизвестен, однако установлено, что гранулин *O. viverrini* проникает в холангиоциты и активирует систему MAP-киназ и сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста. Это намного более мощный путь активации пролиферации, чем используемый гранулином человека.

Гранулин *O. viverrini* эффективно способствует заживлению повреждений, возникающих в результате двигательной активности гельминтов и при их питании (Smout et al., 2015). Кроме того, этот белок стимулирует рост кровяных сосудов (Smout et al., 2015) и может, вероятно, активировать клеточную миграцию. Таким образом, гранулин обладает свойствами, необходимыми для стимуляции пролиферации малигнизированных холангиоцитов, возникающих при хроническом описторхозе, и формирования злокачественной опухоли желчных протоков, холангиокарциномы.

В геноме *O. felineus*, как и в геномах *O. viverrini* и *C. sinensis*, обнаружено четыре гена, GRN-1–GRN-4, кодирующие однодоменные гранулины, а также один ген мультисаитового програнулина (PGRN) (Ershov et al., 2019). Гены однодоменных гранулинов локализованы в одном хромосомном локусе и формируют консервативную синтенную группу генов. Последовательности, кодирующие GRN-1 и GRN-4 *O. felineus*, обладают 95 % гомологией, что предполагает дубликацию одного из них. Фиксация этой дубликации в геномах описторхид может быть связана, вероятно, со значительной функциональной нагрузкой гранулина.

Наиболее высокий уровень экспрессии генов, кодирующих GRN-1 и GRN-4 *O. felineus*, зарегистрирован у взрослых гельминтов, тогда как у метацеркарий доминантно экспрессирующимся является ген GRN-3 (Ershov et al., 2019). Все экспериментальные работы по определению потенциально канцерогенных свойств гранулинов описторхид были выполнены с GRN-1 *O. viverrini*. Однако можно предположить, что митогенными, ангиогенными свойствами и способностью увеличивать миграцию клеток обладает также и GRN-4. У взрослых особей экспрессия генов, кодирующих GRN-2 и GRN-3, практически отсутствует. Вполне вероятно, что продукты этих генов могут быть функционально вовлечены в механизмы взаимоотношений паразит–хозяин в промежуточных хозяевах трематод, моллюсках и рыбе.

Заключение

Возбудитель описторхоза печеночный сосальщик *O. felineus* входит в триаду эпидемиологически значимых видов трематод семейства Opisthorchiidae. Его ареал охватывает огромные территории Европы и Азии, и вспышки описторхоза, вызванного этим гельминтом, можно ожидать во многих странах. Нельзя не учитывать также растущую

миграцию населения и туристический поток между различными странами. Вследствие этих факторов пациенты, страдающие от инвазии *O. felineus*, могут быть выявлены далеко за пределами эндемичных районов. Таким образом, описторхоз, вызванный *O. felineus*, становится глобальной проблемой, выходящей за рамки биомедицинских проблем отдельных регионов.

Появление геномных и протеомных данных *O. felineus* существенно укрепляет базу молекулярно-биологических исследований эпидемиологически важных печеночных сосальщиков. Глубокие исследования геномики и протеомики *O. felineus* позволят генерировать обоснованные гипотезы о механизмах канцерогенеза, ассоциированных с описторхозом, идентифицировать видоспецифические механизмы патогенеза печеночных гельминтозов, проводить направленный поиск молекулярных мишеней для терапии заболеваний. Развитие этих работ должно учитывать острую потребность практического здравоохранения в эффективных средствах терапии и профилактики трематодозов.

Список литературы / References

- Безр С.А. Биология возбудителя описторхоза. М.: Т-во научных изданий «КМК», 2005.
- [Beer S.A. The Biology of the Opisthorchiasis Agent. Moscow: KMK Publ., 2005. (in Russian)]
- Львова М.Н., Дужак Т.Г., Центалович Ю.П., Катохин А.В., Мординов В.А. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*. *Паразитология*. 2014;48(3):169-184.
- [Lvova M.N., Duzhak T.G., Tsentalovitch Y.P., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Parazitologiya = Parasitology*. 2014;48(3):169-184. (in Russian)]
- Роспотребнадзор. О мерах профилактики описторхоза. 2015. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=3480&sphrase_id=462082.
- [Rosspotrebnadzor. On Preventive Measures against Opisthorchiasis. 2015. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=3480&sphrase_id=462082. (in Russian)]
- Bartley D.J., Morrison A.A., Dupuy J., Bartley Y., Sutra J.F., Menez C., Alvinerie M., Jackson F., Devin L., Lespine A. Influence of Pluronic 85 and ketoconazole on disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Vet. Parasitol.* 2012;187:464-472. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.02.011.
- Belshaw R., Bensasson D. The rise and falls of introns. *Heredity*. 2006; 96:208-213. DOI 10.1038/sj.hdy.6800791.
- Berriman M., Haas B.J., LoVerde P.T., Wilson R.A., Dillon G.P., Cerqueira G.C., Mashiyama S.T., Al-Lazikani B., Andrade L.F., Ashton P.D., Aslett M.A., Bartholomeu D.C., Blandin G., Caffrey C.R., Coghlan A., Coulson R., Day T.A., Delcher A., DeMarco R., Djikeng A., Eyre T., Gamble J.A., Ghedin E., Gu Y., Hertz-Fowler C., Hirai H., Hirai Y., Houston R., Ivans A., Johnston D.A., Lacerda D., Macedo C.D., McVeigh P., Ning Z., Oliveira G., Overington J.P., Parkhill J., Pertea M., Pierce R.J., Protasio A.V., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Sajid M., Salzberg S.L., Stanke M., Tivey A.R., White O., Williams D.L., Wortman J., Wu W., Zamanian M., Zerlotini A., Fraser-Liggett C.M., Barrell B.G., El-Sayed N.M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 2009;460:352-358. DOI 10.1038/nature08160.
- Cai X.Q., Liu G.H., Song H.Q., Wu C.Y., Zou F.C., Yan H.K., Yuan Z.G., Lin R.Q., Zhu X.Q. Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini*

- and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitol. Res.* 2012;110:235-243. DOI 10.1007/s00436-011-2477-2.
- Cwiklinski K., Dalton J.P., Dufresne P.J., La Course J., Williams D.J., Hodgkinson J., Paterson S. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* 2015; 16:71. DOI 10.1186/s13059-015-0632-2.
- Ershov N.I., Mordvinov V.A., Prokhortchouk E.B., Pakharukova M.Y., Gunbin K.V., Ustyantsev K., Genaev M.A., Blinov A.G., Mazur A., Boulygina E., Tsygankova S., Khrameeva E., Chekanov N., Fan G., Xiao A., Zhang H., Xu X., Yang H., Solovyev V., Lee S.M., Liu X., Afonnikov D.A., Skryabin K.G. New insights from *Opisthorchis felineus* genome: update on genomics of the epidemiologically important liver flukes. *BMC Genomics.* 2019;20:399. DOI 10.1186/s12864-019-5752-8.
- Gouveia M.J., Pakharukova M.Y., Laha T., Sripa B., Maksimova G.A., Rinaldi G., Brindley P.J., Mordvinov V.A., Amaro T., Santos L.L., Costa J.M.C.D., Vale N. Infection with *Opisthorchis felineus* induces intraepithelial neoplasia of the biliary tract in a rodent model. *Carcinogenesis.* 2017;38:929-937. DOI 10.1093/carcin/bgx042.
- Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(3):466-483. DOI 10.1128/CMR.00012-09.
- Laing R., Kikuchi T., Martinelli A., Tsai I.J., Beech R.N., Redman E., Holroyd N., Bartley D.J., Beasley H., Britton C., Curran D., Devaney E., Gilabert A., Hunt M., Jackson F., Johnston S.L., Kryukov I., Li K., Morrison A.A., Reid A.J., Sargison N., Saunders G.I., Wasmuth J.D., Wolstenholme A., Berriman M., Gilleard J.S., Cotton J.A. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol.* 2013; 14:R88. DOI 10.1186/gb-2013-14-8-r88.
- Lindblom T.H., Dodd A.K. Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 2006; 305(9):720-729. DOI 10.1002/jez.a.324.
- Matousova P., Vokral I., Lamka J., Skalova L. The role of xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. *Trends Parasitol.* 2016;32:481-491. DOI 10.1016/j.pt.2016.02.004.
- Mordvinov V.A., Ershov N.I., Pirozhkova D.S., Pakharukov Y.V., Pakharukova M.Y. ABC transporters in the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2017a;216:60-68. DOI 10.1016/j.molbiopara.2017.07.001.
- Mordvinov V.A., Shilov A.G., Pakharukova M.Y. Anthelmintic activity of cytochrome P450 inhibitors miconazole and clotrimazole: in-vitro effect on the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017b;50:97-100. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.037.
- Morphew R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Woods D.J., Brophy P.M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007;6:963-972. DOI 10.1074/mcp.M600375-MCP200.
- Ovchinnikov V.Y., Afonnikov D.A., Vasiliev G.V., Kashina E.V., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V. Identification of micro-RNA genes in three opisthorchiids. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9: e0003680. DOI 10.1371/journal.pntd.0003680.
- Pakharukova M.Y., Ershov N.I., Vorontsova E.V., Katokhin A.V., Merkulova T.I., Mordvinov V.A. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: Identification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2012;181:190-194. DOI 10.1016/j.molbiopara.2011.11.005.
- Pakharukova M.Y., Kovner A.V., Trigolubov A.N., Fedin E.N., Mikhailova E.S., Autenshlyus A.I., Mordvinov V.A., Shtofin S.G. Mechanisms of trematodiasis pathogenicity: the presence of the secretory proteins from the liver fluke *Opisthorchis felineus* in the gallbladder tissues of the patients with chronic opisthorchiasis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21:312-316. DOI 10.18699/VJ16.17-o.
- Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016;110(1):28-36. DOI 10.1093/trstmh/trv085.
- Pakharukova M.Y., Vavilin V.A., Sripa B., Laha T., Brindley P.J., Mordvinov V.A. Functional analysis of the unique cytochrome P450 of the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(12):e0004258. DOI 10.1371/journal.pntd.0004258.
- Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini*. *Int. J. Parasitol.* 2013;43(12-13):1031-1046. DOI 10.1016/j.ijpara.2013.07.007.
- Pomaznoy M.Y., Logacheva M.D., Young N.D., Penin A.A., Ershov N.I., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felineus*. *Parasitol. Int.* 2016;65(1):12-19. DOI 10.1016/j.parint.2015.09.002.
- Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Gomez Morales M.A. *Opisthorchis felineus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. *Acta Trop.* 2013;126(1):54-62. DOI 10.1016/j.actatropica.2013.01.005.
- Prichard R.K., Basanez M.G., Boatman B.A., McCarthy J.S., Garcia H.H., Yang G.J., Sripa B., Lustigman S. A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:e1549. DOI 10.1371/journal.pntd.0001549.
- Protasio A.V., Tsai I.J., Babbage A., Nichol S., Hunt M., Aslett M.A., De Silva N., Velarde G.S., Anderson T.J., Clark R.C., Davidson C., Dillon G.P., Holroyd N.E., LoVerde P.T., Lloyd C., McQuillan J., Oliveira G., Otto T.D., Parker-Manuel S.J., Quail M.A., Wilson R.A., Zerlotini A., Dunne D.W., Berriman M. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:e1455. DOI 10.1371/journal.pntd.0001455.
- Saier M.H. Jr., Reddy V.S., Tamang D.G., Västermark A. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D251-D258. DOI 10.1093/nar/gkt1097.
- Schuster R., Bonin J., Staubach C., Heidrich R. Liver fluke (*Opisthorchiidae*) findings in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the eastern part of the Federal State Brandenburg, Germany – a contribution to the epidemiology of opisthorchiidosis. *Parasitol. Res.* 1999;85(2):142-146. DOI 10.1007/s004360050523.
- Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitol. Int.* 2010;59:100-103. DOI 10.1016/j.parint.2009.10.012.
- Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Romanov K.V., Besprozvanykh V.V., Fedorov K.P., Yurlova N.I., Serbina E.A., Sithithaworn P., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda). *Parasitol. Res.* 2009;106:293-297. DOI 10.1007/s00436-009-1628-1.
- Sleumer M.C., Mah A.K., Baillie D.L., Jones S.J. Conserved elements associated with ribosomal genes and their trans-splice acceptor sites in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(9):2990-3004. DOI 10.1093/nar/gkq003.
- Smout M.J., Sotillo J., Laha T., Papatprem Siri A., Rinaldi G., Pimenta R.N., Chan L.Y., Johnson M.S., Turnbull L., Whitchurch C.B., Giacomini P.R., Moran C.S., Golledge J., Daly N., Sripa B., Mulvanna J.P., Brindley P.J., Loukas A. Carcinogenic parasite secretes growth factor that accelerates wound healing and potentially promotes neoplasia. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005209. DOI 10.1371/journal.ppat.1005209.
- Tsai I.J., Zarowiecki M., Holroyd N., Garcarrubio A., Sánchez-Flores A., Brooks K.L., Tracey A., Bobes R.J., Fragoso G., Sciuotto E., Aslett M., Beasley H., Bennett H.M., Cai X., Camicia F., Clark R., Cucher M., De Silva N., Day T.A., Deplazes P., Estrada K., Fernández C., Holland P.W.H., Hou J., Hu S., Huckvale T., Hung S.S., Kamenetzky L., Keane J.A., Kiss F., Koziol U., Lambert O., Liu K., Luo X., Luo Y., Macchiaroli N., Nichol S., Paps J., Parkinson J.,

- Pouchkina-Stantcheva N., Riddiford N., Rosenzvit M., Salinas G., Wasmuth J.D., Zamanian M., Zheng Y.; Taenia solium Genome Consortium, Cai J., Soberón X., Olson P.D., Laclette J.P., Brehm K., Berriman M. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 2013;496:57-63. DOI 10.1038/nature12031.
- Urrutia A.O., Hurst L.D. The signature of selection mediated by expression on human genes. *Genome Res*. 2003;13:2260-2264. DOI 10.1101/gr.641103.
- Wang X., Chen W., Huang Y., Sun J., Men J., Liu H., Luo F., Guo L., Lv X., Deng C., Zhou C., Fan Y., Li X., Huang L., Hu Y., Liang C., Hu X., Xu J., Yu X. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis*. *Genome Biol*. 2011;12:R107. DOI 10.1186/gb-2011-12-10-r107.
- Wong K., Ma J., Rothnie A., Biggin P.C., Kerr I.D. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem. Sci*. 2014;39:8-16. DOI 10.1016/j.tibs.2013.11.002.
- Young N.D., Nagarajan N., Lin S.J., Korhonen P.K., Jex A.R., Hall R.S., Safavi-Hemami H., Kaewkong W., Bertrand D., Gao S., Seet Q., Wongkham S., Teh B.T., Wongkham C., Intapan P.M., Maleewong W., Yang X., Hu M., Wang Z., Hofmann A., Sternberg P.W., Tan P., Wang J., Gasser R.B. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. *Nat. Commun*. 2014;5:4378. DOI 10.1038/ncomms5378.
- Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Rubtsov N.B. Comparative cytogenetics of opisthorchid species (Trematoda, Opisthorchiidae). *Parasitol. Int*. 2012;61:87-89. DOI 10.1016/j.parint.2011.07.006.

ORCID ID

V.A. Mordvinov orcid.org/0000-0002-6173-0774
N.I. Ershov orcid.org/0000-0003-3423-3497
M.Y. Pakharukova orcid.org/0000-0003-1054-2068

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-04-00417-A (ВАМ), № 19-34-90060-Аспиранты (ЗО)) и бюджетных проектов ИЦиГ СО РАН (0324-2019-0041 (МЮП), № 0259-2019-0010 (ЗО)).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.10.2019. После доработки 20.12.2019. Принята к публикации 20.12.2019. Опубликована онлайн 23.04.2020.

Роль полиморфных вариантов генов аргиназ (*ARG1*, *ARG2*), участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, в развитии и течении бронхиальной астмы

О.Н. Савельева¹, А.С. Карунас^{1, 2}, Ю.Ю. Федорова², Р.Р. Мурзина³, А.Н. Савельева¹, Р.Ф. Гатиятуллин³, Э.И. Эткина³, Э.К. Хуснутдинова^{2, 4}

¹ Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

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

³ Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: olyasavelie@yandex.ru, carunas@list.ru

Аннотация. Бронхиальная астма (БА) – широко распространенное тяжелое заболевание дыхательных путей, которое при недостаточно эффективном лечении приводит к значительному ухудшению качества жизни пациентов. Отсутствие контроля над симптомами БА ведет к быстрому прогрессированию, утяжелению заболевания и инвалидизации пациентов. Чувствительность к лекарственной терапии БА во многом зависит от взаимодействия генетических и эпигенетических факторов, которые на 50–60 % определяют вариабельность терапевтического ответа пациентов. Одной из основных групп препаратов, используемых для лечения БА, являются бета-2-агонисты, оказывающие значительное бронходилатирующее действие. По литературным данным, аллельные варианты генов аргиназ *ARG1* и *ARG2* ассоциированы с риском развития БА, показателями спирометрии и эффективностью терапии бронходилататорами. Повышенная экспрессия генов аргиназ ведет к снижению биодоступности L-аргинаина и уровня оксида азота в организме и, как следствие, к увеличению степени воспаления и ремоделирования дыхательных путей. Выполнено исследование полиморфных вариантов генов аргиназ (rs2781667 гена *ARG1* и rs17249437, rs3742879, rs7140310 гена *ARG2*) у 236 детей, больных БА, а также у 194 неродственных здоровых индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Проведен поиск ассоциаций изученных полиморфных вариантов с развитием, течением БА и чувствительностью к терапии у пациентов с БА. Установлено, что аллель rs2781667*С гена *ARG1* является маркером повышенного риска развития БА у татар. В группе русских пациентов с БА генотипы rs17249437*ТТ и rs3742879*GG гена *ARG2* ассоциированы со снижением показателей спирометрии (ОФВ1, МОС25). У русских и татар, находящихся на монотерапии ингаляционными глюкокортикостероидами или на комбинированной терапии, показана ассоциация аллеля rs17249437*Т и генотипа rs17249437*ТТ гена *ARG2* с частично контролируемым и неконтролируемым течением астмы. Ключевые слова: бронхиальная астма; бета-2-агонисты; аргиназа 1 (*ARG1*); аргиназа 2 (*ARG2*); ассоциация; гены предрасположенности.

Для цитирования: Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Мурзина Р.Р., Савельева А.Н., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Роль полиморфных вариантов генов аргиназ (*ARG1*, *ARG2*), участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, в развитии и течении бронхиальной астмы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):391-398. DOI 10.18699/VJ20.631

The role of polymorphic variants of arginase genes (*ARG1*, *ARG2*) involved in beta-2-agonist metabolism in the development and course of asthma

O.N. Savelieva¹, A.S. Karunas^{1, 2}, Yu.Yu. Fedorova², R.R. Murzina³, A.N. Savelieva¹, R.F. Gatiyatullin³, E.I. Etkina³, E.K. Khusnutdinova^{2, 4}

¹ Bashkir State University, Ufa, Russia

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

³ Bashkir State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ufa, Russia

⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: olyasavelie@yandex.ru, carunas@list.ru

Abstract. Asthma is a common severe disease of the respiratory tract, it leads to a significant impairment in the quality of a patient's life unless effectively treated. Uncontrolled asthma symptoms are a cause of disease progression and development, they lead to an increase in the patient's disability. The sensitivity to asthma therapy largely

depends on the interaction of genetic and epigenetic factors, which account for about 50–60 % of variability of therapeutic response. Beta-2-agonists are some of the major class of bronchodilators used for asthma management. According to published data, allelic variants of the arginase *ARG1* and *ARG2* genes are associated with a risk of asthma development, spirometry measures and efficacy of bronchodilator therapy. High arginase activity results in a low level of plasma L-arginine and in a decrease in nitric oxide, and, as a result, in an increase in airway inflammation and remodeling. Arginase genetic polymorphisms (rs2781667 of the *ARG1* gene, rs17249437, rs3742879, rs7140310 of the *ARG2* gene) were studied in 236 children with asthma and 194 unrelated healthy individuals of Russian, Tatar and Bashkir ethnicity from the Republic of Bashkortostan. Association analysis of the studied polymorphisms with asthma development and course, the sensitivity to therapy in patients was carried out. It was found that the rs2781667*C allele of the *ARG1* gene is a marker of an increased risk of asthma in Tatars. In Russians, the association of rs17249437*TT and rs3742879*GG genotypes of the *ARG2* gene with a decrease in spirometry measures (FEV1, MEF25) was established. In Russians and Tatars receiving glucocorticoid monotherapy or combination therapy, the association of the rs17249437*T allele and rs17249437*TT genotype of the *ARG2* gene with a partially controlled and uncontrolled course of asthma was shown.

Key words: asthma; beta-2-agonists; arginase 1 (*ARG1*); arginase 2 (*ARG2*); association; predisposition genes.

For citation: Savelieva O.N., Karunas A.S., Fedorova Yu.Yu., Murzina R.R., Savelieva A.N., Gatiyatullin R.F., Etkina E.I., Khusnutdinova E.K. The role of polymorphic variants of arginase genes (*ARG1*, *ARG2*) involved in beta-2-agonist metabolism in the development and course of asthma. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):391-398. DOI 10.18699/VJ20.631

Введение

Бронхиальная астма (БА) – гетерогенное хроническое заболевание дыхательных путей, в развитии которого принимают участие множество генетических и средовых факторов. Распространенность БА в мире составляет 1–18 %, при этом у значительной части пациентов отмечается недостаточная эффективность контроля БА (GINA, 2018). Одной из основных групп лекарственных препаратов, используемых при лечении БА, являются агонисты бета-2-адренорецепторов. Ингаляционные бета-2-агонисты быстрого действия представляют собой препараты выбора для купирования бронхоспазма при обострении БА. Бета-2-агонисты длительного действия при продолжительном применении пациентами оказывают противовоспалительное влияние вследствие снижения сосудистой проницаемости, уменьшения выделения медиаторов из тучных клеток и базофилов и снижения бронхиальной гиперреактивности (Национальная программа..., 2017).

По данным литературы, вклад генетических факторов в формирование индивидуальной чувствительности пациентов к лечению БА составляет около 50–60 % (Farzan et al., 2017). Обнаружено более 20 генов-кандидатов, ассоциированных с чувствительностью к терапии бета-2-агонистами (*ADRB2*, *CRHR2*, *ADCY9*, *ARG1*, *ARG2* и др.) (Martinez et al., 1997; Litonjua et al., 2008; Poon et al., 2008; Vonk et al., 2010; Kim et al., 2011; Федорова и др., 2013; Батожаргалова и др., 2017; Scarparrotta et al., 2019). Использование метода полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) и изучение больших по объему выборок в рамках международных консорциумов позволило значительно расширить число генов и межгенных полиморфных вариантов, ассоциированных с эффективностью терапии бронходилататорами (*COL22A1*, *SLC22A15*, *SLC22A23*, *OXR1*, *THRB*, *NTM* и др.) (www.genome.gwas.org).

Для наиболее изученного полиморфного варианта rs1042713 (с.46A > G, p.Arg16Gly) гена адренорецептора *ADRB2*, участвующего в метаболизме бета-2-агонистов, проведено клиническое исследование третьей стадии (Bateman et al., 2011), а на сайте PharmGB опубликована клиническая аннотация rs1042713 гена *ADRB2* уровня доказательности 2A, которая подтверждает практиче-

скую применимость результатов фармакогенетических исследований БА (<https://www.pharmgkb.org/gene/PA39/clinicalAnnotation/>). Кроме полиморфных локусов в гене *ADRB2*, установлена важная роль полиморфных вариантов других генов в эффективности терапии бета-2-агонистами у пациентов с БА различной этнической принадлежности. Обнаружена ассоциация генотипов и гаплотипов гена аденилилциклазы *ADCY9* с улучшением показателей спирометрии в ответ на использование бета-2-агонистов у больных с БА из Кореи, гена рецептора тиреоидного гормона В *THRB* и гена рецептора кортикотропин-рилизинг гормона 2 *CRHR2* с более выраженным бронходилатационным ответом у пациентов европейского происхождения (Kim et al., 2011; Duan et al., 2013; Drake et al., 2014). В ряде работ показано, что аллельные варианты генов *ARG1* и *ARG2* ассоциированы с риском развития БА, показателями спирометрии и эффективностью терапии бронходилататорами (Li et al., 2006; Salam et al., 2009; Vonk et al., 2010; Duan et al., 2011). Повышенная экспрессия генов аргиназ ведет к снижению биодоступности L-аргинина и уровня оксида азота в организме, увеличению продукции полиаминов и пролина и, как следствие, к увеличению степени воспаления и ремоделирования дыхательных путей (Li et al., 2006; Cloots et al., 2018; Meurs et al., 2019; Said et al., 2019).

Целью нашего исследования был анализ ассоциации полиморфных вариантов генов аргиназ *ARG1* (rs2781667) и *ARG2* (rs17249437, rs3742879, rs7140310) с развитием и течением БА у детей различной этнической принадлежности.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 430 неродственных индивидов, проживающих на территории Республики Башкортостан (РБ), в возрасте 2–17 лет (табл. 1). Группу пациентов составили 236 больных бронхиальной астмой (70 девочек, 166 мальчиков) различной этнической принадлежности (русские – 84, татары – 108, башкиры – 44). Все обследованные находились на стационарном лечении или обследовании в детских отделениях Клиники ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский универ-

Таблица 1. Характеристика больных БА и контрольной группы

Показатель	Выборка		
	Русские	Татары	Башкиры
	Больные БА		
Объем выборки	84	108	44
Возраст, лет	10.45 ± 0.39	10.72 ± 0.31	10.34 ± 0.54
Возраст начала БА, лет	3.85 ± 0.34	3.48 ± 0.29	3.73 ± 0.47
Уровень общего IgE, МЕ/мл	432.15 ± 46.15	431.67 ± 38.86	425.30 ± 58.0
ОФВ1, % от нормы	62.51 ± 3.59	73.27 ± 4.64	81.22 ± 8.30
	Контрольная группа		
Объем выборки	75	83	36
Возраст, лет	11.49 ± 0.43	13.54 ± 0.42	14.19 ± 0.58

Примечание. Данные представлены как $M \pm SE$ (среднее значение и стандартная ошибка).

ситет» Минздрава Российской Федерации и аллергологическом отделении ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» г. Уфы. Основным критерием включения детей в группу наблюдения стал установленный диагноз заболевания в соответствии с критериями GINA (Global Initiative for Asthma) и критериями отечественных программных документов по диагностике, лечению и профилактике БА (Национальная программа..., 2012).

Все больные БА, вошедшие в группу исследования, получали не менее трех месяцев монотерапию ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) или комбинированную терапию (ИГКС–длительно действующий бета-2-агонист) в суточной дозе от 100 до 1000 мкг по флутиказону пропранолу в зависимости от тяжести течения и периода заболевания. Группа больных БА, находящихся на монотерапии ИГКС, включала 187 человек, группа больных на комбинированной терапии (ИГКС–ДДБА) – 49 человек. У 172 пациентов наблюдалось контролируемое течение заболевания на фоне терапии ИГКС и ИГКС–ДДБА, у 50 – частично контролируемое, у 14 пациентов – неконтролируемое течение БА.

Оценку функции внешнего дыхания у больных БА и индивидов контрольной группы выполняли на компьютерном спирографе (Erich Jaeger, Германия) с анализом кривой «поток–объем». Оценивали следующие показатели (в процентах от должных величин, заложенных в компьютерную базу спирометра): жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1), максимальные объемные скорости потока кривой в точках, соответствующих 75, 50 и 25 % ФЖЕЛ (МОС75, МОС50, МОС25 соответственно). Градации нормы и снижение параметров спирограммы в процентах от должной величины для детей до 18 лет оценивались по Р.Ф. Клементу и Н.А. Зильберу (Клемент, Зильбер, 1993). У пациентов с клиническими симптомами БА, которым не было возможности провести спирометрию, выполняли множественные измерения пиковой скорости выдоха (ПСВ) при пикфлоуметрии.

Оценку степени контроля БА на фоне проводимой не менее трех месяцев терапии осуществляли на основании клинических признаков за последние 4 недели (частота дневных симптомов и частота ночных пробуждений в

неделю, потребность в препаратах для купирования приступов в неделю, ограничение активности из-за БА) с использованием валидизированного вопросника «Тест по контролю над астмой» (Asthma control test, АСТ). В качестве контроля исследована группа практически здоровых детей без бронхолегочных, аллергических и аутоиммунных заболеваний с неотягощенной наследственностью в отношении аллергических заболеваний, состоящая из 194 человек (119 девочек, 75 мальчиков) соответствующей этнической принадлежности (русские – 75, татары – 83, башкиры – 36). У детей, включенных в группу контроля, был низкий уровень иммуноглобулина Е (IgE) и не было отклонений от нормальных показателей функции внешнего дыхания по данным спирографии или пикфлоуметрии. Все дети с 15 лет и родители детей младше 15 лет дали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальными биоэтическими комитетами БГМУ (протокол № 28 от 29.10.2012) и ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 4 от 15.11.2012).

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984). Анализ полиморфных вариантов rs2781667 (с.57+665С > Т) гена аргиназы 1 *ARG1* и rs17249437 (с.185-8016Т > С), rs3742879 (с.859+101А > G), rs7140310 (с.363-1623Т > G) гена аргиназы 2 *ARG2* проводили с использованием набора реагентов для амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS) (ООО «Тест-Ген», Москва) согласно протоколу фирмы-производителя, с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad, США).

Выбор однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП) в исследуемых генах был основан на данных литературы, сведений баз данных о частотах редких аллелей полиморфных локусов (более 5 %), их возможном регуляторном влиянии на экспрессию гена, функциональной значимости (Li et al., 2006; Salam et al., 2009; Vonk et al., 2010; Duan et al., 2011).

Для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга использовался критерий χ^2 . При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контро-

ля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. В случае достоверных отличий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95 % доверительного интервала (CI 95 %). Статистическая обработка количественных данных выполнена с использованием параметрической и непараметрической статистики в зависимости от шкал и характера распределения переменных с помощью программы SPSS v.23 (SPSS Inc.). Вид распределения количественных данных оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова, равенство генеральных дисперсий – по критерию Левена. Вклад аллельных вариантов изучаемых генов-кандидатов в вариабельность количественных признаков определяли при помощи критерия Краскела–Уоллиса (в случае трех групп) или Манна–Уитни (в случае

двух групп). Неравновесие по сцеплению между парами полиморфных локусов оценивали с помощью коэффициента D' , предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r^2 Пирсона. Определение частот гаплотипов и тестирование различий в распределении частот гаплотипов в исследуемых выборках проводилось согласно EM-алгоритму, реализованному в программе Haploview 4.2 (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

Результаты

У больных БА и здоровых индивидов, проживающих в РБ, исследованы частоты аллелей и генотипов четырех полиморфных вариантов генов аргиназ *ARG1* (rs2781667) и *ARG2* (rs17249437, rs3742879, rs7140310) (табл. 2). Распределение частот генотипов по всем полиморфным локусам соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0.05$).

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов rs2781667 гена *ARG1* и rs17249437, rs3742879, rs7140310 гена *ARG2* у больных БА и в контрольной группе

Исследуемая группа		N	Генотипы			Аллели	
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
rs2781667			CC	CT	TT	C	T
Больные БА	Русские	84	40 (47.62)	36 (42.86)	8 (9.52)	116 (69.05)	52 (30.95)
	Татары	107	54 (50.47)	44 (41.12)	9 (8.41)	152 (71.03)	62 (28.97)
	Башкиры	44	22 (50.0)	18 (40.91)	4 (9.09)	62 (70.45)	26 (29.55)
Контроль	Русские	75	37 (49.33)	33 (44.0)	5 (6.67)	107 (71.33)	43 (28.67)
	Татары	82	34 (41.46)	32 (39.02)	16 (19.51)	100 (60.98)	64 (39.02)
	Башкиры	35	17 (48.57)	17 (48.57)	1 (2.86)	51 (72.86)	19 (27.14)
rs17249437			TT	TC	CC	T	C
Больные БА	Русские	84	48 (57.14)	29 (34.52)	7 (8.33)	125 (74.4)	43 (25.6)
	Татары	107	43 (40.19)	53 (49.53)	11 (10.28)	139 (64.95)	75 (35.05)
	Башкиры	44	17 (38.64)	21 (47.73)	6 (13.64)	55 (62.5)	33 (37.5)
Контроль	Русские	74	31 (41.89)	36 (48.65)	7 (9.46)	98 (66.22)	50 (33.78)
	Татары	82	33 (40.24)	35 (42.68)	14 (17.07)	101 (61.59)	63 (38.41)
	Башкиры	36	13 (36.11)	18 (50.0)	5 (13.89)	44 (61.11)	28 (38.89)
rs3742879			AA	AG	GG	A	G
Больные БА	Русские	84	37 (44.05)	31 (36.9)	16 (19.05)	105 (62.5)	63 (37.5)
	Татары	106	57 (53.77)	41 (38.68)	8 (7.55)	155 (73.11)	57 (26.89)
	Башкиры	44	23 (52.27)	19 (43.18)	2 (4.55)	65 (73.86)	23 (26.14)
Контроль	Русские	75	36 (48.0)	32 (42.67)	7 (9.33)	104 (69.33)	46 (30.67)
	Татары	82	42 (51.22)	37 (45.12)	3 (3.66)	121 (73.78)	43 (26.22)
	Башкиры	36	17 (47.22)	17 (47.22)	2 (5.56)	51 (70.83)	21 (29.17)
rs7140310			AA	AC	CC	A	C
Больные БА	Русские	82	63 (76.83)	19 (23.17)	–	145 (88.41)	19 (11.59)
	Татары	107	72 (67.29)	34 (31.87)	1 (0.93)	178 (83.18)	36 (16.82)
	Башкиры	44	21 (47.73)	22 (50.0)	1 (2.27)	64 (72.73)	24 (27.27)
Контроль	Русские	75	53 (70.67)	22 (29.33)	–	128 (85.33)	22 (14.67)
	Татары	83	56 (67.47)	22 (26.51)	5 (6.02)	134 (80.72)	32 (19.68)
	Башкиры	36	24 (66.67)	11 (30.56)	1 (2.78)	59 (81.94)	13 (18.06)

Примечание. N – число индивидов; n – численность группы, в скобках дана частота аллелей и генотипов; p – уровень значимости, указан только при наличии статистической значимости (при $p < 0.05$); OR – показатель отношения шансов, в скобках – 95 % доверительный интервал.

Проведен анализ ассоциаций изученных полиморфных вариантов с риском развития и клинико-функциональными особенностями БА (степень контроля БА, возраст начала БА, уровень сывороточного IgE, показатели спиррографии).

Ген, кодирующий аргиназу 1 (*ARG1*), локализован на хромосоме 6 в области 6q23.2 и состоит из 8 экзонов (Vonk et al., 2010). Частота аллеля rs2781667*T в контрольной группе русских составила 28.67 %, татар – 39.02 %, башкир – 27.14 %. Установлена ассоциация аллеля rs2781667*C с риском развития БА у индивидов татарской этнической принадлежности ($p = 0.04$; OR = 1.57, CI 95 % 1.02–2.41). Генотип rs2781667*TT и аллель rs2781667*T полиморфного варианта гена *ARG1* являются маркерами пониженного риска развития БА у татар ($p = 0.03$; OR = 0.38, CI 95 % 0.16–0.91 и $p = 0.04$; OR = 0.64, CI 95 % 0.41–0.98 соответственно).

Вклад аллельных вариантов изучаемых генов-кандидатов в вариабельность количественных признаков (уровень IgE, возраст начала заболевания) определяли с помощью критерия Краскела–Уоллиса (в случае трех групп) или Манна–Уитни (в случае двух групп). Анализ вариабельности уровня IgE у пациентов с различными генотипами полиморфного локуса rs2781667 гена *ARG1* в группе русских с БА выявил более высокие показатели IgE у носителей генотипа rs2781667*CC по сравнению с носителями генотипов rs2781667*CT и rs2781667*TT. Выявлено статистически значимое повышение уровня IgE у носителей генотипа rs2781667*CC по сравнению с носителями генотипа rs2781667*CT ($p = 0.003$).

Генотип	IgE, МЕ/мл
rs2781667*CC	520.70 ± 72.47
rs2781667*CT	331.7 ± 66.28
rs2781667*TT	471.5 ± 108.3
Тест Краскела–Уоллиса	$H = 8.49, p = 0.01$
U-тест Манна–Уитни	
rs2781667*CC/rs2781667*CT	$U = 354.0, p = 0.003$
rs2781667*CC/rs2781667*TT	$U = 136.0, p = 0.91$
rs2781667*CT/rs2781667*TT	$U = 93.0, p = 0.18$

Ген *ARG2* расположен в хромосомной области 14q24.1, состоит из 8 экзонов (Vonk et al., 2010). Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs17249437 гена *ARG2* показал, что менее распространенным в контрольных группах русских, татар и башкир является аллель rs17249437*C (33.78, 38.41 и 38.89 % соответственно) (см. табл. 2). При сравнении групп больных со здоровыми индивидами статистически значимых ассоциаций полиморфного варианта rs17249437 гена *ARG2* с риском развития БА не обнаружено ($p > 0.05$). Отличия в распределении частот генотипов rs17249437 выявлены при разделении пациентов с учетом отклонений от нормы параметров спиррографии в сравнении с группой контроля. Частота гомозиготного генотипа rs17249437*TT (67.74 и 67.74 %) у русских со значительными снижениями параметров ОФВ1 и МОС25 была статистически значимо выше, чем в контрольной группе индивидов (41.89 %; $p = 0.02$; OR = 2.91, CI 95 % 1.2–7.05 и $p = 0.02$; OR = 2.91, CI 95 % 1.2–7.05 соответственно). Частота гетерозиготного генотипа rs17249437*TC у пациентов рус-

ской этнической принадлежности со значительно сниженными показателями ОФВ1 и МОС25 была ниже (19.35 и 22.58 %), чем в контрольной группе (48.65 %; $p = 0.005$; OR = 0.25, CI 95 % 0.09–0.69 и $p = 0.01$; OR = 0.31, CI 95 % 0.12–0.8 соответственно).

У русских пациентов с БА с частично контролируемым и неконтролируемым течением заболевания, которым чаще трех раз в неделю требовались бета-2-агонисты для купирования симптомов заболевания, выявлена более высокая частота встречаемости аллеля rs17249437*T (87.93 %) и генотипа rs17249437*TT (82.76 %) по сравнению с пациентами с контролируемым течением заболевания: 67.27 % для аллеля rs17249437*T ($p = 0.004$; OR = 3.54, CI 95 % 1.46–8.59) и 43.64 % для генотипа rs17249437*TT ($p = 0.0006$; OR = 6.20, CI 95 % 2.06–18.64). Аналогичная ассоциация обнаружена и у больных БА татарской этнической принадлежности. В группе пациентов с частично контролируемым и неконтролируемым течением заболевания выявлялись чаще аллель rs17249437*T (77.59 %) и генотип rs17249437*TT (58.62 %), по сравнению с больными БА с контролируемым течением заболевания – 60.26 % для аллеля rs17249437*T ($p = 0.02$; OR = 2.28, CI 95 % 1.14–4.58) и 33.33 % для генотипа rs17249437*TT ($p = 0.02$; OR = 2.83, CI 95 % 1.18–6.80).

Согласно результатам исследования полиморфного варианта rs3742879 гена *ARG2* у больных БА и индивидов контрольной группы из РБ, менее распространенным во всех этнических группах является аллель rs3742879*G, выявленный в контрольной группе русских с частотой 30.67 %, татар – 26.22 %, башкир – 29.17 % (см. табл. 2). Анализ ассоциаций полиморфного варианта rs3742879 гена *ARG2* с развитием БА у индивидов различной этнической принадлежности не выявил статистически значимых различий между группами больных и контроля ($p > 0.05$). При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs3742879 в группах пациентов с различными показателями спиррографии установлено, что у русских, больных БА, со значительным снижением ОФВ1 генотип rs3742879*GG встречался значительно чаще (25.81 %), чем в контрольной группе (9.33 %; $p = 0.03$; OR = 3.38, CI 95 % 1.1–10.35).

При исследовании полиморфного варианта rs7140310 гена *ARG2* не найдено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов между больными БА и контролем различной этнической принадлежности ($p > 0.05$). Наименее распространенным во всех этнических группах является аллель rs7140310*C, обнаруженный в контрольной группе русских с частотой 14.67 %, у татар – 19.28 %, у башкир – 18.06 % (см. табл. 2).

В результате исследования полиморфных вариантов rs17249437, rs3742879, rs7140310 гена *ARG2* в выборках различной этнической принадлежности выявлено значительное неравновесие по сцеплению между полиморфными локусами rs17249437 и rs3742879 ($D' = 0.76$ у русских, $D' = 0.85$ у татар, $D' = 0.9$ у башкир) во всех изученных группах. При проведении гаплотипического анализа данных полиморфных вариантов гена *ARG2* не обнаружено статистически значимых различий частот гаплотипов между больными БА и контрольной группой ($p > 0.05$).

Обсуждение

Недостаточный контроль над воспалением дыхательных путей при БА приводит к прогрессированию заболевания, способствует возрастанию числа тяжелых форм, случаев смертности и инвалидизации больных. В настоящее время разработаны и доступны высокоэффективные лекарственные препараты, раскрыты многие значимые механизмы патогенеза БА, но проблема недостаточного контроля БА остается одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Многочисленные работы свидетельствуют о межэтнических различиях генетических маркеров риска развития БА и чувствительности к препаратам у разных индивидов (Martinez et al., 1997; Litonjua et al., 2008; Poon et al., 2008; Vonk et al., 2010; Kim et al., 2011; Батожаргалова и др., 2017; Scaparrotta et al., 2019). Ранее нами было проведено исследование гена *ADRB2*, в результате которого обнаружена ассоциация аллеля rs1042713**A* с умеренным снижением ОФВ1 у пациентов с БА, проживающих на территории РБ (Федорова и др., 2013). В данной работе проанализированы ассоциации полиморфных вариантов генов аргиназ *ARG1* (rs2781667) и *ARG2* (rs17249437, rs3742879, rs7140310) с развитием и течением БА, а также с чувствительностью к терапии у пациентов с БА.

Аргиназа представляет собой фермент, катализирующий гидролиз L-аргинина с образованием орнитина и мочевины (Dimitriadis et al., 2014). Два изофермента аргиназы I и II типа кодируются генами *ARG1* и *ARG2* (Vonk et al., 2010). Аллергическое воспаление вызывает снижение общего количества NO и увеличение продукции проконтрактильного и провоспалительного пероксинитрита (ONOO⁻), в частности iNOS, что приводит к обструкции, воспалению и увеличению гиперреактивности дыхательных путей. Кроме того, при аллергической астме под влиянием Th2-цитокинов (IL-4, IL-13) и TGF-β увеличивается экспрессия аргиназы, что повышает продукцию L-орнитина, полиаминов и L-пролина, участвующих в ремоделировании дыхательных путей, вызывая клеточную пролиферацию, повышенную выработку коллагена и фиброз клеток (см. рисунок) (Meurs et al., 2019).

В результате данного исследования установлено, что аллель rs2781667**C* гена *ARG1* ассоциирован с риском развития БА у татар. При сравнительном анализе количественных признаков выявлены более высокие показатели IgE у русских с генотипом rs2781667**CC* по сравнению с носителями генотипа rs2781667**CT*. Впервые ассоциация аллельных вариантов гена *ARG1* с эффективностью терапии БА установлена в работе (Litonjua et al., 2008) у детей с БА европейского происхождения, находящихся на терапии бета-2-агонистами. Обнаружена значимая ассоциация аллеля rs2781659**G* гена *ARG1* с более выраженным бронходилатационным ответом, а ген *ARG1* предложен в качестве возможного маркера риска, определяющего эффективность терапии БА (Litonjua et al., 2008). В работе (Vonk et al., 2010) наблюдалось значительное снижение бронходилатационного ответа у пациентов с БА из Нидерландов с генотипом rs2781667**TT* гена *ARG1* в ответ на терапию бета-2-агонистами. В то же время у больных тяжелой БА с генотипом rs2781667**CC* гена *ARG1* было выявлено снижение показателей ОФВ1 на фоне лечения ИГКС (Vonk et al., 2010). Установлена ассоциация аллеля



Метаболизм аргинина и его влияние на формирование аллерген-индуцированной обструкции, воспаления, гиперреактивности и ремоделирования дыхательных путей, а также повышенной чувствительности к аллергенам (Meurs et al., 2019).

rs2781666**T* и гаплотипа *CT* (rs60389358, 2781666) гена *ARG1* с риском развития БА и показан значительно более высокий уровень сывороточной аргиназы у пациентов с БА из Индии (Donthi et al., 2018). Напротив, в некоторых исследованиях не обнаружено значимой ассоциации полиморфных вариантов гена *ARG1* с эффективностью лечения БА (Almomani et al., 2019; Scaparrotta et al., 2019). В совокупности полученные результаты и литературные данные подтверждают, что аллельные варианты гена *ARG1* могут вносить вклад в риск развития БА и эффективность терапии заболевания.

В настоящем исследовании обнаружена ассоциация генотипов rs17249437**TT* и rs3742879**GG* гена *ARG2* со сниженными показателями спирографии (ОФВ1, МС25), аллеля rs17249437**T* и генотипа rs17249437**TT* гена *ARG2* – с частично контролируемым и неконтролируемым течением заболевания у пациентов русской и татарской этнической принадлежности. Полученные нами результаты противоречат данным работы Vonk с коллегами, в которой выявлена ассоциация аллеля rs17249437**T*, генотипа rs7140310**TT* и аллеля rs3742879**G* с более высокими значениями ОФВ1, а генотипа rs3742879**AA* – с увеличением гиперреактивности бронхов у взрослых пациентов с БА, проживающих в Нидерландах (Vonk et al., 2010). Кроме того, наши данные частично не согласуются с данными исследования Б.Ц. Батожаргаловой с соавторами (2017), по итогам которого показана ассоциация комбинации генотипов NOS2A*(*CC*TTTT) nS/L и rs3742879**AA* гена *ARG2* с повышенным риском развития БА у девочек из России. В то же время М. Salam с коллегами при изучении полиморфных вариантов гена *ARG2* обнаружили ассоциацию аллеля rs3742879**G* в составе гаплотипа TAGTCATGGC (rs12885261, rs7144243, rs3759757, rs4902501, rs7156352, rs4902503, rs7140310, rs742869, rs3742879, rs10483801) со значительно более высоким риском возникновения заболевания у больных БА европейского происхождения (Salam et al., 2009). Это может свидетельствовать о значимой роли аллельных ва-

риантов гена *ARG2* в развитии БА именно в структуре гаплотипа. Исследуя полиморфные варианты гена *ARG2* в выборках различной этнической принадлежности, мы выявили значительное неравновесие по сцеплению между полиморфными локусами rs17249437 и rs3742879 во всех изученных группах. При проведении гаплотипического анализа данных полиморфных вариантов гена *ARG2* значимых ассоциаций не обнаружено, что, возможно, связано с малочисленностью сравниваемых групп.

Заключение

Таким образом, выполнено исследование полиморфных вариантов генов аргиназ *ARG1* и *ARG2*, участвующих в метаболизме бета-2-агонистов, у больных БА и в соответствующей контрольной группе из Республики Башкортостан. Установлено, что аллель rs2781667*С гена *ARG1* является маркером повышенного риска развития БА у татар. Выявлены более высокие показатели общего IgE у пациентов русской этнической принадлежности с генотипом rs2781667*СС. Обнаружено, что генотипы rs17249437*ТТ и rs3742879*GG гена *ARG2* ассоциированы со снижением показателей функции внешнего дыхания (ОФВ1, МОС25) у больных БА русской этнической принадлежности. У пациентов с БА русской и татарской этнической принадлежности установлена ассоциация аллеля rs17249437*Т и генотипа rs17249437*ТТ с частично контролируемым и неконтролируемым течением заболевания. Полученные результаты вносят определенный вклад в понимание патогенеза и молекулярных основ чувствительности к терапии БА.

Список литературы / References

Батожагаралова Б.Ц., Мизерницкий Ю.Л., Дьякова С.Э., Петрова Н.В., Зинченко Р.А. Роль полиморфных вариантов генов NO-синтазы и аргиназы при бронхиальной астме у детей. *Медицинская генетика*. 2017;16(2):40-48.
[Batozhargalova B.T., Mizernitskiy Y.L., Diakova S.E., Petrova N.V., Zinchenko R.A. Role of polymorphic variants of NO synthase and arginase genes in child bronchial asthma. *Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics*. 2017;16(2):40-48. (in Russian)]
Клемент Р.Ф., Зильбер Н.А. Функционально-диагностические исследования в пульмонологии: методические рекомендации. СПб., 1993.
[Klement R.F., Zilber N.A. Functional Diagnostic Tests in Pulmonology: Guidelines. St. Petersburg, 1993. (in Russian)]
Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 4-е изд. М.: Оригинал-макет, 2012.
[National Program "Bronchial Asthma in Children. Treatment Strategy and Prevention". 4th edn. Moscow: Original-Maket Publ., 2012. (in Russian)]
Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е изд. М.: Оригинал-макет, 2017.
[National Program "Bronchial Asthma in Children. Treatment Strategy and Prevention". 5th edn. Moscow: Original-Maket Publ., 2017. (in Russian)]
Федорова Ю.Ю., Карунас А.С., Мурзина Р.Р., Мухтарова Л.А., Рамазанова Н.Н., Гималова Г.Ф., Гатиятуллин Р.Ф., Загидуллин Ш.З., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Исследование ассоциации полиморфных вариантов гена β 2-адренергического рецептора с бронхиальной астмой у русских. *Практ. медицина*. 2013;5(74):116-120.
[Fedorova Yu.Yu., Karunas A.S., Murzina R.R., Mukhtarova L.A., Ramazanova N.N., Gimalova G.F., Gatiyatullin R.F., Zagidullin Sh.Z., Etkina E.I., Khusnutdinova E.K. Association study of the

β 2-adrenergic receptor gene polymorphisms with bronchial asthma in Russians. *Prakticheskaya Meditsina = Practical Medicine*. 2013; 5(74):116-120. (in Russian)]
Almomani B.A., Al-Eitan L.N., Al-Sawalha N.A., Samrah S.M., Al-Quasmi M.N. Association of genetic variants with level of asthma control in the Arab population. *J. Asthma Allergy*. 2019;12:35-42. DOI 10.2147/JAA.S186252.
Bateman E.D., Kormmann O., Schmidt P., Pivovarova A., Engel M., Fabbri L.M. Tiotropium is noninferior to salmeterol in maintaining improved lung function in B16-Arg/Arg patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;128(2):315-322. DOI 10.1016/j.jaci.2011.06.004.
Cloots R.H.E., Poynter M.E., Terwindt E., Lamers W.H., Köhler S.E. Hypoargininemia exacerbates airway hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *Respir. Res.* 2018;19:98. DOI 10.1186/s12931-018-0809-9.
Dimitriades V., Rodriguez P.C., Zabaleta J., Ochoa A.C. Arginase I levels are decreased in the plasma of pediatric patients with atopic dermatitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(3):271-275. DOI 10.1016/j.anai.2014.06.010.
Donthi S., Neela V.S.K., Gaddam S., Mohammed H.H., Ansari S.S., Valluri V.L., Sivasai K.S.R. Association of increased risk of asthma with elevated arginase & interleukin-13 levels in serum & rs2781666 G/T genotype of arginase I. *Indian J. Med. Res.* 2018;148(2):159-168. DOI 10.4103/ijmr.IJMR_379_16.
Drake K.A., Torgerson D.G., Gignoux C.R., Galanter J.M., Roth L.A., Huntsman S., Eng C., Oh S.S., Yee S.W., Lin L., Bustamante C.D., Moreno-Estrada A., Sandoval K., Davis A., Borrell L.N., Farber H.J., Kumar R., Avila P.C., Brigino-Buenaventura E., Chapel R., Ford J.G., Lenoir M.A., Lurmann F., Meade K., Serebrisky D., Thyne S., Rodríguez-Cintrón W., Sen S., Rodríguez-Santana J.R., Hernandez R.D., Giacomini K.M., Burchard E.G. A genome-wide association study of bronchodilator response in Latinos implicates rare variants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;133(2):370-378. DOI 10.1016/j.jaci.2013.06.043.
Duan Q.L., Du R., Lasky-Su J., Klanderman B.J., Partch A.B., Peters S.P., Irvin C.G., Hanrahan J.P., Lima J.J., Blake K.V., Liggett S.B., Litonjua A.A., Tantisira K.G. A polymorphism in the thyroid hormone receptor gene is associated with bronchodilator response in asthmatics. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(2):130-136. DOI 10.1038/tpj.2011.56.
Duan Q.L., Gaume B.R., Hawkins G.A., Himes B.E., Bleecker E.R., Klanderman B., Irvin C.G., Peters S.P., Meyers D.A., Hanrahan J.P., Lima J.J., Litonjua A.A., Tantisira K.G., Liggett S.B. Regulatory haplotypes in *ARG1* are associated with altered bronchodilator response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;183(4):449-454. DOI 10.1164/rccm.201005-0758OC.
Farzan N., Vijverberg S.J., Arets H.G., Raaijmakers J.A., Maitland-van der Zee A.H. Pharmacogenomics of inhaled corticosteroids and leukotriene modifiers: a systematic review. *Clin. Exp. Allergy*. 2017; 47(2):271-293. DOI 10.1111/cea.12844.
Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2018. Vancouver, USA GINA, 2018.
Kim S.H., Ye Y.M., Lee H.Y., Sin H.J., Park H.S. Combined pharmacogenetic effect of *ADCY9* and *ADRB2* gene polymorphisms on the bronchodilator response to inhaled combination therapy. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2011;36(3):399-405. DOI 10.1111/j.1365-2710.2010.01196.x.
Li H., Romieu I., Sienna-Monge J., Ramirez-Aguilar M., Estela del Rio-Navarro B., Kistner E.O., Gjessing H.K., Lara-Sanchez I. del C., Chiu G.Y., London S.J. Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(1):119-126. DOI 10.1016/j.jaci.2005.09.026.
Litonjua A.A., Lasky-Su J., Schneiter K., Tantisira K.G., Lazarus R. *ARG1* is a novel bronchodilator response gene: screening and replication in four asthma cohorts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 178(7):688-694. DOI 10.1164/rccm.200709-1363OC.
Martinez F.D., Graves P.E., Baldini M., Solomon S., Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the beta-2 adrenoceptor

- and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J. Clin. Invest.* 1997;100(12):3184-3188. DOI 10.1172/JCI119874.
- Mathew C.G.P. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. In: Walker J.M. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. *Nucleic Acids*. Humana Press, Clifton, New Jersey, 1984;31-34.
- Meurs H., Zaagsma J., Maarsingh H., Duin M. Recent patents in allergy/immunology: use of arginase inhibitors in the treatment of asthma and allergic rhinitis. *Allergy*. 2019;74(6):1206-1208. DOI 10.1111/all.13770.
- Poon A.H., Tantisira K.G., Litonjua A.A., Lazarus R., Xu J., Lasky-Su J., Lima J.J., Irvin C.G., Hanrahan J.P., Lange C., Weiss S.T. Association of corticotropin-releasing hormone receptor-2 genetic variants with acute bronchodilator response in asthma. *Pharmacogenet. Genomics*. 2008;18(5):373-382. DOI 10.1097/FPC.0b013e3282fa760a.
- Said A.M.A., Naqshbandi A.A.A., Amin Y.K., Ali R.J. Association of the arginase I with bronchial asthma. *J. Univ. Babylon Pure Appl. Sci.* 2019;27(2):238-243. DOI 10.29196/jubpas.v27i2.2092.
- Salam M.T., Islam T., Gauderman W.J., Gilliland F.D. Roles of arginase variants, atopy, and ozone in childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;123:596-602. DOI 10.1016/j.jaci.2008.12.020.
- Scaparrotta A., Franzago M., Loredana Marcovecchio M., Pillo S.D., Chiarelli F., Mohn A., Stuppia L. Role of *THRB*, *ARG1*, and *ADRB2* genetic variants on bronchodilators response in asthmatic children. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.* 2019;32:1-10. DOI 10.1089/jamp.2018.1493.
- Vonk J.M., Postma D.S., Maarsingh H., Bruinenberg M., Koppelman G.H., Meurs H. Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and β_2 agonist and steroid response. *Pharmacogenet. Genomics*. 2010;20(3):179-186. DOI 10.1097/FPC.0b013e328336c7fd.

ORCID ID

O.N. Savelieva orcid.org/0000-0002-9690-1481
A.S. Karunas orcid.org/0000-0002-2570-0789
Yu.Yu. Fedorova orcid.org/0000-0002-9344-828X
E.I. Etkina orcid.org/0000-0003-1371-7927
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проектов № 17-04-02195 и 19-31-590055, государственного задания Минобрнауки РФ (№ АААА-А16-116020350032-1). Использованы образцы ДНК из «Коллекции биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.11.2019. После доработки 18.03.2020. Принята к публикации 29.04.2020.

Полиморфизм и экспрессия генов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию

Е.А. Блинова^{1, 2}✉, В.С. Никифоров¹, М.А. Янишевская^{1, 2}, А.А. Аклеев^{1, 3}

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

³ Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

✉ e-mail: blinova@urcrm.ru

Аннотация. Известно, что ионизирующее излучение влияет на экспрессию генов, выполняющих ключевую роль в механизмах поддержания стабильности клеточного гомеостаза. Как правило, изменение в транскриптоме облученной клетки происходит в первые часы и сутки после радиационного воздействия, что обуславливает ее ранний ответ при повреждении генома. В отдаленном периоде также возможны модуляции в транскрипционной активности генов, приводящие к развитию канцерогенных эффектов облучения. Однако для установления роли экзогенных факторов (ионизирующего излучения) в модификации экспрессии генов клеточного гомеостаза необходимо учитывать и роль эндогенных факторов, способных модифицировать транскрипционную активность генов, что особенно актуально в отдаленном периоде после начала радиационного воздействия. К таким факторам могут относиться полиморфные варианты генов, расположенные в регуляторных областях. Цель настоящего исследования – анализ влияния ионизирующего излучения в отдаленном периоде на содержание мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *NFkB1*, *PADI4*, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток человека, а также оценка связи аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 на количество мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1*. Исследование проведено у лиц, подвергшихся аварийному хроническому радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов в реку Течу. Установлено, что спустя 60 лет после начала радиационного воздействия у лиц, имеющих кумулятивные дозы облучения ККМ в диапазоне от 78 до 3510 мГр, регистрируются изменения в транскрипционной активности генов *NFkB1* и *PADI4*. Не выявлено влияния аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 на количество мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* у облученных лиц. Ключевые слова: облученные лица; мРНК; однонуклеотидный полиморфизм; ПЦР в реальном времени; модификация экспрессии генов.

Для цитирования: Блинова Е.А., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Аклеев А.А. Полиморфизм и экспрессия генов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632

Single nucleotide polymorphisms and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals

Е.А. Blinova^{1, 2}✉, V.S. Nikiforov¹, M.A. Yanishevskaya^{1, 2}, A.A. Akleyev^{1, 3}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

³ South-Urals State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

✉ e-mail: blinova@urcrm.ru

Abstract. It is known that ionizing radiation influences the expression of the genes that play a key role in the mechanisms of maintaining the stability of cellular homeostasis. As a rule, changes in the transcriptome of an exposed cell occur within the first 24 hours following radiation exposure. And it predetermines early response in the case of genome damage. Later on modulations in gene transcription activity are also possible and could result in a carcinogenic effect. However, in order to find the role of exogenous factors (ionizing radiation), it is also necessary to take into account the contribution of endogenous factors that are able to modify gene transcription activity. This is especially important for long after the onset of radiation exposure. Single nucleotide polymorphisms located in regulatory regions of the genes may belong to this group of factors. The objective of the current study was to analyze the influence of ionizing radiation on the transcription activity of the *STAT3*, *GATA3*, *NFkB1*, *PADI4* genes, which regulate proliferation and differentiation of immune competent human cells; and to assess the potential influence of single nucleotide polymorphisms located in regulatory regions of the genes on the amount of mRNA. The study involved

people who had been chronically exposed due to releases of radioactive waste into the Techa River. It was observed that 60 years after the onset of radiation exposure changes in the transcription activity of the *NFkB1* and *PADI4* genes were registered in people with cumulative doses to RBM within the range 78–3510 mGy. In people who had been chronically exposed, the effect of allelic variations in rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 on the level of mRNAs of the *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* genes has not been established.

Key words: exposed persons; mRNA; single-nucleotide polymorphism; real-time PCR; modification of gene expression.

For citation: Blinova E.A., Nikiforov V.S., Yanishevskaya M.A., Akleyev A.A. Single nucleotide polymorphisms and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632

Введение

Ионизирующее излучение вызывает изменения транскрипционной активности генов, выполняющих ключевую роль в механизмах поддержания стабильности клеточного гомеостаза. Однако профиль экспрессии генов существенно отличается при облучении в диапазоне малых и больших доз (Ding et al., 2005). Показано, что при облучении в диапазоне малых и средних доз повышается экспрессия не только генов, вовлеченных в ответ на повреждение ДНК, но и генов, отвечающих за апоптоз (Azimian et al., 2015), элементы цитоскелета и перемещение секреторных везикул (Woloschak et al., 1990), пролиферацию и дифференцировку клеток (Amundson et al., 2003), а также активацию лимфоцитов, экспрессию цитокинов и хемокинов (Wyrobek et al., 2011). Хорошо известно, что изменение в транскриптом облученной клетки происходит в первые часы и сутки после радиационного воздействия, что обуславливает ранний ответ при повреждении генома.

В отдаленном периоде также регистрируется aberrантная экспрессия ряда генов. В исследованиях (Fachin et al., 2009; Iliencko, Vazyuka, 2016) показаны изменения транскрипционной активности генов, продукты которых регулируют внутриклеточный транспорт, репарацию ДНК, иммунный ответ клетки спустя 10–20 лет после начала радиационного воздействия. Ранее нами было установлено, что в отдаленные сроки (более 60 лет) у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в диапазоне средних и высоких доз (0.1–4.5 Гр), наблюдается снижение содержания мРНК антиапоптозного гена *BCL2* по сравнению с необлученными людьми (Никифоров и др., 2019).

Изменение экспрессии генов, кодирующих различные ферменты, а также регуляторные белки, может приводить на молекулярном уровне к изменению количества активных форм кислорода, нарушению баланса между про- и противовоспалительными цитокинами и хемокинами (Barnes, Karin, 1997). Однако следует учитывать, что помимо экзогенных факторов окружающей среды, в том числе ионизирующего излучения, на уровень транскрипционной активности генов могут влиять эндогенные (генетические) факторы. В связи с этим для установления роли ионизирующего излучения в изменении транскрипционной активности генов в отдаленном периоде необходимо учитывать вклад генетической компоненты.

В последние десятилетия однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) активно исследуется в качестве маркера, ассоциированного с различными заболеваниями (Visscher et al., 2012; Tan, 2017). Механизм, благодаря которому полиморфизм оказывает влияние на фенотип, определяется, в первую очередь, функциональной ролью последователь-

ности ДНК, в которой он расположен. Однонуклеотидный полиморфизм может влиять как на структуру и активность продукта гена, так и на его количество.

Из всех ОНП, расположенных в кодирующих последовательностях (экзонах) гена, порядка 58 % являются несинонимичными и могут влиять на ферментативную активность белка, его стабильность, средство лиганда к определенному белку; приводить к изменениям процесса фолдинга белка и, как следствие, к нарушениям формирования его четвертичной структуры (Bhattacharya et al., 2017). Остальные ОНП – синонимичные и могут модифицировать уровень экспрессии белка посредством влияния на вторичную структуру зрелой мРНК (Robert, Pelletier, 2018), способствовать нарушению микроРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов (Brest et al., 2011). Помимо изменения уровня экспрессии, синонимичные ОНП могут воздействовать на стабильность и сплайсинг мРНК (Wang et al., 2015).

Фенотипическое проявление ОНП, расположенных в интронах, обусловлено по большей части модификациями, находящимися в различных регуляторных элементах (Shastry, 2009). Известно несколько возможных механизмов воздействия расположенных в интронах ОНП на фенотип. К ним относят изменения в регуляторных цис-элементах – модулях энхансеров и сайленсеров, приводящих к изменению средства транс-факторов к этим элементам и к соответствующей вариации уровня экспрессии (Campbell et al., 2016); влияние на дифференциальную экспрессию материнских и отцовских аллелей из-за вариаций в метилировании ДНК и ацетилировании гистонов, а также иные возможные механизмы воздействия интронных ОНП на уровень экспрессии генов, например за счет образования дополнительных хроматиновых петель (Wright et al., 2010).

Целью настоящего исследования были анализ воздействия ионизирующего излучения в отдаленном периоде на уровень мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *NFkB1*, *PADI4*, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток человека, а также оценка связи аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 с количеством мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1*.

Материалы и методы

Исследование проводили у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в результате сбросов Производственного объединения «Маяк» жидких радиоактивных отходов в р. Течу в 1949–1956 гг. Население прибрежных сел подверглось сочетанному внешнему и внутреннему облучению. Источниками внешнего γ -об-

Таблица 1. Характеристика обследованных лиц

Признак	Группа сравнения <i>n</i> = 146	Облученные <i>in utero</i> <i>n</i> = 48	Облученные в постнатальном периоде <i>n</i> = 115
Этническая группа, % (<i>n</i>)	Славяне	66.4 (97)	52.2 (60)
	Тюрки	33.6 (49)	47.8 (55)
Пол, % (<i>n</i>)	Мужчины	30.8 (45)	37.4 (43)
	Женщины	69.2 (101)	62.6 (72)
Средний возраст, лет, <i>M</i> ± <i>SE</i>	62.4 ± 0.5 (57–81) ¹	65.1 ± 0.3 (60–68)	73.2 ± 0.8 (65–86)
Кумулятивная доза облучения ККМ, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>	16 ± 1 (0–68) ²	506 ± 58 (78–1721)	799 ± 63 (80–3510)
Кумулятивная внутриутробная доза облучения ККМ, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>	0	85 ± 12 (0–358)	0

Примечание. ККМ – красный костный мозг; *M* – средняя; *SE* – ошибка средней; *n* – количество человек; ¹ – возрастной диапазон; ² – диапазон индивидуальных значений доз.

лучения были донные отложения и пойменные почвы, загрязненные радионуклидами. Внутреннее облучение определялось радионуклидами, поступившими в организм с речной водой и продуктами питания местного производства. Основным дозообразующим радионуклидом являлся ⁹⁰Sr, который, будучи β-излучателем, избирательно накапливался в костной ткани и длительное время воздействовал на красный костный мозг (ККМ) (Последствия радиоактивного загрязнения..., 2016). Ранее в когорте облученных жителей прибрежных сел р. Течи были установлены повышенные риски развития лейкозов (Schüz et al., 2017) и злокачественных опухолей (Крестинина и др., 2017).

В исследовании приняло участие 309 человек, имеющих реконструированную дозу облучения ККМ по дозиметрической системе TRDS (Techa River Dosimetry System, версия 2016) (Degteva et al., 2019). В основную группу облученных лиц вошло 163 человека с индивидуальными накопленными дозами облучения ККМ, находящимися в диапазоне 78–3510 мГр. Среди этих лиц 48 человек подверглись хроническому радиационному воздействию в период внутриутробного и постнатального развития (далее *in utero*). Средняя доза внутриутробного облучения ККМ у этих лиц была 85 ± 12 мГр, средняя доза постнатального облучения ККМ равнялась 506 ± 58 мГр. Остальные 115 человек из основной группы родились до начала радиоактивного загрязнения р. Течи и подверглись только постнатальному облучению (средняя постнатальная доза облучения ККМ составила 799 ± 63 мГр). В группу сравнения вошло 146 человек, проживающих в сходных социально-экономических и хозяйственно-бытовых условиях (сельское население), но с интенсивностью облучения ККМ, не превышавшей 1 мГр/год, и накопленной дозой менее 70 мГр за весь период своей жизни, в соответствии с п. 3.1.4. НРБ-99/2009 (Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09). Обследуемые группы включали лиц обоего пола, принадлежавших к двум этническим группам: тюркам (татары и башкиры) и славянам (русские) (табл. 1).

На транскрипционную активность генов у обследованных лиц могут влиять различные факторы, в связи с этим из исследования были исключены лица, имеющие аутоиммунные, онкологические, хронические воспалительные

заболевания в фазе обострения; принимающие цитостатические препараты и антибиотики и проходившие диагностическое облучение в течение шести предшествующих месяцев до момента взятия образца крови, а также вступавшие в контакты с генотоксическими (химическими) агентами в процессе профессиональной деятельности. Перед процедурой забора крови все обследованные лица проходили плановый осмотр в клиническом отделении Уральского научно-практического центра радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России (УНПЦ РМ ФМБА России) в период 2016–2019 гг. в рамках оказания медицинской помощи облученному населению. Согласно действующим международным нормам, все обследованные лица дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Настоящая работа проводилась с разрешения этического комитета УНПЦ РМ ФМБА России.

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-ВР) оценивали транскрипционную активность генов *STAT3*, *GATA3*, *NFκB1* и *PADI4*. Образцы венозной крови от пациентов в период 2016–2019 гг. собирали в вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Applied Biosystem, США). Выделение нативной РНК осуществлялось либо сразу после стабилизации, либо после хранения образцов при –80 °С.

Экстракцию РНК выполняли с использованием коммерческого набора GeneJET Whole Blood RNA Purification Kit (Thermo Scientific™, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Информацию о концентрации и чистоте выделенных образцов РНК получали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Соотношение оптических плотностей, измеренных при A260/280 для очищенной РНК, выделенной из всех образцов крови, составило 2.1 ± 0.02.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли с использованием готового набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, США), содержащего рекомбинантную обратную транскриптазу M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), случайные гекса- и нанонуклеотидные праймеры, смесь dNTP и буфер ОТ. Согласно протоколу производителя, для синтеза кДНК использовали 10 мкл тотальной РНК.

Таблица 2. Характеристика праймеров и зондов для определения содержания мРНК

Ген	Праймеры и зонды (длина, п. н.)	Tm	GC, %	Размер ампликона, п. н.	Ссылки на мишени (транскрипты) из ресурса NCBI
STAT3	F: Экзон-экзонный переход – ex13-ex14 (20)	51.71	55.00	70	NM_003150.3
	R: Экзон-экзонный переход – ex14-ex15 (20)	51.96	55.00		
	Probe: Экзон – ex14 (20)	52.81	56.01		
GATA3	F: Экзон-экзонный переход – ex3-ex4 (18)	47.4	61.1	86	NM_001002295.1
	R: Экзон-экзонный переход – ex4-ex5 (18)	47.4	61.1		
	Probe: Экзон – ex4 (20)	50.5	60.00		
PADI4	F: Экзон-экзонный переход – ex5-ex6 (20)	52.90	55.00	107	NM_012387.2
	R: Экзон-экзонный переход – ex6-ex7 (20)	51.7	55.00		
	Probe: Экзон – ex6 (20)	52.35	55.00		
NFKB1	F: Экзон-экзонный переход – ex22-ex23 (21)	51.60	42.90	66	NM_001165412.1
	R: Экзон-экзонный переход – ex23-ex24 (21)	51.50	42.90		
	Probe: Экзон – ex22 (23)	52.00	44.10		
B2M	F: Экзон-экзонный переход – ex1-ex2 (22)	53.7	59.00	64	NM_004048.2
	R: Экзон-экзонный переход – ex2-ex3 (23)	53.4	45.5		
	Probe: Экзон – ex2 (23)	53.9	46.00		

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; Probe – зонд; Tm – температура плавления; GC, % – процент содержания GC-пар.

Таблица 3. Характеристика полиморфных участков генов STAT3, GATA3, NFKB1, PADI4

Ген	Полиморфизм	Алель	Расположение ¹	Позиция ¹
STAT3	rs1053023	T/C	3'UTR	chr17:42313598
GATA3	rs4143094	A/C	Инtron	chr10:8047173
NFKB1	rs28362491	Del/ATTG	Инtron	chr4:102500998-102501005
PADI4	rs874881	G/C	5'UTR	chr1:17334004

¹ По данным полногеномной базы данных 1000Genom, версия GRCh38.p12 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Анализ содержания мРНК выполняли методом количественной ПЦР-ВР с использованием коммерческих наборов TaqMan (Applied Biosystem, США). Характеристика праймеров и зондов, используемых для оценки экспрессии мРНК, приведена в табл. 2.

Для получения статистически значимых результатов каждую реакцию выполняли в трех повторах с использованием отрицательного контроля на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystem, США). Температурный режим: 1 цикл предварительная денатурация 95 °C/10 мин, далее 50 циклов: 95 °C/15 с, 60 °C/1 мин. Данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» B2M в каждом образце.

Отбор ОНП, вошедших в исследование, проводили на основе анализа интернет-баз данных полногеномных исследований (www.harmap.ncbi.nlm.nih.gov) и базы данных однонуклеотидных полиморфизмов (www.snpedia.com). При отборе учитывались расположение ОНП и потенциальная возможность его влияния на транскрипционную активность генов (табл. 3).

Для генотипирования использовали ДНК, выделенную из замороженных при –80 °C образцов крови. Экстракцию ДНК из цельной крови осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК ExtraPhen (АТГ-Биотех, Россия). Количественную и качественную оценку образцов ДНК после экстракции выполняли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Termo Scientific, США).

Генотипирование образцов и детекцию результатов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе Applied Biosystems StepOnePlus (США) с использованием наборов реагентов, включающих праймеры и зонды для генотипирования («ТестГен», Россия). Характеристика праймеров и зондов для генотипирования приведена в табл. 4.

Амплификацию осуществляли согласно инструкции производителя к конкретному набору. В качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакетов программ Statistica 10.0 и WinPepi for Windows версия 11.65, проверку нормальности

Таблица 4. Последовательности праймеров и зондов для проведения генотипирования

Ген, полиморфизм	Праймеры и зонды (длина, п. н.)
<i>STAT3</i> rs1053023	F: 5'-GGTCTTAACTCTGATTGTAG-3' (20)
	R: 5'-CAGCTTATAAACACCTTATAG-3' (22)
	Probe: 5'-FAM-tcttTaaTggGccac-BHQ-1-3' (15)
	Probe: 5'-VIC-tcttTaaCggGccac-BHQ-2-3' (15)
<i>GATA3</i> rs4143094	F: 5'-GCAGAAGATAAACGAGGTG-3' (19)
	F: 5'-GACGCAAACCTGCTTTAAC-3' (18)
	Probe: 5'-FAM-caaccCaaAagAaaaccc-BHQ-1-3' (18)
	Probe: 5'-VIC-caaccCaaCagAaaaccc-BHQ-2-3' (18)
<i>NFkB1</i> rs28362491	F: 5'-TGGACCGCATGACTCTATC-3' (19)
	R: 5'-GCTCTGGCTTCCTAGCAG-3' (18)
	Probe: 5'-FAM-ccccgacCattgGgc-BHQ-1-3' (15)
	Probe: 5'-VIC-ccccgacCattgattgGgc-BHQ-2-3' (18)
<i>PADI4</i> rs874881	F: 5'-GGTGTGTTGTTGAATGACTAA-3' (20)
	R: 5'-CACTGACTAAGGATGGAATA-3' (20)
	Probe: 5'-FAM-tcaccgGggTggg-BHQ-1-3' (13)
	Probe: 5'-VIC-tcaccgCggTggg-BHQ-2-3' (13)

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

распределения количества мРНК – с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Полученное распределение перенных отличалось от нормального, в связи с этим использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Сравнение частот генотипов между этническими группами выполняли с применением статистического критерия χ^2 Пирсона. Уровень статистической значимости при оценке экспрессии генов соответствовал $p = 0.05$ и менее, при оценке связи ОНП с экспрессией генов – $p = 0.01$ и менее.

Результаты

Проведенный анализ мРНК у всех облученных лиц свидетельствовал о снижении содержания мРНК гена *NFkB1* и повышении количества мРНК гена *PADI4* относительно

группы сравнения. Те же закономерности регистрировались в группе лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, и в группе людей, облученных только в период постнатального развития (табл. 5).

Анализ сравнения медианных значений количества мРНК исследуемых генов у представителей различных этнических групп (тюрков и славян) в группе облученных лиц и группе сравнения не выявил статистически значимых различий (табл. 6). Распределение частот полиморфных локусов исследуемых генов у облученных лиц показано в табл. 7.

В этнических группах славян и тюрков распределение генотипов для всех полиморфных участков соответствовало ожидаемому, согласно закону Харди–Вайнберга, за исключением полиморфного участка rs 4143094 гена *GATA3* в группе тюрков. Кроме того, распределения аллелей и генотипов в группах славян и тюрков не различались между собой.

Не установлено ассоциаций аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 с количеством мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* у облученных лиц в группе славян, группе тюрков, а также в объединенной популяции (табл. 8).

Обсуждение

Нами выявлено, что спустя 60 лет после начала радиационного воздействия у лиц, имеющих кумулятивные дозы облучения ККМ в диапазоне от 78 до 3510 мГр, регистрируются изменения в количестве мРНК генов *NFkB1* и *PADI4* по сравнению с контрольной группой (дозы облучения ККМ менее 70 мГр). Модуляция транскрипционной активности генов иммунного надзора ранее регистрировались и в других группах облученных лиц. Так, у людей с кумулятивными дозами облучения 0.1–113.35 мГр от трансуроновых радионуклидов наблюдалась избыточная экспрессия генов иммунного надзора и апоптоза через пять лет после начала облучения (Bazyka et al., 2018). Результаты исследования экспрессии генов у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС также демонстрируют модуляцию активности более 100 генов, включая гены цитокинов и иммунного ответа у лиц с дозами облучения более 400 мГр через 11–12 лет после начала радиационного воздействия (Albanese et al., 2007).

Таблица 5. Количество мРНК (отн. ед.) исследуемых генов в клетках периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию

Ген	Группа сравнения	Все облученные лица	Лица, облученные только в постнатальном периоде	Лица, облученные <i>in utero</i> и в постнатальном периоде
			Медиана 25–75 %	
<i>STAT3</i>	0.95* (0.57–1.43)**	0.90 (0.62–1.46)	0.92 (0.61–1.46)	0.88 (0.71–1.46)
<i>GATA3</i>	0.86 (0.58–1.38)	0.85 (0.61–1.41)	0.89 (0.62–1.49)	0.82 (0.61–1.15)
<i>NFkB1</i>	1.05 (0.57–1.66)	0.69 (0.46–1.31) $p = 0.0005$	0.71 (0.45–1.36) $p = 0.004$	0.69 (0.50–1.07) $p = 0.003$
<i>PADI4</i>	0.71 (0.43–1.12)	0.83 (0.54–1.89) $p = 0.003$	0.78 (0.54–1.81) $p = 0.02$	1.05 (0.58–2.08) $p = 0.006$

Примечание. Здесь и ниже: * – медиана; ** – 25 и 75 % квартили; p – уровень статистической значимости различий показателей между группой облученных лиц и группой сравнения.

Таблица 6. Количество мРНК (отн. ед.) исследуемых генов в зависимости от этнической принадлежности обследованных лиц

Ген	Группа сравнения		Облученные лица	
	Славяне	Тюрки	Славяне	Тюрки
<i>PADI4</i>	0.71 (0.42–1.11)	0.71 (0.49–1.13)	0.83 (0.46–1.72)	0.88 (0.59–2.25)
<i>NFkB1</i>	0.99 (0.57–1.50)	1.17 (0.61–1.85)	0.69 (0.49–1.20)	0.70 (0.44–1.38)
<i>STAT3</i>	0.97 (0.56–1.40)	0.93 (0.63–1.47)	0.84 (0.59–1.34)	0.98 (0.70–1.55)
<i>GATA3</i>	0.89 (0.61–1.37)	0.85 (0.51–1.57)	0.82 (0.57–1.21)	0.88 (0.65–1.47)

Таблица 7. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам в группе облученных лиц

Ген, полиморфизм	Параметр	Этническая группа		<i>p</i> -value	Ген, полиморфизм	Параметр	Этническая группа		<i>p</i> -value
		Славяне	Тюрки				Славяне	Тюрки	
<i>STAT3</i> rs1053023	Частота аллелей, % (N)				<i>NFkB1</i> rs28362491	Частота аллелей, % (N)			
	Аллель Т	81 (151)	87 (120)	<i>p</i> = 0.165		Аллель Del	52 (92)	48 (62)	<i>p</i> = 0.489
	Аллель С	19 (35)	13 (18)			Аллель ATTG	48 (86)	52 (68)	
	Частота генотипа, % (N)					Частота генотипа, % (N)			
	Т/Т	69 (64)	77 (53)	<i>p</i> = 0.426		Del/Del	25 (22)	20 (13)	<i>p</i> = 0.756
	Т/С	25 (23)	20 (14)			Del/ATTG	54 (48)	55 (36)	
С/С	6 (6)	3 (2)	ATTG/ATTG		21 (19)	25 (16)			
<i>rE_{H-W}</i>	0.08	0.31		<i>rE_{H-W}</i>	0.53	0.46			
<i>GATA3</i> rs4143094	Частота аллелей, % (N)				<i>PADI4</i> rs874881	Частота аллелей, % (N)			
	Аллель С	73 (130)	80 (107)	<i>p</i> = 0.164		Аллель G	47 (84)	41 (43)	<i>p</i> = 0.052
	Аллель А	27 (48)	20 (27)			Аллель С	53 (94)	59 (77)	
	Частота генотипа, % (N)					Частота генотипа, % (N)			
	С/С	53 (47)	69 (46)	<i>p</i> = 0.059		G/G	21 (19)	15 (10)	<i>p</i> = 0.519
	С/А	40 (36)	22 (15)			G/C	52 (46)	51 (33)	
А/А	7 (6)	9 (6)	С/С		27 (24)	34 (22)			
<i>rE_{H-W}</i>	1.00	0.02		<i>rE_{H-W}</i>	0.83	0.80			

Примечание. *p*-value – уровень значимости различия частот аллелей и генотипов между славянами и тюрками; *rE_{H-W}* – равновесие Харди–Вайнберга.

Транскрипционные факторы часто используются в качестве кандидатных маркеров при развитии различных патологических состояний иммунной системы, поскольку их работа обеспечивает пластичность популяции иммунокомпетентных клеток, которая отмечается при аутоиммунных заболеваниях или злокачественных новообразованиях. Например, при различных видах рака может наблюдаться снижение функциональных способностей CD8⁺-клеток, фенотипически начинают преобладать Т-клетки эффекторной памяти (Т_{ЕМ}-клетки), в то же время увеличение количества Т-клеток центральной памяти (Т_{СМ}) и короткоживущих эффекторных клеток (Т_{ЕМРА}) повышает активность противоопухолевого иммунитета (DuPage, Bluestone, 2016).

Ранее в группе облученных жителей прибрежных сёл р. Течи нами была выявлена корреляционная связь экспрессии генов *NFkB1* и *PADI4* с показателями системного иммунитета у облученных лиц. В частности, количество мРНК коррелировало с абсолютным числом В-лимфо-

цитов и уровнями сывороточных IgG и IgM, а количество мРНК гена *PADI4* – с интенсивностью внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов (Аклеев и др., 2019). Вероятно, изменения в транскрипционной активности генов *NFkB1* и *PADI4* могут вносить определенный вклад в работу иммунной системы.

Помимо влияния внешних факторов, в транскрипционной активности генов определенную роль имеет и генетическая компонента, в частности ОНП, располагающиеся в некодирующих областях (энхансерах, донорах сплайсинга и акцепторных сайтах интронов). Такие ОНП способны влиять на уровень экспрессии генов путем изменений в сайтах связывания, образования новых сайтов или изменения степени родства различных транскрипционных факторов к определенным сайтам связывания ДНК. Однако в настоящем исследовании не установлено ассоциаций аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 с количеством мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* у облученных лиц.

Таблица 8. Оценка влияния ОНП на транскрипционную активность генов у облученных лиц

Ген, полиморфизм	Модель	Генотип	Объединенная популяция		Славяне		Тюрки	
			Кол-во мРНК, медиана 25–75 %	<i>p</i>	Кол-во мРНК, медиана 25–75 %	<i>p</i>	Кол-во мРНК, медиана 25–75 %	<i>p</i>
<i>STAT3</i> rs1053023	Кодоминантная	T/T (109/58/51)	0.95 (0.60–1.46)	0.46	1.02 (0.59–1.36)	0.87	0.93 (0.60–1.53)	–
		T/C (36/23/13)	1.08 (0.67–1.43)		0.96 (0.64–1.40)		1.25 (0.97–1.46)	
		C/C (7/5/2)	0.84 (0.60–1.34)		1.04 (0.77–1.34)		–	
	Доминантная	T/T (109/58/51)	0.95 (0.60–1.46)	0.79	1.02 (0.59–1.38)	0.85	0.93 (0.60–1.52)	0.28
		T/C-C/C (43/28/15)	1.04 (0.66–1.40)		0.96 (0.64–1.40)		1.17 (0.71–1.46)	
	Рецессивная	T/T-T/C (145/81/64)	0.96 (0.62–1.46)	0.56	1.02 (0.62–1.39)	0.83	0.96 (0.69–1.49)	–
<i>GATA3</i> rs4143094	Кодоминантная	C/C (109/58/51)	0.85 (0.65–1.16)	0.24	0.82 (0.64–1.09)	0.97	0.91 (0.66–1.60)	0.77
		A/C (49/35/14)	0.74 (0.59–1.38)		0.80 (0.61–1.54)		0.68 (0.46–0.74)	
		A/A (13/6/7)	1.20 (0.44–1.49)		0.79 (0.36–2.03)		1.21 (0.67–1.49)	
	Доминантная	C/C (109/58/51)	0.85 (0.65–1.16)	0.59	0.82 (0.64–1.09)	0.44	0.91 (0.66–1.60)	0.10
		C/A-A/A (43/28/15)	0.76 (0.53–1.47)		0.80 (0.59–1.54)		0.69 (0.49–1.15)	
	Рецессивная	C/C-C/A (134/77/58)	0.81 (0.64–1.21)	0.51	0.80 (0.65–1.09)	0.89	0.76 (0.65–1.21)	0.29
<i>NFKB1</i> rs28362491	Кодоминантная	Del/Del (31/19/12)	1.09 (0.50–1.92)	0.50	1.14 (0.66–1.92)	0.19	0.82 (0.43–1.89)	0.22
		Del/ATTG (79/45/34)	0.85 (0.51–1.39)		0.82 (0.53–1.44)		1.01 (0.51–1.27)	
		ATTG/ATTG (34/18/16)	1.05 (0.53–1.36)		0.68 (0.43–1.28)		1.24 (0.89–1.67)	
	Доминантная	Del/Del (31/19/12)	1.09 (0.5–1.92)	0.78	1.14 (0.66–1.92)	0.25	0.82 (0.43–1.89)	0.71
		Del/ATTG-ATTG/ATTG (113/63/50)	0.99 (0.53–1.39)		0.77 (0.46–1.39)		1.09 (0.56–1.54)	
	Рецессивная	Del/Del-Del/ATTG (110/64/46)	0.96 (0.51–1.54)	0.44	0.87 (0.53–1.57)	0.17	0.98 (0.5–1.3)	0.11
<i>PADI4</i> rs874881	Кодоминантная	G/G (29/19/10)	0.75 (0.44–1.07)	0.09	0.75 (0.44–0.99)	0.36	0.75 (0.33–1.42)	0.30
		G/C (79/46/33)	0.82 (0.45–1.37)		0.80 (0.46–1.37)		0.91 (0.45–1.44)	
		C/C (46/24/22)	0.60 (0.39–0.93)		0.66 (0.39–0.90)		0.57 (0.39–0.93)	
	Доминантная	G/G (29/19/10)	0.75 (0.43–1.07)	0.85	0.75 (0.44–0.99)	0.99	0.75 (0.33–1.42)	0.55
		G/C-C/C (125/70/55)	0.67 (0.44–1.21)		0.69 (0.41–1.21)		0.64 (0.44–1.19)	
	Рецессивная	G/G-G/C (108/65/43)	0.78 (0.45–1.32)	0.04	0.78 (0.46–1.16)	0.14	0.91 (0.44–1.44)	0.12
	C/C (46/24/22)	0.60 (0.39–0.93)		0.66 (0.39–0.90)		0.57 (0.39–0.93)		

Заключение

Таким образом, у лиц, подвергшихся хроническому аварийному радиационному воздействию, наблюдаются снижение количества мРНК гена *NfkB1* и повышение количества мРНК гена *PADI4* относительно группы сравнения. Не выявлено влияния аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 на количество мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NfkB1* у облученных лиц.

С учетом малой численности обследованных лиц по изученным полиморфным участкам результаты исследования являются предварительными и требуют дальнейшей проверки с увеличением объема выборки.

Список литературы / References

Аклеев А.А., Никифоров В.С., Блинова Е.А., Долгушин И.И. Экспрессия генов иммунного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки. *Рос. иммунол. журнал.* 2019;13(22):1042-1044. [Akleyev A.A., Nikiforov V.S., Blinova E.A., Dolgushin I.I. Delayed expression of immune response genes in persons chronically

exposed to radiation. *Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal = Russian Journal of Immunology.* 2019;13(22):1042-1044. (in Russian)]
База данных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). – URL: www.snpedia.com.
[Single-Nucleotide Polymorphism Database (SNP) – URL: www.snpedia.com.]
Крестинина Л.Ю., Силкин С.С., Микрюкова Л.Д., Епифанова С.Б., Аклеев А.В. Сравнительный анализ риска смерти от солидных злокачественных новообразований у населения, облучившегося на реке Теча и Восточно-Уральском радиоактивном следе. *Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра).* 2017;26(1):100-114. DOI 10.21870/0131-3878-2017-26-1-100-114.
[Krestinina L.Yu., Silkin S.S., Mikryukova L.D., Epifanova S.B., Akleyev A.V. Risk of death from solid cancer among residents of the Techa Riverside and the East Urals radioactive trace areas exposed to radiation: comparative analysis. *Radiatsiya i Risk = Radiation and Risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry).* 2017;26(1):100-114. DOI 10.21870/0131-3878-2017-26-1-100-114. (in Russian)]
Национальный центр биотехнологической информации (NCBI). – URL: www.ncbi.nlm.nih.gov.

- [National Center for Biotechnology Information (NCBI). – URL: www.ncbi.nlm.nih.gov. (in Russian)]
- Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Влияние комплекса факторов радиационной и нерадиационной природы на профиль транскрипционной активности генов у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Вопросы радиационной безопасности*. 2019;2(94):64-70.
- [Nikiforov V.S., Blinova E.A., Akleyev A.V. Influence of a combination of radiation and non-radiation factors on gene transcriptional activity profile in chronically exposed persons. *Voprosy Radiatsionnoy Bezopasnosti = Radiation Safety Issues*. 2019;2(94): 64-70. (in Russian)]
- Последствия радиоактивного загрязнения реки Теча. Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016.
- [Akleyev A.V. (Ed.) The Consequences of Radioactive Pollution of the Techa River. Chelyabinsk: The Book Publ., 2016. (in Russian)]
- Портал для данных о генотипе HapMap. – URL: www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov.
- [HapMap Genotype Data Portal. – URL: www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov]
- Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2009 - п. 3.1.4.
- [Sanitary Regulations and Standards SanPiN 2.6.1.2523-09. Radiation Safety Standard-99/2009 (NRB-99/2009). p. 3.1.4 (in Russian)]
- Albanese J., Martens K., Karanitsa L.V., Schreyer S.K., Dainiak N. Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology. *Exp. Hematol.* 2007;35(4):47-54. DOI 10.1016/j.exphem.2007.01.012.
- Amundson S.A., Lee R., Koch-Paiz C.A. Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Mol. Cancer Res.* 2003;1(6):445-452.
- Azimian H., Bahreyni-Toossi M., Rezaei A., Rafatpanah H., Hamzehloei T., Fardid R. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. *J. Med. Phys.* 2015;40(1):38-44. DOI 10.4103/0971-6203.152249.
- Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336(15):1066-1071. DOI 10.1056/NEJM199704103361506.
- Bazyka D., Iliencko I., Sushko V., Loganovsky K., Lyashenko L., Golyarnik N., Lyaskivska O., Nechaev S., Shvayko L., Bazyka K., Pilinska M., Bezdobna L. Biological markers of external and internal exposure in shelter construction workers: a 13-year experience. *Radiat. Prot. Dosim.* 2018;182(1):146-153. DOI 10.1093/rpd/ncy128.
- Bhattacharya R., Rose P.W., Burley S.K., Prlić A. Impact of genetic variation on three dimensional structure and function of proteins. *PLoS One.* 2017;12(3):e0171355. DOI 10.1371/journal.pone.0171355.
- Brest P., Lapaquette P., Souidi M., Lebrigand K., Cesaro A., Vouret-Craviari V., Mari B., Barbry P., Mosnier J.F., Hebuterne X., Harel-Bellan A., Mograbi B., Darfeuille-Michaud A., Hofman P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* 2011;43(3):242-245. DOI 10.1038/ng.762.
- Campbell T.M., Castro M.A.A., de Santiago L., Fletcher M.N.C., Hallim S., Prathalingam R., Ponder B.A.J., Meyer K.B. FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting estrogen responsiveness. *Carcinogenesis*. 2016;37(8):741-750. DOI 10.1093/carcin/bgw065.
- Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I., Shishkina E.A., Shagina N.B., Volchkova A.Y., Bougrov N.G., Smith M.A., Anspaugh L.R. Enhancements in the Techa River Dosimetry System: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures. *Health Phys.* 2019;117(4):378-387. DOI 10.1097/HP.0000000000001067.
- Ding L.H., Shingyoji M., Chen F., Hwang J.J., Burma S., Lee C., Cheng J.F., Chen D.J. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: A comparative study of low and high doses. *Radiat. Res.* 2005;164(1):17-26. DOI 10.1667/r3354.
- DuPage M., Bluestone J.A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cell to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16(3): 149-163. DOI 10.1038/nri.2015.18.
- Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P., Junta C.M., Ghilardi-Netto T., Donadi E.A., Passos G.A., Sakamoto-Hojo E.T. Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *J. Radiat. Res.* 2009;50(1):61-71. DOI 10.1269/jrr.08034.
- Iliencko I.N., Bazyka D.A. Overexpression of TP53, TP53I3 and BIRC5, alterations of gene regulation of apoptosis and aging of human immune cells in a remote period after radiation exposure. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2016;21:238-246.
- Robert F., Pelletier J. Exploring the impact of single-nucleotide polymorphisms on translation. *Front. Genet.* 2018;9:507. DOI 10.3389/fgene.2018.00507.
- Schüz J., Deltour I., Krestinina L.Y., Tsareva Y.V., Tolstykh E.I., Sokolnikov M.E., Akleyev A.V. *In utero* exposure to radiation and haematological malignancies: pooled analysis of Southern Urals cohorts. *Br. J. Cancer.* 2017;116(1):126-133. DOI 10.1038/bjc.2016.373.
- Shastri B.S. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol. Biol.* (Clifton, N.J.). 2009;578:3-22. DOI 10.1007/978-1-60327-411-1_1.
- Tan H. The association between gene SNPs and cancer predisposition: Correlation or causality? *EBioMedicine.* 2017;16:8-9. DOI 10.1016/j.ebiom.2017.01.047.
- Visscher P.M., Brown M.A., McCarthy M.I., Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(1):7-24. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.11.029.
- Wang Y., Qiu C., Cui Q. A large-scale analysis of the relationship of synonymous SNPs changing microRNA regulation with functionality and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(10):23545-23555. DOI 10.3390/ijms161023545.
- Woloschak G.E., Shearin-Jones P., Chang-Liu C.M. Effects of ionizing radiation on expression of genes encoding cytoskeletal elements: Kinetics and dose effects. *Mol. Carcinog.* 1990;3(6):374-378. DOI 10.1002/mc.2940030609.
- Wright J.B., Brown S.J., Cole M.D. Upregulation of c-MYC in cis through a large chromatin loop linked to a cancer risk-associated single-nucleotide polymorphism in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 2010;30(6):1411-1420. DOI 10.1128/MCB.01384-09.
- Wyrobek A.J., Manohar C.F., Krishnan V.V., Nelson D.O., Furtao M.R., Bhattacharya M.S., Marchetti F., Coleman M.A. Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10 cGy of acute gamma radiation. *Mutat. Res.* 2011;722(2):119-130. DOI 10.1016/j.mrgentox.2011.03.002.

ORCID ID

E.A. Blinova orcid.org/0000-0002-2567-7945
V.S. Nikiforov orcid.org/0000-0002-6685-1823
M.A. Yanishevskaya orcid.org/0000-0002-2649-5123


Благодарности. Статья подготовлена в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Оптимизация высокотехнологических методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона», контракт № 27.501.19.2 от 08.07.2019 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.03.2020. После доработки 17.05.2020. Принята к публикации 19.05.2020.

Причины глобальных вымираний в истории жизни: факты и гипотезы

Т.М. Хлебодарова , В.А. Лихошвай

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 e-mail: tamara@bionet.nsc.ru


Аннотация. Палеонтологи характеризуют глобальные вымирания на Земле как потерю ~3/4 существующего биоразнообразия на большей части земного шара за относительно короткий геологический промежуток времени. В палеонтологической летописи Земли, описывающей период фанерозоя (~500 млн лет), документировано как минимум пять таких глобальных вымираний: ~65, 200, 260, 380 и 440 млн лет назад. Существуют данные о возможности глобальных вымираний в более отдаленные периоды жизни на Земле – в позднем кембрии (~500 млн лет назад) и эдиакарии (более 540 млн лет назад). Общего мнения о причинах их возникновения до сих пор не сформировано. В настоящем обзоре систематизированы документированные факты глобальных вымираний сложных форм жизни на Земле с момента их возникновения в эдиакарии и до современного периода. Рассматриваются возможные причины их возникновения с точки зрения воздействия абиогенных факторов, планетарных или астрономических, и последствий их действия. Анализируются данные «за» и «против» гипотезы периодичности массовых вымираний биоразнообразия морской биоты в фанерозойский период. Обсуждаются факты, позволяющие высказывать гипотезы о наличии дополнительных механизмов возникновения кризисов в эволюции сложных форм жизни на Земле, связанных с различными внутренними биотическими факторами. Развивая тему внутренних причин периодичности и прерывистости эволюционного процесса, мы высказываем собственную, оригинальную гипотезу, согласно которой глобальные вымирания являются отражением сложной динамики изменения уровня биоразнообразия на Земле и следствием феномена бистабильности. Этот феномен возникает только в экосистеме, большая часть организмов которой размножается половым путем. Данная гипотеза говорит о том, что, если бы даже не было никаких глобальных катастроф абиотического характера, кризисы в развитии биоты возникали бы все равно. Однако гипотеза не исключает, что в определенные моменты времени биота Земли подвергалась мощным внешним воздействиям, оказавшим существенное влияние на ее дальнейшее развитие, что нашло отражение в конкретных палеонтологических данных.

Ключевые слова: палеонтологическая летопись Земли; эволюция глобальных экосистем; массовые вымирания; динамические системы; сложная динамика; периодичность; моделирование.

Для цитирования: Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. Причины глобальных вымираний в истории жизни: факты и гипотезы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):407-419. DOI 10.18699/VJ20.633

Causes of global extinctions in the history of life: facts and hypotheses

T.M. Khlebodarova, , V.A. Likhoshvai

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 e-mail: tamara@bionet.nsc.ru

Abstract. Paleontologists define global extinctions on Earth as a loss of about three-quarters of plant and animal species over a relatively short period of time. At least five global extinctions are documented in the Phanerozoic fossil record (~500-million-year period): ~65, 200, 260, 380, and 440 million years ago. In addition, there is evidence of global extinctions in earlier periods of life on Earth – during the Late Cambrian (~500 million years ago) and Ediacaran periods (more than 540 million years ago). There is still no common opinion on the causes of their occurrence. The current study is a systematized review of the data on recorded extinctions of complex life forms on Earth from the moment of their occurrence during the Ediacaran period to the modern period. The review discusses possible causes for mass extinctions in the light of the influence of abiogenic factors, planetary or astronomical, and the consequences of their actions. We evaluate the pros and cons of the hypothesis on the presence of periodicity in the extinction of Phanerozoic marine biota. Strong evidence that allows us to hypothesize that additional mechanisms associated with various internal biotic factors are responsible for the emergence of extinctions in the evolution of complex life forms is discussed. Developing the idea of the internal causes of periodicity and discontinuity in evolution, we propose our own original hypothesis, according to which the bistability phenomenon underlies the complex dynamics of the biota development, which is manifested in the form of global extinctions. The bistability phenomenon arises only in ecosystems with predominant sexual reproduction. Our hypothesis suggests that even in the

absence of global abiotic catastrophes, extinctions of biota would occur anyway. However, our hypothesis does not exclude the possibility that in different periods of the Earth's history the biota was subjected to powerful external influences that had a significant impact on its further development, which is reflected in the Earth's fossil record.

Key words: Earth's fossil record; evolution of global ecosystems; mass extinctions; dynamic systems; complex dynamics; periodicity; modeling.

For citation: Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. Causes of global extinctions in the history of life: facts and hypotheses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):407-419. DOI 10.18699/VJ20.633

Введение

Палеонтологи определяют глобальные вымирания на Земле как потерю порядка 3/4 существующего биоразнообразия за относительно короткий геологический промежуток времени, если этот процесс протекал на всем или почти всем земном шаре. В палеонтологической летописи Земли, описывающей эпоху фанерозоя (~500 млн лет), документировано как минимум пять таких глобальных вымираний: на границах мела и палеогена (~65 млн лет назад), юрского периода и триаса (~200 млн лет назад), перми и триаса (~260 млн лет назад), в позднем девоне (~380 млн лет назад) и на границе ордовика и силура (~440 млн лет назад). Эти пять вымираний впервые были описаны как великие при анализе ископаемых окаменелостей более чем 36 тыс. родов морских беспозвоночных и позвоночных, которые представлены в базе данных, созданной D.M. Raup и J.J. Sepkoski (1982). Некоторыми исследователями современный период позиционируется как «шестое» массовое вымирание. Это мнение сложилось на основании оценки скорости исчезновения видов животных и растений в настоящий период, которая оказалась сравнимой с таковой в периоды глобальных вымираний, оцененных на основе палеонтологических данных (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2015).

В последнее десятилетие список глобальных вымираний сложных форм жизни на Земле, выявленных на основе ископаемых данных, пополнился. Появились данные о том, что в более отдаленные периоды жизни на Земле – позднем кембрии (~500 млн лет назад) и эдиакарии (> 540 млн лет назад) (Gill et al., 2011; Darroch et al., 2015) – массовые вымирания несли глобальный характер. Вымирание в эдиакарии позиционируется как первое массовое вымирание сложных форм в истории жизни (Darroch et al., 2015). Рассмотрим существующие факты и гипотезы о причинах глобальных вымираний.

Массовые вымирания как результат глобальных катастроф абиотического характера

Для большинства «великих вымираний», зарегистрированных в палеонтологической летописи Земли, описан набор абиогенных факторов, которые могли бы быть их причиной. Это не касается исчезновения биоразнообразия в позднем эдиакарии (Xiao, Laflamme, 2009; Buatois et al., 2014; Darroch et al., 2015), позднем кембрии (Gill et al., 2011) и в современный период (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2015).

К наиболее известным абиогенным факторам, которые связывают с экологическими катастрофами, относятся: падение астероида ~65 млн лет назад (Alvarez et al., 1980, 1981; Schulte et al., 2010; Kaiho, Oshima, 2017), вулкани-

ческая активность и глобальное потепление ~200 млн лет назад (Marzoli et al., 1999; Whiteside et al., 2010; Blackburn et al., 2013; Thibodeau et al., 2016; Miller et al., 2017; Percival et al., 2017; Heimdal et al., 2018), трапповые извержения ~260 млн лет назад (Huey, Ward, 2005; Wignall et al., 2009; Rampino et al., 2017), а также глобальное похолодание – оледенение Гондваны ~440 млн лет назад (Sutcliffe et al., 2000; Sheehan, 2001; Finnegan et al., 2011, 2012; Sheets et al., 2016). Эти явления и их последствия, связанные с изменением климата, позволяют в какой-то мере объяснить вымирания на границе мела и палеогена (Alvarez et al., 1980, 1981; Schulte et al., 2010; Kaiho et al., 2016), на границе юрского периода и триаса (Marzoli et al., 1999; Whiteside et al., 2010; Blackburn et al., 2013; Percival et al., 2017), в поздней перми (Wignall et al., 2009) и на границе ордовика и силура (Sutcliffe et al., 2000; Sheehan, 2001; Finnegan et al., 2011, 2012; Sheets et al., 2016).

Следует, однако, отметить, что в целом документированные внешние воздействия в эти периоды достаточно разнообразны и единой точки зрения на причины тех или иных вымираний до сих пор нет, особенно это касается вымираний в позднем девоне ~380 млн лет назад.

Так, относительно вымираний на границе мела и палеогена ~65 млн лет назад существует другой набор данных, связывающий его с изменением уровня моря, вызванного тектоническими движениями материковых плит (Peters, 2008) или вулканической активностью (Archibald et al., 2010; Courtillot, Fluteau, 2010; Keller et al., 2010; Schoene et al., 2015, 2019).

Вымирание на границе юрского периода и триаса ~200 млн лет назад объясняют значительным потеплением климата в результате аномально высоких концентраций углекислого газа в атмосфере магматического происхождения (McElwain et al., 1999; Beerling, 2002; Schaller et al., 2011), которое могло сопровождаться штормами, ударами молний, пожарами и быть непосредственной причиной глобального вымирания наземной биоты (Petersen, Lindström, 2012), выбросами больших объемов вулканического сернистого газа (Bacon et al., 2013), быстрым изменением климата от похолодания к потеплению, вызванному вулканическими выбросами вначале больших объемов сернистого газа, а затем углекислого газа (Guex et al., 2016). При этом данные работы (Tanner et al., 2001) свидетельствуют о стабильности концентрации углекислого газа в атмосфере Земли в этот период. Исследования последних лет подтверждают вулканическую природу климатических изменений в конце триаса и приводят доказательства, что токсический эффект вулканических выбросов может быть связан с ртутью – самым генотоксичным элементом на Земле (Percival et al., 2017; Lindström et al., 2019).

Вымирание биоты в поздней перми ~260 млн лет назад, когда погибло более 90 % морских беспозвоночных, также объясняют разными причинами: низким уровнем кислорода в поверхностных слоях океана (Knoll et al., 1996; Wignall et al., 2009; Shen et al., 2011; Zhang et al., 2018a), в том числе и в сочетании с теплым климатом, губительным для мелководных организмов (Song et al., 2014), закислением океана (Clarkson et al., 2015), связанным с выбросом углекислого газа в атмосферу и сопровождающимся быстрым глобальным потеплением и кислотными дождями (Sun et al., 2018), а также похолоданием, засушливостью, гипоксией и кислотными дождями (Zhu et al., 2019). Результаты математического моделирования климатических особенностей поздней перми поддерживают гипотезу о том, что снижение уровня биоразнообразия в этот период могло быть связано с гипоксией и потеплением океана (Penn et al., 2018). Получены дополнительные данные в пользу вулканической природы биотического кризиса в поздней перми (Burgess et al., 2017; Shen et al., 2019).

Вымирание на границе ордовика и силура ~440 млн лет назад, когда погибло ~85 % морских организмов, традиционно связывают с глобальным похолоданием тропического океана (Sutcliffe et al., 2000; Sheehan, 2001; Finnegan et al., 2011, 2012), которое сопровождалось падением уровня моря и потерей мелководных мест обитания (Finnegan et al., 2012).

Однако существует мнение, что триггером этого похолодания было резкое увеличение космической пыли во внутреннем пространстве Солнечной системы, связанное с распадом родительского тела L-хондрита в поясе астероидов ~466 млн лет назад (Schmitz et al., 2019), хотя наличие этой связи признается не всеми (Lindskog et al., 2017).

Согласно точке зрения М.Н.М. Ghienne с коллегами (2014), сценарий этого вымирания был сложнее, включал три ледниковых периода, и причиной первоначального вымирания было не охлаждение моря, а таяние ледников и повышение уровня моря, которое было спровоцировано наличием в этот период большого ледяного покрова при относительно теплом океане. Пусковым механизмом второго импульса вымирания считается снижение концентрации кислорода в воде, произошедшее во время высокого уровня моря до пика оледенения в позднем ордовике (Bartlett et al., 2018). В последнее время причиной этого вымирания считают вулканическую активность (Gong et al., 2017; Rasmussen et al., 2019; Smolarek-Lach et al., 2019).

Относительно вымирания в позднем девоне ~380 млн лет назад (Sallan, Coates, 2010), затронувшего в основном морскую биоту на мелководье (Ma et al., 2016), существует достаточно много различных предположений о причинах его возникновения. Так, его связывают с похолоданием (Huang et al., 2018; Wang et al., 2018), которое было спровоцировано захоронением большого количества органического углерода и сопровождалось падением концентрации углекислого газа в атмосфере (Huang et al., 2018) и понижением уровня моря (Wang et al., 2018), глобальным потеплением, которое явилось результатом вулканической активности и массового выброса метана в атмосферу (Gharaie et al., 2004, 2007), частыми клима-

тическими колебаниями от потепления к похолоданию (Chen et al., 2005), которые провоцировались различными процессами, в том числе захоронением большого количества органического углерода и диссоциацией газовых гидратов (Chen et al., 2002), колебаниями уровня моря и дефицитом кислорода в его водах (Joachimski, Buggisch, 1993). Причиной девонского вымирания считают также пожары, возникновение которых объясняют высокой концентрацией кислорода в атмосфере и сухим климатом (Kaiho et al., 2013), трапповыми извержениями (Ricci et al., 2013), падением астероидов (Claeys et al., 1992) и др. В целом признается, что эти причины до сих пор неясны (Percival et al., 2018).

Необходимо отметить потенциальную уникальность биотических кризисов в позднем девоне и в конце триаса, которые коррелируют со снижением скорости видообразования, а не с увеличением скорости вымирания (Vam- bach et al., 2004; Lamsdell, Selden, 2017).

Остальные документированные вымирания: в позднем кембрии ~499 млн лет назад (Gill et al., 2011), в конце эдиакария (> 540 млн лет назад) (Xiao, Laflamme, 2009; Buatois et al., 2014; Darroch et al., 2015; Zhang et al., 2018b), а также исчезновение биоразнообразия на Земле, наблюдаемое в современный период (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2015), пока не связывают с глобальными катастрофами abiотического характера.

В последнее время все чаще одной из основных причин глобальных вымираний биоты, в том числе в эдиакарии (Zhang et al., 2018b), позднем кембрии (Gill et al., 2011), на границе ордовика и силура (Bartlett et al., 2018), в позднем девоне (Bond, Wignall, 2008; Liu et al., 2016), конце перми (Brennecke et al., 2011; Shen et al., 2011; Lau et al., 2016; Zhang et al., 2018a) и ранней юре (Them et al., 2018), считают недостаток кислорода в воде. Однако, если в поздней перми, как полагают, его провоцирует глобальное потепление (Zhang et al., 2018a), а в позднем ордовике – похолодание (Bartlett et al., 2018), то чем он вызван в другие периоды массовых вымираний, пока неясно. Более того, существуют данные (Darroch et al., 2015), которые противоречат утверждению о наличии дефицита кислорода в океане позднего эдиакария (Zhang et al., 2018b).

Периодичность в истории глобальных вымираний

Необходимо отметить, что история массовых вымираний характеризуется относительной циклическостью, на которую обратили внимание исследователи еще при создании первой базы данных по ископаемым останкам морской биоты в фанерозойский период (Raup, Sepkoski, 1984, 1986; Sepkoski, 1989). На временном промежутке в 250 млн лет выявлено восемь пиков вымирания с периодичностью изменения уровня биоразнообразия морской биоты, равной ~26–27 млн лет. С тех пор данные базы Sepkoski dataset (Sepkoski, 2002) были проанализированы с помощью различных методов другими исследователями и получены результаты, как подтверждающие наличие периодичности, хотя и неярко выраженной, равной ~27 млн лет (Lieberman, Melott, 2007), так и свидетельствующие о более строгой периодичности, составляющей ~62–63 млн лет (Rohde, Muller, 2005; Lieberman, Melott, 2007), которая

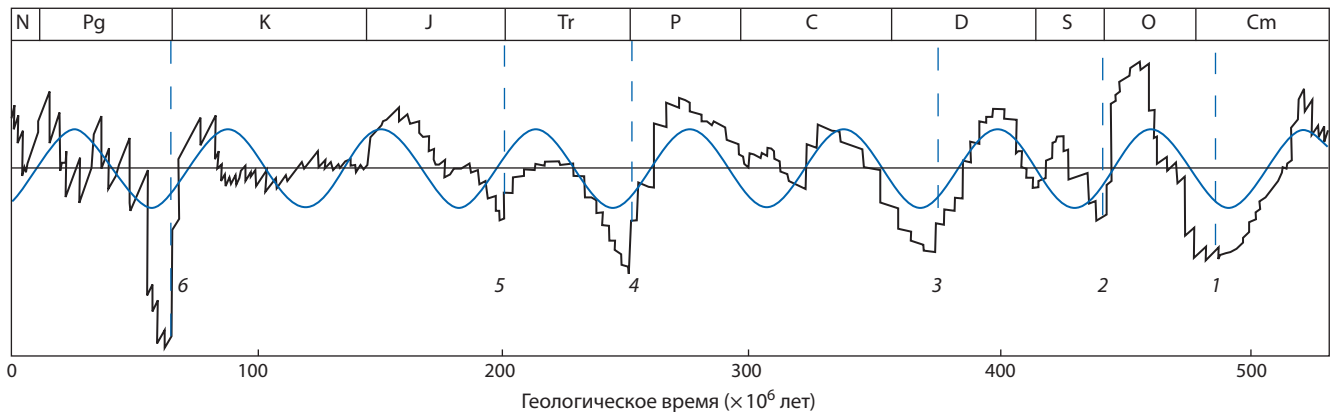


Рис. 1. Динамика разнообразия морской биоты в фанерозое.

Сверху указаны основные геологические периоды, согласно (Raup, Sepkoski, 1982); вертикальной штриховой линией отмечены времена шести глобальных вымираний биоты на Земле: 1 – в позднем кембрии; 2 – на границе ордовика и силура; 3 – в позднем девоне; 4 – на границе перми и триаса; 5 – на границе юрского периода и триаса; 6 – на границе мела и палеогена. Синяя кривая – синусоида, черная кривая – адаптировано из (Rohde, Muller, 2005; fig. 1, c).

проявилась на промежутке в 500 млн лет (рис. 1) (Rohde, Muller, 2005).

Аналогичные исследования были проведены с использованием альтернативных баз данных: Paleobiology Database (PBDB) ископаемых морских беспозвоночных (Alroy, 2008; Melott, 2008; Lieberman, Melott, 2012; Roberts, Mannion, 2019) и базы данных Fossil Record 2 окаменелостей морских и наземных организмов (Benton, 1995). Получены данные, как подтверждающие наличие периодичностей (Melott, 2008; Lieberman, Melott, 2012; Roberts, Mannion, 2019), так и отрицающие строгую цикличность (Benton, 1995; Alroy, 2008).

На материале базы Fossil Record 2 (Benton, 1995) выявлено семь пиков массовых вымираний морской биоты на промежутке в 250 млн лет, временной промежутков между ними был варьирующим от 20 до 60 млн лет. J. Alroy (2008) на материале базы PBDB не обнаружил каких-либо значимых данных в пользу теории периодичности вымираний. В то же время A.L. Melott (2008) и B.C. Lieberman и A.L. Melott (2012) подтвердили наличие достаточно строгой периодичности в ~62–63 млн лет в возникновении массовых вымираний в фанерозое, которая была установлена и при анализе баз данных Sepkoski dataset (Rohde, Muller, 2005; Lieberman, Melott, 2007, 2012). Последние исследования на материале Paleobiology Database (Roberts, Mannion, 2019) подтверждают наличие периодичности вымираний ~27 млн лет, но ограничивают их существование последними 200 млн лет. Реальность цикличности вымираний с периодами в ~27 и ~62 млн лет в последние 465 млн лет демонстрируется и в других работах (Melott, Vambach, 2014, 2017).

Следует добавить, что на материале базы Sepkoski dataset был обнаружен еще один цикл изменения биоразнообразия морской биоты, который имел период 140 ± 15 млн лет (Rohde, Muller, 2005), однако цикличность глобальных вымираний в фанерозое в ~62–63 млн лет была более строгой.

Таким образом, на материале различных баз данных разными учеными в фанерозое выявлено как минимум три цикла в возникновении массовых вымираний с перио-

дами 26–30, 62–63 и ~140 млн лет (Raup, Sepkoski, 1984, 1986; Sepkoski, 1989; Rohde, Muller, 2005; Melott, 2008; Lieberman, Melott, 2007, 2012; Melott, Vambach, 2014, 2017; Roberts, Mannion, 2019), причем цикл с периодом ~27 млн лет наиболее четко выражен в последние 200 млн лет (Roberts, Mannion, 2019).

Ввиду этого возникает вопрос, существует ли связь между наблюдаемой периодичностью в разнообразии земной биоты и теми процессами, которые рассматриваются выше с точки зрения причин глобальных вымираний? Иными словами, существует ли периодический абиотический процесс, который мог бы лежать в основе наблюдаемой периодичности в разнообразии морской или наземной биоты или даже всей биоты Земли?

Необходимо еще раз подчеркнуть, что описанные выше вымирания характеризуются как глобальные, т. е. в большей или меньшей степени затрагивают биоту всей Земли, а это означает, что наблюдаемая периодичность в ее развитии, если она связана с абиотическими факторами, может быть отражением только таких циклических процессов, которые затрагивают планетарный уровень. С этой точки зрения можно выделить два типа процессов, обладающих подобными характеристиками: первый является отражением внутрипланетных мантийных и тектонических процессов: дрейфа континентов, вулканической активности, изменения уровня мирового океана и др., второй тип процессов связан с динамикой движения самой планеты как космического объекта, тем или иным образом взаимодействующего с другими объектами Вселенной.

Рассмотрим существующие гипотезы о связи периодичности глобальных вымираний с глобальными катастрофами, которые могли бы быть вызваны такого рода периодическими процессами.

Периодичность вымираний как отражение планетарных процессов и эволюции Солнца

В настоящее время действительно предложен целый ряд гипотез возможной связи периодичности вымираний на Земле с астрономическими процессами. Так, модель, основанная на крупномасштабных флуктуациях магнит-

ного поля Солнца, демонстрирует поразительную периодичность в 66 млн лет (Baker, Flood, 2015), близкую к периодичности массовых вымираний в ~62–63 млн лет, обнаруженную при анализе как минимум двух баз данных ископаемых морских беспозвоночных (Rohde, Muller, 2005; Lieberman, Melott, 2007, 2012). Предложены также гипотезы, связывающие подобную периодичность вымираний на Земле с флюктуациями потока внегалактических космических лучей в результате вертикальных колебаний Солнечной системы в плоскости Галактики (Medvedev, Melott, 2007), с периодичностью прохождения Солнечной системы через плоскость галактики Млечный Путь (Lieberman, Melott; 2012; Rampino et al., 1997, 2015), а также с периодичностью прохождения комет вблизи Земли и падением астероидов, формирующих различные периодичности в зависимости от размера небесных тел (Rampino, Stothers, 1984; Rampino et al., 1997).

Однако в последнее годы появились данные, что периодичности, связанные с колебаниями Солнечной системы в плоскости Галактики, статистически недостоверны (Egrykin et al., 2017, 2018) и не могут быть причиной периодичности вымираний на Земле. И, хотя некоторые исследователи с этим не согласны, в целом признается, что прямых доказательств астрономических причин периодичности вымираний биоты на Земле нет (Melott, Bambach, 2017).

О влиянии планетарных процессов на периодичность вымираний также имеется большое разнообразие мнений. Так, существующую палеонтологическую летопись Земли объясняют периодическими изменениями уровня моря (Peters, 2008; Tennant et al., 2016) или связывают ее с динамикой тектонического движения материковых плит и их фрагментацией (Valentine, Moores, 1970; Zaffos et al., 2017). Одно из возможных предположений, касающееся того, что мантийные и тектонические процессы на Земле могут быть причиной периодичности массовых вымираний биоты, высказано на основании данных о периодичности в ~60 млн лет в изменении соотношения изотопов Sr^{87}/Sr^{86} в морских отложениях (Melott et al., 2012).

Другое предположение связывает периодические вымирания с динамикой температурного режима на Земле (Mayhew et al., 2012). Можно отметить, что для холодных периодов (оледенений) показано наличие цикла в ~135 млн лет (Veizer et al., 2000), что статистически неотличимо от периодичности в 140 ± 15 млн лет, установленной на материале базы Sepkoski dataset (Rohde, Muller, 2005).

Интерес представляют данные датировки кратеров вулканов за последние 260 млн лет, которые демонстрируют наличие цикла, близкого к 26–27 млн лет (Rampino, Caldeira, 2015), характерного именно для этого отрезка времени (Raup, Sepkoski, 1984, 1986; Sepkoski, 1989; Roberts, Mannion, 2019). Однако в целом для вулканической активности на планете в последние 300 млн лет характерны слабо проявленные циклы с периодом 15, 30 и 60 млн лет (Prokoph et al., 2004).

Что касается достаточно строгой цикличности вымираний с периодом колебаний ~62–63 млн лет, установленной исследователями на материале различных баз данных ископаемых морских беспозвоночных (Rohde,

Muller, 2005; Melott, 2008; Lieberman, Melott, 2007, 2012; Melott, Bambach, 2014, 2017), то существующие данные, которые указывают на наличие цикличности в 60 млн лет, обусловленной динамикой тектонических процессов на Земле (Melott et al., 2012), а также результаты моделирования крупномасштабных флюктуаций магнитного поля Солнца, демонстрирующие периодичность в 66 млн лет (Baker, Flood, 2015), не позволяют однозначно связать их с периодичностью глобальных вымираний на Земле.

Если принять во внимание, что в истории планеты есть примеры серьезных внешних воздействий (падение астероидов и метеоритов) без последующего вымирания (Archibald et al., 2010) и вымираний без явных катастроф абиотического характера, о которых мы сказали выше, то можно предположить, что в основе массовых вымираний биоты, которые в разные периоды могли совпадать с глобальными катастрофами или провоцироваться ими, лежат более глубокие, внутренние причины биотического характера. Мы полагаем, что эти причины могут быть отражением сложного динамического поведения живой системы, каковой является наземная или морская биоты или даже биота всей Земли в целом.

Массовые вымирания и их периодичность как результат проявления внутренних свойств глобальной экосистемы

Идеи о том, что существующие палеонтологические данные об уровне биоразнообразия на Земле – это отражение внутренних законов функционирования глобальной экосистемы Земли, возникали не единожды. Массовые вымирания – лишь один из аспектов ее сложного динамического поведения, которое выражается в прерывистости и неравномерности темпов эволюционного процесса и наблюдается в палеонтологической летописи Земли в последние 500 млн лет. Для объяснения прерывистости эволюционного процесса S.J. Gould и N. Eldredge еще в 1972 г. сформулировали «теорию прерывистого равновесия» (Gould, Eldredge, 1977, 1993; Eldredge, Gould, 1997).

Эта теория не относится к числу строгих теорий. Она базируется на некоторых «эмпирических обобщениях» ряда фактов, давно подмеченных палеонтологами, которые свидетельствуют о том, что в эволюции видов длительные периоды стабильности, когда основные черты вида(ов) сохраняются неизменными, чередуются с короткими интервалами быстрых качественных перемен, которые характеризуются «внезапным» исчезновением старых видов, впоследствии замещаемых новыми. Авторами этой теории и другими исследователями были найдены достаточно яркие примеры из палеонтологической летописи Земли, подтверждающие наличие этой закономерности (Овчаренко, 1969; Bambach, 1977; Gould, Eldredge, 1977, 1993; Williamson, 1981; Sepkoski, 1988; Jackson, Cheetham, 1999). Хотя интерпретация некоторых исследований подвергается сомнению (Van Bocxlaer et al., 2008), в целом наличие этой закономерности в эволюционном процессе не отрицается (Hunt, 2007; Mattila, Bokma, 2008; Rasskin-Gutman, Esteve-Altava, 2008).

Ранее идея существования внутренних биотических причин, определяющих динамику эволюционного процес-

са, высказывалась в виде гипотезы «самоорганизующей критичности» (Bak, Paczusi, 1995; Sneppen et al., 1995; Solé, Manrubia, 1996), которая отражает взаимодействия между различными экосистемами и привлекалась для объяснения массовых вымираний и прерывистой эволюции. Предполагалось, что эти взаимодействия в совокупности со спонтанными мутациями и генетическими вариациями, всегда присутствующими в популяциях, могут приводить к большим эволюционным перестройкам, названным «коэволюционными лавинами». В последнее время идея «самоорганизующей критичности» вновь обращает на себя внимание исследователей (Nykter et al., 2008; Solé et al., 2010; Hesse, Gross, 2014; Valverde et al., 2015). Однако уже в 1990-е гг. (Newman, 1997a, b) и впоследствии (Alroy, 2008) существовали доказательства возможности возникновения массовых вымираний в простых моделях адаптации видов к внешним условиям и пищевым ресурсам без привлечения коэволюции и критических процессов, причем как с участием абиотических факторов, так и без них (Roberts, Newman, 1996; Newman, 1997a, b).

Предложены и другие идеи внутренних биотических причин, определяющих наблюдаемое биоразнообразие на Земле. Так, гипотеза, высказанная J.W. Huntley и M. Kowalewski (2007), связывает уровень биоразнообразия в фанерозое с интенсивностью хищничества в морских сообществах и предполагает определенную роль хищников в формировании разнообразия морской биоты, хотя в других исследованиях корреляции между хищниками и жертвами обнаружено не было (Madin et al., 2006). Данные, полученные в работе Р. Сергеев с коллегами (2017), позволили связать историю морского дна и уровень биоразнообразия через доступность пищевых ресурсов.

В моделях динамики фанерозойской морской биоты (Марков, 2001а, б; Марков, Коротаев, 2007), в развитии которой ярко выражается принцип прерывистости эволюции, периодичность вымираний не исследовалась и была введена в модель как данность. Однако, обсуждая результаты моделирования, авторы отмечали, что причины «этапности» следует искать в структуре развивающихся сообществ (Марков, 2001а). А.В. Марков и А.В. Коротаев (2007) обращали особое внимание на те формы жизни, которые обладают повышенной способностью к адаптивной диверсификации, связаны с половым размножением. Следует обратить внимание на исследования А.М. Bush с коллегами (2016), которые считают, что диверсификацию морских хищников, начиная с мелово-кайнозойского периода (~200 млн лет назад), можно объяснить особенностями полового размножения при направленной передаче спермы. Однако, учитывая, что внутреннее оплодотворение, вероятно, было со времен позднего неопротерозоя (> 500 млн лет назад), столь отсроченная диверсификация требует объяснения (Novack-Gottshall, 2016).

В ряде теоретических исследований присутствие в палеонтологической летописи прерывистости и этапности рассматривали как следствие априори существующих в природе «feedback» регуляторных петель – отрицательных и положительных, сочетание которых ведет к неустойчивости системы (Robertson, 1991; Seaborg, 1999). Это свойство «feedback» регуляторных петель отмечено достаточно давно и продемонстрировано в моделях биологических

систем на самых разных уровнях ее организации (Mackey, Glass, 1977; Decroly, Goldbeter, 1982; Martinez de la Fuente, 1996; Goldbeter et al., 2001; Harish, Hansel, 2015; Likhoshvai et al., 2015, 2016; Kogai et al., 2017; Khlebodarova et al., 2017, 2018). Однако оказалось, что это не единственный механизм в нелинейной динамической системе, который может приводить к неустойчивости.

Периодичность и прерывистость в истории жизни через призму математической модели

Ни у кого не вызывает сомнений, что модели математической физики – мощный инструмент познания самых глубоких законов существования Вселенной. Метод математического моделирования пока не играет такой роли в науках о живых системах. Но живые системы являются частью динамических систем. Это открытые и нелинейные системы на всех уровнях их организации, поэтому метод математического моделирования потенциально способен открывать законы их функционирования. И чем глобальнее система, тем фундаментальнее и одновременно проще по сути, но не по содержанию должны быть законы, определяющие ее функционирование.

Развивая тему внутренних причин прерывистости эволюционного процесса с этой точки зрения, мы исследовали законы эволюции больших экосистем методами математического моделирования. Под большой экосистемой мы понимаем некую абстрактную популяцию, состоящую из организмов одного вида, который мы назвали «транзитным». В наших моделях эта популяция имитирует биоту экосистемы достаточно большого размера, чтобы ее можно было соотнести с наземной или морской биотой. Это традиционные логистические модели рамочного типа, в которых эффективность воспроизводства и смертности организмов в популяции зависит от ее плотности. По мнению А.В. Маркова, «гипотеза о том, что динамика фанерозойской морской биоты, вычисляемая традиционными способами (без специальных поправок), адекватно отражает реальные изменения биоразнообразия, остается непровергнутой и по-прежнему является наиболее удобной и надежной основой для содержательных биологических интерпретаций» (Марков, Коротаев, 2007, с. 4).

Эволюционный процесс описан в моделях как процесс саморазвития экосистемы (популяции «транзитного» вида), в течение которого происходит локальное возрастание приспособленности ее особей к условиям существования вследствие мутационной изменчивости и естественного отбора.

Анализ динамики функционирования таких моделей показал, что живые системы с различными способами размножения реализуют разные эволюционные законы саморазвития: «бесполое» экосистемы демонстрировали стабильность, а «половые» экосистемы эволюционировали циклически (Лихошвай, Хлебодарова, 2016а; Лихошвай и др., 2017). То есть, если в популяции идет отбор в направлении повышения приспособленности ее особей к условиям существования, то на определенном этапе эволюции живой системы (возникновение полового размножения) он может выступать в качестве фактора, дестабилизирующего систему.

Более того, оказалось, что действием этих же факторов можно объяснить такие детали прерывистой эволюции, наблюдаемые в палеонтологической летописи, как катастрофы вымирания и фазы быстрого роста, а также фазы стазиса видового разнообразия, понимания причин возникновения которой нет до сих пор (Voje, 2016; Voje et al., 2018). Фазы эволюции параметра плотности «транзитной» популяции на примере одного полного цикла колебаний его значений показаны на рис. 2. В модели фазы уменьшения и роста значения этого параметра с неизбежностью повторяются неограниченное число раз, примерно через одинаковый интервал времени. Точную длительность каждой фазы предсказать нельзя, так как колебательная динамика, наблюдаемая в модели, является хаотической.

Временной отрезок $t \in [32000, 44000]$ усл. ед., на котором в модели реализуется полный эволюционный цикл развития «транзитной» популяции, составляет ~ 12000 усл. ед. времени (см. рис. 2). Наличие феномена фрактальности эволюции (Dieckmann, Law, 1996), который выражается в подобии законов, управляющих динамикой изменения плотности популяции, разнообразия видов, родов и более высоких уровней организации живых систем на разных временных масштабах, позволяет переносить эти данные при изменении масштаба времени на более высокий уровень организации живых систем, чем отдельная популяция. Нетрудно убедиться, что, если считать одну усл. ед. времени равной 50 лет, то длительность эволюционного цикла будет близка к оценке времени существования вида, если 500 лет, – это будет оценка времени существования рода, которые, согласно (Gingerich, 1976; Северцов, 1990, 2014), составляют ~ 0.5 и ~ 5.9 млн лет соответственно. Эти грубые оценки ничего не доказывают, но позволяют предположить, что масштабы времени, характерные для динамических процессов на уровне биоты больших экосистем, на порядок больше, т. е. составляют десятки млн лет, и циклические изменения разнообразия морской биоты в фанерозое с периодом 62–63 млн лет (Rohde, Muller, 2005; Melott, 2008; Lieberman, Melott, 2007, 2012; Melott, Vambach, 2014, 2017) могут быть их отражением.

Таким образом, результаты моделирования показали, что если эффективность воспроизводства и смертности организмов в популяции зависит от ее плотности и в ней идет отбор наиболее приспособленных особей, варибельность которых по параметру приспособленности возникает в результате мутационной изменчивости в процессе самовоспроизводства (ошибки репликации генома), то для живой системы, размножающейся половым путем, этих условий *достаточно* для формирования циклической и прерывистой динамики изменения биоразнообразия.

Возникает вопрос, каков механизм возникновения циклической и прерывистости в эволюции жизни на Земле?

Глобальные вымирания биоты в эволюционной истории Земли как отражение феномена бистабильности: гипотеза двух «древ жизни»

Идея о том, что в основе феномена прерывистой эволюции может лежать явление бистабильности, была высказана В.А. Лихошваем достаточно давно, при моделировании эволюции простейшей саморазвивающейся живой систе-

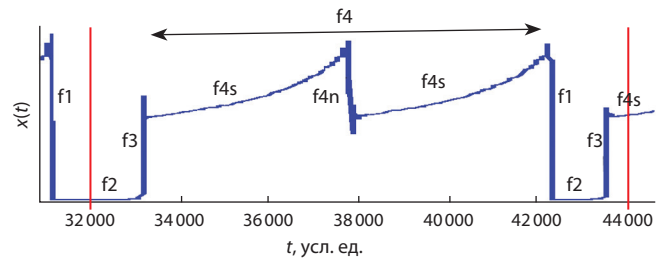


Рис. 2. Фазы эволюции параметра $x(t)$ (плотности биоты) на примере одного полного цикла колебания его значений.

Красными вертикальными линиями отмечены границы анализируемого периода. Фазы соответствуют: f1 – вымиранию; f2 – этапу развития биоты после глобального вымирания; f3 – этапу взрывообразного роста биоразнообразия биоты; f4 – этапу развития биоты, когда наблюдаются высокое разнообразие форм жизни и относительно невысокая скорость их роста. В пределах фазы f4 присутствуют стадии стазиса f4s и локального вымирания f4n.

мы, как возможность существования у саморазвивающейся живой системы латентного фенотипа – внутреннего ресурса ее эволюционного развития (Likhoshvai, Matushkin, 2000, 2004). Впоследствии в приложении к глобальным экосистемам она трансформировалась в гипотезу двух «древ жизни».

Необходимо отметить, что «древом жизни» Ч. Дарвин назвал разнообразие живых организмов на Земле. Этот образ очень точно отражает самую глубокую суть жизни, которая в своем непрерывном эволюционном развитии постоянно рождает новые тоненькие веточки видов, которые со временем могут сформироваться в новые ветви родов, типов, классов и т. д., но могут и засохнуть, отмереть (Дарвин, 1991).

Наиболее общими характеристиками «древа жизни» являются плотность массы биоты и разнообразие видов. В нашей модели – это плотность популяции «транзитного» вида, которая зависит от соотношения скоростей самовоспроизводства и «смертности» ее особей. Анализ поведения этих функций показал, что для эволюционирующей экосистем, в которых размножение идет неполным путем, существует единственное устойчивое состояние, тогда как для экосистем с половым способом размножения возможна бистабильность, т. е. наличие двух устойчивых стационарных состояний, каждое из которых можно интерпретировать как «дерево жизни», одно из которых проявлено, а другое нет. Причем, если вектор эволюции направлен в сторону улучшения приспособленности особей популяции «транзитного» вида к условиям обитания, что должно сопровождаться расширением экологической ниши вида и увеличением коэффициента использования ресурса, то в какой-то момент времени происходит потеря устойчивости проявленного состояния и система скачком переходит в новое устойчивое состояние, которое до этого существовало, но было непроявленным. Результат такого перехода можно интерпретировать как внезапное «исчезновение» старых «видов» и взрывообразное появление «новых», т. е. смену одного «древа жизни» на другое. Для динамической нелинейной системы с математической точки зрения в этом нет ничего необычного. Механизм возникновения локальных и глобальных вымираний биоты продемонстрирован на рис. 3.

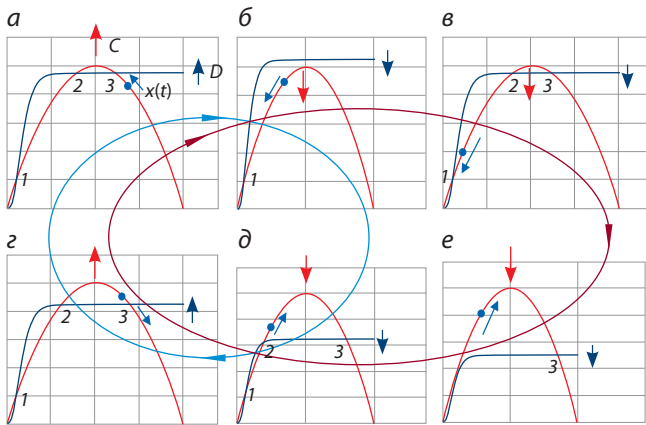


Рис. 3. Графики функций воспроизводства C (красная кривая) и смертности D (синяя кривая) в разные периоды времени эволюции системы.

1 – устойчивая стационарная точка x_{min} ; 2 – неустойчивая стационарная точка x_{mdl} ; 3 – устойчивая стационарная точка x_{max} ; синяя точка – текущее значение $x(t)$; цветные стрелки показывают направление эволюции (изменения) параметров; синий овал соответствует контуру локальных вымираний; красный – глобальных.

Пересечение функций C и D соответствует наличию у системы стационарных точек, которые могут быть устойчивыми (x_{min} и x_{max}) или неустойчивыми (x_{mdl}). Если текущее значение параметра плотности и биоразнообразия биоты $x(t)$ находится вблизи устойчивого стационара, то оно попадает в область его притяжения и будет стремиться к данному значению x_{max} (см. рис. 3, а, г, д) или x_{min} (см. рис. 3, в). Тот факт, что в этот же момент времени имеется еще один устойчивый стационар, никак не влияет на состояние системы, поскольку значение $x(t)$ находится вне области его притяжения и система не может в него попасть без внешнего воздействия. Поэтому можно считать, что в момент времени, описанный на рис. 3, в, стационар x_{min} – проявленный, а стационар x_{max} – непроявленный. На рис. 3, а, г, д – наоборот, стационар x_{max} – проявленный, а x_{min} – непроявленный.

Поскольку с течением времени система эволюционирует в сторону увеличения численности и разнообразия биоты, то значение параметра $x(t)$ увеличивается, при этом область притяжения проявленного стационара уменьшается, он сближается со стационаром x_{mdl} и в некоторой точке они сливаются и исчезают, и мы наблюдаем у системы только один стационар – x_{min} (см. рис. 3, б) или x_{max} (см. рис. 3, е), который из непроявленного состояния переходит в проявленное. Поскольку значение $x(t)$ значительно отличается от значения проявленного в данный момент стационара (см. рис. 3, б, е), то наблюдается взрывообразное изменение значения $x(t)$. Мы полагаем, что быстрое изменение параметров системы при переходе системы из одного состояния в другое может быть отражением неравномерности темпов эволюции, наблюдаемой в филогенетических исследованиях (Nichol et al., 1993; Pagel et al., 2006; Wolf et al., 2006; Palmer et al., 2012).

Из этих данных также следует, что локальные вымирания (см. рис. 3, голубой контур) связаны с колебаниями текущего значения плотности и разнообразия биоты $x(t)$ в области притяжения устойчивого стационара x_{max} (см.

рис. 3, а, г), тогда как глобальные вымирания связаны с потерей его устойчивости и переходом $x(t)$ в область притяжения стационара x_{min} (см. рис. 3, б). Именно этот переход мы интерпретируем как смену одного «древа жизни» на другое.

Таким образом, мы пришли к выводу, что сам процесс приспособления организмов к сложившимся внешним условиям в результате постепенного накопления мутаций (процесс эволюции) может быть одной из причин возникновения нестабильности в живой системе, которая проявилась на Земле в периодически возникающих «катастрофах» вымирания биоты. Однако возникла эта нестабильность только на определенном этапе эволюционного развития живой системы и связана с возникновением полового диморфизма. Это не отрицает того факта, что в определенные периоды жизни на Земле эти «катастрофы» могли совпадать с планетарными экологическими катастрофами или провоцироваться ими.

Заключение

Анализ причин глобальных вымираний в истории жизни на Земле показал, что, хотя преобладающими признаются абиогенные факторы, различные наборы которых могут быть причиной большей части вымираний, описанных в палеонтологической летописи Земли, они не позволяют объяснить такие особенности эволюционного процесса, как периодическая прерывистость и неравномерность темпов эволюции живых организмов. Между тем это характерные черты эволюционного процесса, которые проявляются на всех известных уровнях организации живых систем – от молекулярно-генетического до биосферного. В настоящее время уже доказано, что «скачкообразность» эволюции на палеонтологическом уровне имеет свое отражение и на молекулярном (Nichol et al., 1993; Pagel et al., 2006; Wolf et al., 2006; Palmer et al., 2012).

Мы полагаем, что помимо внешних факторов существуют дополнительные, внутренние причины для глобальных вымираний земной биоты. Согласно нашей гипотезе, они являются следствием феномена бистабильности, который возникает только в таких экосистемах, большая часть организмов которых размножается половым путем. Палеонтологическая летопись ископаемых останков живых организмов на Земле в последние 500 млн лет отражает историю жизни именно таких организмов. Эта гипотеза говорит о том, что, если бы даже не было никаких глобальных катастроф абиотического характера, кризисы в эволюции живых организмов возникали бы все равно. О возможности этого свидетельствует наличие в истории планеты вымираний, которые пока не связывают с глобальными катастрофами абиотического характера, а также наличие серьезных внешних воздействий, которые не сопровождалось вымираниями (Archibald et al., 2010).

Мы считаем, что феномен бистабильности должен проявляться в эволюции живой системы на всех уровнях ее организации. Вклад этого феномена в эволюцию сложности клеточных форм нами продемонстрирован (Лихошвай, Хлебодарова, 2016b; Khlebodarova, Likhoshvai, 2018; Хлебодарова, Лихошвай, 2019). На уровне биоты всей Земли он должен интерферировать с абиогенными факторами, которые наблюдались в истории планеты и нашли

отражение в конкретных палеонтологических данных. Об этом свидетельствует наличие, хотя и неярко выраженного, цикла вымираний с периодом ~140 млн лет (Rohde, Muller, 2005), который можно связать с периодичностью оледенений Земли, предшествующих вымираниям (Veizer et al., 2000), а также цикла, близкого к 26–27 млн лет, наблюдаемого в последние 250 млн лет (Raup, Sepkoski, 1984, 1986; Sepkoski, 1989; Roberts, Mannion, 2019), который совпадает с датировкой кратеров вулканов в этот период (Rampino, Caldeira, 2015).

Что касается обнаруженной при анализе палеонтологических данных достаточно строгой цикличности вымираний морской биоты, проявленной на промежутке в 500 млн лет, период которой равен ~63 млн лет (Rohde, Muller, 2005; Melott, 2008; Lieberman, Melott, 2007, 2012; Melott, Vambach, 2014, 2017), то эмпирические данные о наличии периодичности в ~60 млн лет в изменении соотношения изотопов $\text{Sr}^{87}/\text{Sr}^{86}$ в морских отложениях (Melott et al., 2012), указывающие на возможность существования цикличности, связанной с динамикой тектонических процессов на Земле, а также результаты моделирования крупномасштабных флуктуаций магнитного поля Солнца, демонстрирующие периодичность в 66 млн лет (Baker, Flood, 2015), не позволяют однозначно связать их с периодичностью глобальных вымираний на Земле.

На данном этапе развития модели мы также не можем объяснить наличие именно такого периода вымираний. Для этого модель слишком проста. При изменении масштаба времени она воспроизводит период колебаний, характерный для конкретного уровня организации живых систем, но достаточно грубо. И тем не менее полученные оценки дают возможность предположить, что масштабы времени, характерные для динамических процессов на уровне биоты больших экосистем или даже всей Земли, — это десятки миллионов лет. В настоящее время этот вопрос остается открытым.

Список литературы / References

Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественного отбора, или Сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь. СПб.; Наука, 1991.
[Darwin C. The Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London, 1872. (Russ. ed.: Darvin Ch. Proiskhozhdenie Vidov Putem Estestvennogo Otbora, ili Sokhranenie Blagopriyatnykh Ras v Bor'be za Zhizn'. Saint-Petersburg: Nauka Publ., 1991)]

Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Хлебодарова Т.М. Стазис и периодичность в эволюции глобальной экосистемы: минимальная логистическая модель. *Матем. биол. биоинформ.* 2017;12(1): 120-136. DOI 10.17537/2017.12.120.
[Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Stasis and periodicity in the evolution of a global ecosystem: the minimum logistic model. *Matematicheskaya Biologiya i Bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics.* 2017;12(1):120-136. DOI 10.17537/2017.12.120. (in Russian)]

Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. Минимальная логистическая модель эволюции глобальной экосистемы. Докл. VI междунар. конф. «Математическая биология и биоинформатика», Пушкино, 16-21 октября 2016. Пушкино. 2016а;6:116-117.
[Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. The minimum logistic model of global ecosystem evolution. Proc. of the VI Int. Conf. "Mathematical Biology and Bioinformatics", Puschino, 16-21 October. 2016а; 6:116-117. (in Russian)]

Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. Фенотипическая множественность клеточного цикла бактерий: математическая модель. *Матем. биол. биоинформ.* 2016б;11(1):91-113. DOI 10.17537/2016.11.91.
[Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Phenotypic variability of bacterial cell cycle: mathematical model. *Mathematical Biology and Bioinformatics.* 2017;12(Suppl.):t23-t44. DOI 10.17537/2017.12.t23.]

Марков А.В. Новый подход в моделировании динамики разнообразия фанерозойской морской биоты. *Журн. общ. биологии.* 2001а;62(6):460-471.
[Markov A.V. A new approach to modeling the diversity dynamics of Phanerozoic marine biota. *Zhurnal Obshchei Biologii = Journal of General Biology.* 2001а;62(6):460-471. (in Russian)]

Марков А.В. Динамика разнообразия морской фауны в фанерозое: новый подход. *Палеонтол. журнал.* 2001б;35(1):3-12.
[Markov A.V. Dynamics of the marine faunal diversity in the Phanerozoic: a new approach. *Paleontol. J.* 2001b;35(1):1-9.]

Марков А.В., Коротаев А.В. Динамика разнообразия фанерозойских морских животных соответствует модели гиперболического роста. *Журн. общ. биологии.* 2007;68(1):3-18.
[Markov A.V., Korotaev A.V. The dynamics of Phanerozoic marine animal diversity fits the hyperbolic growth model. *Zhurnal Obshchei Biologii = Journal of General Biology.* 2007;68(1):3-18. (in Russian)]

Овчаренко В.Н. Переходные формы и видовая дифференцировка брахиопод. *Палеонтол. журнал.* 1969;3:57-63.
[Ovcharenko V.N. Transitional forms and speciation of brachiopods. *Paleontologicheskii Zhurnal = Paleontological Journal.* 1969;3: 57-63. (in Russian)]

Северцов А.С. Внутривидовое разнообразие как причина эволюционной стабильности. *Журн. общ. биологии.* 1990;51(5):579-589. (2-е изд. Русский орнитологический журнал. 2014;23(1072): 3659-3673.
[Severtsov A.S. Interspecific variety as a cause of evolutionary stability. *Zhurnal Obshchei Biologii = Journal of General Biology.* 1990;51(5):579-589. (in Russian)]

Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. Молекулярные механизмы ненаследуемой толерантности к антибиотикам у бактерий и архей. *Молекуляр. биология.* 2019;53(4):531-540. DOI 10.1134/S0026898419040050.
[Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. Molecular mechanisms of non-inherited antibiotic tolerance in bacteria and archaea. *Mol. Biol. (Moscow).* 2019;53(4):475-483. DOI 10.1134/S0026893319040058.]

Alroy J. Colloquium paper: dynamics of origination and extinction in the marine fossil record. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(Suppl. 1):11536-11542. DOI 10.1073/pnas.0802597105.

Alvarez L.W., Alvarez W., Asaro F., Michel H.V. Extraterrestrial cause for the Cretaceous-Tertiary extinction. *Science.* 1980;208(4448): 1095-1108.

Alvarez L.W., Alvarez W., Asaro F., Michel H.V. Asteroid extinction hypothesis. *Science.* 1981;211(4483):654-656.

Archibald J.D., Clemens W.A., Padian K., Archibald J.D., Clemens W.A., Padian K., Rowe T., Macleod N., Barrett P.M., Gale A., Holroyd P., Sues H.D., Ares N.C., Horner J.R., Wilson G.P., Goodwin M.B., Brochu C.A., Lofgren D.L., Hurlbert S.H., Hartman J.H., Eberth D.A., Wignall P.B., Currie P.J., Weil A., Prasad G.V., Dingus L., Courtillot V., Milner A., Milner A., Bajpai S., Ward D.J., Sahni A. Cretaceous extinctions: multiple causes. *Science.* 2010; 328(5981):973.

Bacon K.L., Belcher C.M., Haworth M., McElwain J.C. Increased atmospheric SO_2 detected from changes in leaf physiognomy across the Triassic-Jurassic boundary interval of East Greenland. *PLoS One.* 2013;8(4):e60614. DOI 10.1371/journal.pone.0060614.

Bak P., Paczuski M. Complexity, contingency, and criticality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92(15):6689-6696.

Baker R.G., Flood P.G. The Sun-Earth connect 3: lessons from the periodicities of deep time influencing sea-level change and marine

- extinctions in the geological record. *SpringerPlus*. 2015;4:285. DOI 10.1186/s40064-015-0942-6.
- Bambach R.K. Species richness in marine benthic habitats through the Phanerozoic. *Paleobiology*. 1977;3(2):152-167.
- Bambach R.K., Knoll A.J., Wang S.C. Origination, extinction, and mass depletions of marine diversity. *Paleobiology*. 2004;30:522-542. DOI 10.1666/0094-8373(2004)030<0522:OEAMDO>2.0.CO;2.
- Barnosky A.D., Matzke N., Tomiya S., Wogan G.O., Swartz B., Quental T.B., Marshall C., McGuire J.L., Lindsey E.L., Maguire K.C., Mersey B., Ferrer E.A. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*. 2011;471(7336):51-57. DOI 10.1038/nature09678.
- Bartlett R., Elrick M., Wheelley J.R., Polyak V., Desrochers A., Asmerom Y. Abrupt global-ocean anoxia during the Late Ordovician-early Silurian detected using uranium isotopes of marine carbonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(23):5896-5901. DOI 10.1073/pnas.1802438115.
- Beerling D. CO₂ and the end-Triassic mass extinction. *Nature*. 2002; 415(6870):386-387.
- Benton M.J. Diversification and extinction in the history of life. *Science*. 1995;268(5207):52-58.
- Blackburn T.J., Olsen P.E., Bowring S.A., McLean N.M., Kent D.V., Puffer J., McHone G., Rasbury E.T., Et-Touhami M. Zircon U-Pb geochronology links the end-Triassic extinction with the Central Atlantic Magmatic Province. *Science*. 2013;340(6135):941-945. DOI 10.1126/science.1234204.
- Bond D.P.G., Wignall P.B. The role of sea-level change and marine anoxia in the Frasnian-Famennian (Late Devonian) mass extinction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2008;263(3-4):107-118.
- Brenneke G.A., Herrmann A.D., Algeo T.J., Anbar A.D. Rapid expansion of oceanic anoxia immediately before the end-Permian mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(43):17631-17634. DOI 10.1073/pnas.1106039108.
- Buatois L.A., Narbonne G.M., Mángano M.G., Carmona N.B., Myrow P. Ediacaran matground ecology persisted into the earliest Cambrian. *Nat. Commun.* 2014;5:3544. DOI 10.1038/ncomms4544.
- Burgess S.D., Muirhead J.D., Bowring S.A. Initial pulse of Siberian Traps sills as the trigger of the end-Permian mass extinction. *Nat. Commun.* 2017;8:164. DOI 10.1038/s41467-017-00083-9.
- Bush A.M., Hunt G., Bambach R.K. Sex and the shifting biodiversity dynamics of marine animals in deep time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(49):14073-14078.
- Ceballos G., Ehrlich P.R., Barnosky A.D., García A., Pringle R.M., Palmer T.M. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 2015;1(5):e1400253. DOI 10.1126/sciadv.1400253.
- Cermeño P., Benton M.J., Paz Ó., Vérard C. Trophic and tectonic limits to the global increase of marine invertebrate diversity. *Sci. Rep.* 2017;7:15969. DOI 10.1038/s41598-017-16257-w.
- Chen D.Z., Qing H.R., Li R.W. The Late Devonian Frasnian-Famennian (F/F) biotic crisis: Insights from delta C-13(carb), delta C-13(org) and Sr-87/Sr-86 isotopic systematics. *Earth Planet. Sci. Lett.* 2005; 235(1-2):151-166.
- Chen D.Z., Tucker M.E., Shen Y.N., Yans J., Preat A. Carbon isotope excursions and sea-level change: implications for the Frasnian-Famennian biotic crisis. *J. Geol. Soc.* 2002;59(6):623-626. DOI 10.1144/0016-764902-027.
- Claeys P., Casier J.G., Margolis S.V. Microtektites and mass extinctions: evidence for a late devonian asteroid impact. *Science*. 1992; 257(5073):1102-1104.
- Clarkson M.O., Kasemann S.A., Wood R.A., Lenton T.M., Daines S.J., Richoz S., Ohnemüller F., Meixner A., Poulton S.W., Tipper E.T. Ocean acidification and the Permo-Triassic mass extinction. *Science*. 2015;348(6231):229-232. DOI 10.1126/science.aaa0193.
- Courtillot V., Fluteau F. Cretaceous extinctions: the volcanic hypothesis. *Science*. 2010;328(5981):973-974.
- Darroch S.A., Sperling E.A., Boag T.H., Racicot R.A., Mason S.J., Morgan A.S., Tweedt S., Myrow P., Johnston D.T., Erwin D.H., Laflamme M. Biotic replacement and mass extinction of the Ediacara biota. *Proc. Biol. Sci.* 2015;282(1814):pii20151003. DOI 10.1098/rspb.2015.1003.
- Decroly O., Goldbeter A. Birhythmicity, chaos, and other patterns of temporal self-organization in a multiply regulated biochemical system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982;79(22):6917-6921.
- Dieckmann U., Law R. The dynamical theory of coevolution: a derivation from stochastic ecological processes. *J. Math. Biol.* 1996; 34(5-6):579-612.
- Eldredge N., Gould S.J. On punctuated equilibria. *Science*. 1997; 276(5311):338-341.
- Erlykin A.D., Harper D.A.T., Sloan T., Wolfendale A.W. Mass extinctions over the last 500 myr: an astronomical cause? *Palaeontology*. 2017;60(2):159-167. DOI 10.1111/pala.12283.
- Erlykin A.D., Harper D.A.T., Sloan T., Wolfendale A.W. Periodicity in extinction rates. *Palaeontology*. 2018;61:149-158. DOI 10.1111/pala.12334.
- Finnegan S., Bergmann K., Eiler J.M., Jones D.S., Fike D.A., Eisenman I., Hughes N.C., Tripathi A.K., Fischer W.W. The magnitude and duration of Late Ordovician-Early Silurian glaciation. *Science*. 2011;331(6019):903-906.
- Finnegan S., Heim N.A., Peters S.E., Fischer W.W. Climate change and the selective signature of the Late Ordovician mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(18):6829-6834.
- Gharaie M.H.M., Matsumoto R., Kakuwa Y., Milroy P.G. Late Devonian facies variety in Iran: volcanism as a possible trigger of the environmental perturbation near the Frasnian-Famennian boundary. *Geol. Quart.* 2004;48(4):323-332.
- Gharaie M.H.M., Matsumoto R., Racki G., Kakuwa Y. Chemostratigraphy of Frasnian-Famennian transition: Possibility of methane hydrate dissociation leading to mass extinction. Large ecosystem perturbations: causes and consequences. *Geological Society of America Special Paper*. 2007;424:109-125. DOI 10.1130/2007.2424(07).
- Ghienne J.F., Desrochers A., Vandenbroucke T.R., Achab A., Asselin E., Dabard M.P., Farley C., Loi A., Paris F., Wickson S., Veizer J. A Cenozoic-style scenario for the end-Ordovician glaciation. *Nat. Commun.* 2014;5:4485. DOI 10.1038/ncomms5485.
- Gill B.C., Lyons T.W., Young S.A., Kump L.R., Knoll A.H., Saltzman M.R. Geochemical evidence for widespread euxinia in the later Cambrian ocean. *Nature*. 2011;469(7328):80-83. DOI 10.1038/nature09700.
- Gingerich P.D. Paleontology and phylogeny: patterns of evolution of the species level in early tertiary mammals. *Am. J. Sci.* 1976;276: 1-28.
- Goldbeter A., Gonze D., Houart G., Leloup J.C., Halloy J., Dupont G. From simple to complex oscillatory behavior in metabolic and genetic control networks. *Chaos*. 2001;11(1):247-260.
- Gong Q., Wang X., Zhao L., Grasby S.E., Chen Z.Q., Zhang L., Li Y., Cao L., Li Z. Mercury spikes suggest volcanic driver of the Ordovician-Silurian mass extinction. *Sci. Rep.* 2017;13(7(1)):5304. DOI 10.1038/s41598-017-05524-5.
- Gould S.J., Eldredge N. Punctuated equilibria: the tempo and mode of evolution reconsidered. *Paleobiology*. 1977;3:115-151.
- Gould S.J., Eldredge N. Punctuated equilibrium comes of age. *Nature*. 1993;366(6452):223-227.
- Guex J., Pilet S., Müntener O., Bartolini A., Spangenberg J., Schoene B., Sell B., Schaltegger U. Thermal erosion of cratonic lithosphere as a potential trigger for mass-extinction. *Sci. Rep.* 2016;6:23168. DOI 10.1038/srep23168.
- Harish O., Hansel D. Asynchronous rate chaos in spiking neuronal circuits. *PLoS Comput. Biol.* 2015;11(7):e1004266. DOI 10.1371/journal.pcbi.1004266.
- Heimdal T.H., Svensen H.H., Ramezani J., Iyer K., Pereira E., Rodrigues R., Jones M.T., Callegaro S. Large-scale sill emplacement in Brazil as a trigger for the end-Triassic crisis. *Sci. Rep.* 2018;8(1):141. DOI 10.1038/s41598-017-18629-8.
- Hesse J., Gross T. Self-organized criticality as a fundamental property of neural systems. *Front. Syst. Neurosci.* 2014;8:166. DOI 10.3389/fnsys.2014.00166.

- Huang C., Joachimski M.M., Gong Y.M. Did climate changes trigger the Late Devonian Kellwasser Crisis? Evidence from a high-resolution conodont delta O-18(PO4) record from South China. *Earth Planet. Sci. Lett.* 2018;495:174-184. DOI 10.1016/j.epsl.2018.05.016.
- Huey R.B., Ward P.D. Hypoxia, global warming, and terrestrial late Permian extinctions. *Science*. 2005;308(5720):398-401.
- Hunt G. The relative importance of directional change, random walks, and stasis in the evolution of fossil lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(47):18404-18408.
- Huntley J.W., Kowalewski M. Strong coupling of predation intensity and diversity in the Phanerozoic fossil record. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(38):15006-15010.
- Jackson J.B., Cheetham A.H. Tempo and mode of speciation in the sea. *Trends Ecol. Evol.* 1999;14(2):72-77.
- Joachimski M.M., Buggisch W. Anoxic events in the late Frasnian – causes of the Frasnian-Famennian faunal crisis. *Geology*. 1993; 21(8):675-678.
- Kaiho K., Oshima N. Site of asteroid impact changed the history of life on Earth: the low probability of mass extinction. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):14855. DOI 10.1038/s41598-017-14199-x.
- Kaiho K., Oshima N., Adachi K., Adachi Y., Mizukami T., Fujibayashi M., Saito R. Global climate change driven by soot at the K-Pg boundary as the cause of the mass extinction. *Sci. Rep.* 2016;6: 28427. DOI 10.1038/srep28427.
- Kaiho K., Yatsu S., Oba M., Gorjan P., Gorjan P., Casier J.G., Ikeda M. A forest fire and soil erosion event during the Late Devonian mass extinction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2013;392: 272-280. DOI 10.1016/j.palaeo.2013.09.008.
- Keller G., Adatte T., Pardo A., Bajpai S., Khosla A., Samant B. Cretaceous extinctions: evidence overlooked. *Science*. 2010;328(5981): 974-975. DOI 10.1126/science.328.5981.974-a.
- Khlebodarova T.M., Kogai V.V., Trifonova E.A., Likhoshvai V.A. Dynamic landscape of the local translation at activated synapses. *Mol. Psychiatry*. 2018;23(1):107-114. DOI 10.1038/mp.2017.245.
- Khlebodarova T.M., Kogai V.V., Fadeev S.I., Likhoshvai V.A. Chaos and hyperchaos in simple gene network with negative feedback and time delays. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2017;15(2):1650042. DOI 10.1142/S0219720016500426.
- Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. Persister cells – a plausible outcome of neutral coevolutionary drift. *Sci. Rep.* 2018;8(1):14309. DOI 10.1038/s41598-018-32637-2.
- Knoll A.H., Bambach R.K., Canfield D.E., Grotzinger J.P. Comparative Earth history and Late Permian mass extinction. *Science*. 1996; 273:452-457.
- Kogai V.V., Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Multiple scenarios of transition to chaos in the alternative splicing model. *Int. J. Bifurcat. Chaos*. 2017;27(2):1730006. DOI 10.1142/S0218127417300063.
- Lamsdell J.C., Selden P.A. From success to persistence: Identifying an evolutionary regime shift in the diverse Paleozoic aquatic arthropod group Eurypterida, driven by the Devonian biotic crisis. *Evolution*. 2017;71(1):95-110. DOI 10.1111/evo.13106.
- Lau K.V., Maher K., Altiner D., Kelley B.M., Kump L.R., Lehmann D.J., Silva-Tamayo J.C., Weaver K.L., Yu M., Payne J.L. Marine anoxia and delayed Earth system recovery after the end-Permian extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(9):2360-2365. DOI 10.1073/pnas.1515080113.
- Lieberman B.S., Melott A.L. Considering the case for biodiversity cycles: re-examining the evidence for periodicity in the fossil record. *PLoS One*. 2007;2(8):e759.
- Lieberman B.S., Melott A.L. Whilst this planet has gone cycling on: what role for periodic astronomical phenomena in large-scale patterns in the history of life? In: Talent J.A. (Ed.). *Earth and Life, International Year of Planet Earth*. Springer Science and Business Media B.V., 2012;37-50.
- Likhoshvai V.A., Kogai V.V., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Alternative splicing can lead to chaos. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2015; 13(1):1540003. DOI 10.1142/S021972001540003X.
- Likhoshvai V.A., Kogai V.V., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Chaos and hyperchaos in a model of ribosome autocatalytic synthesis. *Sci. Rep.* 2016;6:38870. DOI 10.1038/srep38870.
- Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Latent phenotype as adaptation reserve: a simplest model of cell evolution. Proc. of the II Int. Conf. “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure”. Novosibirsk. 2000;1:195-198.
- Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Sporadic emergence of latent phenotype during evolution. In: Kolchanov N., Hofstaedt R. (Eds.). *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure*. Boston; Dordrecht; London: Kluwer Academic Publishers, 2004;231-243.
- Lindskog A., Costa M.M., Rasmussen C.M., Connelly J.N., Eriksson M.E. Refined Ordovician timescale reveals no link between asteroid breakup and biodiversification. *Nat. Commun.* 2017;8:14066. DOI 10.1038/ncomms14066.
- Lindström S., Sanei H., van de Schootbrugge B., Pedersen G.K., Leshner C.E., Tegner C., Heunisch C., Dybkjær K., Outridge P.M. Volcanic mercury and mutagenesis in land plants during the end-Triassic mass extinction. *Sci. Adv.* 2019;5(10):eaaw4018. DOI 10.1126/sciadv.aaw4018.
- Liu J.S., Qie W.K., Algeo T.J., Yao L., Huang J.H., Luo G.M. Changes in marine nitrogen fixation and denitrification rates during the end-Devonian mass extinction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2016;448:195-206. DOI 10.1016/j.palaeo.2015.10.022.
- Ma X.P., Gong Y.M., Chen D.Z., Racki G., Chen X.Q., Liao W.H. The Late Devonian Frasnian-Famennian event in South China – patterns and causes of extinctions, sea level changes, and isotope variations. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2016;448:224-244. DOI 10.1016/j.palaeo.2015.10.047.
- Mackey M.C., Glass L. Oscillation and chaos in physiological control systems. *Science*. 1977;197:287-289.
- Madin J.S., Alroy J., Aberhan M., Fürsich F.T., Kiessling W., Kosnik M.A., Wagner P.J. Statistical independence of escalatory ecological trends in Phanerozoic marine invertebrates. *Science*. 2006; 312(5775):897-900.
- Martinez de la Fuente I., Martinez L., Veguillas J., Aguirregabiria J.M. Quasiperiodicity route to chaos in a biochemical system. *Biophys. J.* 1996;71(5):2375-2379.
- Marzoli A., Renne P.R., Piccirillo E.M., Ernesto M., Bellieni G., De Min A. Extensive 200-million-year-old continental flood basalts of the central atlantic magmatic province. *Science*. 1999;284(5414): 616-618.
- Mattila T.M., Bokma F. Extant mammal body masses suggest punctuated equilibrium. *Proc. Biol. Sci.* 2008;275(1648):2195-2199. DOI 10.1098/rspb.2008.0354.
- Mayhew P.J., Bell M.A., Benton T.G., McGowan A.J. Biodiversity tracks temperature over time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(38):15141-15145.
- McElwain J.C., Beerling D.J., Woodward F.I. Fossil plants and global warming at the Triassic-Jurassic boundary. *Science*. 1999;285:1386-1390.
- Medvedev M.V., Melott A.L. Do extragalactic cosmic rays induce cycles in fossil diversity? *Astrophys. J.* 2007;664(2):879-889. DOI 10.1086/518757.
- Melott A.L. Long-term cycles in the history of life: periodic biodiversity in the paleobiology database. *PLoS One*. 2008;3(12):e4044. DOI 10.1371/journal.pone.0004044.
- Melott A.L., Bambach R.K. Analysis of periodicity of extinction using the 2012 geological time scale. *Paleobiology*. 2014;40:177-196. DOI 10.1666/13047.
- Melott A.L., Bambach R.K. Periodicity in the extinction rate and possible astronomical causes – comment on mass extinctions over the last 500 myr: an astronomical cause? (Erlykin et al.). *Palaeontology*. 2017;60:911-920. DOI 10.1111/pala.12322.
- Melott A.L., Bambach R.K., Petersen K.D., McArthur J.M. An similar to 60-million-year periodicity is common to marine ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr, fossil biodiversity, and large-scale sedimentation: what does the periodicity reflect? *J. Geol.* 2012;120(2):217-226. DOI 10.1086/663877.

- Miller C.S., Peterse F., da Silva A.C., Baranyi V., Reichart G.J., Kürschner W.M. Astronomical age constraints and extinction mechanisms of the Late Triassic Carnian crisis. *Sci. Rep.* 2017;7(1):2557. DOI 10.1038/s41598-017-02817-7.
- Newman M.E. A model of mass extinction. *J. Theor. Biol.* 1997a; 189(3):235-252.
- Newman M.E. Evidence for self-organized criticality in evolution. *Physica D.* 1997b;107:293-296.
- Nichol S.T., Rowe J.E., Fitch W.M. Punctuated equilibrium and positive Darwinian evolution in vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90:10424-10428.
- Novack-Gottshall P.M. Love, not war, drove the Mesozoic marine revolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(51):14471-14473. DOI 10.1073/pnas.1617404113.
- Nykter M., Price N.D., Aldana M., Ramsey S.A., Kauffman S.A., Hood L.E., Yli-Harja O., Shmulevich I. Gene expression dynamics in the macrophage exhibit criticality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(6):1897-1900. DOI 10.1073/pnas.0711525105.
- Pagel M., Venditti C., Meade A. Large punctuational contribution of speciation to evolutionary divergence at the molecular level. *Science.* 2006;314:119-121. DOI 10.1126/science.1129647.
- Palmer S.A., Clapham A.J., Rose P., Freitas F.O., Owen B.D., Beresford-Jones D., Moore J.D., Kitchen J.L., Allaby R.G. Archaeogenomic evidence of punctuated genome evolution in *Gossypium*. *Mol. Biol. Evol.* 2012;29:2031-2038. DOI 10.1093/molbev/mss070.
- Penn J.L., Deutsch C., Payne J.L., Sperling E.A. Temperature-dependent hypoxia explains biogeography and severity of end-Permian marine mass extinction. *Science.* 2018;362(6419):eaat1327. DOI 10.1126/science.aat1327.
- Percival L.M.E., Davies J.H.F.L., Schaltegger U., De Vleeschouwer D., Da Silva A.C., Föllmi K.B. Precisely dating the Frasnian-Famennian boundary: implications for the cause of the Late Devonian mass extinction. *Sci. Rep.* 2018;8(1):9578. DOI 10.1038/s41598-018-27847-7.
- Percival L.M.E., Ruhl M., Hesselbo S.P., Jenkyns H.C., Mather T.A., Whiteside J.H. Mercury evidence for pulsed volcanism during the end-Triassic mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017; 114(30):7929-7934. DOI 10.1073/pnas.1705378114.
- Peters S.E. Environmental determinants of extinction selectivity in the fossil record. *Nature.* 2008;454(7204):626-629. DOI 10.1038/nature07032.
- Petersen H.I., Lindström S. Synchronous wildfire activity rise and mire deforestation at the Triassic-Jurassic boundary. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47236. DOI 10.1371/journal.pone.0047236.
- Prokoph A., Ernst R.E., Buchan K.L. Time-series analysis of large igneous provinces: 3500 Ma to present. *J. Geol.* 2004;112(1):1-22. DOI 10.1086/379689.
- Rampino M.R. Disc dark matter in the Galaxy and potential cycles of extraterrestrial impacts, mass extinctions and geological events. *MNRAS.* 2015;448(2):1816-1820. DOI 10.1093/mnras/stu2708.
- Rampino M.R., Caldeira K. Periodic impact cratering and extinction events over the last 260 million years. *MNRAS.* 2015;454(4):3480-3484. DOI 10.1093/mnras/stv2088.
- Rampino M.R., Haggerty B.M., Pagano T.C. A unified theory of impact crises and mass extinctions: quantitative tests. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1997;822:403-431.
- Rampino M.R., Rodriguez S., Baransky E., Cai Y. Global nickel anomaly links Siberian Traps eruptions and the latest Permian mass extinction. *Sci. Rep.* 2017;7(1):12416. DOI 10.1038/s41598-017-12759-9.
- Rampino M.R., Stothers R.B. Geological rhythms and cometary impacts. *Science.* 1984;226:1427-1431.
- Rasmussen C.M.Ø., Kröger B., Nielsen M.L., Colmenar J. Cascading trend of Early Paleozoic marine radiations paused by Late Ordovician extinctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(15):7207-7213. DOI 10.1073/pnas.1821123116.
- Rasskin-Gutman D., Esteve-Altava B. The multiple directions of evolutionary change. *Bioessays.* 2008;30(6):521-525. DOI 10.1002/bies.20766.
- Raup D.M., Sepkoski J.J. Jr. Mass extinctions in the marine fossil record. *Science.* 1982;215(4539):1501-1503.
- Raup D.M., Sepkoski J.J. Periodicity of extinctions in the geologic past. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984;81(3):801-805.
- Raup D.M., Sepkoski J.J. Jr. Periodic extinction of families and genera. *Science.* 1986;231:833-836.
- Ricci J., Quidelleur X., Pavlov V., Orlov S., Shatsillo A., Courtillot V. New ⁴⁰Ar/³⁹Ar and K-Ar ages of the Viluy traps (Eastern Siberia): Further evidence for a relationship with the Frasnian-Famennian mass extinction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2013; 386:531-540. DOI 10.1016/j.palaeo.2013.06.020.
- Roberts B.W., Newman M.E. A model for evolution and extinction. *J. Theor. Biol.* 1996;180(1):39-54.
- Roberts G.G., Mannion P.D. Timing and periodicity of Phanerozoic marine biodiversity and environmental change. *Sci. Rep.* 2019;9(1): 6116. DOI 10.1038/s41598-019-42538-7.
- Robertson D.S. Feedback theory and Darwinian evolution. *J. Theor. Biol.* 1991;152(4):469-484.
- Rohde R.A., Muller R.A. Cycles in fossil diversity. *Nature.* 2005; 434(7030):208-210.
- Sallan L.C., Coates M.I. End-Devonian extinction and a bottleneck in the early evolution of modern jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(22):10131-10135. DOI 10.1073/pnas.0914000107.
- Schaller M.F., Wright J.D., Kent D.V. Atmospheric PCO₂ perturbations associated with the Central Atlantic Magmatic Province. *Science.* 2011;331(6023):1404-1409. DOI 10.1126/science.1199011.
- Schmitz B., Farley K.A., Goderis S., Heck P.R., Bergström S.M., Boschi S., Claeys P., Debaille V., Dronov A., van Ginneken M., Harper D.A.T., Iqbal F., Friberg J., Liao S., Martin E., Meier M.M.M., Peucker-Ehrenbrink B., Soens B., Wieler R., Terfelt F. An extraterrestrial trigger for the mid-Ordovician ice age: Dust from the breakup of the L-chondrite parent body. *Sci. Adv.* 2019;5(9):eaax4184. DOI 10.1126/sciadv.aax4184.
- Schoene B., Eddy M.P., Samperton K.M., Keller C.B., Keller G., Adatte T., Khadri S.F.R. U-Pb constraints on pulsed eruption of the Deccan Traps across the end-Cretaceous mass extinction. *Science.* 2019;363(6429):862-866. DOI 10.1126/science.aau2422.
- Schoene B., Samperton K.M., Eddy M.P., Keller G., Adatte T., Bowring S.A., Khadri S.F., Gertsch B. U-Pb geochronology of the Deccan Traps and relation to the end-Cretaceous mass extinction. *Science.* 2015;347(6218):182-184. DOI 10.1126/science.aaa0118.
- Schulte P., Alegret L., Arenillas I., Arz J.A., Barton P.J., Bown P.R., Bralower T.J., Christeson G.L., Claeys P., Cockell C.S., Collins G.S., Deutsch A., Goldin T.J., Goto K., Grajales-Nishimura J.M., Grieve R.A., Gulick S.P., Johnson K.R., Kiessling W., Koeberl C., Kring D.A., MacLeod K.G., Matsui T., Melosh J., Montanari A., Morgan J.V., Neal C.R., Nichols D.J., Norris R.D., Pierazzo E., Ravizza G., Rebolledo-Vieyra M., Reimold W.U., Robin E., Salge T., Speijer R.P., Sweet A.R., Urrutia-Fucugauchi J., Vajda V., Whalen M.T., Willumsen P.S. The Chicxulub asteroid impact and mass extinction at the Cretaceous-Paleogene boundary. *Science.* 2010;327(5970):1214-1218. DOI 10.1126/science.1177265.
- Seaborg D.M. Evolutionary feedback: a new mechanism for stasis and punctuated evolutionary change based on integration of the organism. *J. Theor. Biol.* 1999;198(1):1-26.
- Sepkoski J.J. Jr. Extinctions of life. *Los Alamos Sci.* 1988;16:36-49.
- Sepkoski J.J. Jr. Periodicity in extinction and the problem of catastrophism in the history of life. *J. Geol. Soc. London.* 1989;146:7-19.
- Sepkoski J.J. Jr. A compendium of fossil marine animal genera. *Bull. Am. Paleontol.* 2002;363:1-560.
- Sheehan P.M. The Late Ordovician mass extinction. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2001;29:331-364.
- Sheets H.D., Mitchell C.E., Melchin M.J., Loxton J., Štorch P., Carlucci K.L., Hawkins A.D. Graptolite community responses to global climate change and the Late Ordovician mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(30):8380-8385. DOI 10.1073/pnas.1602102113.

- Shen J., Chen J., Algeo T.J., Yuan S., Feng Q., Yu J., Zhou L., O'Connell B., Planavsky N.J. Evidence for a prolonged Permian-Triassic extinction interval from global marine mercury records. *Nat. Commun.* 2019;10(1):1563. DOI 10.1038/s41467-019-09620-0.
- Shen Y., Farquhar J., Zhang H., Masterson A., Zhang T., Wing B.A. Multiple S-isotopic evidence for episodic shoaling of anoxic water during Late Permian mass extinction. *Nat. Commun.* 2011;2:210. DOI 10.1038/ncomms1217.
- Smolarek-Lach J., Marynowski L., Trela W., Wignall P.B. Mercury spikes indicate a volcanic trigger for the Late Ordovician mass extinction event: an example from a deep shelf of the Peri-Baltic region. *Sci. Rep.* 2019;9(1):3139. DOI 10.1038/s41598-019-39333-9.
- Sneppen K., Bak P., Flyvbjerg H., Jensen M.H. Evolution as a self-organized critical phenomenon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:5209-5213.
- Solé R.V., Manrubia S.C. Extinction and self-organized criticality in a model of large-scale evolution. *Phys. Rev. E.* 1996;54(1):R42-R45.
- Solé R.V., Saldaña J., Montoya J.M., Erwin D.H. Simple model of recovery dynamics after mass extinction. *J. Theor. Biol.* 2010;267(2):193-200. DOI 10.1016/j.jtbi.2010.08.015.
- Song H., Wignall P.B., Chu D., Tong J., Sun Y., Song H., He W., Tian L. Anoxia/high temperature double whammy during the Permian-Triassic marine crisis and its aftermath. *Sci. Rep.* 2014;4:4132. DOI 10.1038/srep04132.
- Sun H., Xiao Y., Gao Y., Zhang G., Casey J.F., Shen Y. Rapid enhancement of chemical weathering recorded by extremely light seawater lithium isotopes at the Permian-Triassic boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(15):3782-3787. DOI 10.1073/pnas.1711862115.
- Sutcliffe O.E., Dowdeswell J.A., Whittington R.J., Theron J.N., Craig J. Calibrating the Late Ordovician glaciation and mass extinction by the eccentricity cycles of Earth's orbit. *Geology.* 2000;28(11):967-970. DOI 10.1130/0091-7613(2000)028<0967:CTLOGA>2.3.CO;2.
- Tanner L.H., Hubert J.F., Coffey B.P., McInerney D.P. Stability of atmospheric CO₂ levels across the Triassic/Jurassic boundary. *Nature.* 2001;411(6838):675-677.
- Tennant J.P., Mannion P.D., Upchurch P. Sea level regulated tetrapod diversity dynamics through the Jurassic/Cretaceous interval. *Nat. Commun.* 2016;7:12737. DOI 10.1038/ncomms12737.
- Them T.R. 2nd, Gill B.C., Caruthers A.H., Gerhardt A.M., Gröcke D.R., Lyons T.W., Marroquin S.M., Nielsen S.G., Trabucho Alexandre J.P., Owens J.D. Thallium isotopes reveal protracted anoxia during the Toarcian (Early Jurassic) associated with volcanism, carbon burial, and mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(26):6596-6601. DOI 10.1073/pnas.1803478115.
- Thibodeau A.M., Ritterbush K., Yager J.A., West A.J., Ibarra Y., Bottjer D.J., Berelson W.M., Bergquist B.A., Corsetti F.A. Mercury anomalies and the timing of biotic recovery following the end-Triassic mass extinction. *Nat. Commun.* 2016;7:11147. DOI 10.1038/ncomms11147.
- Valentine J.W., Moores E.M. Plate-tectonic regulation of faunal diversity and sea level: a model. *Nature.* 1970;228:657-659.
- Valverde S., Ohse S., Turalaska M., West B.J., Garcia-Ojalvo J. Structural determinants of criticality in biological networks. *Front. Physiol.* 2015;6:127. DOI 10.3389/fphys.2015.00127.
- Van Bocxlaer B., Damme D.V., Feibel C.S. Gradual versus punctuated equilibrium evolution in the Turkana Basin molluscs: evolutionary events or biological invasions? *Evolution.* 2008;62(3):511-520. DOI 10.1111/j.1558-5646.2007.00296.x.
- Veizer J., Godderis Y., Francois L. Evidence for decoupling of atmospheric CO₂ and global climate during the Phanerozoic eon. *Nature.* 2000;408:698-701. DOI 10.1038/35047044.
- Voje K.L. Tempo does not correlate with mode in the fossil record. *Evolution.* 2016;70(12):2678-2689. DOI 10.1111/evo.13090.
- Voje K.L., Starrfelt J., Liow L.H. Model adequacy and microevolutionary explanations for stasis in the fossil record. *Am. Nat.* 2018;191(4):509-523. DOI 10.1086/696265.
- Wang X., Liu S.A., Wang Z.R., Chen D.Z., Zhang L.Y. Zinc and strontium isotope evidence for climate cooling and constraints on the Frasnian-Famennian (similar to 372 Ma) mass extinction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2018;498:68-82. DOI 10.1016/j.palaeo.2018.03.002.
- Whiteside J.H., Olsen P.E., Eglinton T., Brookfield M.E., Sambrotto R.N. Compound-specific carbon isotopes from Earth's largest flood basalt eruptions directly linked to the end-Triassic mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(15):6721-6725. DOI 10.1073/pnas.1001706107.
- Wignall P.B., Sun Y., Bond D.P., Izon G., Newton R.J., Védérine S., Widdowson M., Ali J.R., Lai X., Jiang H., Cope H., Bottrell S.H. Volcanism, mass extinction, and carbon isotope fluctuations in the Middle Permian of China. *Science.* 2009;324(5931):1179-1182. DOI 10.1126/science.1171956.
- Williamson P.O. Palaeontological documentation of speciation in Cenozoic molluscs from Turkana basin. *Nature.* 1981;293:437-443.
- Wolf Y.I., Viboud C., Holme E.C., Koonin E.V., Lipman D.J. Long intervals of stasis punctuated by bursts of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. *Biol. Direct.* 2006;1:34. DOI 10.1186/1745-6150-1-34.
- Xiao S., Laflamme M. On the eve of animal radiation: phylogeny, ecology and evolution of the Ediacara biota. *Trends Ecol. Evol.* 2009;24(1):31-40.
- Zaffos A., Finnegan S., Peters S.E. Plate tectonic regulation of global marine animal diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114(22):5653-5658. DOI 10.1073/pnas.1702297114.
- Zhang F., Romaniello S.J., Algeo T.J., Lau K.V., Clapham M.E., Richoz S., Herrmann A.D., Smith H., Horacek M., Anbar A.D. Multiple episodes of extensive marine anoxia linked to global warming and continental weathering following the latest Permian mass extinction. *Sci. Adv.* 2018a;4(4):e1602921. DOI 10.1126/sciadv.1602921.
- Zhang F., Xiao S., Kendall B., Romaniello S.J., Cui H., Meyer M., Gil-leaudeau G.J., Kaufman A.J., Anbar A.D. Extensive marine anoxia during the terminal Ediacaran Period. *Sci. Adv.* 2018b;4(6):eaan8983. DOI 10.1126/sciadv.aan8983.
- Zhu Z., Liu Y., Kuang H., Benton M.J., Newell A.J., Xu H., An W., Ji S., Xu S., Peng N., Zhai Q. Altered fluvial patterns in North China indicate rapid climate change linked to the Permian-Triassic mass extinction. *Sci. Rep.* 2019;9(1):16818. DOI 10.1038/s41598-019-53321-z.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-14-50159. Авторы благодарят В.В. Сулова за критические замечания и полезную дискуссию при подготовке рукописи к публикации.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.12.2019. После доработки 03.02.2020. Принята к публикации 24.03.2020.

Diagnosis of the mechanisms of different types of discordances between phylogenies inferred from nuclear and mitochondrial markers

A.A. Poroshina , D.Y. Sherbakov, T.E. Peretolchina

Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

 e-mail: a.poroshina@lin.irk.ru

Abstract. In ancient freshwater lakes, an abnormally large species diversity is observed. The mechanisms that generated extremely high biodiversity in the ancient lakes have not been sufficiently studied and remain only partially known. Sequences of environmental changes in highly complex ecosystems such as Lake Baikal, may induce sophisticated combinations of microevolutionary processes. These processes are likely to result in unusual “patterns” of genetic variability of species. The most unusual patterns include the ones when speciation is followed by incomplete lineage sorting as well as mitochondrial or nuclear introgression. All these phenomena are diagnosed by comparing the topologies of phylogenetic trees inferred from molecular markers of evolution located in mitochondria and nuclei. Mitochondrial and nuclear introgression is a particularly interesting and complex case, which is the process of incorporating the gene alleles of one species into the gene pool of a sister species due to interspecific hybridization (introgressive hybridization). In many cases, existing methods for molecular phylogenetic analysis do not automatically allow the observed patterns of polymorphism to be explained and, therefore, cannot provide hypotheses that would explain the mechanisms which resulted to these patterns. Here we use adaptive dynamics models to study neutral molecular evolution under various scenarios of interaction between sister species and the environment. We propose and justify a set of criteria for detecting how two evolutionary trees may differ, with a special focus on comparing a tree inferred from nuclear DNA to one from mitochondrial DNA. The criteria react to branching pattern and branch lengths, including relative distances from ancestral lineages. Simulations show that the criteria allow fast and automated detection of various types of introgression, secondary breaches of reproductive barriers, and incomplete lineage sorting.


Key words: mitochondrial introgression; incomplete lineage sorting; ancient lakes; sympatric speciation; parapatric speciation; disagreements between phylogenies; Lake Baikal.

For citation: Poroshina A.A., Sherbakov D.Y., Peretolchina T.E. Diagnosis of the mechanisms of different types of discordances between phylogenies inferred from nuclear and mitochondrial markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):420-426. DOI 10.18699/VJ20.634

Метод выявления и определения типов несоответствий между филогенетическими деревьями, построенными по ядерным и митохондриальным маркерам

А.А. Порошина , Д.Ю. Щербakov, Т.Е. Перетолчина

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

 e-mail: a.poroshina@lin.irk.ru

Аннотация. В древних пресноводных озерах наблюдается аномально большой видовой состав организмов. Механизмы, которые обусловили формирование биоразнообразия в древних озерах, еще недостаточно изучены. Микроэволюционные процессы, приводящие в конечном итоге к видообразованию, включают в себя в качестве элементарных процессов изменения численности особей, миграцию и репродуктивную изоляцию. В природных условиях, особенно в такой сложной экосистеме, как экосистема Байкала, комбинации микроэволюционных процессов могут носить самый причудливый характер и порождать необычные «узоры» генетической изменчивости видов. К наиболее необычным следам сложных видообразовательных процессов относятся унаследованный полиморфизм, а также митохондриальная и ядерная интрогрессии. Эти явления диагностируются на основании сравнения топологий филогенетических деревьев, построенных по ядерным и митохондриальным молекулярным маркерам эволюции. Особенно интересный и сложный случай – митохондриальная и ядерная интрогрессия, представляющая собой процесс включения аллелей генов одного вида в генофонд сестринского вида при межвидовой гибридизации (интрогрессивная гибридизация). Часто существующие методы анализа генетического полиморфизма не позволяют автоматически находить объяснение наблюдаемых картин полиморфизма и, следовательно, предлагать гипотезы, которые бы раскрыли меха-

низмы, породившие эти картины. В настоящей работе мы используем модели адаптивной динамики для изучения нейтральной молекулярной эволюции при различных сценариях взаимодействия между сестринскими видами и окружающей средой. Мы предлагаем набор критериев для определения того, как могут различаться два эволюционных дерева, построенных с использованием последовательностей ядерной и митохондриальной ДНК. Моделирование показывает, что критерии позволяют быстро и автоматически выявлять различные типы интрогрессии, вторичные нарушения репродуктивных барьеров и неполное расхождение видов.

Ключевые слова: митохондриальная интрогрессия; неполная сортировка родословной; древние озера; симпатрическое видообразование; парапатрическое видообразование; разногласия между филогениями; озеро Байкал.

Introduction

Significant advances in gathering the data on genetic polymorphisms of all kinds of organisms have shed light on important features of the evolutionary process. For example, recent technique, allow one to study previously cryptic features of the mechanisms, generating and maintaining the diversity of life. Among the most challenging foci of modern evolutionary studies are the hyper-diverse and geographically constrained ancient freshwater lakes (Lake Baikal in East Siberia, Lake Tanganyika in East Africa etc). These lakes are inhabited by rapidly evolving species assemblages generated by adaptive radiation, mostly in sympatry, and ultimately responding to the fast and powerful environmental challenges generated by global changes (Brooks, 1950; Sherbakov, 1999; Salzburger et al., 2014). Studies of speciation processes in ancient lakes revealed numerous cases of presumably complicated evolutionary histories and therefore many unexpected patterns of genetic diversity. The most striking are the cases of dramatic discordance between the patterns resulting the studies of mitochondrial and nuclear DNA described in (Nevado et al., 2009; Sturmbauer et al., 2010; Kéver et al., 2018).

Although these phenomena are well and long known to exist in many species, their explanations involve the assumption of large-scale range shifts (Toews, Brelsford, 2012; Schön, Martens, 2012) and thus are hardly applicable to the situations of sympatric or parapatric speciation responsible for the most of the species diversification in relatively small and closed ecosystems. A systematic study of disagreements between mitochondrial and nuclear phylogenies requires a formal procedure automating search for such cases, such as testing significance of the disagreement and modelling of evolutionary scenarios likely to cause generation of the discrepancies between nuclear and cytoplasmic phylogenies. Here we describe fast simultaneous analysis of two tree topologies allowing one to detect a discordance, test its significance and diagnose its type. We test this approach on a set of trees resulting simulations of evolutionary events and on the real-world data set on endemic to Lake Baikal gastropods of genus *Baicalia*.

Materials and methods

Individual based modeling. Individual-based models (Grimm, Railsback, 2005) simulating evolution of two sister species of diploid organisms possessing both mitochondrial and nuclear DNA markers were designed as described in (Semovski et al., 2004). Differential responses of the sister species to the same environmental challenges were modelled by pre-setting independent curves of environmental niche capacity for the two sympatrically occurring species. Model also allows independent variation of gene flows between the species thus mimicking asymmetric or symmetric breach of

the reproductive barrier during defined periods of time. Each simulation was succeeded by collection of certain amount (usually 100 of each to make it comparable to an experimental study) of marker sequences from the same “individuals”, saved in separate files and maximum likelihood trees were inferred with PhyML version 3.3.20180129 (Guindon et al., 2010), using the model of molecular evolution set to JC because of the simulation settings. Tree comparisons were performed with custom Python scripts using ete2 library (Huerta-Cepas et al., 2010).

Types of discordances between mitochondrial and nuclear markers. Discordance between nuclear and mitochondrial trees should be declared when their branching patterns differ significantly so that one of them looks distorted strongly if compared to the other. We test following kinds of phylogeny discordances of two sister groups of organisms may occur:

- **splitting into two species;**
- **introgression** is when on the one tree all groups form separate clades, while on the other tree one group appears inside the cluster formed by the other group. In other words, the common for one group allele becomes fully substituted with the allele originated from the other group;
- **inherited polymorphism (incomplete lineage sorting)** is when due to recent breach of reproductive barrier both groups acquire alleles from the other ones. Discriminating between different types of branching order discordances.

In order to detect the cases of introgressions while comparing data sets, we had developed the test, which was used then to optimize the processing of fairly large amounts of data. The test employs three values estimated from the phylogenies (Fig. 1). The first value is the corrected mutational distance between the common ancestors of the two species (nodes L_A and L_B) and the most basal node CA (common ancestor of the two species). In the case of inherited polymorphism all three points in fact are the same point and thus all three distances are equal to zero. Therefore if all three distances insignificantly differ from zero one may assume incomplete sorting of ancestral lineages. Obviously all three distances would have significant lengths if unaccomplished divergence of the two species took place. We can also find the distance between CA and L (d) for two species and find their difference (D). With inherited polymorphism and separation into two types, the distances d_a and d_b will be approximately equal.

The second value useful for detecting of introgression is the sum of all distances from all representatives of the same species to the most recent common ancestral node of the tree (E_Σ if the number of specimens of the two species analyzed is very far from equal, the average distance \hat{E} by a species must be used). In spite of any accomplishments this value should be approximately equal if molecular clock hypothesis holds.

The latter condition may be tested separately. The significantly different from zero value of the difference between \hat{E}_A and \hat{E}_B determined for one molecular marker, i. e. mitochondrial gene while remaining approximately equal for other marker(s) points at full introgression (see Fig. 1).

The possibility of a dramatic violations of molecular clock hypothesis as well as numerous other reasons make it necessary to support the hypothesis on the introgression independently. Here we propose to use for that purpose the test for monophyly of the clades in question. We employed the simplest form of the test as it is implemented in ete2 and ete3 libraries for Python (<http://etetoolkit.org/>). Based on the topology of the tree it calculates the coefficient of monophyly, P . It becomes 0 in case of a monophyletic clade and 1 in case of polyphyly.

The values and designations involved in the analysis are: P – inherited polymorphism; I – introgression; $2s$ – two species; P – coefficient of polyphyleticity (0: monophyletic, 1: polyphyletic); CA – closest common ancestor; L – furthest descendant of the common ancestor indexed by the species; d – distance (along the tree) from CA to L indexed by the species.

It is important to note that the protocol (pipeline) described here makes it easy to test directly the statistical significance of the diagnosis. This may be done by applying it to the bootstrap replicates of the original data set followed by odds ratio test to estimate the support to the conclusion.

In the case of the full introgression all sequences of one type appear as the ingroup(s) to the recipient type. The other marker yields monophyletic clusters consisting of a single type of sequences. The four cases above may be diagnosed by measuring the distances between the common ancestors of sequences as they appear on the tree and comparing them to distances from the common ancestors to the common root in combination with the monophyleticity test for the both sister groups. Indeed, the inner branch between the common ancestors of two groups passes the node defined by the outgroup in all cases except for complete introgression. In the latter case the common ancestor of the recipient group is connected to the outgroup via the common ancestor of the donor group. In this case the donor group is always polyphyletic, while the recipient may be both monophyletic or polyphyletic if the introgression occurred more then, once or multiple donor's lineages were involved. Mutual introgression from the recent bi-directional hybridization generates the latter pattern in both directions. In this case each type of sequences appears in the other cluster as an ingroup.

Introgression differs from incomplete lineage sorting because in former case common ancestors of the invader (donated) lineages would be significantly younger then the common ancestor of the recipient. In contrast, incomplete sorting of ancestral lineages results in the absence of separate clusters for the two groups in case of one of the markers. The simplest cause of the latter may be the insufficient rate of molecular evolution of the marker affected.

In all cases the internal branching order must be robustly supported, and the branches crucial for the diagnosis must have significant lengths. Therefore testing the diagnosis significance simply turns into testing the significance of the sum of branch lengths between common ancestors of the groups (species)

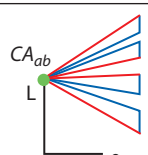
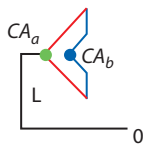
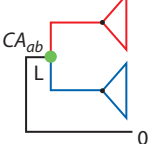
	Tree	D	P
IP		$d_a = d_b$	1
I		$d_a \neq d_b$	1
2s		$d_a = d_b$	0

Fig. 1. Schematic representation of the distortions to the tree topology resulting the inherited polymorphism (incomplete lineage sorting) and full introgression as compared to the unspoiled separation of two sister species.

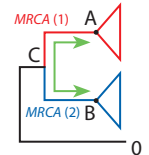
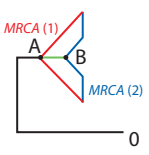
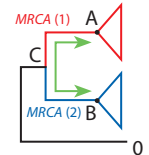
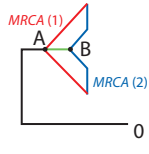
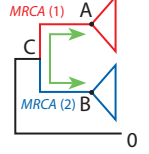
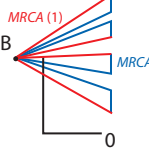
	Mitochondrial introgression	Nuclear introgression	Inherited polymorphism
a			
b			

Fig. 2. The respective position of the most recent common ancestors (MRCA) in trees inferred from nuclear and mitochondrial introgressions.

Upperraw (a): trees inferred from nuclear markers, lower raw (b): trees inferred from mitochondrial markers.

and the most ancestral node of the tree. There are several methods of estimating the confidence limits of the branch length (Felsenstein, Felsenstein, 2004; Anisimova, Gascuel, 2006).

Additional feature helping to diagnose the distortions of tree topology is the monophyleticity of the groups. In the case of the lack of any discordance, the mutual correspondence must hold between the groups and clades on the tree.

If the tree is rooted by outgroup (Fig. 2, scheme of a fully resolved phylogeny of two groups showing designations used in this paper) CA_A and CA_B labelled with colored dots designate the common ancestors of the respective groups, O is their common ancestor as it is defined by the outgroup) linked to the common ancestor of species A and B with their common ancestors designated as it is shown on the same figure, the relative position of the three nodes will distinguish

Table 1. Diagnostic of the tree distortions (nuclear or mitochondrial)

Pattern	Group A is monophyletic	Group B is monophyletic	CA_A	CA_B	$CA_{A \in B}$	$CA_{B \in A}$
Division into 2 species	+	+	>L	>L	0	0
Introggression	-	+	$\geq L$	$\geq L$	> 0	0
Inherited polymorphism	-	-	=L	=L	0	0

between full introgressions if taken together with the results of testing the groups for monophyleticity. All possible outcomes are summarized in Table 1 (L is the distance between the common ancestor of a groups to the common ancestor of the two groups).

Baicalia sequences. Sampling locations of *Baicalia* specimens are specified in (Peretolchina et al., 2007). Genomic DNA was extracted from muscle tissue using a modified method described earlier (Sokolov, 2000). Gene fragments of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) were amplified using primers L1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and H2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994); fragments of the internal transcribed spacer (ITS1) were amplified using primers Kp-2F (5'-AAAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3') and 5.8SR (5'-AGCTTGGTGCCTTCTTCATCGA-3') (Nazar, Roy, 1978). An average of 1–3 μ L of DNA extracted was amplified in a 25 μ L reaction using BioMaster HS-Taq PCR Kit (Biolabmix, Russia) under the conditions recommended by the manufacturer. The conditions for amplification, electrophoresis and amplicon purification are those in T.E. Peretolchina et al. (2007). GenBank accession numbers of ITS1 sequences: FJ598711, FJ598712, FJ598715–FJ598723, FJ598727–FJ598732, FJ598735–FJ598741, FJ598743–FJ598745, FJ598748–FJ598760, FJ598762–FJ598771, FJ598832–FJ598848; of COI sequences: Z92995 (Zubakov et al., 1997), HQ113269–HQ113278, DQ436384–DQ436443, GU22640–GU22649, KT885116, FJ749133.

Software availability. All custom software used in this work is available from <https://github.com/dysh/MRDR>.

Results and discussion

We have used several example phylogenies resulted from computer experiments where various scenarios were used to generate different patterns of disagreements between maternally inherited mitochondrial and nuclear DNA of diploid

organisms. The simulations involved differential responses of sister species to the changes of environmental capacity accompanied by periods of reproductive isolation breaches. Each simulation produced two sets of “DNA sequences” (Semovski et al., 2004) used for tree inferences subsequently compared to each other using the procedure described here. All kinds of disagreements between the trees were obtained in course of these simulations and successfully classified using the distances between ancestral roots and tests for motophyleticity (Table 2). An example of full mitochondrial introgression is shown on Fig. 3 (circles designate common ancestors. The trees are rooted with the starting sequence used in the simulation).

Experimental data example: genus *Baicalia*. Gastropod genus *Baicalia* belonging to the subfamily Baicaliinae endemic to Lake Baikal consists of five species diverged from the common ancestor relatively recently in confines of the lake (Sherbakov, 1999). Species of this genus differ morphologically and ecologically. The most remarkable ecological difference between them is their substrate-dependent mating behavior. Both nuclear and mitochondrial markers have been used in phylogenetic inferences involving the species of *Baicalia* (Zubakov et al., 1997; Peretolchina et al., 2007; Sitnikova et al., 2016). Dramatic discrepancies between phylogenies inferred from several nuclear markers and mitochondrial markers are reported to be typical for the whole group and for *Baicalia* in particular (Peretolchina et al., 2007; Sitnikova et al., 2016). Here we have reproduced phylogenetic inferences using the data set consisting of two markers of different inheritance mode belonging to three *Baicalia* species: *B. carinata*, *B. dybowskiana* and *B. turriiformis* from (Peretolchina et al., 2007). Two separate phylogenies have been obtained for the nuclear gene ITS1 and mitochondrial COI. Maximum likelihood trees obtained differed from each other (Fig. 4).

The two species, *B. dybowskiana* and *B. turriiformis*, appear as monophyletic separate clades in a phylogeny inferred from

Table 2. Metrics of the ML trees inferred from simulated data

Treefiles	Group A is monophyletic	Group B is monophyletic	CA_A	CA_B	$CA_{A \in B}$	$CA_{B \in A}$	Type
tree2S mit root.tre	+	+	0.038290	0.040520	0	0	Division into 2 species
tree2S n root.tre	+	+	0.082230	0.19520	0	0	
treeINT mit root.tre	-	+	0.026070	0	0	> 0	Introggression
treeINT n root.tre	-	+	0.050680	0.087960	> 0	> 0	
treeIP mit root.tre	-	-	0	0	0	0	Inherited polymorphism
treeIP n root.tre	-	-	0	0	0	0	

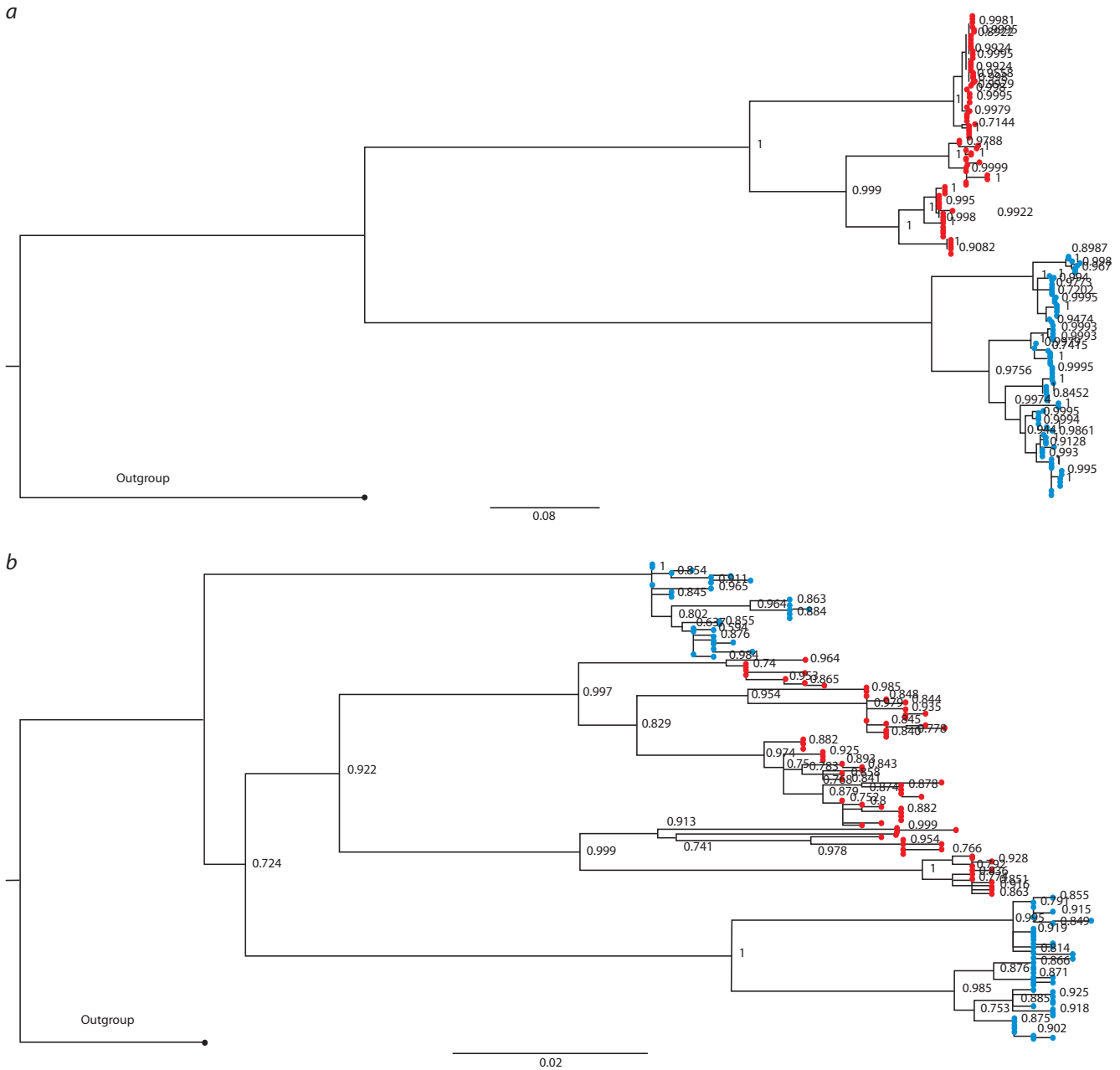


Fig. 3. Phylogenetic trees inferred from simulated data sets.

a – the tree inferred from “sequences” evolving as neutral nuclear marker; *b* – the tree based on “sequences” evolved according to the rules specific for mitochondrial DNA. The aLRT supports are given in the nodes of trees.

nuclear sequences. According to the tree inferred from the sequences of mitochondrial origin both *B. dybowskiana* and *B. turriiformis* become in-groups to *B. carinata*. However, their clusters are separated from each other. This example illustrates that discrepancies between phylogenies may be relative and complicated if traced in more than two groups: while there are clear indications of full mitochondrial introgressions from *B. carinata* to *B. turriiformis* and to *B. dybowskiana*, if the representatives of latter two species are subjected to phylogenetic inference in the absence of *B. carinata* there is no discrepancy between the trees inferred from different markers. Interestingly, the two introgressions were not simultaneous and occurred with a large time gap.

Conclusion

We present here a simple and fast procedure allowing one to distinguish automatically between contrasting patterns of disagreement between trees inferred for the same groups of organisms using different sets of data. In this communication we concentrate on the comparison between trees inferred from DNA sequences of mitochondrial and nuclear origin. First, we define different kinds of disagreements between the tree topologies (introgression, ancestral polymorphism) and propose the set of criteria, which may be estimated from a phylogeny. The approach is based on the estimating distances between common ancestors of groups defined externally, for example, by species identity of their members. Two trees are

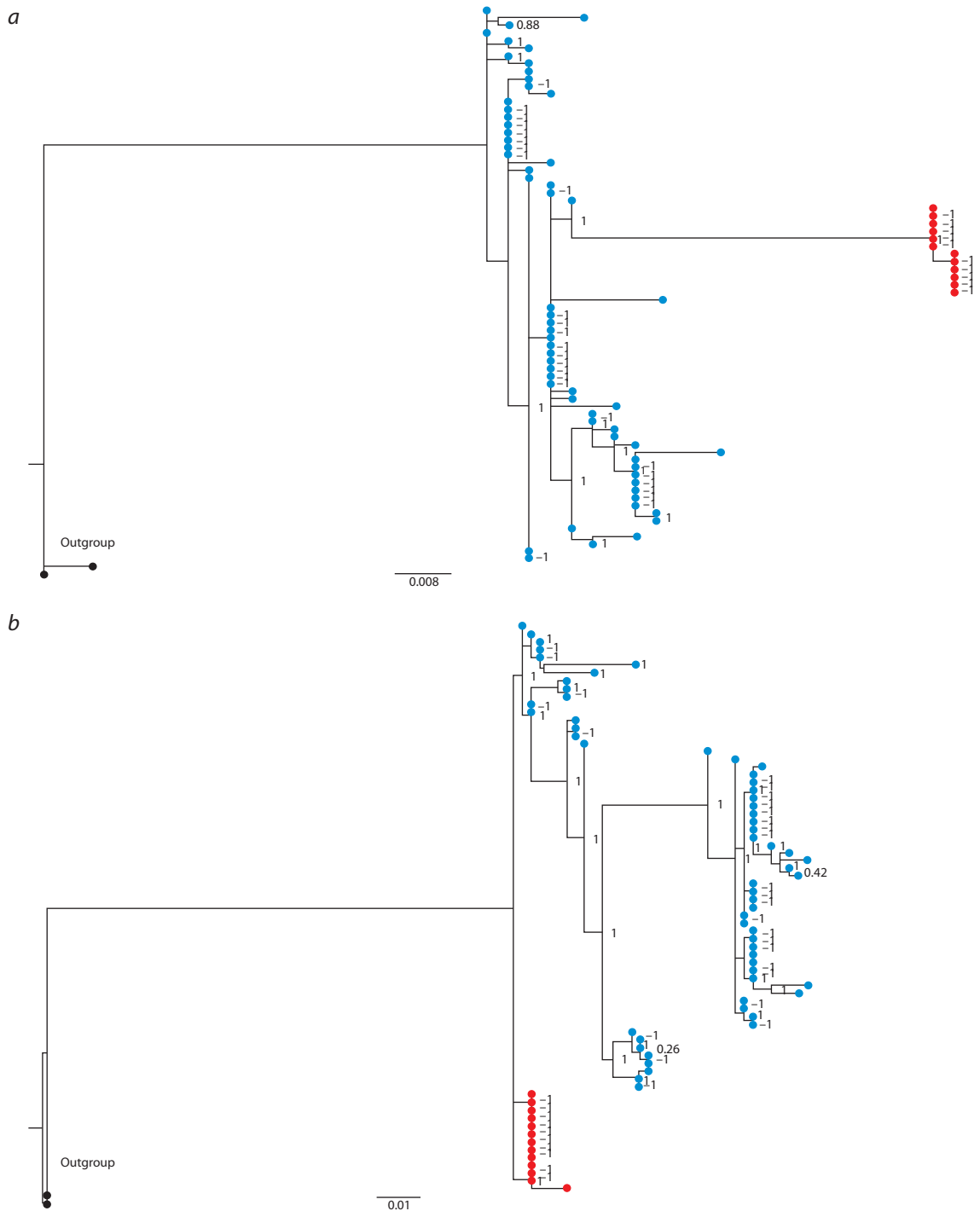


Fig. 4. Phylogenetic trees inferred from DNA sequences of a mitochondrial marker COI (a) and nuclear marker ITS1 (b) for three sister species of gastropods belonging to genus *Baicalia* (*B. carinata* (blue), and *B. dybowskiana* (red)).

The trees are rooted by outgroups consisting of all paralogous sequences belonging to other Baicaliinae. The aLRT supports are given in the nodes of trees.

used as the input, the groups are tested if they are monophyletic and then set of distances between clusters is measured. At this point it is possible to test for the statistical significance of the distortions and their diagnoses using any appropriate approach such as various kinds of bootstrapping.

This procedure is required for any modeling efforts aiming at the elucidation of ecological circumstances favoring different types of disagreements between trees inferred for the

same organisms. It is interesting to note, that the same procedure is potentially applicable to the cases when several sets of loci of the same mode of inheritance give rise to dramatically different trees due to selection or adaptation-guided acquisition from sister taxa. The discordance detection procedure proposed here is fast and sufficient to browse transcriptomes in search of sequence cliques evolving accordingly to each other but differently from other large sets of sequences.

References

- Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 2006; 55(4):539-552. DOI 10.1080/10635150600755453.
- Brooks J.L. Speciation in ancient lakes (concluded). *Quart. Rev. Biol.* 1950;25(2):131-176. DOI 10.1086/397539.
- Felsenstein J., Felsenstein J. Inferring Phylogenies. Vol. 2. Sinauer Associates. Sunderland, 2004.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994;3:294-299.
- Grimm V., Railsback S.F. Individual-Based Modeling and Ecology. Princeton: Princeton University Press, 2005.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010;59(3):307-321. DOI 10.1093/sysbio/syq010.
- Huerta-Cepas J., Dopazo J., Gabaldón T. ETE: a python environment for tree exploration. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):24. DOI 10.1186/1471-2105-11-24.
- Kéver L., Parmentier E., Derycke S., Verheyen E., Snoeks J., Steenberge M., Poncin P. Limited possibilities for prezygotic barriers in the reproductive behaviour of sympatric Ophthalmotilapia species (Teleostei, Cichlidae). *Zoology.* 2018;126:71-81. DOI 10.1016/j.zool.2017.12.001.
- Nazar R.N., Roy K.L. Nucleotide sequence of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ribosomal 5.8 S ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 1978; 253(2):395-399.
- Nevado B., Koblmüller S., Sturmbauer C., Snoeks J., Usano-Alemany J., Verheyen E. Complete mitochondrial DNA replacement in a Lake Tanganyika cichlid fish. *Mol. Ecol.* 2009;18(20):4240-4255. DOI 10.1111/j.1365-294X.2009.04348.x.
- Peretolchina T.E., Bukin Y.S., Sitnikova T.Y., Sherbakov D.Y. Genetic differentiation of the endemic Baikalian mollusk *Baicalia carinata* (Mollusca: Caenogastropoda). *Russ. J. Genet.* 2007;43(12):1400-1407. DOI 10.1134/S1022795407120095.
- Salzburger W., Van Bocxlaer B., Cohen A.S. Ecology and evolution of the African Great Lakes and their faunas. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2014;45:519-545. DOI 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091804.
- Schön I., Martens K. Molecular analyses of ostracod flocks from Lake Baikal and Lake Tanganyika. *Hydrobiologia.* 2012;682(1):91-110. DOI 10.1007/s10750-011-0935-6.
- Semovski S.V., Verheyen E., Sherbakov D.Y. Simulating the evolution of neutrally evolving sequences in a population under environmental changes. *Ecol. Modelling.* 2004;176(1-2):99-107. DOI 10.1016/j.ecolmodel.2003.07.013.
- Sherbakov D.Y. Molecular phylogenetic studies on the origin of biodiversity in Lake Baikal. *Trends Ecol. Evol.* 1999;14(3):92-95. DOI 10.1016/S0169-5347(98)01543-2.
- Sitnikova T., Kovalenkova M., Peretolchina T., Sherbakov D. A new, genetically divergent species of *Pseudobaicalia* Lindholm, 1909 (Caenogastropoda, Baicaliidae). *ZooKeys.* 2016;593:1. DOI 10.3897/zookeys.593.8511.
- Sokolov E.P. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *J. Moll. Stud.* 2000;66(4):573-575. DOI 10.1093/mollus/66.4.573.
- Sturmbauer C., Salzburger W., Duftner N., Schelly R., Koblmüller S. Evolutionary history of the Lake Tanganyika cichlid tribe Lamprologini (Teleostei: Perciformes) derived from mitochondrial and nuclear DNA data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010;57(1):266-284. DOI 10.1016/j.ympev.2010.06.018.
- Toews D.P.L., Brelsford A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol. Ecol.* 2012;21(16):3907-3930. DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x.
- Zubakov D.I., Shcherbakov D.I., Sitnikova T.I. Analysis of phylogeny of endemic mollusca of family Baicaliidae, Clessin 1878 (Gastropoda, Pectinibranchia) from Baikal lake using fragments of nucleotide sequences of the mitochondrial gene *COI*. *Mol. Biol. (Moscow).* 1997;31(6):1092-1097.

ORCID ID

A.A. Poroshina orcid.org/0000-0002-3234-8955
D.Y. Sherbakov orcid.org/0000-0002-1410-392X
T.E. Peretolchina orcid.org/0000-0002-2950-9762

Author contributions. DS wrote the manuscript and wrote the custom computer code, AP wrote computer code and performed the simulations, TP performed the experimental work and preliminary processing of data.

Acknowledgements. The study was funded by the topic of budget financing of Limnological Institute SB RAS 0345-2016-0004 (AAAA-A16-116122110060-9).

Conflict of interest. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received October 13, 2019. Revised April 10, 2020. Accepted April 11, 2020.

Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина у самок и самцов мышей

Т.В. Яковлева¹✉, Н.Е. Костина¹, Е.Н. Макарова¹, Н.М. Бажан^{1, 2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: jakov@bionet.nsc.ru

Аннотация. В настоящее время показано положительное влияние эстрадиола на чувствительность к инсулину на уровне целого организма у самок и самцов мышей. При этом чувствительность к инсулину в целом у самок выше, чем у самцов, и самцы демонстрируют большую склонность к развитию метаболических нарушений. Предполагают, что данные половые различия объясняются протективным действием эстрадиола у самок, но не у самцов. Эстрадиол является стероидным гормоном, и его действие обусловлено модуляцией экспрессии генов-мишеней, однако влияние эстрадиола на экспрессию генов, кодирующих трансдукцию сигнала инсулина и транспорт глюкозы в клетку, изучено недостаточно. Целью работы было сравнительное исследование молекулярных механизмов влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у мышей обоих полов. Исследовано влияние гонадэктомии и эстрадиола (1 мкг/животное, три дня) на экспрессию генов сигнального каскада инсулина в мышцах, жировой ткани и печени, а также на экспрессию *Fgf21*, рецепторов эстрадиола (*Esr1/2*) и транскрипционного фактора *Stat3* в печени у самок и самцов мышей. Ложно оперированные (ЛО) самцы отличались от ЛО самок сниженным уровнем эстрадиола, повышенным уровнем глюкозы и большей резистентностью к инсулину. В печени у ЛО самцов уровни мРНК *Irs2*, *Pik3cd* и *Esr1/2* были ниже, чем у ЛО самок. У самок гонадэктомия снижала уровень эстрадиола в крови, повышала резистентность к инсулину и уровень глюкозы в крови по сравнению с ЛО самками. Введение эстрадиола гонадэктомированным самкам снижало уровень инсулина в крови и резистентность к инсулину. У самцов гонадэктомия, наоборот, повышала уровень эстрадиола в крови, снижала резистентность к инсулину и уровень инсулина в крови. Введение эстрадиола гонадэктомированным самцам не оказывало влияния на исследованные показатели. Развитие инсулинорезистентности у гонадэктомированных самок было ассоциировано со снижением экспрессии гена *Irs2* в печени, а повышение чувствительности к инсулину у гонадэктомированных самцов – с увеличением уровней мРНК *Irs2* и *Pik3cd* в печени. Можно предположить, что повышение уровня эстрадиола в крови активирует экспрессию гена *Irs2* в печени независимо от пола животного. Также независимо от пола животного эстрадиол, по-видимому, регулирует транспорт глюкозы в жировой ткани: у самок и самцов повышение уровня эстрадиола в крови было ассоциировано со снижением экспрессии гена *Slc2a4* в жировой ткани. Таким образом, эффекты эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада, по-видимому, не зависят от пола животного, но имеют тканевую специфичность. Поскольку молекулярный механизм влияния эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада у самок и самцов не различается, причиной половых различий в чувствительности к инсулину и скорости развития метаболических нарушений может быть сниженный, по сравнению с самками, уровень эстрадиола в крови и сниженная экспрессия рецепторов эстрадиола в печени.

Ключевые слова: гонадэктомия; эстрадиол; тестостерон; чувствительность к инсулину; экспрессия генов; мыши линии C57BL/6J.

Для цитирования: Яковлева Т.В., Костина Н.Е., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина у самок и самцов мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):427-434. DOI 10.18699/VJ20.635

Effect of gonadectomy and estradiol on the expression of insulin signaling cascade genes in female and male mice

T.V. Iakovleva¹✉, N.E. Kostina¹, E.N. Makarova¹, N.M. Bazhan^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: jakov@bionet.nsc.ru

Abstract. A positive effect of estradiol on insulin sensitivity has been shown for females and males. Insulin sensitivity is higher in females than in males, and males show a greater tendency to develop metabolic disorders. It is believed that these sex differences are due to a protective effect of estradiol in females, but not in males. Estradiol is a steroid hormone, and its effect is due to the modulation of target gene expression, but the effect of estradiol on the expression of genes encoding insulin signal transduction and glucose transport has not been sufficiently studied. The aim

of the study was to compare the molecular mechanisms of the estradiol influence on insulin sensitivity in mice of both sexes. The effect of gonadectomy and estradiol (1 µg/animal, three days) on the expression of insulin signaling cascade genes in muscle, adipose tissue, and liver, as well as on the expression of *Fgf21*, estradiol receptors (*Esr1/2*), and transcription factor *Stat3* in the liver in female and male mice was investigated. Estradiol levels were lower and glucose blood levels and insulin resistance were higher in Sham operated (Sham) males compared to Sham females. *Irs2*, *Pik3cd*, and *Esr1/2* mRNA levels were lower in the liver of Sham males than in Sham females. In females, gonadectomy reduced the level of estradiol in the blood, increased insulin resistance and blood glucose levels compared to Sham females. Administration of estradiol to gonadectomized females decreased blood insulin levels and insulin resistance. In males, gonadectomy, on the contrary, increased the blood estradiol level, decreased blood insulin level and insulin resistance. Estradiol did not affect the parameters studied in males. The development of insulin resistance in gonadectomized females was associated with a decreased expression of the *Irs2* gene in the liver. Increased insulin sensitivity in gonadectomized males was associated with increased levels of *Irs2* and *Pik3cd* mRNA in the liver. It can be assumed that increasing the level of estradiol in the blood activates the expression of the *Irs2* gene in the liver regardless of animal sex. Also, estradiol seems to regulate the transport of glucose in adipose tissue regardless of animal sex: in females and males, an increase in the blood estradiol level was associated with a decrease in the expression of the *Slc2a4* gene in adipose tissue. Thus, the effects of estradiol on the expression of insulin cascade genes do not seem to depend on animal sex, but have tissue specificity. Since the molecular mechanism of estradiol influence on the expression of insulin cascade genes in females and males is the same, the cause of sexual differences in insulin sensitivity and the rate of development of metabolic disorders may be a decrease in the level of estradiol in the blood, as well as a decrease in the expression of estradiol receptors in the liver in males compared to females.

Key words: gonadectomy; estradiol; testosterone; insulin sensitivity; gene expression; C57BL/6J mice.

For citation: Iakovleva T.V., Kostina N.E., Makarova E.N., Bazhan N.M. Effect of gonadectomy and estradiol on the expression of insulin signaling cascade genes in female and male mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):427-434. DOI 10.18699/VJ20.635

Введение

Имеющиеся на сегодняшний день данные предполагают существование тесной взаимосвязи между эстрогенами и чувствительностью к инсулину, а именно: эстрадиол повышает поступление глюкозы в клетки мышечной ткани, подавляет продукцию глюкозы печенью, снижает уровень глюкозы в крови и повышает толерантность к глюкозе у овариэктомированных самок мышей и крыс, у интактных самок мышей с выраженным генетическим или диет-индуцированным ожирением, у самок мышей и у мужчин (Faustini-Fustini et al., 1999; Bryzgalova et al., 2008; Saengsirisuwan et al., 2009; Zhu et al., 2014).

Молекулярные механизмы влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину активно изучают, и в настоящее время известно, что они обусловлены его влиянием на фосфорилирование субстратов инсулинового рецептора первого и второго типов (IRS1 и 2), а также на уровень и транслокацию в клеточную мембрану транспортера глюкозы четвертого типа (GLUT4) (González et al., 2001; Saengsirisuwan et al., 2009; Gorres et al., 2011; Muthusamy et al., 2011; Narasimhan et al., 2013).

Эффекты эстрадиола как стероидного гормона зависят от его действия на экспрессию генов. Показано влияние эстрадиола на экспрессию транспортера глюкозы четвертого типа (*Slc2a4*) у самок и самцов и на экспрессию рецептора инсулина (*Insr*) у самцов. Овариэктомия повышает, а введение эстрадиола снижает экспрессию *Slc2a4* в жировой ткани у самок мышей (Яковлева и др., 2014). У самцов крыс гонадэктомия снижает экспрессию *Insr* в печени, мышцах и в жировой ткани и *Slc2a4* в мышцах и жировой ткани, но экзогенный эстрадиол не влияет на данные показатели (Muthusamy et al., 2009, 2011). Результаты экспериментов *in vitro* на культурах клеток (СНО, НерG2) позволяют предположить, что эстрадиол не участвует в регуляции экспрессии *Insr* и активирует экспрессию субстрата инсулинового рецептора (*Irs*) перво-

го и второго типов в печени (Xie et al., 2003; Panno et al., 2006; Parthasarathy et al., 2009).

Влияние эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада может быть опосредовано другими факторами. Например, влияние эстрадиола на чувствительность к инсулину у мышей с генетическим ожирением (мышь линии ob/ob) обусловлено активацией экспрессии в печени транскрипционного фактора STAT3 (Gao et al., 2006). Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) повышает чувствительность к инсулину в печени (Gong et al., 2016) и также может опосредовать влияние эстрадиола на метаболизм, поскольку на самках мышей показано, что активация рецептора эстрадиола типа альфа повышает экспрессию *Fgf21* в печени (Allard et al., 2019).

Как известно, эстрогены синтезируются в яичниках, тестикулах и надпочечниках, а также в периферических тканях из андрогенных предшественников под влиянием ароматазного ферментного комплекса, поэтому у самцов мышей уровень эстрадиола в крови сравним с таковым у самок. Однако при потреблении диеты с большим содержанием жиров самцы демонстрируют большую склонность к развитию метаболических нарушений и сниженную чувствительность к инсулину: в отличие от самок, у них снижается чувствительность к инсулину в печени, развивается голодная гипергликемия (Akoum et al., 2011). Предполагают, что связанные с полом различия в чувствительности к инсулину и в скорости развития метаболических нарушений вызваны тем, что у самок, в отличие от самцов, эстрадиол обладает протективным действием и повышает чувствительность к инсулину. Однако молекулярные механизмы влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у самцов остаются малоизученными.

Целью работы было провести сравнительное исследование молекулярных механизмов влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у мышей обоих полов.

Исследовали эффекты гонадэктомии и экзогенного эстрадиола на экспрессию генов сигнального каскада инсулина в мышцах, жировой ткани и печени, а также на экспрессию *Fgf21*, рецепторов эстрадиола типа альфа и бета (*Esr1/2*) и транскрипционного фактора *Stat3* в печени у самок и самцов мышей.

Материалы и методы

Животные. Исследование выполнено на базе вивария ИЦиГ СО РАН. Мышей C57BL разводили и содержали в условиях постоянного светового режима (12:12) и свободного доступа к воде и пище (Assortiment Agro, Тураково, Россия) при температуре 22 ± 2 °C. Работу проводили с соблюдением биоэтических норм (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe No. 123, Strasbourg 1985) and Russian national instructions for the care and use of laboratory animals).

Эксперимент. Самок и самцов в возрасте 10 недель гонадэктомировали или ложно оперировали и рассаживали по одному. Через три недели после операции начинали эксперимент: животные в течение трех дней в 09:00 получали перорально инъекцию β -эстрадиола (Sigma-Aldrich) в дозе 1 мкг/животное или растворителя (растительное масло промышленного производства, 100 мкл). Для каждого пола были сформированы три экспериментальные группы: ложно оперированные животные, которые получали инъекцию масла и служили контролем (ЛО); гонадэктомированные животные, которые получали инъекцию масла (ГЭ); и гонадэктомированные животные, которые получали инъекцию E2 (E2). Через сутки после последней инъекции животных декапитуировали после ночного голодания (18:00–09:00) для взятия образцов крови и тканей (печень, мышцы, висцеральный жир). Кровь собирали в пробирки с 5 мкл ЭДТА, центрифугировали (4000 g, 20 мин), плазму крови хранили при -70 °C. Образцы тканей помещали в жидкий азот до выделения РНК и белка. После определения уровня глюкозы и инсулина рассчитывали физиологический индекс резистентности к инсулину (НОМА-IR) по формуле: [уровень глюкозы в крови после голодания (ммоль/л) \times уровень инсулина в крови после голодания (нг/мл)]/22.5.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента ExtraRNA («Евроген Лаб», Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для получения кДНК 1 мкг РНК смешивали с 2.5 мкл праймера oligo-dT («Евроген Лаб», конечная концентрация праймера 2 мкМ) и денатурировали при 70 °C в течение 2 мин на амплификаторе БИС (Россия). Затем добавляли 5 мкл (5 \times) буфера («СибЭнзим», Новосибирск, Россия), 2.5 мкл dNTP (5 мМ по каждому, «Медиген», Новосибирск, Россия) и 0.5 мкл (100 ед.) М-MuLV («СибЭнзим»). Полученную смесь инкубировали при 42 °C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при -20 °C. ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси Синтол на приборе VIIA 7 для выполнения ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя. В качестве праймеров и зондов применяли коммерческие наборы Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) для мышей (табл. 1). Внутренним контролем служил бета-актин. Анализ относительного количества мРНК генов проводили $\Delta\Delta$ CT-методом.

Вестерн-блот анализ уровня белков. Образцы печени, мышечной и жировой тканей гомогенизировали. Экстракцию белков проводили в лизирующем буфере (Tris-Triton buffer). Концентрацию белка в пробах оценивали по методу Бредфорда с помощью NanoDrop2000 (ThermoScientific). Разделение белков по молекулярной массе выполняли с помощью гель-электрофореза в 10 % полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере (25 мМ трис, 250 мМ глицин, 0.1 % SDS). Электроперенос белков на 0.45 мкм нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере с помощью Trans-Blot system (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 5 % обезжиренным молоком (milk powder, PanReac AppliChem). Использовали первичные поликлональные антитела кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), разведение 1:2000: insulin R α antibody (sc-710) и GLUT4 antibody (sc-7938). После отмывки фосфатно-солевым буфером (0.1 % Tween-20) мембраны инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:5000) (sc-2004, AT/goat anti-rabbit IgG-

Таблица 1. Коммерческие наборы Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) для мышей, использованные в работе

Название гена	Обозначение	Номер в каталоге
Рецептор инсулина	<i>Insr</i>	Mm01211875_m1
Субстрат инсулинового рецептора первого типа	<i>Irs1</i>	Mm01278327_m1
Субстрат инсулинового рецептора второго типа	<i>Irs2</i>	Mm03038438_m1
Каталитическая субъединица дельта фосфатидилинозитол-3-киназы	<i>Pik3cd</i>	Mm00435674_m1
Транспортер глюкозы четвертого типа	<i>Slc2a4</i>	Mm01245502_m1
Бета-актин	<i>Actb</i>	Mm006007938_s1
Рецептор эстрадиола первого типа	<i>Esr1</i>	Mm00433149_m1
Рецептор эстрадиола второго типа	<i>Esr2</i>	Mm00599821_m1
Сигнал трансдукции и активации транскрипции 3	<i>Stat3</i>	Mm01219775_m1
Фактор роста фибробластов 21	<i>Fgf21</i>	Mm00840165_g1

HRP, HRP-conjugated, Santa Cruz Biotechnology). Выявление структурного белка бета-актина (разведение 1:5000) (sc-130656, Santa Cruz Biotechnology) проводили на той же мембране. По окончании иммуноблоттинга мембрану отмывали и инкубировали 1 мин в субстратной смеси (10 мл 100 мМ трис-НСl pH 8.5; 50 мкл 250 мМ люминола; 22 мкл 90 мМ кумаровой кислоты; 3 мкл 33 % H₂O₂), после чего визуализировали хемилюминесценцию на приборе ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad). Результаты анализировали с применением программы Image Studio Lite Ver 5.2. Сигнал исследуемого белка в пробе относили к сигналу бета-актина в той же пробе. Уровень экспрессии белка в пробе в оцифрованном виде является отношением нормированного сигнала в данной пробе к нормированному сигналу в референсной пробе.

Определение биохимических показателей крови. Концентрацию глюкозы в крови определяли с помощью глюкометра OneTouch Select (Lifescan, Johnson and Johnson, США), концентрации эстрадиола, тестостерона и инсулина в плазме крови – ИФА-методом с помощью коммерческих наборов Mouse Estradiol (E2) ELISA Kit (MyBioSource, США), Testosterone rat/mouse ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Германия) и Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Millipore, США) согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка результатов. Значения представлены как среднее ± ошибка среднего. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола на исследованные показатели у самок и самцов определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа MANOVA (градации фактора «экспериментальная группа»: ЛО, ГЭ, E2), апостериорные сравнения выборочных средних проводили с помощью post-hoc Newman–Keuls теста. Для анализа эффектов гонадэктомии на уровень эстрадиола в крови использовали MANOVA с градациями фактора «экспериментальная группа» ЛО и ГЭ, поскольку образцы крови были взяты через сутки после последней инъекции гормона и уровень эстрадиола в крови у E2 животных не мог отражать реальный уровень гормона в крови после инъекции. Для сравнения показателей ЛО самок и ЛО самцов применяли *t*-тест. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Уровень в крови половых гормонов, глюкозы и инсулина

Влияние пола у ЛО мышей. У самок уровень эстрадиола был достоверно выше, а уровень тестостерона – достоверно ниже, чем у самцов (табл. 2). Самки имели более высокую чувствительность к инсулину, чем самцы: уровень инсулина у самок и самцов достоверно не различался, при этом уровень глюкозы и показатель резистентности к инсулину (HOMA-IR) у самок были достоверно ниже, чем у самцов (табл. 3).

Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола. У самок гонадэктомия снизила уровень эстрадиола в крови (MANOVA, $p < 0.05$). Показано достоверное влияние фактора «экспериментальная группа» на показатели чувствительности к инсулину у самок: индекс резистентности к инсулину, уровни глюкозы и инсулина у ГЭ самок были выше, чем у ЛО самок, причем экзогенный эстрадиол нормализовал данные показатели. У самцов гонадэктомия снизила уровень тестостерона в крови (MANOVA, $p < 0.01$). Уровень эстрадиола в крови у ГЭ самцов, напротив, был выше, чем у ЛО самцов (MANOVA, $p < 0.05$). Экспериментальные воздействия не повлияли на уровни в крови глюкозы и инсулина и, соответственно, на показатель резистентности к инсулину у самцов.

Экспрессия компонентов инсулинового каскада в печени

Влияние пола у ЛО животных. Самки отличались от самцов по экспрессии генов *Irs2*, каталитической субъединицы фосфатидилинозитол-3-киназы (*Pik3cd*), *Esr1* и *Esr2*: уровень мРНК этих генов у самок был достоверно выше, чем у самцов. Экспрессия генов *Insr*, *Irs1*, *Fgf21*, *Stat3* и уровень белка INSR в печени у самок и самцов достоверно не различались (рис. 1 и 2).

Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола. У самок гонадэктомия снизила, а экзогенный эстрадиол повысил, хотя и не нормализовал, уровень мРНК гена *Irs2* в печени (MANOVA, $p < 0.01$).

У самцов экзогенный эстрадиол не повлиял на экспрессию исследованных генов в печени, тогда как гонадэкто-

Таблица 2. Вес тела и уровни половых гормонов в плазме крови у самок и самцов мышей C57BL

Пол	Экспериментальная группа (число животных в группе)	Вес тела, г	Эстрадиол, плазма, пг/мл	Тестостерон, плазма, нг/мл
Самки	ЛО (9)	20.3 ± 0.5	151 ± 15	0.24 ± 0.03
	ГЭ (12)	23.3 ± 1.2	122 ± 6	0.11 ± 0.06
	E2 (10)	21.8 ± 0.5	127 ± 4	0.15 ± 0.04
MANOVA			$p < 0.05$	
Самцы	ЛО (8)	25.4 ± 0.4 ^{\$\$\$}	94 ± 12 ^{\$\$}	2.80 ± 0.9 ^{\$\$}
	ГЭ (10)	24.6 ± 0.4	133 ± 10	0.16 ± 0.05 [*]
	E2 (11)	25.1 ± 0.5	128 ± 12	0.12 ± 0.03 [*]
MANOVA			$p < 0.05$	$p < 0.01$

^{\$\$} $p < 0.01$, ^{\$\$\$} $p < 0.001$ по сравнению с ЛО самками, *t*-тест; ^{*} $p < 0.05$ по сравнению с ЛО животными того же пола, post-hoc Newman–Keuls тест.

Таблица 3. Уровень инсулина в плазме крови, уровень глюкозы в крови и показатель HOMA-IR у самок и самцов C57BL

Пол	Экспериментальная группа (число животных в группе)	Глюкоза, кровь, ммоль/л	Инсулин, плазма, нг/мл	HOMA-IR
Самки	ЛО (9)	6.1 ± 0.3	0.70 ± 0.14	0.18 ± 0.03
	ГЭ (12)	7.9 ± 0.4**	1.12 ± 0.24	0.41 ± 0.10*
	E2 (10)	6.9 ± 0.5	0.43 ± 0.07#	0.13 ± 0.02#
MANOVA		$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Самцы	ЛО (8)	7.7 ± 0.4 ^{§§}	1.28 ± 0.31	0.47 ± 0.13 [§]
	ГЭ (10)	6.8 ± 0.4	0.51 ± 0.11	0.14 ± 0.02
	E2 (11)	7.0 ± 0.4	1.25 ± 0.41	0.40 ± 0.14

[§] $p < 0.05$, ^{§§} $p < 0.01$ по сравнению с ЛО самками, t-тест; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с ЛО животными того же пола; # $p < 0.05$ по сравнению с ГЭ животными того же пола, post-hoc Newman-Keuls тест.

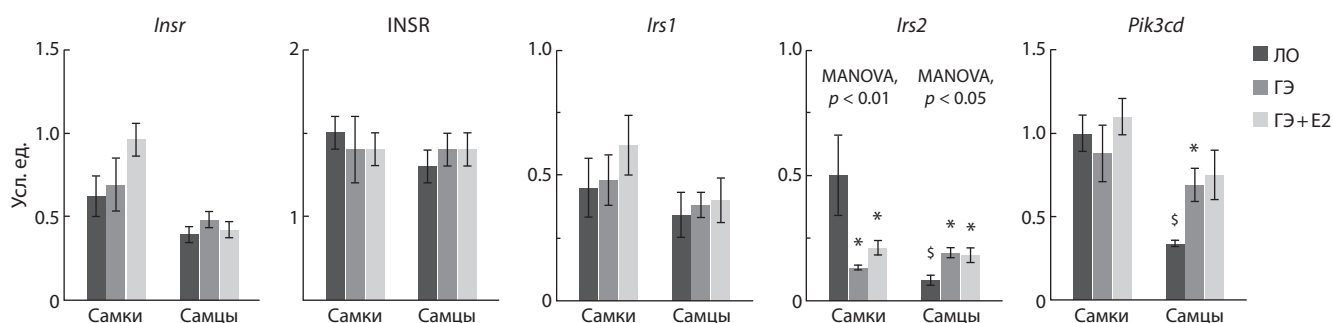


Рис. 1. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК *Insr*, *Irs1*, *Irs2*, *Pik3cd* и уровень белка INSR в печени у ЛО, ГЭ и ГЭ+E2 самок и самцов мышей.

Здесь и на рис. 2–4: [§] $p < 0.05$ по сравнению с самками; * $p < 0.05$ по сравнению с ЛО животными того же пола; # по сравнению с ГЭ животными того же пола. MANOVA, $p < 0.05$ или $p < 0.01$ – влияние фактора «экспериментальная группа» статистически достоверно.

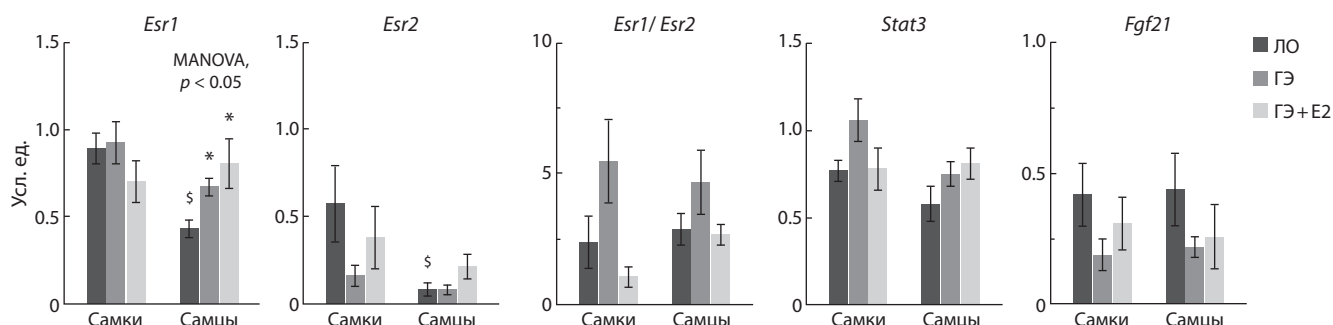


Рис. 2. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК рецепторов эстрадиола (*Esr1* и *Esr2*), *Fgf21* и *Stat3* в печени у ЛО, ГЭ и ГЭ+E2 самок и самцов мышей.

мия повысила экспрессию *Irs2* и *Esr1* в печени (MANOVA, $p < 0.05$ в обоих случаях): уровни мРНК этих генов у ГЭ и E2 самцов были выше, чем у ЛО самцов. Уровень мРНК *Pik3cd* в печени у ГЭ и E2 самцов также был выше, чем у ЛО самцов, однако различия не достигали уровня значимости (MANOVA, $p = 0.07$). Уровень мРНК *Esr1* у самцов положительно коррелировал ($p < 0.05$) с уровнем мРНК *Irs2* ($r = 0.74$).

Экспериментальные воздействия не повлияли достоверно на соотношение *Esr1/Esr2* в печени у самок и самцов.

Экспрессия компонентов инсулинового каскада в мышечной и жировой тканях

Влияние пола у ЛО животных. Экспрессия генов и белков инсулинового каскада в мышцах и в жировой ткани у ложно оперированных самок и самцов не различалась (рис. 3 и 4).

Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола. У самок экспериментальные воздействия не повлияли на экспрессию исследованных показателей инсулинового каскада в мышечной ткани. У ГЭ самцов в мышечной ткани

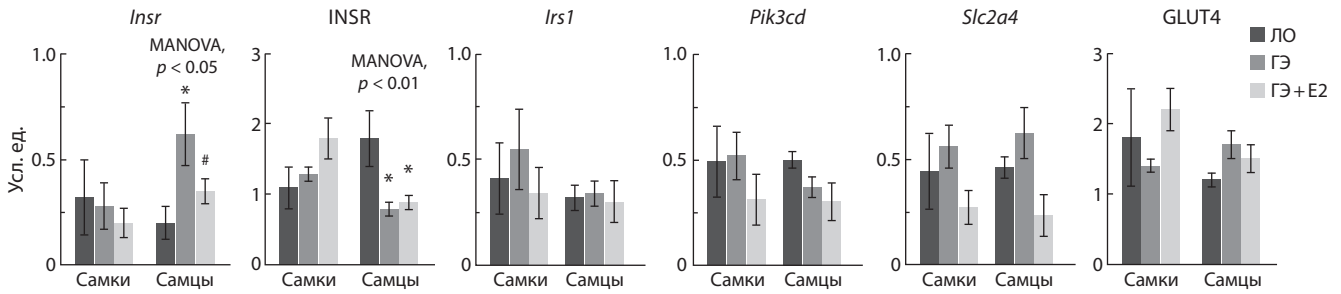


Рис. 3. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК *Insr*, *Irs1*, *Pik3cd*, *Slc2a4* и уровень белков *INSR* и *GLUT4* в скелетных мышцах у ЛО, ГЭ и ГЭ+E2 самок и самцов мышей.

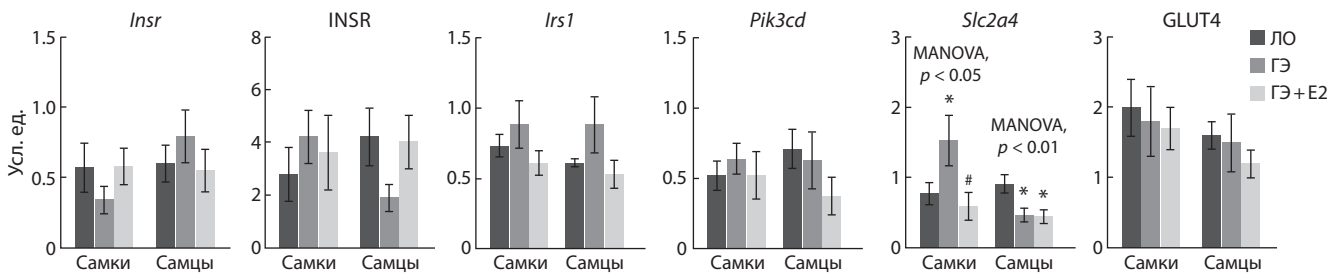


Рис. 4. Влияние гонадэктомии и экзогенного эстрадиола (1 мкг/животное, 3 дня) на уровни мРНК *Insr*, *Irs1*, *Pik3cd*, *Slc2a4* и уровень белков *INSR* и *GLUT4* в висцеральной жировой ткани у ЛО, ГЭ и ГЭ+E2 самок и самцов мышей.

уровень мРНК *Insr* был выше, чем у ЛО самцов. Уровень белка *INSR* был ниже у ГЭ и E2 самцов по сравнению с ЛО самцами. В жировой ткани самок гонадэктомия повысила и экзогенный эстрадиол нормализовал экспрессию *Slc2a4* (MANOVA, $p < 0.05$). У ГЭ и E2 самцов экспрессия *Slc2a4* в жировой ткани была ниже, чем у ЛО самцов.

Обсуждение

Одним из подходов для изучения влияния эстрадиола на экспрессию генов трансдукции сигнала инсулина является сравнение показателей у самок и самцов. Чувствительность к инсулину на уровне целого организма (уровень в крови глюкозы, индекс резистентности к инсулину), а также экспрессия генов трансдукции сигнала инсулина (*Irs2* и *Pik3cd*) в печени у ЛО самок была выше, чем у ЛО самцов, что совпадает с данными, полученными на интактных животных (Parks et al., 2015; Яковлева и др., 2017; Torre et al., 2017). В нашей работе впервые показано, что ЛО самки отличаются от ЛО самцов не только повышенным уровнем эстрадиола в крови, но и повышенной экспрессией рецепторов эстрадиола обоих типов в печени, что может быть одной из причин половых различий эффектов эстрадиола на чувствительность к инсулину в печени.

Для изучения эффектов эстрадиола на экспрессию генов инсулинового каскада, помимо сравнения показателей у самок и самцов, нами использована модель гонадэктомии с последующим введением эстрадиола. Мы предполагали, что гонадэктомия приведет к снижению уровня эстрадиола в крови у самок вследствие элиминации основного источника продукции гормона, а у самцов – вследствие снижения уровня тестостерона как предшественника синтеза эстрадиола в тканях. Но у самцов уровень гормона

в крови после гонадэктомии повысился. Возможно, это следствие активации продукции гормона надпочечниками. В результате гонадэктомии нивелировалась различия по уровню половых стероидов между самками и самцами: уровни эстрадиола и тестостерона в крови у гонадэктормированных самок и самцов не различались. Однако у самок гонадэктомия индуцировала развитие инсулинорезистентности, а экзогенный эстрадиол нормализовал чувствительность к инсулину, тогда как у самцов экспериментальные воздействия не оказали достоверного влияния на исследованные показатели чувствительности к инсулину (уровни глюкозы и инсулина в крови, показатель НОМА-IR). Результаты влияния овариэктомии и экзогенного эстрадиола на уровни глюкозы и инсулина в крови и показатель резистентности к инсулину у самок соответствуют существующим представлениям (Rogers et al., 2009; Oh et al., 2011). Эффект гонадэктомии на показатель НОМА-IR у самцов зависит от генотипа животного (Parks et al., 2015), и у C57BL/6J самцов данный показатель снижается через 10 недель после гонадэктомии. В нашей работе показатель НОМА-IR у ГЭ самцов не отличался достоверно от такового у ЛО самцов, но был в 3.4 раза ниже. Отсутствие достоверного влияния гонадэктомии на чувствительность к инсулину у самцов, возможно, обусловлено меньшей продолжительностью эксперимента.

Снижение чувствительности к инсулину у ГЭ самок было ассоциировано со снижением экспрессии *Irs2* и *Esr2* в печени и повышением экспрессии *Slc2a4* в жировой ткани. Экзогенный эстрадиол, напротив, снизил экспрессию *Slc2a4* в жировой ткани и повысил экспрессию *Irs2* в печени. Влияние гонадэктомии на экспрессию *Irs2* в печени хорошо согласуется с наблюдаемыми половыми различиями: у самок этот показатель был выше, чем у

самцов. Известно, что эффекты эстрадиола на экспрессию *Irs1* и *Irs2* в печени у самок мышей опосредуют рецепторы эстрадиола типа альфа (ER α) (Panno et al., 2006). Рецепторы эстрадиола типа бета (ER β), вероятно, ингибируют эффекты эстрадиола, опосредованные ER α (Lindberg et al., 2003). Согласно полученным данным, овариэктомиа не повлияла на экспрессию ER α и снизила экспрессию ER β в печени у самок, что предполагает усиление эффектов эстрадиола, опосредованных ER α , и, возможно, имеет компенсаторно-адаптивный характер, направленный на поддержание чувствительности к инсулину в условиях снижения уровня эстрадиола в крови.

У самцов гонадэктомиа не повлияла на уровни инсулина и глюкозы в крови, но вызвала увеличение уровней мРНК *Irs2*, *Pik3cd* и *Esr1* в печени. Поскольку у самцов отмечена тенденция к увеличению уровня эстрадиола в крови после гонадэктомии и наблюдалась корреляция между уровнем экспрессии субстрата инсулинового рецептора второго типа и экспрессией рецептора эстрадиола типа альфа в печени, можно предположить, что экспрессия *Irs2* в печени у самцов, как и у самок, регулируется эстрадиолом. Соответственно, активация экспрессии гена рецептора эстрадиола типа альфа может быть частью молекулярного механизма влияния эстрадиола на чувствительность к инсулину у ГЭ самцов. Таким образом, повышение уровня эстрадиола в крови у самок и у самцов может независимо от пола активировать экспрессию гена *Irs2* в печени и способствовать улучшению чувствительности к инсулину в целом.

Как известно, в опосредовании эффектов эстрадиола на экспрессию генов липогенеза в печени участвует транскрипционный фактор STAT3 (Gao et al., 2006). FGF21 также может опосредовать действие эстрадиола на экспрессию генов глюконеогенеза, поскольку повышает экспрессию гена *Irs2* и гена глюкоза-6-фосфатазы (Fisher et al., 2011). Однако роль STAT3 и FGF21 как посредников эстрадиола в регуляции экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина требует дополнительного исследования, так как в данной работе не было обнаружено различий в уровнях мРНК *Stat3* и *Fgf21* в печени у животных разного пола и экспериментальных групп.

Активация экспрессии *Pik3cd* в печени у ГЭ самцов, по-видимому, обусловлена снижением у них уровня тестостерона. У самок уровень мРНК *Pik3cd* был выше, чем у самцов, но эти различия не связаны с уровнем эстрадиола, поскольку овариэктомиа и последующее введение эстрадиола не повлияли на уровень мРНК *Pik3cd* у самок.

Существует представление, что влияние эстрадиола на чувствительность к инсулину в жировой и в мышечной тканях вызвано его стимуляцией захвата глюкозы клетками вследствие увеличения уровня GLUT4 и активации его транслокации в клеточную мембрану. У самок мышей овариэктомиа в течение 2 недель не влияет, а через 10 недель вызывает снижение уровня мРНК *Slc2a4* в мышцах и в жировой ткани (Kim et al., 2010). У самок крыс через 12 недель после овариэктомии уровень белка GLUT4 в мышцах снижен, тогда как введение эстрадиола предотвращает данное снижение (Saengsirisuwan et al., 2009). В нашей работе через 3 недели после овариэктомии уровень мРНК *Slc2a4* в жировой ткани у самок повысился

и экзогенный эстрадиол нормализовал его, тогда как достоверного влияния воздействий на уровень мРНК *Slc2a4* в мышечной ткани и уровень белка GLUT4 в жировой ткани и в мышцах не обнаружено. Ранее нами было показано, что овариэктомиа в течение 5 недель также повышает уровень мРНК *Slc2a4* в жировой ткани, а введение эстрадиола в течение 3 недель его снижает, в то время как в мышечной ткани уровень мРНК *Slc2a4* снижается после овариэктомии, но не меняется на фоне введения эстрадиола (Яковлева и др., 2014). По-видимому, эффекты овариэктомии и экзогенного эстрадиола на экспрессию *Slc2a4* в жировой и мышечной тканях существенным образом зависят от длительности эксперимента.

Влияние гонадэктомии и эстрадиола на экспрессию инсулинового рецептора и транспортера глюкозы четвертого типа в жировой и мышечной тканях у самцов исследовали на крысах. Показано, что гонадэктомиа сопровождается снижением уровня мРНК и белка INSR и GLUT4 в жировой и мышечной тканях, а экзогенный эстрадиол нормализует уровни белков (Muthusamy et al., 2009, 2011). Результаты нашего эксперимента слабо согласуются с литературными данными, что может быть следствием межвидовых различий влияния ГЭ на уровень эстрадиола в крови и на соотношение уровней половых стероидов у самцов. В нашем эксперименте повышение уровня эстрадиола после гонадэктомии у самцов было ассоциировано с повышением уровня мРНК *Insr*, но снижением белка INSR в мышцах, а в жировой ткани – со снижением мРНК *Slc2a4*. Отметим, что повышение уровня эстрадиола в крови независимо от пола животного (при введении гормона у самок и после гонадэктомии у самцов) было ассоциировано со снижением экспрессии *Slc2a4* в жировой ткани.

Закключение

Вышесказанное позволяет предположить, что влияние эстрадиола на экспрессию генов и белков инсулинового каскада является тканеспецифическим и не зависит от пола животного: в печени эстрадиол может повышать экспрессию *Irs2*, в жировой ткани – подавлять экспрессию *Slc2a4*. Активация экспрессии *Irs2* в печени на фоне повышения уровня эстрадиола в крови в результате введения гормона у самок или после гонадэктомии у самцов направлена на улучшение метаболизма глюкозы, поэтому эффекты эстрадиола в печени обуславливают повышение чувствительности к инсулину на уровне целого организма. Значение влияния эстрадиола на экспрессию *Slc2a4* в жировой ткани у самок и самцов не ясно и требует дальнейших исследований. Несмотря на универсальный механизм действия, протективный эффект эстрадиола у самцов менее выражен, чем у самок, по-видимому, из-за пониженного уровня гормона в крови и сниженной экспрессии рецепторов эстрадиола в печени.

Список литературы / References

- Яковлева Т.В., Казанцева А.Ю., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(7):833-840. DOI 10.18699/VJ17.303.
[Yakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Makarova E.N., Bazhan N.M. Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in

- young and adult C57BL/6J mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7): 833-840. DOI 10.18699/VJ17.303. (in Russian)]
- Яковлева Т.В., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Влияние овариэктомии и эстрадиола на уровень мРНК GLUT4 в жировой и мышечной тканях самок мышей C57BL/6J – *Agouti yellow*. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014;100(5):602-612.
- [Iakovleva T.V., Makarova E.N., Bazhan N.M. Effect of ovariectomy on GLUT4 mRNA levels in adipose and muscle tissues in females of mice C57BL/6J – *Agouti yellow*. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = *Russian Journal of Physiology*. 2014;100(5):602-612. (in Russian)]
- Akoum S.E., Lamontagne V., Cloutier I., Tanguay J.F. Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011;3:34.
- Allard C., Bonnet F., Xu B., Coons L., Albarado D., Hill C., Fagherazzi G., Korach K.S., Levin E.R., Lefante J., Morrison C., Mauvais-Jarvis F. Activation of hepatic estrogen receptor- α increases energy expenditure by stimulating the production of fibroblast growth factor 21 in female mice. *Mol. Metab.* 2019;22:62-70. DOI 10.1016/j.molmet.2019.02.002.
- Bryzgalova G., Lundholm L., Portwood N., Gustafsson J.A., Khan A., Efendic S., Dahlman-Wright K. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008;295(4):E904-E912.
- Faustini-Fustini M., Rochira V., Carani C. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur. J. Endocrinol.* 1999;140(2):111-129.
- Fisher F.M., Estall J.L., Adams A.C., Antonellis P.J., Bina H.A., Flier J.S., Kharitonov A., Spiegelman B.M., Maratos-Flier E. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) *in vivo*. *Endocrinology*. 2011;152(8):2996-3004. DOI 10.1210/en.2011.0281.
- Gao H., Bryzgalova G., Hedman E., Khan A., Efendic S., Gustafsson J.A., Dahlman-Wright K. Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol. Endocrinol.* 2006;20(6):1287-1299.
- Gong Q., Hu Z., Zhang F., Cui A., Chen X., Jiang H., Gao J., Chen X., Han Y., Liang Q., Ye D., Shi L., Chin Y.E., Wang Y., Xiao H., Guo F., Liu Y., Zang M., Xu A., Li Y. Fibroblast growth factor 21 improves hepatic insulin sensitivity by inhibiting mammalian target of rapamycin complex 1 in mice. *Hepatology*. 2016;64(2):425-438. DOI 10.1002/hep.28523.
- González C., Alonso A., Grueso N.A., Díaz F., Esteban M.M., Fernández S., Patterson A.M. Effect of treatment with different doses of 17- β -estradiol on insulin receptor substrate-1. *JOP. J. Pancreas*. 2001;2(4):140-149.
- Gorres B.K., Bomhoff G.L., Morris J.K., Geiger P.C. *In vivo* stimulation of oestrogen receptor α increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. *J. Physiol.* 2011;589(8):2041-2054. DOI 10.1113/jphysiol.2010.199018.
- Kim J.Y., Jo K.J., Kim O.S., Kim B.J., Kang D.W., Lee K.H., Baik H.W., Han M.S., Lee S.K. Parenteral 17 β -estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. *Life Sci.* 2010;87(11-12):358-366. DOI 10.1016/j.lfs.2010.07.009.
- Lindberg M.K., Movérare S., Skrtic S., Gao H., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.A., Ohlsson C. Estrogen receptor (ER)- β reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a “Ying Yang” relationship between ER α and ER β in mice. *Mol. Endocrinol.* 2003;17(2):203-208. DOI 10.1210/me.2002-0206.
- Muthusamy T., Murugesan P., Balasubramanian K. Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat. *Metabolism*. 2009;58(11):1581-1592.
- Muthusamy T., Murugesan P., Balasubramanian K. Sex steroids influence glucose oxidation through modulation of insulin receptor expression and IRS-1 serine phosphorylation in target tissues of adult male rat. *Mol. Cell. Biochem.* 2011;352(1-2):35-45.
- Narasimhan A., Sampath S., Jayaraman S., Karundevi B. Estradiol favors glucose oxidation in gastrocnemius muscle through modulation of insulin signaling molecules in adult female rats. *Endocr. Res.* 2013;38(4):251-262. DOI 10.3409/07435800.2013.775148.
- Oh Y.S., Lee T.S., Cheon G.J., Jang I.S., Jun H.S., Park S.C. Modulation of insulin sensitivity and caveolin-1 expression by orchidectomy in a nonobese type 2 diabetes animal model. *Mol. Med.* 2011;17(1-2): 4-11. DOI 10.2119/molmed.2009.00105.
- Panno M.L., Mauro L., Marsico S., Bellizzi D., Rizza P., Morelli C., Salerno M., Giordano F., Andò S. Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor α through its interaction with Sp1. *J. Mol. Endocrinol.* 2006;36(1):91-105. DOI 10.1677/jme.1.01848.
- Parks B.W., Sallam T., Mehrabian M., Psychogios N., Hui S.T., Norheim F., Castellani L.W., Rau C.D., Pan C., Phun J., Zhou Z., Yang W.P., Neuhaus I., Gargalovic P.S., Kirchgessner T.G., Graham M., Lee R., Tontonoz P., Gerszten R.E., Hevener A.L., Lusis A.J. Genetic architecture of insulin resistance in the mouse. *Cell Metab.* 2015;21(2):334-347.
- Parthasarathy C., Renuka V.N., Balasubramanian K. Sex steroids enhance insulin receptors and glucose oxidation in Chang liver cells. *Clin. Chim. Acta.* 2009;399(1-2):49-53.
- Rogers N.H., Perfield J.W. 2nd, Strissel K.J., Obin M.S., Greenberg A.S. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. 2009;150(5):2161-2168. DOI 10.1210/en.2008-1405.
- Saengsirisuwan V., Pongseeda S., Prasannarong M., Vichaiwong K., Toskulkaeo C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism*. 2009;58(1):38-47. DOI 10.1016/j.metabol.2008.08.004.
- Torre S.D., Lolli F., Ciana P., Maggi A. Sexual dimorphism and estrogen action in mouse liver. In: Mauvais-Jarvis F. (Ed.). *Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity* (Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1043). Springer Int. Publ., 2017;141-151. DOI 10.1007/978-3-319-70178-3_8.
- Xie P., Liu M.L., Gu Y.P., Lu J., Xu X., Zeng W.M., Song H.P. Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2003;30(9):643-648. DOI 10.1046/j.1440-1681.2003.03899.x.
- Zhu L., Martinez M.N., Emfinger C.H., Palmisano B.T., Stafford J.M. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014; 306(10):E1188-E1197. DOI 10.1152/ajpendo.00579.2013.

ORCID ID

T.V. Iakovleva orcid.org/0000-0001-7628-5856
N.E. Kostina orcid.org/0000-0001-6137-0492
E.N. Makarova orcid.org/0000-0002-6417-9893
N.M. Bazhan orcid.org/0000-0002-7246-4758

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-15-01036), с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.11.2019. После доработки 17.02.2020. Принята к публикации 27.02.2020.

Апоптоз в печени самцов мышей *db/db* при развитии ожирения и сахарного диабета 2-го типа

С.В. Мичурина¹, И.Ю. Ищенко¹✉, С.А. Архипов¹, М.А. Черепанова¹, Д.В. Васендин³, Е.Л. Завьялов²

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Сибирский государственный университет геосистем и технологий, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: irenisch@mail.ru

Аннотация. Известно, что ожирение и сахарный диабет приводят к развитию метаболического синдрома и неалкогольной жировой болезни печени. В поддержании клеточного гомеостаза при неалкогольной жировой болезни печени принимают активное участие механизмы запрограммированной клеточной гибели. Белки семейства BCL-2 являются ключевым регулятором физиологического и патологического апоптоза. Используемые в исследовании гомозиготные самцы мышей линии BKS.Cg-Dock7^mLepr^{db}/+/+J (мыши *db/db*) характеризуются прогрессирующим ожирением и развитием сахарного диабета 2-го типа (СД2), выраженной гипергликемией с 4–8-й недели жизни и развитием органических поражений после 8–10-й недели. Целью работы было изучить экспрессию молекулярно-клеточных регуляторов апоптоза в клетках печени самцов мышей *db/db* на разных сроках развития ожирения и сахарного диабета (в возрасте 10 и 18 нед). Проведены иммуногистохимический анализ (с помощью непрямого авидин-биотинового пероксидазного метода) и морфометрическая оценка экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического протеина Bad в клетках печени исследуемых животных на разных сроках развития ожирения и СД2. В печени исследуемых самцов в возрасте 10 нед установлено превышение значения площади окрашивания на белок Bcl-2 над белком Bad. Индекс соотношения площадей экспрессии Bcl-2/Bad у 10-недельных животных оказался в два раза выше по сравнению с 18-недельными особями, что свидетельствует о наличии условий для блокирования процессов апоптоза в печени мышей *db/db* более раннего возраста. На 18-й неделе жизни у самцов мышей *db/db* обнаружено почти трехкратное увеличение площади экспрессии белка Bad на фоне неизменившейся экспрессии белка Bcl-2. Снижение значения соотношения площадей окрашивания Bcl-2/Bad у 18-недельных животных произошло за счет роста площади экспрессии Bad, что подтверждает отсутствие антиапоптотической защиты клеток и создает условия для активации митохондриальной «ветви» апоптоза в печени самцов мышей *db/db* с выраженными признаками ожирения и СД2.

Ключевые слова: мыши *db/db*; ожирение; сахарный диабет 2-го типа; печень; эндотелиоциты; гепатоциты; Bcl-2; Bad.

Для цитирования: Мичурина С.В., Ищенко И.Ю., Архипов С.А., Черепанова М.А., Васендин Д.В., Завьялов Е.Л. Апоптоз в печени самцов мышей *db/db* при развитии ожирения и сахарного диабета 2-го типа. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):435-440. DOI 10.18699/VJ20.43-0

Apoptosis in the liver of male *db/db* mice during the development of obesity and type 2 diabetes

S.V. Michurina¹, I.Yu. Ishchenko¹✉, S.A. Arkhipov¹, M.A. Cherepanova¹, D.V. Vasendin³, E.L. Zavjalov²

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Siberian State University of Geosystems and Technologies, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: irenisch@mail.ru

Abstract. Obesity and diabetes mellitus are known to lead to the development of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The mechanisms of programmed cell death are actively involved in maintaining cellular homeostasis along development of NAFLD. Proteins of the BCL-2 family are key regulators of physiological and pathological apoptosis. Homozygous males of BKS.Cg-Dock7^mLepr^{db}/+/+J mice (*db/db* mice) are characterized by progressive obesity and the development of type 2 diabetes mellitus (DM2) with severe hyperglycemia at 4–8 weeks and organ lesions at 8–10 weeks of age. The aim of this research was to study the expression of molecular cell regulators of apoptosis in liver cells of *db/db* mice males at different stages of obesity and diabetes development (at the age of 10 and 18 weeks). Immunohistochemical analysis (using the indirect avidin-biotin peroxidase method) and morphometric evaluation of the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and the proapoptotic protein Bad in liver cells of studied animals at different stages of obesity and DM2 were carried out. An excess of the value of the Bcl-2 protein staining area over the Bad protein staining area was revealed in the liver of 10-week-old animals. The Bcl-2/Bad expression area ratio in 10-week-old animals was twice as high as in 18-week-old animals, which indicates the presence of conditions for blocking apoptosis in the liver

of younger *db/db* mice. At the 18th week of life, *db/db* mice displayed an almost threefold increase in the expression area of the Bad protein against the background of an unchanged expression of the Bcl-2 protein. The decrease in the Bcl-2/Bad staining area ratio in 18-week-old animals was due to the increase in the Bad expression area, which indicates the absence of antiapoptotic cell protection and creates conditions for activation of the mitochondrial pathway of apoptosis in the liver of male *db/db* mice with pronounced signs of obesity and DM2.

Key words: *db/db* mice; obesity; type 2 diabetes mellitus (DM2); liver; endothelial cells; hepatocytes; Bcl-2; Bad.

For citation: Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A., Cherepanova M.A., Vasendin D.V., Zavjalov E.L. Apoptosis in the liver of male *db/db* mice during the development of obesity and type 2 diabetes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):435-440. DOI 10.18699/VJ20.43-o

Введение

В условиях развития неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) в поддержании клеточного гомеостаза принимают активное участие механизмы запрограммированной клеточной гибели (Schuppan, Schattenberg, 2013). Ожирение и связанные с ним нарушения обмена веществ, включая накопление липидов в печени и воспаление, играют важную роль в канцерогенезе печени. Последние данные указывают на то, что ожирение и сахарный диабет приводят к развитию метаболического синдрома и НАЖБП, которые у пациентов с этим заболеванием могут прогрессировать до неалкогольного стеатогепатита, включающего риск развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (Shimizu et al., 2011). Белки семейства BCL-2 являются ключевым регулятором физиологического и патологического апоптоза. Согласно современной модели регуляции апоптоза, соотношение белков регуляторов апоптоза Bcl-2, Bad и Bax определяет чувствительность клеток к воздействию апоптотических факторов и служит «молекулярным переключателем», определяющим, будет ли происходить рост либо атрофия ткани (Sun et al., 2015). Молекулярные особенности развития митохондриальной «ветви» апоптоза в печени самцов мышей *db/db* в постнатальном онтогенезе на разных сроках развития ожирения и сахарного диабета 2-го типа (СД2) до настоящего времени не изучены.

Цель нашего исследования – изучить экспрессию молекулярно-клеточных регуляторов апоптоза белков семейства BCL-2 – антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического протеина Bad – в клетках печени самцов мышей *db/db* на разных сроках развития ожирения и СД2 (в возрасте 10 и 18 нед).

Материалы и методы

Эксперименты проведены в ЦКП SPF-виварий Института цитологии и генетики СО РАН на гомозиготных самцах мышей линии BKS.Cg-Dock7^mLepr^{db/+}/+J (мыши *db/db*). Гомозиготные особи этой линии имеют дефект рецептора лептина (*Lepr^{db}*) и характеризуются полифагией, прогрессирующим ожирением с 3–4-й недели жизни, выраженной гипергликемией с 4–8-й недели жизни, развитием органических поражений после 8–10-й недели. Животных содержали в помещении с регулярным световым циклом 14С:10Т, постоянной комнатной температурой 24±2 °С и относительной влажностью 45±10 %, на стандартном корме (Ssniff, Германия) и воде *ad libitum*.

Исследования проводили на мышках в возрасте 10 (*n* = 7) и 18 (*n* = 7) недель, который сопоставим с 10 и 18 годами человека соответственно (Flurkey et al., 2006). Животных

выводили из эксперимента методом краниоцервикальной дислокации и забирали образцы печени для светооптических и иммуногистохимических исследований. Все экспериментальные работы на животных были выполнены с соблюдением принципов гуманности, проведены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЭС). Исследование одобрено локальным этическим комитетом (Протокол № 128 от 15.03.2017).

Образцы печени фиксировали в 10 % забуференном формалине (BioVitrum, Россия) в течение 48 ч, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в гистомикс (BioVitrum). Срезы ткани толщиной 3 мкм получали на микротоме LEICA RM2155 (Германия). Для светооптического исследования использовали препараты, окрашенные гематоксилином Майера и эозином.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков Bcl-2 и Bad проводили на парафиновых срезах печени с помощью непрямого авидин-биотинового пероксидазного метода с использованием набора “Vectastain Universal Elite ABC Kit” (Vector Laboratories, Catalog Number PK-7200). На последнем этапе иммуногистохимическую окраску осуществляли в хромогенном субстрате, содержащем диаминобензидин (раствор готовится *ex tempore* из компонентов набора “ImmPACT DAB” (Vector Laboratories, Catalog Number SK-4105). Часть срезов докрашивали гематоксилином Майера, промывали водой и после дегидратации монтировали под покровные стекла. Для количественной оценки экспрессии Bcl-2 и Bad в печени мышей проводили компьютерный морфометрический анализ цифровых фотографий, полученных при помощи микроскопа LEICA DM 2500 с видеокамерой LEICA DFC425C (Германия) при увеличении ×400. С помощью программы “Image J” на цифровых снимках определяли среднюю площадь зон окрашивания на Bcl-2 и Bad. Вычисляли индекс отношения площади экспрессии Bcl-2 к площади экспрессии Bad.

Статистическую обработку результатов исследований проводили при помощи лицензионного пакета программ Statistica 6.1 (серийный № AXXR101E832903FA). Для анализа данных, подчиняющихся нормальному распределению (среднюю площадь окрашивания белков Bcl-2 и Bad), рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку средней арифметической; достоверность различий исследуемых групп устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Достоверность различий данных,

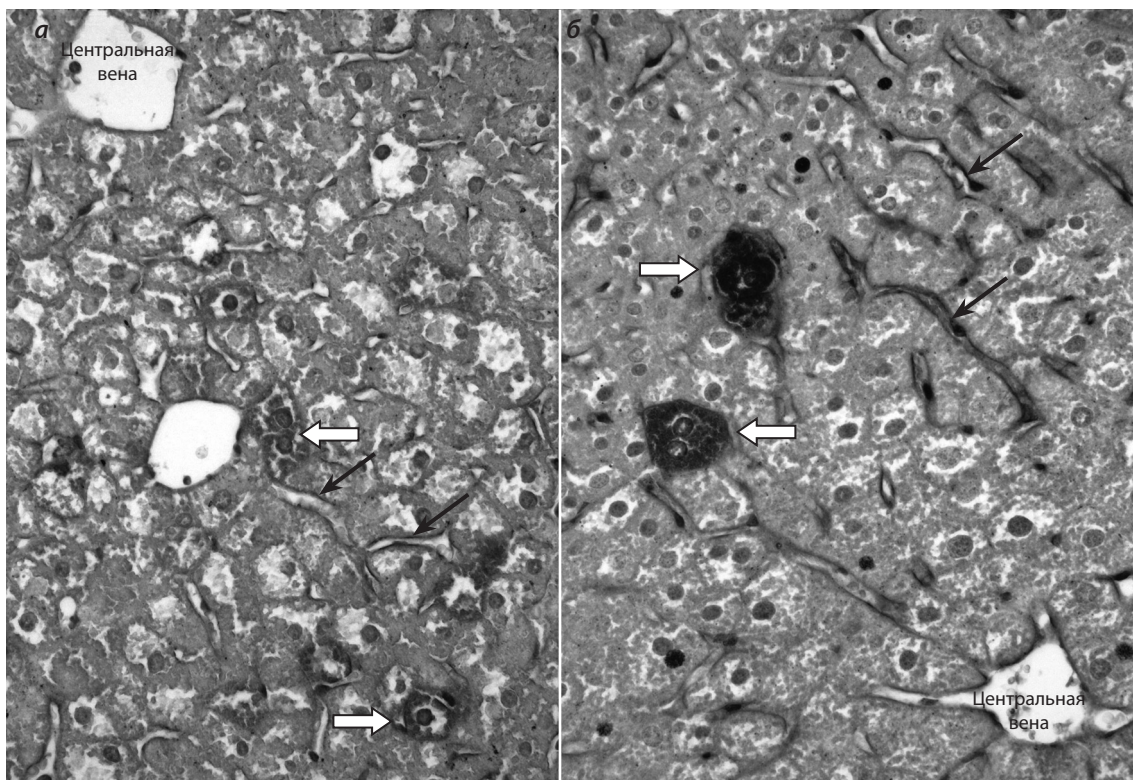


Рис. 1. Печень мышей *db/db* в возрасте 10 нед: *a* – слабо выраженное иммуногистохимическое окрашивание на проапоптотический белок Bad с докраской гематоксилином Майера; *b* – ярко выраженное иммуногистохимическое окрашивание на антиапоптотический белок Bcl-2 с докраской гематоксилином Майера.

Здесь и на рис. 3: черными стрелками указаны синусоидные капилляры печени, белыми – иммуногистохимически окрашенные гепатоциты. Окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$.

отличных от нормального распределения (индекс отношения площади экспрессии Bcl-2 к площади экспрессии Bad), определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия сравниваемых величин считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

В печени исследуемых самцов мышей в возрасте 10 нед обнаружены застойные явления в междольковых венах, расширение лимфатических сосудов, желчных протоков. В отдельных гепатоцитах и группах паренхиматозных клеток, расположенных главным образом в промежуточных зонах печеночных долек, отмечены признаки белковой дистрофии и аккумуляции липидов, преимущественно мелкокапельного характера.

Имуногистохимически был выявлен слабый Bad-положительный сигнал в отдельных гепатоцитах и в гетерогенной популяции синусоидных клеток кровеносных капилляров печени (рис. 1, *a*), участвующих в образовании гемато-лимфатического барьера печени, включающего эндотелиоциты, клетки Купфера, клетки Ито и Pit-клетки (Мичурина и др., 2016). При этом в клетках печени наблюдалось выраженное иммуногистохимическое окрашивание и на антиапоптотический белок Bcl-2. В печеночных дольках исследуемый маркер был сосредоточен в основном в эндотелиальных клетках выстилки кровеносных синусоидных капилляров и в единичных гепатоцитах (см. рис. 1, *b*).

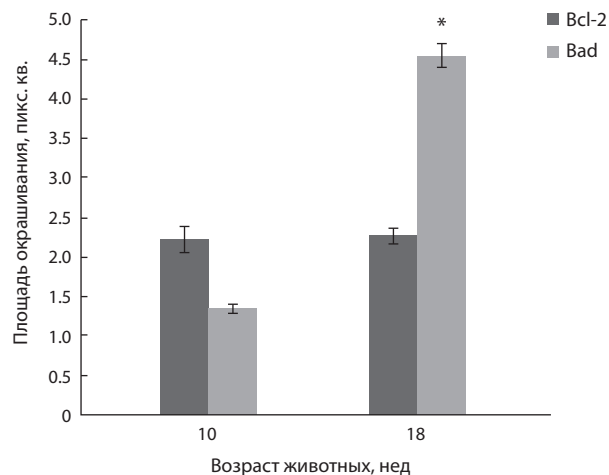


Рис. 2. Площадь окрашивания белков Bcl-2 и Bad в печени мышей *db/db* в возрасте 10 и 18 нед.

* Различия достоверны между группами «10 нед» и «18 нед» ($p < 0.05$).

Количественная оценка экспрессии молекулярно-клеточных регуляторов апоптоза антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического протеина Bad в печени самцов мышей *db/db* показала, что в клетках органа у животных в возрасте 10 нед происходит превышение значения площади иммуногистохимического окрашивания на белок Bcl-2 над значением этого параметра для белка Bad (рис. 2).

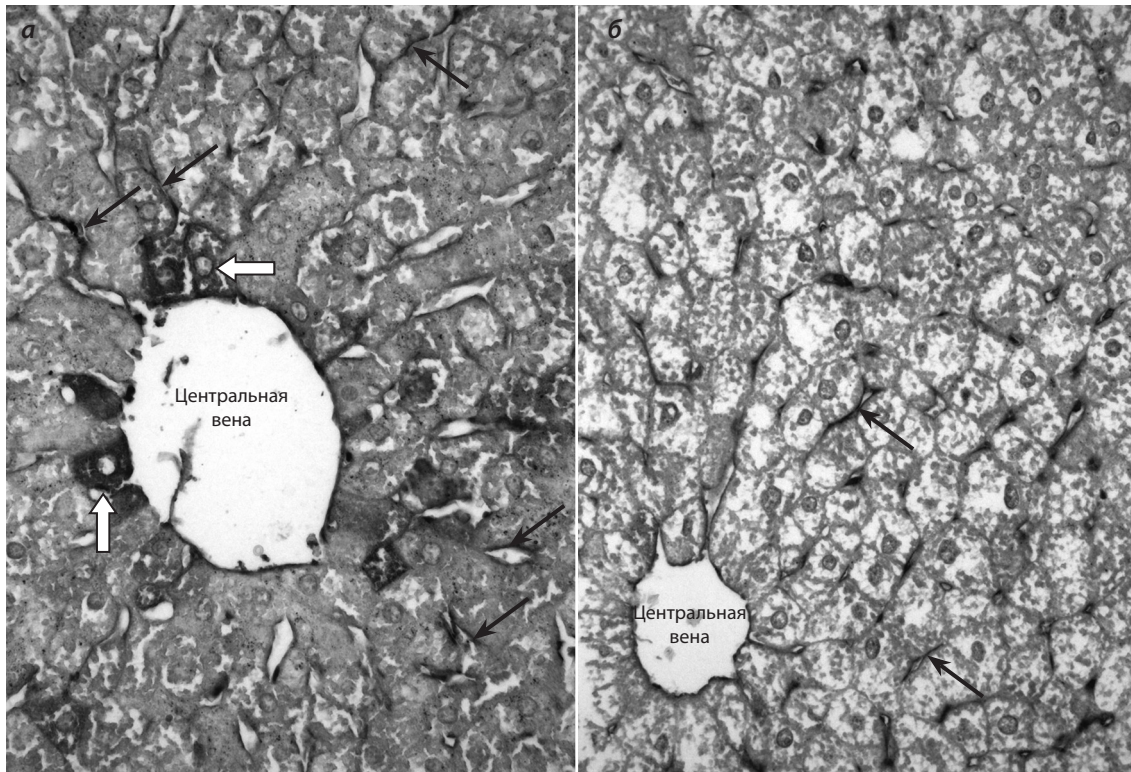


Рис. 3. Печень мышей *db/db* в возрасте 18 нед: *a* – выраженное иммуногистохимическое окрашивание на проапоптотический белок Bad с докраской гематоксилином Майера; *б* – слабое иммуногистохимическое окрашивание на антиапоптотический белок Bcl-2 с докраской гематоксилином Майера.

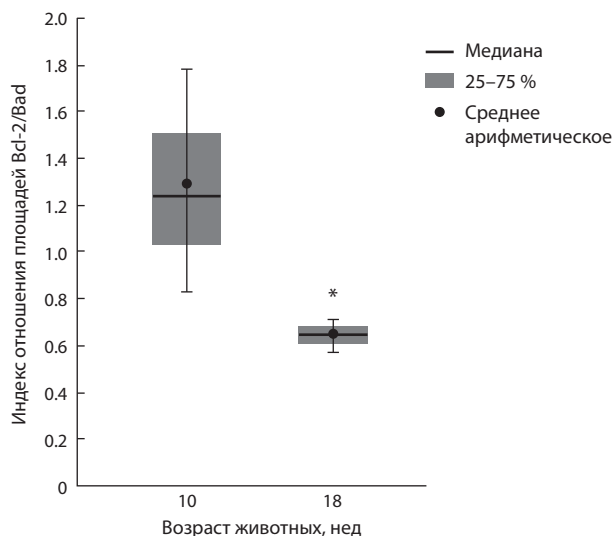


Рис. 4. Индекс отношения площадей окрашивания Bcl-2/Bad.
* Различия достоверны между группами «10 нед» и «18 нед» ($p < 0.05$).

В печени мышей самцов мышей *db/db* в возрасте 18 нед отмечены признаки развития неалкогольной жировой болезни, более выраженные, чем у животных 10-недельного возраста. В паренхиматозных клетках всех зон печеночных долек определялась диффузная аккумуляция липидов средне- и крупнокапельного характера, развивающаяся на фоне нарушений микроциркуляции, внутри-

органного транспорта желчи, значительной дилатации кровеносных и лимфатических сосудов в системе триад и центральных вен.

Исследование экспрессии молекулярно-клеточных регуляторов апоптоза белков семейства BCL-2 в печени самцов мышей *db/db* в возрасте 18 нед показало выраженное иммуногистохимическое окрашивание на проапоптотический белок Bad эндотелиальных клеток кровеносных синусоидных капилляров. Сильный Bad-положительный сигнал определялся в гепатоцитах, расположенных преимущественно в перипортальных зонах и вокруг центральных вен (рис. 3, *a*), а также в дуктальном эпителии желчных протоков триад. При этом в клетках гематолимфатического барьера печени и единичных гепатоцитах исследуемых животных в возрасте 18 нед наблюдалось слабое иммуногистохимическое окрашивание на антиапоптотический белок Bcl-2 (см. рис. 3, *б*).

Морфометрический анализ печени животных в возрасте 18 нед показал увеличение площади экспрессии проапоптотического белка Bad, по сравнению с 10-недельными мышами. При этом площадь окрашивания на антиапоптотический белок Bcl-2 не изменилась, по сравнению с животными в возрасте 10 нед (см. рис. 2).

Оценка отношения площадей экспрессии Bcl-2/Bad выявила значительное снижение этого индекса у 18-недельных мышей *db/db* по сравнению с 10-недельными животными (рис. 4), происходящее за счет возрастания главным образом площади экспрессии Bad у самцов в возрасте 18 нед. Полученные данные свидетельствуют об

отсутствии антиапоптотической защиты клеток органа, что создает условия для активации митохондриальной «ветви» апоптоза в клетках печени мышей *db/db* в возрасте 18 нед.

Обсуждение

Известно, что на развитие программированной клеточной гибели оказывают влияние посттрансляционные модификации белков семейства BCL-2. Один из путей регуляции активности апоптоз-индуцирующих белков – процесс фосфорилирование/дефосфорилирование, это влияет на их способность образовывать гетеродимеры с другими членами белков семейства BCL-2. В свете современных данных, индукция экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 вызывает закрытие каналов в митохондриальной мембране и предотвращает выход протеазы AIF (фактор, индуцирующий апоптоз) и цитохрома C, защищая тем самым клетку от апоптоза. При этом Bcl-2 блокирует реакции перекисного окисления липидов в мембранах клеток, обеспечивая защиту клеток от повреждения свободными радикалами и препятствуя, таким образом, развитию апоптоза (Chevalier et al., 2000; Пальцев, 2002; Мушкамбаров, Кузнецов, 2007; Dewanjee et al., 2015). Ранее нами было установлено, что к 10-недельному возрасту мыши *db/db* уже характеризовались ожирением, имели тяжелую гипергликемию с уровнем глюкозы в плазме 506 мг/дл (28.1 ммоль/л) и больше. Однако существенных различий в уровнях глюкозы, триглицеридов, общего холестерина, АЛТ и ГГТ у мышей *db/db* в возрасте 10 и 18 нед не найдено (Michurina et al., 2016). Как обнаружено в этом исследовании, в печени самцов в возрасте 10 нед площадь экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 превышает значение площади иммуногистохимического окрашивания на проапоптотический белок Bad. Полученные результаты свидетельствуют о наличии антиапоптотической защиты клеток печени на данном сроке развития НАЖБП.

Показано, что при СД2 в печени самцов мышей *db/db* в возрасте 18 нед выявляются ультраструктурные нарушения энергетического и белоксинтетического аппаратов клеток, углеводного и жирового обмена, что приводит к развитию белковой и жировой дистрофии гепатоцитов (Michurina et al., 2016).

Нарушения кровообращения и лимфотока в печени этих животных обуславливают нарушения морфологической организации гемато-лимфатического барьера печени, приводят к понижению экспрессии рецептора LYVE-1 на мембранах эндотелиальных клеток синусоидов. Такие морфологические перестройки способствуют развитию тканевой гипоксии, оксидативного стресса и повреждению митохондрий – индукторов клеточной гибели (Eckert et al., 2003; Michurina et al., 2016). В этих условиях с помощью белков семейства Bcl-2 запускается митохондриальная «ветвь» апоптоза клеток. При нарушении наружной мембраны митохондрий из межмембранного объема также выделяется термоллабильный фактор, катализирующий реакции с O_2 и приводящий к развитию окислительного стресса. При этом образуются активные формы кислорода, разрушающие митохондрии и являющиеся мощными индукторами апоптоза (Колесников и др., 1999; Dewanjee et al., 2015).

Развитие микровезикулярного стеатоза также считается следствием тяжелого нарушения функции митохондрий (Begriche et al., 2011). Предполагают, что те же митохондриальные нарушения могут быть частой причиной развития мелкопузырчатого стеатоза и апоптоза у мышей с ожирением (Trak-Smauga et al., 2011).

В нашем исследовании выявлены наибольшие изменения в эндотелиальных клетках кровеносных синусоидных капилляров печени. Мы только начинаем понимать всю сложность функций эндотелиальных клеток. В настоящее время доказано, что эти клетки контролируют регенерацию печени как «пространственно-временной реостат». Динамически регулируя экспрессию ангиопоэтина-2, они координируют собственную регенерацию и пролиферацию гепатоцитов, поддерживают восстановление соединительной ткани, контролируют созревание и состояние покоя кровеносных сосудов (Hu et al., 2014). Эндотелий выступает в качестве исходной линии защиты от вторжения патогенных микроорганизмов, а также регулирует тонус сосудов и проницаемость. Поскольку поврежденные эндотелиоциты могут отделяться от их базальной мембраны и свободно циркулировать в крови, дискуссионной была возможность обнаружения эндотелиального апоптоза в естественных условиях. Степень развития сосудистых травм непосредственно коррелирует с травмой органов у больных в критическом состоянии (Hutchins et al., 2013). Выявленное нами в печени самцов мышей *db/db* в возрасте 18 нед выраженное иммуногистохимическое окрашивание на проапоптотический белок Bad эндотелиальных клеток кровеносных синусоидных капилляров при низком уровне экспрессии в них антиапоптотического белка Bcl-2 свидетельствует о развитии митохондриальной «ветви» апоптоза в клетках гематолимфатического барьера печени при НАЖБП (Shimizu et al., 2011; Hutchins et al., 2013).

Поскольку запуск апоптоза происходит через инактивирование Bcl-2 при его связывании с белком Bad, установленное нами увеличение площади окрашивания проапоптотического белка Bad говорит об отсутствии антиапоптотической защиты и развитии апоптоза по митохондриальному пути в клетках печени. Это подтверждается также понижением соотношения площадей экспрессии Bcl-2/Bad в печени у самцов мышей *db/db* на 18-й неделе жизни.

Заключение

Проведены иммуногистохимический анализ и морфометрическая оценка экспрессии молекулярно-клеточных регуляторов апоптоза белков членов семейства BCL-2: антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического протеина Bad в клетках печени самцов мышей *db/db* на разных сроках развития ожирения и сахарного диабета 2-го типа. В печени самцов в возрасте 10 нед выявлено превышение значения площади окрашивания на белок Bcl-2 над белком Bad. Индекс соотношения площадей экспрессии Bcl-2/Bad у 10-недельных животных оказался в два раза выше по сравнению с 18-недельными особями, что говорит о наличии условий для блокирования процессов апоптоза в печени более молодых мышей. На 18-й неделе жизни у мышей обнаружено почти трех-

кратное увеличение площади экспрессии белка Bad на фоне неизменившейся экспрессии белка Bcl-2. Снижение значения отношения Bcl-2/Bad у 18-недельных животных отмечалось за счет роста площади экспрессии Bad. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии антиапоптотической защиты клеток и создании условий для активации митохондриальной «ветви» апоптоза в печени самцов мышей *db/db* с выраженными признаками ожирения и СД2.

Список литературы / References

Колесников С.И., Семенюк А.В., Грачев С.В. Импринтинг действия токсикантов в эмбриогенезе. М., 1999.
[Kolesnikov S.I., Semenyuk A.V., Grachev S.V. Toxicant Action Imprinting in Embryogenesis. Moscow, 1999. (in Russian)]

Мичурина С.В., Ищенко И.Ю., Архипов С.А., Климонтов В.В., Рачковская Л.Н., Коненков В.И., Завьялов Е.Л. Влияние комплекса мелатонина, оксида алюминия и полиметилсилоксана на экспрессию LYVE-1 в печени мышей с моделью ожирения и сахарного диабета 2-го типа. *Бюл. эксперим. биол. и медицины*. 2016;162(8):238-242.
[Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A., Klimontov V.V., Rachkovskaya L.N., Konenkov V.I., Zavjalov E.L. Effects of melatonin, aluminum oxide, and polymethylsiloxane complex on the expression of LYVE-1 in the liver of mice with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;162(2):269-272. DOI 10.1007/s10517-016-3592-y.]

Мущкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007.
[Mushkambarov N.N., Kuznetsov S.L. Molecular Biology. Moscow, 2007. (in Russian)]

Пальцев М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук. *Вестн. РАН*. 2002;72(1):13-21.
[Paltsev M.A. Molecular medicine and progress in basic sciences. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2002;72(1):13-21. (in Russian)]

Begriffe K., Massart J., Robin M.A., Borgne-Sanchez A., Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol*. 2011;54(4):773-794. DOI 10.1016/j.jhep.2010.11.006.

Chevalier R.L., Smith C.D., Wolstenholme J., Krajewski S., Reed J.C. Chronic ureteral obstruction in the rat suppresses renal tubular Bcl-2 and stimulates apoptosis. *Exp. Nephrol*. 2000;8(2):115-122. DOI 10.1159/000020657.

Dewanjee S., Dua T.K., Khanra R., Das S., Barma S., Joardar S., Bhattacharjee N., Zia-Ul-Haq M., Jaafar H.Z. Water spinach, *Ipomoea aquatica* (Convolvulaceae), ameliorates lead toxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139831. DOI 10.1371/journal.pone.0139831.

Eckert A., Keil U., Kressmann S., Schindowski K., Leutner S., Leutz S., Müller W.E. Effects of EGb 761 *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry*. 2003;36(Suppl. 1):S15-S23. DOI 10.1055/c-2003-40449.

Flurkey K., Curren J.M., Harrison D.E. Mouse models in aging research. In: Fox J.G., Barthold S.W., Davisson M.T., Newcomer C.E., Quimby F.W., Smith A.L. (Eds.). *The Mouse in Biomedical Research*. 2nd Edition. New York: Elsevier, 2006;3:637-672.

Hu J., Srivastava K., Wieland M., Runge A., Mogler C., Besemfelder E., Terhardt D., Vogel M.J., Cao L., Korn C., Bartels S., Thomas M., Augustin H.G. Endothelial cell-derived angiotensin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. *Science*. 2014;343(6169):416-419. DOI 10.1126/science.1244880.

Hutchins N.A., Chung C.S., Borgerding J.N., Ayala C.A., Ayala A. Kupffer cells protect liver sinusoidal endothelial cells from Fas-dependent apoptosis in sepsis by down-regulating gp130. *Am. J. Pathol*. 2013;182(3):742-754. DOI 10.1016/j.ajpath.2012.11.023.

Michurina S.V., Ishchenko I.J., Klimontov V.V., Arkhipov S.A., Myakina N.E., Cherepanova M.A., Zavjalov E.L., Koncevaya G.V., Konenkov V.I. Linagliptin alleviated fatty liver disease in diabetic *db/db* mice. *World J. Diabetes*. 2016;7(19):534-546. DOI 10.4239/wjd.v7.i19.534.

Schuppan D., Schattenberg J.M. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2013;28(Suppl. 1):68-76. DOI 10.1111/jgh.12212.

Shimizu M., Yasuda Y., Sakai H., Kubota M., Terakura D., Baba A., Ohno T., Kochi T., Tsurumi H., Tanaka T., Moriwaki H. Pitavastatin suppresses diethylnitrosamine-induced liver preneoplasms in male C57BL/KsJ-*db/db* obese mice. *BMC Cancer*. 2011;11:281. DOI 10.1186/1471-2407-11-281.

Sun D., Li S., Wu H., Zhang M., Zhang X., Wei L., Qin X., Gao E. Oncostatin M (OSM) protects against cardiac ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice by regulating apoptosis, mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity. *J. Cell. Mol. Med*. 2015;19(6):1296-1307. DOI 10.1111/jcmm.12501.

Trak-Smayra V., Paradis V., Massart J., Nasser S., Jebara V., Fromenty B. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. *Int. J. Exp. Pathol*. 2011;92(6):413-421. DOI 10.1111/j.1365-2613.2011.00793.x.

ORCID ID

E.L. Zavjalov orcid.org/0000-0002-9412-3874


Благодарности. Разведение животных поддержано бюджетным проектом № 0324-2019-0041, исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.09.2019. После доработки 23.10.2019. Принята к публикации 23.10.2019. Опубликована онлайн 24.03.2020.

Адаптация сульфосфосфованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster*

М.А. Еремина , Н.Е. Грунтенко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 e-mail: eremina@bionet.nsc.ru


Аннотация. Липидный обмен имеет решающее значение в физиологии. В последние десятилетия модельный объект *Drosophila melanogaster* активно используется в изучении фундаментальных вопросов метаболизма липидов и его нарушений, включая ожирение, а также в поиске терапевтических целей для лечения метаболических нарушений у человека. Быстрое и точное количественное определение содержания липидов – важный шаг в решении этих задач. Впервые метод количественного измерения общих липидов с использованием сульфосфосфованилинового (СФВ) метода был описан Цольнером с коллегами в 1962 г., а адаптирован для насекомых Ван Генделем на самках желтолихорадочного комара *Aedes aegypti*. Преимущество этого метода по сравнению с традиционными гравиметрическим и хроматографическим методами анализа заключается в том, что он позволяет обходиться минимальным количеством биологического материала, не требует сложных манипуляций с образцом, является высокочувствительным, воспроизводимым и простым в реализации с минимальным набором оборудования. В настоящей работе описана модификация протокола Ван Генделя, позволяющая осуществлять адаптацию метода количественного определения общих липидов для различных организмов, на примере классической биологической модели *D. melanogaster*. В представленном протоколе адаптированы время реакции, объемы химических растворов и реагентов для проведения анализа образцов индивидуальных дрозофил. Данная работа является актуальной, так как описывает универсальную схему, согласно которой СФВ метод может быть адаптирован для количественного анализа содержания общих липидов у широкого спектра биологических объектов. Для проверки результативности модифицированного метода мы измерили содержание общих липидов у самок *D. melanogaster*, несущих гипоморфные мутации генов инсулинового сигнального каскада *dilp6* и *dfoxo*, по сравнению с линией дикого типа Canton-S и показали участие *dilp6*, но не *dfoxo* в регуляции жирового обмена. Полученные результаты подчеркивают эффективность колориметрического метода с использованием СФВ реакции и спектрофотометрии для количественного анализа содержания общих липидов.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; сульфосфосфованилиновый метод; колориметрия; спектрофотометрия; общие липиды; жировой обмен; мутации *dilp6⁴¹* и *dfoxo^{BG01018}*.

Для цитирования: Еремина М.А., Грунтенко Н.Е. Адаптация сульфосфосфованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):441-445. DOI 10.18699/VJ20.636

Adaptation of the sulfophosphovanillin method of analysis of total lipids for various biological objects as exemplified by *Drosophila melanogaster*

М.А. Eremina , N.E. Gruntenko

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 e-mail: eremina@bionet.nsc.ru

Abstract. Lipid metabolism is crucial in physiology. In recent decades the model object *Drosophila melanogaster* has been actively used in the study of the fundamental issues of lipid metabolism and its disorders, including obesity, as well as in the search for therapeutic goals for the treatment of metabolic disorders in humans. Quick and accurate quantification of lipid content is an important step in solving these problems. For the first time the method of quantitative measurement of total lipids with the use of the sulfophosphovanillin (SPV) method was described by Zöllner and colleagues in 1962, and adapted for insects by Van Handel on females of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. The advantages of this method compared to traditional gravimetric and chromatographic methods of analysis are the use of a small amount of biological material, lack of need for complex manipulations with the sample, its high sensitivity, reproducibility and simplicity of implementation with a minimum set of equipment. Here, a modification of the Van Handel protocol is described, which allows the method to be adapted for quantitative determination of total lipids for various organisms as exemplified a widely used model, *D. melanogaster*. To test the effectiveness of the modified

method, we measured the content of total lipids in *D. melanogaster* females carrying hypomorphic mutations of the *dilp6* and *dfoxo* insulin signaling pathway genes compared to the wild-type Canton-S line, and showed that *dilp6* took part in the regulation of fat metabolism, while *dfoxo* did not. The results obtained emphasize the effectiveness of the colorimetric method with the use of SPV reaction and spectrophotometry for the quantitative analysis of total lipids.
Key words: *Drosophila melanogaster*; sulfophosphovanillin method; colorimetry; spectrophotometry; total lipids; lipid metabolism; mutations *dilp6*⁶⁴¹ and *dfoxo*^{BG01018}.

For citation: Eremina M.A., Gruntenko N.E. Adaptation of the sulfophosphovanillin method of analysis of total lipids for various biological objects as exemplified by *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):441-445. DOI 10.18699/VJ20.636 (in Russian)

Введение

Липидный обмен имеет решающее значение для выживания и размножения организмов, поскольку липиды формируют энергетический резерв организма и являются важными структурными компонентами клеточных мембран и сигнальными молекулами (Trinh, Boulianne, 2013). Для изучения механизмов регуляции метаболического обмена и его нарушений, включая ожирение, а также в поиске терапевтических целей для лечения метаболических нарушений у человека часто проводят исследования на различных животных моделях, от нематоды и дрозофилы до грызунов и приматов (Kleinert et al., 2018). *Drosophila melanogaster* подходит для моделирования метаболических заболеваний человека, поскольку, во-первых, большая часть генов и семейств генов, связанных с регуляцией углеводно-жирового метаболического пути, эволюционно консервативны у дрозофилы и человека; а во-вторых, дрозофила имеет менее сложный геном и меньшую избыточность генов, чем позвоночные, что дает значительные преимущества в изучении функций генов *in vivo* и определении новых компонентов пути (Liu, Huang, 2013; Álvarez-Rendón et al., 2018).

Консервативность распространяется и на функциональный уровень: жировое тело насекомого (аналог печени и белой жировой ткани млекопитающих) участвует в поглощении, запасании и обмене питательных веществ (Liu, Huang, 2013; Musselman, Kuhnlein, 2018). Содержание жира в организме мух может варьировать в широких пределах и служить чувствительным диагностическим критерием, указывающим на дисбаланс в метаболизме липидов (Hildebrandt et al., 2011). Быстрое и точное количественное определение уровня липидов очень важно при проведении исследований в этой сфере. К традиционным методам количественного определения липидов, как правило, относят гравиметрический или хроматографический методы анализа, недостатками которых считают сложность проведения, трудоемкость, использование большого количества исходного материала, что затрудняет выполнение небольших по объему анализируемого материала экспериментов (Anschau et al., 2017; Patel et al., 2019).

Ряд исследований доказывает, что колориметрический метод на основе сульфосфосфованилиновой (СФВ) реакции является универсальным: применяется для определения содержания общих липидов и в спинномозговой жидкости, и в сыворотке и плазме крови человека, и в пищевых продуктах и экологических образцах (Park et al., 2016). Метод анализа общих липидов у насекомых впервые описан Ван Генделем (Van Handel, 1985) для самок желтолихорадочного комара *Aedes aegypti*. В настоящее время данный колориметрический метод используется

для ряда других видов насекомых, в число которых входят сверчки *Gryllus bimaculatus* (Fukumura et al., 2018) и 15 представителей семейства жесткокрылых (Bozdoğan et al., 2016), а также модифицирован для эндопаразитов *Venturia canescens* (Foray et al., 2012), клещей *Ixodes ricinus* (Abdullah et al., 2018), рыб (Lu et al., 2008), простейших (Park et al., 2016) и хемолитотрофных микроорганизмов (Anschau et al., 2017). Стоит подчеркнуть, что метод, предложенный еще в 1962 г. (Zöllner et al., 1962; цит. по: Ростовцев, Резник, 1982), и сегодня не потерял актуальности и приобрел ряд модификаций, отвечающих современным целям и разнообразию объектов исследований.

Преимущество этого простейшего метода заключается в возможности анализа образцов малых объемов и в быстром количественном измерении содержания общих липидов (Park et al., 2016) с использованием минимального набора оборудования. Принцип метода основан на том, что СФВ реакция требует двойной связи углерод–углерод или свободных гидроксильных групп в липидных компонентах; концентрированная серная кислота вступает в реакцию с ненасыщенными липидами с образованием карбониевого аниона; фосфорная кислота вступает в реакцию с ванилином с образованием фосфатного эфира, приводя к увеличению реакционной способности карбонильной группы; карбониевый анион вступает в реакцию с карбонильной группой фосфованилина с образованием стабильного окрашенного комплекса (Knight et al., 1972). Интенсивность окрашивания может быть количественно определена путем измерения поглощения при 525–530 нм с использованием спектрофотометрических методов (Park et al., 2016).

Хотя колориметрический метод на примере количественного анализа содержания нейтральных липидов триглицеридов (90 % от всех липидов) был подвержен критике (Al-Anzi, Zinn, 2010), он показывает сходные результаты как с тонкослойной хроматографией, так и с колориметрическим анализом (Cheng et al., 2011; Tennesen et al., 2014; Byreddy et al., 2016).

Таким образом, возможность адаптировать этот простой и эффективный метод анализа для различных видов животных представляет несомненный интерес. В настоящей работе мы предлагаем протокол адаптации СФВ метода для количественной оценки содержания общих липидов у индивидуальных мух *D. melanogaster* и результаты применения этого метода при изучении содержания липидов у двух линий с мутациями генов инсулинового каскада. Для проверки эффективности метода мы исследовали содержание общих липидов у мух, несущих гипоморфные мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6*⁴¹) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo*^{BG01018}). Мы

полагаем, что проведенное исследование позволит оценить участие данных генов в липидном обмене.

Материалы и методы

Реагенты

- Хлороформ (99.1 %) ХЧ (АО «База № 1 Химреактивов», Россия);
- метанол (99.5 %) ХЧ (ЗАО «Вектон», Россия);
- серная кислота (93.5–95.6 %) ОСЧ (ЗАО «Союзхимпром», Россия);
- ортофосфорная кислота (85 %) ОСЧ (ЗАО «Союзхимпром», Россия);
- ванилин кристаллический (ГОСТ 16599-71);
- рафинированное подсолнечное масло (ГОСТ 1129-2013).

Экспериментальные животные. Мухи содержались на стандартной питательной среде (агар-агар, 7 г/л; кукурузная мука, 50 г/л; сухие дрожжи, 18 г/л; сахар, 40 г/л) в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25 °С, относительной влажности 50 %, 12-часовом световом дне. Для экспериментов имаго синхронизировали по вылету (мухи собирались в течение 3–4 ч). В работе были использованы три линии *D. melanogaster*: линия *dilp6⁴¹* с делецией 3'-области гена *phl*, 5'-области гена *dilp6*, захватывающей первый экзон и часть первого интрона (Rauschenbach et al., 2016); линия *foxo^{BG01018}*, несущая вставку Р-элемента [GT1] в 5'-области гена *dfoxo*, приводящую к частичной потере функции гена (Dionne et al., 2006); и линия дикого типа Canton-S. Все линии получены из Bloomington Drosophila Stock Center.

Подготовка и хранение образцов. Для предотвращения ферментативной деградации липидов Ван Гендель рекомендует хранить насекомых при температуре –20 °С или ниже либо высушивать их при 90 °С для остановки ферментативной активности (Van Handel, 1985). Описана также возможность хранить насекомых в 70–95 % этаноле; при этом для предотвращения ферментативной деградации при хранении выше –20 °С рекомендуется измельчать насекомое (Lee, 2019). В настоящей работе мух замораживали в жидком азоте (–195.75 °С) и хранили при –80 °С. Во избежание влияния глазного пигмента на результаты измерений перед анализом мух декапитуировали. В оригинальном методе (Van Handel, 1985) у самок рекомендуется удалять яичники либо не использовать в опытах оплодотворенных самок, так как липиды в яичниках запасаются для последующего развития потомства и не имеют установленной питательной ценности для мух. Но поскольку у дрозофил не представляется возможным извлечь яичники, не повредив при этом саму муху, в нашей работе мы постарались решить этот вопрос использованием для анализа неоплодотворенных самок. Также следует отметить, что количественное измерение общих липидов СФВ методом у мух с яичниками не препятствует обнаружению различий между линиями.

Колориметрический метод количественной оценки содержания общих липидов с использованием сульфосфосованилиновой реакции. Для получения фосфованилинового реагента к 120 мг ванилина добавляли 20 мл горячей воды и размешивали до полного растворения ванилина. Далее добавляли 80 мл H_3PO_4 до конечной концентрации 1.2 мг/мл.

Липидные стандарты, например триолеин (92860; Sigma), можно приобрести у поставщика химических веществ и разводить до нужной концентрации (Fogay et al., 2012), однако в работе (Byreddy et al., 2016) указано, что триолеин дает слишком сильное окрашивание и не подходит в качестве стандарта. В качестве липидного стандарта исследователи в основном используют растительные масла (Van Handel, 1985; Park et al., 2016; Anschau et al., 2017). Известное количество стандарта вступает в реакцию с реагентами для получения калибровочной линии, линейные регрессии часто имеют значение R^2 0.95 или выше. В настоящей работе в качестве липидного стандарта использовали 0.1 % раствор рафинированного подсолнечного масла (ГОСТ 1129-2013) (0.919 кг/м³). Для приготовления стандарта 10 мг масла растворяли в хлороформе до конечной концентрации 1 мг/мл.

Измерение концентрации общих липидов проводили посредством модифицированного для дрозофилы метода Ван Генделя (Van Handel, 1985). В связи с отличиями дрозофилы от комара *Ae. aegypti*, для которого разрабатывал свой метод Ван Гендель, в нашем протоколе были модифицированы время реакции, объемы химических растворов и реагентов для проведения анализа образцов индивидуальных дрозофил. Индивидуальную муху гомогенизировали в 100 мкл охлажденной смеси хлороформ-метанола (V/V), после чего образцы интенсивно встряхивали в течение 10 мин, далее 50 мкл супернантанта переносили в чистые пробирки и нагревали в микротермостате М-208 («Бис-Н», Россия) при 90 °С до полного испарения растворителя, добавляли 10 мкл H_2SO_4 и нагревали образцы при той же температуре 2 мин. Затем образцы охлаждали на льду и добавляли фосфованилиновый реагент до общего объема 1 мл. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте до проявления розового окрашивания, стабильно сохранявшегося в течение 1 ч. Анализировали образцы в спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 525 нм против «холостого» образца, содержащего только фосфованилиновый реагент.

Для построения калибровочной линии Форей с коллагами (Fogay et al., 2012) рекомендуют начинать с концентрации ниже ожидаемой в образце насекомого и заканчивать концентрацией выше ожидаемой. Калибровочную линию получали с использованием девяти разведений: 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг липидного стандарта в трех повторах. Далее процедуру выполняли согласно вышеописанному протоколу.

Статистический анализ. Расчет результатов проводили на основании данных калибровочной линии. Достоверность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Построение градуировочной кривой для определения содержания общих липидов у *D. melanogaster*

Посредством спектрофотометрического поглощения известных концентраций рафинированного подсолнечного масла при 525 нм получена градуировочная кривая (рис. 1). Установлена линейная регрессия: $y = 0.0023x + 0.0369$; $R^2 = 0.9971$.

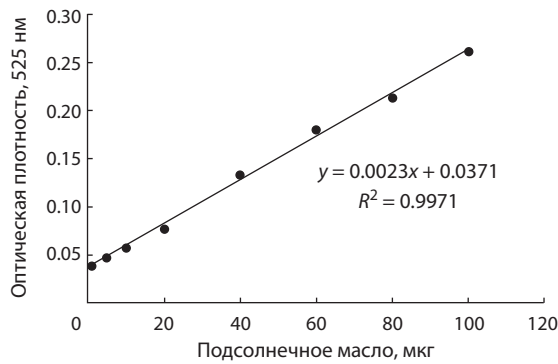


Рис. 1. Калибровочная линия продукта, образованного сульфосованилиновой реакцией с рафинированным подсолнечным маслом, растворенным в хлороформе до концентрации 1 мг/мл.

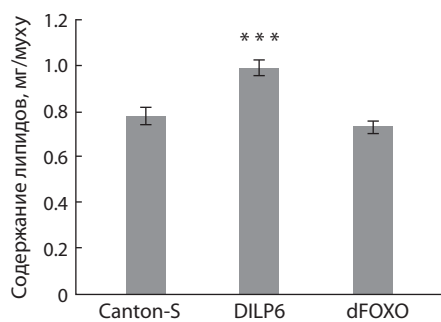


Рис. 2. Уровень общих липидов у трехсуточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа (Canton-S) и линий, несущих гипоморфные мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 и транскрипционного фактора dFOXO.

Каждое значение – среднее из 16–20 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. *** $p < 0.001$ – достоверность отличий мутантных самок с мутацией гена инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) от самок линии Canton-S.

Анализ образцов с известной концентрацией липидного стандарта показал, что метод является чувствительным и способен точно определять уровень общих липидов в диапазоне от 0 до 100 мкг.

Определение содержания общих липидов у самок *D. melanogaster* с гипоморфными мутациями генов инсулинового каскада *dilp6* и *dfoxo*

Известно, что инсулиновый сигнальный каскад дрозофилы включает шесть гомологов инсулина и инсулиноподобных факторов роста млекопитающих (DILPs1–6), которые связываются с единственным инсулиноподобным рецептором дрозофилы (dInR), активирующим инсулиновый каскад (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), и два гомолога релаксина (DILPs7, 8) (Gontijo, Garelli, 2018). Стимуляция dInR через субстрат инсулиноподобного рецептора (CHICO, гомолог IRS1–4 млекопитающих) приводит к активации dAkt/ПКВ (гомолог протеинкиназы B), которая модулирует активность ряда белков, в частности транскрипционного фактора семейства Forkhead box class O, dFOXO (гомолог FOXO1, 3a и 4 у млекопитающих) (Álvarez-Rendón et al., 2018).

Ранее методом ПЦР в реальном времени было установлено двукратное снижение уровня экспрессии гена *dfoxo*

(Gruntenko et al., 2016) и снижение в 13 раз уровня экспрессии гена *dilp6* (Еремина и др., 2019) в жировом теле (основном месте синтеза dFOXO и DILP6) у самок линий с мутацией *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* соответственно, по сравнению с уровнем экспрессии этих генов в жировом теле у самок линии дикого типа Canton-S. Кроме того, мы обнаружили, что уровень глюкозы и трегалозы – основного сахара насекомых, у самок обеих мутантных линий повышен по сравнению с контрольной линией Canton-S (Еремина и др., 2019). На основании этих данных мы предположили возможность участия генов *dilp6* и *dfoxo* в регуляции уровня жиров у дрозофилы. Для проверки этой гипотезы мы сравнили содержание общих липидов у самок *D. melanogaster* с мутациями *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}*, а также у самок контрольной линии Canton-S с помощью СФВ метода. Результаты проведенных измерений представлены на рис. 2. Очевидно, что у мутантных самок линии *dilp6⁴¹* уровень общих липидов повышен по сравнению с самками дикого типа (различия достоверны при $p < 0.001$), однако уровень общих липидов у самок линии *foxo^{BG01018}* не отличается от такового у самок дикого типа Canton-S.

В статье (Murillo-Maldonado et al., 2011) говорится об увеличении содержания общих липидов у линий с частичной потерей функции генов инсулинового каскада *PKB*, *dInR* и *chico*. Кроме того, авторы определили содержание углеводов у этих линий и продемонстрировали, что лишь у небольшого числа линий наблюдались значительные изменения. Так, гетероаллельная комбинация *InR^{3T5/E19}* приводила к значительному увеличению содержания углеводов, тогда как для *PKB^{1/3}* и *chico^{1/1}* существенных изменений не наблюдалось. Ранее нами было выявлено участие генов *dilp6* и *dfoxo* в регуляции углеводного обмена, сопровождающегося повышением уровня глюкозы и трегалозы у гипоморфных мутантов *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* (Еремина и др., 2019). Однако оставалось невыясненным, участвуют ли эти гены в регуляции липидного обмена. В настоящей работе с помощью быстрого метода с использованием сульфосованилиновой реакции мы показали, что в регуляции липидного обмена принимает участие *dilp6*, но не *dfoxo*. Наши результаты согласуются с результатами Мурилло-Мальдонадо с коллегами (Murillo-Maldonado et al., 2011) и свидетельствуют о том, что гены инсулинового сигнального каскада могут влиять либо только на углеводный обмен, как в случае *dfoxo*, либо только на липидный обмен, как в случае *PKB* и *chico*, либо и на углеводный, и на липидный, как в случае *dilp6* и *dInR*. Возможные механизмы этого влияния требуют дальнейшего изучения.

Заключение

Полученные данные демонстрируют высокую эффективность и чувствительность колориметрического метода с использованием сульфосованилиновой реакции для определения уровня общих липидов, в том числе в низких концентрациях. Проведенный анализ содержания общих липидов у самок *D. melanogaster* с гипоморфными мутациями генов инсулинового каскада это подтверждает, демонстрируя участие гена *dilp6*, но не *dfoxo* в регуляции жирового обмена. Таким образом, предложенный нами

протокол модификации колориметрического метода анализа содержания общих липидов с использованием спектрофотометрии может быть успешно применен при изучении механизмов жирового обмена у широкого спектра биологических объектов.

Список литературы / References

- Еремина М.А., Карпова Е.К., Раушенбах И.Ю., Пирожкова Д.С., Андреевкова О.В., Груntenко Н.Е. Влияние мутаций генов инсулинового сигнального каскада на изменение уровня углеводов у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом стрессе. *Генетика*. 2019;55(4):485-488. DOI 10.1134/S0016675819030068. [Eremina M.A., Karpova E.K., Rauschenbach I.Yu., Pirozhkova D.S., Andreenkova O.V., Gruntenko N.E. Mutations in the insulin signaling pathway genes affect carbohydrate level under heat stress in *Drosophila melanogaster* females. *Russ. J. Genet.* 2019;55(4): 519-521. DOI 10.1134/S1022795419030050.]
- Ростовцев В.Р., Резник Г.Е. Количественное определение липидных фракций в крови. *Лаб. дело*. 1982;4:26-29. [Rostovtsev V.N., Reznik G.E. Quantification of lipid fractions in blood. *Laboratornoe Delo = Laboratory Science*. 1982;4:26-29. (in Russian)]
- Abdullah S., Davies S., Wall R. Spectrophotometric analysis of lipid used to examine the phenology of the tick *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors*. 2018;11:523. DOI 10.1186/s130-71-018-3102-3.
- Al-Anzi B., Zinn K. Colorimetric measurement of triglycerides cannot provide an accurate measure of stored fat content in *Drosophila*. *PLoS One*. 2010;5(8):e12353. DOI 10.1371/journal.pone.0012353.
- Álvarez-Rendón J.P., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. *BioMed. Res. Int.* 2018;2018:1417528. DOI 10.1155/2018/1417528.
- Anschaу А., Caruso C.S., Kuhn R.C., Franco T.T. Validation of the sulfo-phospho-vanillin (spv) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Braz. J. Chem. Eng.* 2017; 34(1):19-27. DOI 10.1590/0104-6632.20170341s20140222.
- Bozdoğan H., Erbey M., Aksoy H.A. Total amount of protein, lipid and carbohydrate of some adult species belong to curculionidae family (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Zool. Stud.* 2016;4(5):242-248.
- Byreddy A.R., Gupta A., Barrow C.J., Puri M. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *J. Microbiol. Meth.* 2016;125:28-32.
- Cheng Y.S., Zheng Y., VanderGheynst J.S. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids*. 2011;46(1):95-103. DOI 10.1007/s11745-010-3494-0.
- Dionne M.S., Pham L.N., Shirasu-Hiza M., Schneider D.S. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2006;16:1977-1985.
- Foray V., Pelisson P.-F., Venner M.C.B., Desouhant E., Venner S., Menu F., Giron D., Rey B. A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *Physiol. Entomol.* 2012;37:295-302. DOI 10.1111/j.1365-3032.2012.00831.x.
- Fukumura K., Konuma T., Tsukamoto Y., Nagata S. Adipokinetic hormone signaling determines dietary fatty acid preference through maintenance of hemolymph fatty acid composition in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Sci. Rep.* 2018;8:4737. DOI 10.1038/s41598-018-22987-2.
- Gontijo A.M., Garelli A. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: a relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech. Dev.* 2018;154:44-50. DOI 10.1016/j.mod.2018.04.005.
- Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Karpova E.K., Andreenkova O.V., Gladkikh D.V., Ilinsky Y.Y., Rauschenbach I.Yu. The impact of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *Biol. Open*. 2016;5:1706-1711. DOI 10.1242/bio.022038.
- Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2018;258:134-139. DOI 10.1016/j.ygcen.2017.05.019.
- Hildebrandt A., Bickmeyer I., Kühnlein R.P. Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay. *PLoS One*. 2011; 6(9):e23796. DOI 10.1371/journal.pone.0023796.
- Kleinert M., Clemmensen C., Hofmann S.M., Moore M.C., Renner S., Woods S.C., Huypens P., Beckers J., de Angelis M.H., Schürmann A., Bakhti M., Klingenspor M., Heiman M., Cherrington A.D., Ristow M., Lickert H., Wolf E., Havel P.J., Müller T.D., Tschöp M.H. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018;14(3):140-162. DOI 10.1038/nrendo.2017.161.
- Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin. Chem.* 1972;18(3):199-202.
- Lee C.L. What we can learn from the energetic levels of insects: a guide and review. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2019;112(3):220-226. DOI 10.1093/aesa/say051.
- Liu Z., Huang X. Lipid metabolism in *Drosophila*: development and disease. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2013;45(1):44-50. DOI 10.1093/abbs/gms105.
- Lu Y., Ludsin S.A., Fanslow D.L., Pothoven S.A. Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2008;65:2233-2241. DOI 10.1139/F08-135.
- Murillo-Maldonado J.M., Sánchez-Chávez G., Salgado L.M., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*. 2011;60(5):1632-1636. DOI 10.2337/db10-1288.
- Musselman L.P., Kühnlein R.P. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *J. Exp. Biol.* 2018;221(Suppl.1):jeb163881. DOI 10.1242/jeb.163881.
- Park J., Jeong H.J., Yoon E.Y., Moon S.J. Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*. 2016;31(4):391-401. DOI 10.4490/algae.2016.31.12.7.
- Patel A., Antonopoulou I., Enman J., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art. *BMC Chem. Eng.* 2019;1:13. DOI 10.1186/s42480-019-0013-9.
- Rauschenbach I.Yu., Karpova E.K., Burdina E.V., Adonyeva N.V., Bykov R.A., Ilinsky Y.Y., Menshanov P.N., Gruntenko N.E. Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2016;243: 1-9. DOI 10.1016/j.ygcen.2016.11.004 0016-6480.
- Tennessen J.M., Barry W.E., Cox J., Thummel C.S. Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*. 2014;68(1):105-115. DOI 10.1016/j.ymeth.2014.02.034.
- Trinh I., Boulianne G.L. Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. *Physiology*. 2013;28:117-124. DOI 10.1152/physiol.00025.2012.
- Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1985;1:302-304.

ORCID ID

M.A. Eremina orcid.org/0000-0001-6136-6928
N.E. Gruntenko orcid.org/0000-0003-3272-1518

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № 0324-2019-0041 и гранта РФФИ № 20-04-00579.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.04.2020. После доработки 22.05.2020. Принята к публикации 22.05.2020.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....
Подписано в печать 20.06.2020. Выход в свет 30.06.2020. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.95.

Уч.-изд. л. 16.2. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.). Заказ № 70. Цена свободная.

.....
Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.