

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

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)
К.В. 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)
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)
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)
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***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
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
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
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

255

ОТ РЕДАКТОРА

Молекулярная генетика

256

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние различий в третьем домене гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом.
И.К. Байков, А.Л. Матвеев, Л.А. Емельянова, Г.Б. Каверина, С.Е. Ткачёв, Н.В. Тикунова

262

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Связь гаплотипов SNP LTR-области *BLV* с гематологическими показателями крови крупного рогатого скота. Н.В. Блажко, С.Х. Вышегуров, А.С. Донченко, К.С. Шатохин, Т.И. Крыцына, В.А. Рябина

Генетика растений

270

ОБЗОР

Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты. Д.Ю. Тяпкина, Е.З. Кочеева, М.А. Слугина

281

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изучение посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования. Е.С. Беспалова, Ю.В. Ухатова, Н.Н. Волкова, Е.В. Овзс, Н.А. Гаитова, Т.А. Гавриленко

287

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм ITS-последовательностей генов 35S рРНК у видов *Elymus dahuricus* aggr.: два криптических вида?
А.В. Родионов, К.С. Добрякова, Н.Н. Носов, А.А. Гнутиков, Е.О. Пунина, А.А. Крюков, В.С. Шнеер (на англ. языке)

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

296

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Молекулярная идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине в интрогрессивных линиях яровой мягкой пшеницы. О.А. Баранова, С.Н. Сибикеев, А.Е. Дружин (на англ. языке)

304

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Мозаичные вирусы картофеля, поражающие растения клубненосных видов рода *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР. Е.В. Розгозина, Н.В. Мироненко, Н.А. Чалая, Ю. Мацухита, Х. Янагисава

312

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Приоритизация генов картофеля, вовлеченных в формирование селекционно-значимых признаков, с использованием базы знаний *SOLANUM TUBEROSUM*.
П.С. Деменков, О.В. Сайк, Т.В. Иванисенко, Н.А. Колчанов, А.В. Кочетов, В.А. Иванисенко

320

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Оптимизация параметров качества зерна для селекции озимой ржи. М.Л. Пономарева, С.Н. Пономарев

Генетика и селекция микроорганизмов

328

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Направленная селекция психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы. И.И. Новикова, Ю.А. Титова, И.В. Бойкова, И.Л. Краснобаева

337

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии. Б.Н. Зайцев, О.С. Таранов, Н.Б. Рудометова, Н.С. Щербакова, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко

Генетика животных

343

ОБЗОР

Молекулярно-генетические основы формирования окраски оперения у кур.
А.В. Макарова, О.В. Митрофанова, А.Б. Вахрамеев, Н.В. Дементьева

355

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Синапсис, рекомбинация и эпигенетическая модификация хромосом у баранов, гетерозиготных по метацентрической хромосоме 3 домашней овцы *Ovis aries* и акроцентрическим гомологам архара *Ovis ammon*. Т.И. Бикчурина, Е.К. Томгорова, А.А. Торгашева, В.А. Багиров, Н.А. Волкова, П.М. Бородин

Экологическая генетика

362

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Филогеографическая структура евразийской связи (*Mareca penelope*) в Голарктике. И.В. Куликова, Ю.Н. Журавлев, И.Г. Коробицын, Г.А. Немкова, К.Г. МакКрекен, Дж.Л. Петерс

370

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Митотип *Drosophila melanogaster* может иметь адаптивное значение. Д.В. Петровский, Л.П. Захаренко

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING
CONTENTS • 2019 • 23 • 3

- 255 FROM THE EDITOR
- Molecular genetics**
- 256 ORIGINAL ARTICLE
The effect of differences in the third domain of the glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of recombinant D3 proteins with a chimeric antibody. *I.K. Baykov, A.L. Matveev, L.A. Emelianova, G.B. Kaverina, S.E. Tkachev, N.V. Tikunova*
- 262 ORIGINAL ARTICLE
Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle. *N.V. Blazhko, S.Kh. Vyshegurov, A.S. Donchenko, K.S. Shatokhin, T.I. Krytsyna, V.A. Ryabinina*
- Plant genetics**
- 270 REVIEW
Vitamin C in fleshy fruits: biosynthesis, recycling, genes, and enzymes. *D.Y. Tyapkina, E.Z. Kochieva, M.A. Slugina*
- 281 ORIGINAL ARTICLE
Investigation of the post-cryogenic regeneration ability of potato varieties under different cultivation conditions. *E.S. Beshpalova, Yu.V. Ukhatova, N.N. Volkova, E.V. Oves, N.A. Gaitova, T.A. Gavrilenko*
- 287 ORIGINAL ARTICLE
Polymorphism of ITS sequences in 35S rRNA genes in *Elymus dahuricus* aggregate species: two cryptic species? *A.V. Rodionov, K.S. Dobryakova, N.N. Nosov, A.A. Gnutikov, E.O. Punina, A.A. Kriukov, V.S. Shneyer*
- Plant breeding for immunity and performance**
- 296 ORIGINAL ARTICLE
Molecular identification of the stem rust resistance genes in the introgression lines of spring bread wheat. *O.A. Baranova, S.N. Sibikeev, A.E. Druzhin*
- 304 ORIGINAL ARTICLE
Potato mosaic viruses which infect plants of tuber-bearing *Solanum* spp. growing in the VIR field gene bank. *E.V. Rogozina, N.V. Mironenko, N.A. Chalaya, Yu. Matsushita, H. Yanagisawa*
- 312 ORIGINAL ARTICLE
Prioritization of potato genes involved in the formation of agronomically valuable traits using the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base. *P.S. Demenkov, O.V. Saik, T.V. Ivanisenko, N.A. Kolchanov, A.V. Kochetov, V.A. Ivanisenko*
- 320 ORIGINAL ARTICLE
Optimization of grain quality parameters for winter rye breeding. *M.L. Ponomareva, S.N. Ponomarev*
- Microbial genetics and selection**
- 328 ORIGINAL ARTICLE
Controlled breeding of the psychrophilic strain G-034 VIZR of *Trichoderma asperellum* for fast crop residues' polymers utilization and soil enhancement. *I.I. Novikova, J.A. Titova, I.V. Boykova, I.L. Krasnobaeva*
- 337 ORIGINAL ARTICLE
An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. *B.N. Zaitsev, O.S. Taranov, N.B. Rudometova, N.S. Shcherbakova, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko*
- Animal genetics**
- 343 REVIEW
Molecular-genetic bases of plumage coloring in chicken. *A.V. Makarova, O.V. Mitrofanova, A.B. Vakhrameev, N.V. Dementeva*
- 355 ORIGINAL ARTICLE
Chromosome synapsis, recombination and epigenetic modification in rams heterozygous for metacentric chromosome 3 of the domestic sheep *Ovis aries* and acrocentric homologs of the argali *Ovis ammon*. *T.I. Bikchurina, E.K. Tomgorova, A.A. Torgasheva, V.A. Bagirov, N.A. Volkova, P.M. Borodin*
- Ecological genetics**
- 362 ORIGINAL ARTICLE
Holarctic phylogeographic structure of Eurasian wigeon (*Mareca penelope*). *I.V. Kulikova, Y.N. Zhuravlev, I.G. Korobitsyn, G.A. Nemkova, K.G. McCracken, J.L. Peters*
- 370 ORIGINAL ARTICLE
A Drosophila melanogaster mitotype may have an adaptive meaning. *D.V. Petrovskii, L.P. Zakharenko*

Уважаемые коллеги, дорогие читатели! Очередной номер «Вавиловского журнала генетики и селекции» посвящен актуальным направлениям исследований в различных областях генетики растений, животных и микроорганизмов.

В рубрике «Молекулярная генетика» привлекает внимание оригинальное исследование, в котором описана разработка препаратов для профилактики и лечения такого опасного заболевания, как клещевой энцефалит. Результаты проверки эффективности действия химерного антитела ch14D5 по отношению к гликопротеину E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов позволяют прогнозировать протективную активность антитела к различным штаммам вируса.

Основные пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты (витамина C) и пути ее рециркуляции в тканях различных растений рассмотрены в обзорной статье раздела «Генетика растений». Описаны ключевые гены, участвующие в биосинтезе и накоплении аскорбиновой кислоты в плодах. Показаны различия, которые наблюдаются в путях биосинтеза в зависимости от вида растения и стадии его развития. Одна из экспериментальных статей этого же раздела знакомит с молекулярно-филогенетическими исследованиями сибирских и дальневосточных видов пырейника (*Elymus ssp.*) с использованием ITS-последовательностей генов 35S рРНК, на основе которых сделано заключение о необходимости пересмотра используемых на данный момент признаков для классификации этого вида.

Традиционную для журнала рубрику «Селекция растений на иммунитет и продуктивность» открывает оригинальное исследование, в котором представлены результаты фитопатологического и молекулярно-генетического тестирования сортов и селекционных линий мягкой пшеницы на устойчивость к патогену

стеблевой ржавчины. Анализируя полевую и лабораторную устойчивость образцов, авторы установили влияние различных генов и их комбинаций на уровень восприимчивости растений к патогену. Интересны также две работы, выполненные на картофеле. Одна из них посвящена диагностике мозаичных вирусов картофеля у дикорастущих видов из коллекции генбанка ВИР, а в другой с помощью биоинформатического подхода выявлены гены-кандидаты, определяющие устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам.

К настоящему времени возросла актуальность исследований по поиску и изучению штаммов микроорганизмов, используемых для биоремедиации вод и грунтов. В экспериментальной статье раздела «Генетика и селекция микроорганизмов» представлены данные по отбору и тестированию активности штамма рода *Trichoderma* для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и целлюлозосодержащих материалов с целью оздоровления почвы и биоконтроля почвообитающих фитопатогенных видов. В следующей статье описан методический подход для количественного анализа различных образцов, содержащих вирусы животных, растений и микроорганизмов. Для диагностики вирусов предлагается использовать электронную микроскопию, которая имеет ряд преимуществ в сравнении с традиционными методами.

В обзорной статье раздела «Генетика животных» анализируются данные, раскрывающие природу меланиновой окраски оперения у птиц на примере кур, и молекулярно-генетические механизмы появления разных типов окраски. Известно, что межвидовая гибридизация – один из способов расширения генетического разнообразия животных. Протекание мейотического процесса и нарушения, которые возникают при отдаленных скрещиваниях, рассмотрены в оригинальном исследовании на примере домашней овцы *Ovis aries*.

Заключительная рубрика «Экологическая генетика» включает две экспериментальные статьи. В первой обсуждаются вопросы генетической дифференциации популяций евразийской свиньи (*Mareca penelope*) – одного из многочисленных перелетных видов уток. Проведено сравнение генетической дифференциации вида, полученное с помощью данных кольцевания птиц и результатов секвенирования митохондриальной ДНК. Во второй статье дан анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального генома у природных популяций *Drosophila melanogaster*. Полученные авторами результаты рассмотрены с точки зрения адаптивности различных митогаметотипов дрозофил.

Академик В.К. Шумный

Влияние различий в третьем домене гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом

И.К. Байков¹✉, А.А. Матвеев^{1,2}, Л.А. Емельянова^{1,2}, Г.Б. Каверина¹, С.Е. Ткачев¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru; ivan_baykov@mail.ru

Целью настоящей работы было исследование влияния различий аминокислотной последовательности рекомбинантных доменов D3 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, Сибирского и европейского субтипов на связывание протективного антитела ch14D5 с этими белками. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса было показано, что наибольшее сродство ($K_D = 1.7 \pm 0.5$ нМ) антитело ch14D5 проявляет к домену D3 вируса клещевого энцефалита штамма «Софьин-Ру», принадлежащего к дальневосточному субтипу вируса. В то же время сродство к аналогичным белкам D3, полученным на основе штаммов «Заусаев», «1528-99» и «Абсеттаров» сибирского и европейского субтипов вируса клещевого энцефалита, оказалось заметно ниже ($K_D = 25 \pm 4$, 300 ± 50 и 250 ± 50 нМ соответственно). Кроме того, информация о пространственном расположении аминокислотных остатков, которыми отличаются полученные рекомбинантные белки, указывает на то, что узнаваемый антителом ch14D5 эпитоп находится в области бокового ребра домена D3 гликопротеина E.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; гликопротеин E; домен D3; антитело; рекомбинантный белок; поверхностный плазмонный резонанс; картирование эпитопа.

Для цитирования: Байков И.К., Матвеев А.А., Емельянова Л.А., Каверина Г.Б., Ткачев С.Е., Тикунова Н.В. Влияние различий в третьем домене гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):256-261. DOI 10.18699/VJ19.490

The effect of differences in the third domain of the glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of recombinant D3 proteins with a chimeric antibody

И.К. Байков¹✉, А.А. Матвеев^{1,2}, Л.А. Емельянова^{1,2}, Г.Б. Каверина¹, С.Е. Ткачев¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru; ivan_baykov@mail.ru

Currently, a therapeutic drug based on recombinant antibodies for the prevention and treatment of tick-borne encephalitis virus (TBEV) is developed in ICBFM SB RAS, and the chimeric antibody ch14D5 is considered as one of the key components of this drug. It was previously shown that this antibody is directed to the domain D3 of the glycoprotein E of TBEV. It was previously shown that this antibody is able to protect mice from the European subtype of TBEV, strain "Absettarov", and the presence of virus-neutralizing activity against the Far Eastern subtype of TBEV, strain 205 was also shown for this antibody. However, it remains unclear whether this antibody exhibits selectivity for different subtypes of TBEV. The aim of this study was to investigate the effect of amino acid sequence differences of recombinant D3 domains derived from the glycoprotein E of TBEV of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of the protective antibody ch14D5 to these proteins. Using Western blot analysis and surface plasmon resonance, it was shown that ch14D5 antibody has the highest affinity ($K_D = 1.7 \pm 0.5$ нМ) for the D3 domain of the TBEV of the "Sofjin-Ru" strain belonging to the Far Eastern subtype of the virus. At the same time, the affinity of ch14D5 antibody for similar D3 proteins derived from "Zausaev", "1528-99" and "Absettarov" strains of the Siberian and European subtypes of TBEV was noticeably lower ($K_D = 25 \pm 4$, 300 ± 50 , 250 ± 50 нМ, respectively). In addition, information about the spatial arrangement of amino acid residues that are different for the studied

recombinant proteins indicates that the epitope recognized by the ch14D5 antibody is in close proximity to the lateral ridge of D3 domain of E glycoprotein.

Key words: tick-borne encephalitis virus; glycoprotein E; domain D3; antibody; recombinant protein; surface plasmon resonance; epitope mapping.

For citation: Baykov I.K., Matveev A.L., Emelianova L.A., Kaverina G.B., Tkachev S.E., Tikunova N.V. The effect of differences in the third domain of the glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of recombinant D3 proteins with a chimeric antibody. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):256-261. DOI 10.18699/VJ19.490 (in Russian)

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к роду *Flavivirus*, переносится иксодовыми клещами и вызывает у людей тяжелые нейроинфекции. Ежегодно в мире регистрируют около 10 тыс. случаев заболевания клещевым энцефалитом (Heinz, Stiasny, 2012). В настоящее время единственным специфическим препаратом для профилактики и лечения клещевого энцефалита является «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» (далее ВКЭ-Ig), представляющий собой антитела IgG, получаемые из сыворотки крови иммунизированных доноров, а также людей, проживающих на эндемичных по клещевому энцефалиту территориях. Этот препарат, производимый в Российской Федерации, используется только на территории России, а также в Казахстане, в то время как в большинстве стран Европы специфические средства профилактики и лечения клещевого энцефалита отсутствуют. Поскольку препараты сывороточных антител имеют ряд ограничений, связанных с нестабильностью характеристик и повышенным уровнем биологического риска при использовании, в мировой практике наблюдается тенденция замены таких препаратов более перспективными и безопасными лекарственными средствами на основе рекомбинантных антител. Разработка препарата для профилактики и лечения клещевого энцефалита – одно из приоритетных направлений Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Ранее был получен набор мышинных моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита (Tsekhanovskaya et al., 1993) и продемонстрированы высокие противовирусные свойства некоторых из них как *in vitro*, так и *in vivo* (Levanov et al., 2010; Baykov et al., 2014). В случае антитела ch14D5, которое наряду с другими антителами может быть использовано для создания современного иммунопрепарата против ВКЭ, протективная активность была исследована только в отношении европейского субтипа вируса клещевого энцефалита, штамм «Абсеттаров» (Baykov et al., 2014), в то время как штаммы других субтипов ВКЭ не исследованы. Кроме того, было установлено, что узнаваемый антителом ch14D5 эпитоп расположен в домене D3 гликопротеина E (Байков и др., 2018). Хотя последовательность аминокислотных остатков этого домена высоко консервативна для ВКЭ, при сравнении различных штаммов этого вируса иногда выявляются единичные аминокислотные замены в этой части гликопротеина E. В случае, если эти различия попадают в область связывания антитела, они могут существенно влиять на величину сродства антитела ch14D5 к белку E, и, возможно, на противовирусные свойства этого антитела. Таким образом, в настоящее время остается открытым вопрос о том,

проявляет ли ch14D5 избирательность по отношению к различным субтипам вируса клещевого энцефалита.

Цель исследования – выяснить, влияют ли различия в последовательности аминокислотных остатков рекомбинантных доменов D3, полученных на основе гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов, на связывание протективного антитела ch14D5 с этими белками.

Материалы и методы

Материалы. Химерное антитело ch14D5a было получено и очищено согласно методике, опубликованной ранее (Baykov et al., 2014). Использованная в работе кДНК различных штаммов ВКЭ была получена в реакции обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР, на основе суммарной РНК, выделенной из индивидуальных клещей, собранных на территории Сибири и Дальнего Востока.

Получение генетических конструкций, кодирующих белки D3_Eu, D3_ZauM и D3_Val. На основе кДНК, полученной для образцов TBEV-2781 (штамм «Заусаев» сибирского субтипа ВКЭ), 126-17 (штамм «Абсеттаров» европейского субтипа ВКЭ), 1528-99 (балтийская линия сибирского субтипа ВКЭ) из коллекции ИХБФМ СО РАН с помощью олигонуклеотидов D3_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCGGCGGTGGCTCGGGTCTTACATACACAATGTGCG-3'; и D3_his_NotI_rev: 5'-TTAGCGGCCGCTTAGTGTGGTGATGATGATGACTCCCTTTTGGAAACCATTG-3' были получены ПЦР-фрагменты размером около 330 п. н. Фрагменты ДНК, кодирующие белки D3_Eu, D3_ZauM и D3_Val, были встроены в плазмидную ДНК рHEN2 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *NotI*. Правильность конструкций рHEN2-D3_ZauM, рHEN2-D3_Eu и рHEN2-D3_Val подтверждали секвенированием.

Получение рекомбинантных белков. Бактерии *E. coli* HB2151, трансформированные соответствующей плазмидной ДНК, растили в среде LB с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл и 0.1 % глюкозы при скорости перемешивания 180 об./мин при 37 °С. При достижении оптической плотности $OD_{600} = 0.7-0.9$ индуцировали синтез белка добавлением изопропил-бета-тиогаляктозида до конечной концентрации 0.5 мМ; культивирование продолжали при скорости перемешивания 180 об./мин и температуре 30 °С. Через 4 ч биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 6000 g, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 % сахарозы, 1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) и 10 мМ Трис-HCl pH 7.5, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры. После инкубации 5 мин при комнатной температуре и 5 мин при 0 °С клетки осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С. После удаления супернатанта

клеточный осадок ресуспендировали в 5 мМ растворе $MgSO_4$, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры, и инкубировали 5 мин при 0 °С. Осадок сферопластов отделяли центрифугированием 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С, а супернатант, содержащий периплазматические белки, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0.22 мкм и анализировали электрофорезом в 15 % полиакриламидном геле.

Вестерн-блот анализ. Растворы периплазматических белков, содержащие целевые белки D3_Sof, D3_Val, D3_ZauM и D3_Eu, фракционировали электрофорезом в 15 % денатурирующем полиакриламидном геле, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) методом электропереноса. Далее анализ проводили аналогично тому, как это описано в (Байков и др., 2018). Рекомбинантные белки выявляли раствором антитела ch14D5 в концентрации 1 мкг/мл. Иммунные комплексы выявляли вторичным антителом, конъюгированным со щелочной фосфатазой, Anti-Human IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, A1543 (Sigma). Окрашенную мембрану промывали дистиллятом и сканировали.

Исследование взаимодействия антитела с рекомбинантными белками D3 методом поверхностного плазмонного резонанса. Взаимодействие антитела ch14D5 с рекомбинантными белками D3 исследовали на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36, в качестве системного буфера использовали фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0.005 % твин-20 и 0.1 мМ ЭДТА. Поверхность HTG-чипа активировали пропусканием 1 мМ водного раствора $Ni(NO_3)_2$ в течение 120 с. Образцы периплазматических белков, содержащие какой-либо из целевых белков, использовали для иммобилизации на поверхность HTG-чипа до достижения уровня сигнала 50–70 единиц отклика. Неспецифически связавшиеся белки отмывали пропусканием 25 мМ раствора имидазола. Последовательные трехкратные разведения антитела ch14D5 анализировали на связывание с рекомбинантными белками. После первоначального скрининга для белков D3_Eu и D3_Val был выбран диапазон концентраций 405, 135, 45, 15 и 5 нМ, для белков D3_ZauM и D3_Sof – 81, 27, 9, 3 и 1 нМ. Диапазон концентраций выбирали так, чтобы он охватывал концентрацию, равную по значению K_D для исследуемого взаимодействия. В качестве референсного сигнала использовали сигнал, зарегистрированный для буфера, не содержащего антитела, а также сигнал, полученный при пропускании разведений антитела в той части чипа, где не было иммобилизовано белков. Скорректированный таким образом сигнал использовали для вычисления кинетических и равновесных констант методом глобального выравнивания с использованием простой модели односайтового связывания с помощью программного обеспечения PreoteOn Manager 3.1.0.

Анализ последовательностей гена E вируса клещевого энцефалита и визуализация различий на пространственных моделях гликопротеина E и вириона ВКЭ. Последовательности аминокислотных остатков белков D3_Sof, D3_Val, D3_ZauM и D3_Eu выравнивали с помощью программы MEGA 5 методом Clustal. Для визуализации расположения различий на пространствен-

ной модели гликопротеина E использовали программу PyMol 1.8 и файл координат pdb_id: 1svb.

Результаты

На первом этапе на основе вирусной РНК штаммов «Заусаев» и «1528-99», относящихся к сибирскому субтипу вируса клещевого энцефалита, а также штамма «Абсеттаров», относящегося к европейскому субтипу ВКЭ, были получены фрагменты ДНК, кодирующие домен D3 гликопротеина E этих вирусов. Фрагменты были встроены в плазмидную ДНК рHEN2-rED3_301, использованную нами ранее для получения фрагмента D3 штамма «Софьин-Ru» (Байков и др., 2018). После индукции синтеза белка из клеток были выделены фракции периплазматических белков, содержащих целевые белки D3_Sof, D3_Eu, D3_Val и D3_ZauM (рис. 1), соответствующие штаммам «Софьин-Ru», «Абсеттаров», «1528-99» балтийской линии и «Заусаев».

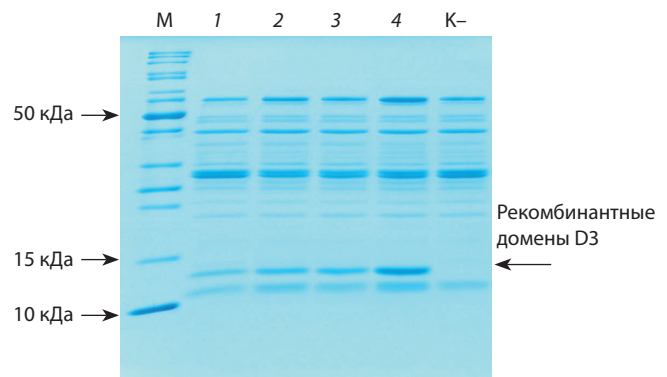


Рис. 1. Электрофореграмма в 15 % полиакриламидном геле периплазматических фракций клеток, содержащих плазмиду рHEN2-D3_Eu (дорожка 1), рHEN2-D3_Val (дорожка 2), рHEN2-D3_ZauM (дорожка 3) и рHEN2-rED3_301 (дорожка 4).

«К–» – периплазма клеток, не содержащих плазмидной ДНК; М – маркер молекулярных масс (Thermo scientific #26614).

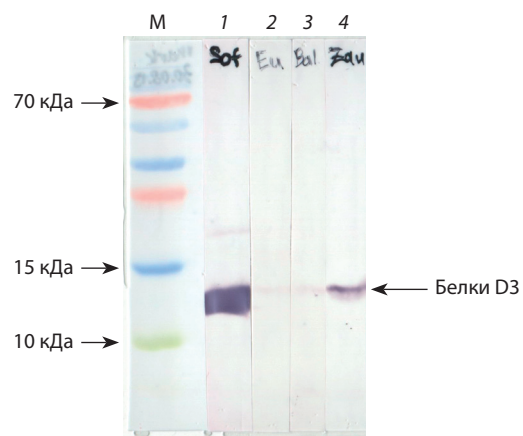


Рис. 2. Вестерн-блот анализ белков D3 с использованием антитела ch14D5.

Результат анализа образцов периплазматических фракций, содержащих белок D3_Sof (образец 1), D3_Eu (образец 2), D3_Val (образец 3) и D3_ZauM (образец 4), антителом ch14D5. М – маркер молекулярных масс (Thermo scientific #26619). Белковые комплексы проявлены конъюгатом Sigma #A1543.

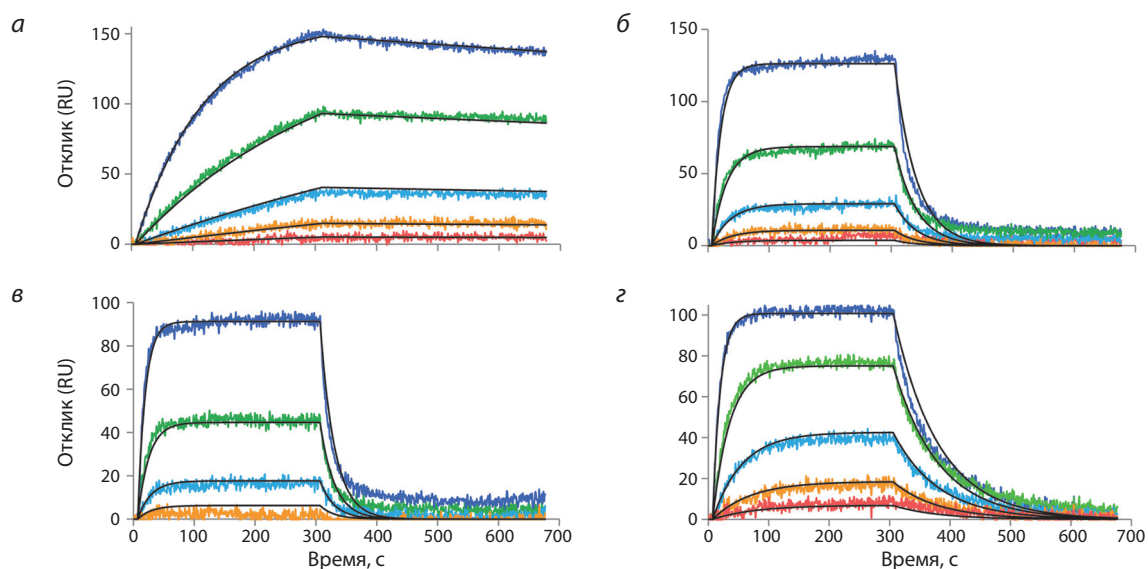


Рис. 3. Связывание антитела ch14D5 с рекомбинантными белками D3_Sof (а), D3_Eu (б), D3_Bal (в) и D3_ZauM (г), исследованное методом поверхностного плазмонного резонанса.

Цветные линии – экспериментальные данные, черные – аппроксимация.

Далее методом вестерн-блот анализа было исследовано взаимодействие химерного антитела ch14D5 с полученными рекомбинантными белками. Количество материала для переноса белков было выбрано так, чтобы на нитроцеллюлозной мембране оказалось равное количество целевых белков. В результате было показано, что химерное антитело проявляет наибольшее сродство к варианту D3_Sof. Вариант D3_ZauM окрашивался со значительно меньшей интенсивностью, а варианты D3_Eu и D3_Bal окрасились наиболее бледно (рис. 2).

Кроме того, сродство антитела ch14D5 к полученным рекомбинантным белкам было определено методом поверхностного плазмонного резонанса (рис. 3). Значения равновесных констант диссоциации составили 1.7 ± 0.5 нМ для белка D3_Sof, 250 ± 50 нМ для белка D3_Eu, 300 ± 50 нМ для белка D3_Bal и 25 ± 4 нМ для белка D3_ZauM, что хорошо согласуется с качественными данными, полученными методом вестерн-блот анализа.

Обсуждение

Один из современных подходов при профилактике и лечении вирусных инфекций – использование препаратов на основе специфических вируснейтрализующих либо протективных антител (Lambour et al., 2016; Salazar et al., 2017). Для флавивирусных инфекций этот подход также применим, и в настоящее время разрабатывают терапевтические антитела против вируса клещевого энцефалита, вируса Западного Нила, вируса лихорадки Денге, вируса Зика, вируса желтой лихорадки и других флавивирусов (Oliphant et al., 2005; Lai et al., 2010; Sautto et al., 2013; Vaykov et al., 2014; Julander et al., 2014; Fuzik et al., 2018). В зависимости от того, какой эпитоп на поверхности вирусного белка узнает то или иное антитело, антитела могут либо быть протективными, либо, наоборот, усиливать развитие инфекции. Так, антитела, направленные к третьему домену флавивирусного гликопротеина E, часто

обладают выраженными противовирусными свойствами (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016). Это вызвано тем, что именно третий домен гликопротеина E флавивирусов участвует в связывании с клеточными рецепторами. Антитела, направленные к доменам D1 и D2, часто усиливают инфекцию, что делает их не только бесполезными, но даже опасными (Dowd, Pierson, 2011; Halstead, 2014; Haslwanter et al., 2017; Katzelnick et al., 2017).

В настоящей работе мы изучили связывание антитела ch14D5 с рекомбинантными белками, представляющими собой фрагменты гликопротеина E ВКЭ европейского, сибирского и дальневосточного субтипов. Поскольку ранее было установлено, что антитело ch14D5 связывается с доменом D3 гликопротеина E (Байков и др., 2018), то в исследовании были использованы рекомбинантные домены D3, продуцируемые бактериями *E. coli* в растворимом мономерном виде. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса было обнаружено, что сродство антитела ch14D5 к различным вариантам домена D3 различается более чем на два порядка. При постановке экспериментов мы постарались исключить возможное влияние на результаты экспериментов факторов, связанных с продукцией белка: белки D3_Sof, D3_Eu, D3_Bal и D3_ZauM нарабатывали и выделяли одновременно в идентичных условиях. Дизайн эксперимента на биосенсоре ProteOn XPR36 был выбран таким образом, что рекомбинантные белки D3 были иммобилизованы на поверхность, а анализируемое антитело находилось в растворе. Соответственно, в случае потенциально гетерогенного образца, в котором часть молекул целевого белка имеет далекую от нативной конформацию, изменились бы количество образующихся комплексов и уровень детектируемого сигнала, но не детектируемые кинетические константы k_{on} , k_{off} и равновесная константа диссоциации K_D , характеризующая степень сродства антитела

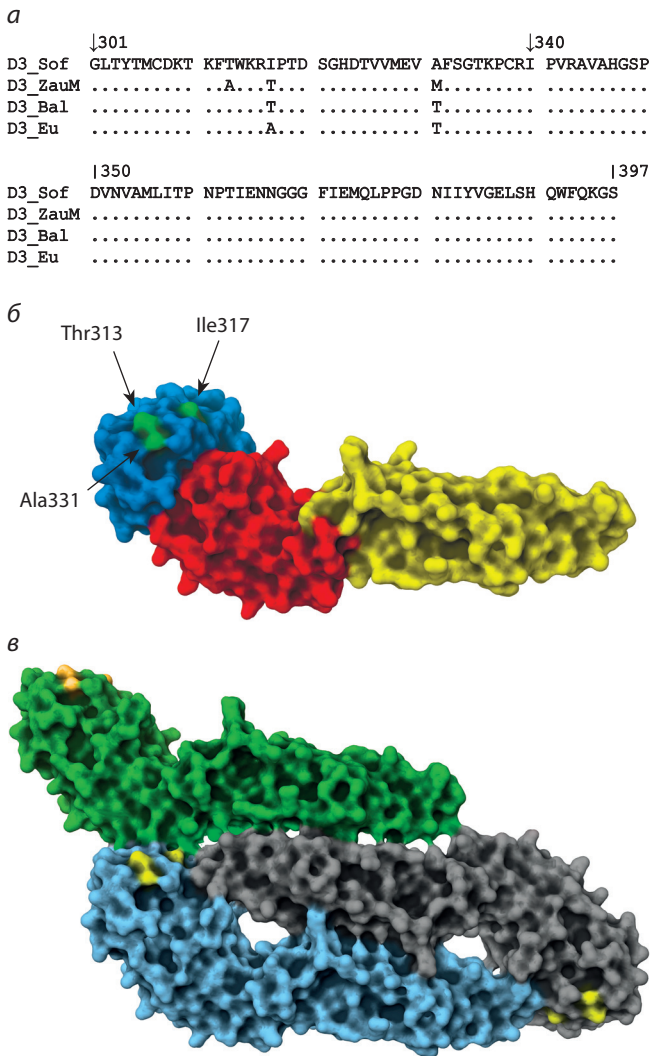


Рис. 4. Локализация различий в последовательности аминокислотных остатков белков D3_Sof, D3_Bal, D3_ZauM и D3_Eu на поверхности гликопротеина E ВКЭ.

а – выравнивание последовательности аминокислотных остатков; б – пространственная структура гликопротеина E ВКЭ. Зеленым цветом выделены аминокислотные остатки, которыми белки D3_Sof, D3_Bal, D3_ZauM и D3_Eu отличаются друг от друга; красным, желтым и синим – домены D1, D2 и D3 соответственно; в – фрагмент поверхности вириона ВКЭ, иллюстрирующий пространственную доступность аминокислотных остатков Thr313, Ile317 и Ala331 (показано желтым цветом); зеленым, голубым и серым цветом показаны три молекулы гликопротеина E, составляющие асимметричную ячейку на поверхности вириона.

к рекомбинантным белкам. Кроме того, эксперименты по наработке рекомбинантных белков и анализу на био-сенсоре проводили в нескольких повторах с получением сходных результатов.

Сродство антитела к рекомбинантным фрагментам вирусного гликопротеина E различных штаммов ВКЭ, вероятно, коррелирует со способностью антитела нейтрализовать инфекционность вируса или обеспечивать протекцию животных. Естественно, механизмы противовирусного действия каждого конкретного антитела достаточно гибкие и могут включать множество путей, поэтому корреляция, скорее всего, далека от 100 %. Вместе с тем в случае нескольких антител против ВКЭ было

показано, что разница в сродстве антитела к антигену хорошо согласуется с разницей в нейтрализующей активности *in vitro* этих антител (Tsekhanovskaya et al., 1993; Levanov et al., 2010; Baykov et al., 2014). В проведенных нами экспериментах наиболее слабое сродство, около 250 нМ, было зарегистрировано по отношению к белкам D3_Eu и D3_Bal, полученным на основе гена E штамма «Абсеттаров» европейского субтипа ВКЭ и штамма «1528-99» балтийской линии сибирского субтипа ВКЭ соответственно. Ранее было установлено, что антитело ch14D5 обладает высокой протективной активностью в отношении штамма «Абсеттаров» и способно блокировать развитие инфекции на мышинной модели клещевого энцефалита при однократном введении в дозировке 80 мкг/мышь (Baykov et al., 2014). Поскольку сродство к белкам D3_ZauM и D3_Sof, полученным на основе штаммов «Заусаев» и «Софьин_Ru» сибирского и дальневосточного субтипов ($K_D = 25 \pm 4$ и 1.7 ± 0.5 нМ соответственно), оказалось выше сродства к белку D3_Eu, полученному на основе штамма «Абсеттаров» ($K_D = 250 \pm 50$ нМ), то мы полагаем, что протективная активность антитела ch14D5 по отношению к большинству штаммов сибирского и дальневосточного субтипов ВКЭ либо окажется на том же уровне, что и протективная активность этого антитела по отношению к штамму «Абсеттаров» (Baykov et al., 2014), либо будет выше.

Следует отметить, что поскольку штаммы как сибирского, так и дальневосточного субтипов обладают некоторой вариабельностью последовательности аминокислотных остатков гликопротеина E, то в случае некоторых отдельных штаммов ВКЭ с нетипичными аминокислотными остатками в области эпитопа антитело ch14D5 может проявлять сниженную активность. В то же время, как только эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5, будет определен с точностью до отдельных аминокислотных остатков, подобные случаи можно будет прогнозировать на основе данных о нуклеотидной последовательности гена E каждого конкретного штамма ВКЭ.

Зарегистрированные в настоящем исследовании различия в прочности связывания антитела ch14D5 с белками D3 разных субтипов ВКЭ могли быть вызваны либо тем, что отличающиеся аминокислотные остатки находились в области эпитопа, узнаваемого антителом, либо тем, что белки D3 обладали разной стабильностью и, соответственно, пространственная структура была более подвижна в случае менее стабильных белков, что могло приводить к ослаблению сродства антитела к белку. Анализ различий в последовательностях аминокислотных остатков исследованных белков D3 (рис. 4, а) показал, что соответствующие аминокислотные остатки пространственно сгруппированы и расположены на поверхности домена D3 (см. рис. 4, б). Более того, аминокислотные остатки Thr313 и Ala331 находятся в области бокового ребра домена D3, известного тем, что антитела к этой области домена D3 обладают наиболее выраженными противовирусными свойствами (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005).

Поскольку аминокислотные остатки Thr313, Ile317 и Ala331 расположены на поверхности и не затрагивают внутреннюю структуру домена D3, то крайне малове-

роятно, что они влияют на стабильность этого домена, который сам по себе стабилен (Zidane et al., 2013). По-видимому, эти аминокислотные остатки находятся в области эпитопа, узнаваемого антителом ch14D5, тем более что этот участок домена D3 расположен на поверхности вириона и пространственно доступен для связывания антител (см. рис. 4, в).

Заключение

В результате проведенного исследования показано, что сродство химерного антитела ch14D5 к домену D3 гликопротеина E различных субтипов вируса клещевого энцефалита существенно различается. Наименьшее сродство антитело проявляет к белку, полученному на основе штамма «Абсеттаров», и в то же время известно, что антитело ch14D5 обладает высокими протективными свойствами по отношению к штамму «Абсеттаров». Поэтому есть все основания полагать, что протективная активность этого антитела по отношению к штаммам сибирского и дальневосточного субтипов будет также высокой. Кроме того, установлено, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5 на поверхности гликопротеина E, находится в области бокового ребра домена D3, что, по-видимому, обуславливает высокие противовирусные свойства этого антитела.

Список литературы / References

- Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М., Матвеев А.Л., Бабкин И.В., Хлусевич Я.А., Подгорный В.Ф., Тикунова Н.В. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):459-467.
- [Baykov I.K., Emelyanova L.A., Sokolova L.M., Karelina E.M., Matveev A.L., Babkin I.V., Khlusevich Ya.A., Podgornyy V.F., Tikunova N.V. Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383 (in Russian)]
- Baykov I.K., Matveev A.L., Stronin O.V., Ryzhikov A.B., Matveev L.E., Kasakin M.F., Richter V.A., Tikunova N.V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. Vaccine. 2014; 32(29):3589-3594. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.05.012.
- Dai L., Song J., Lu X., Deng Y.Q., Musyoki A.M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C.F., Qi J., Gao G.F. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. Cell Host Microbe. 2016;19(5):696-704. DOI 10.1016/j.chom.2016.04.013.
- Dowd K.A., Pierson T.C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. Virology. 2011;411(2):306-315. DOI 10.1016/j.virol.2010.12.020.
- Fűzik T., Formanov P., Rűzek D., Yoshii K., Niedrig M., Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. Nat. Commun. 2018;9(1):436. DOI 10.1038/s41467-018-02882-0.
- Halstead S.B. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. Microbiol. Spectr. 2014;2(6):249-271. DOI 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- Haslwanter D., Blaas D., Heinz F.X., Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. PLoS Pathog. 2017;13(9):e1006643. DOI 10.1371/journal.ppat.1006643.
- Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. J. Clin. Virol. 2012;55(4):289-295. DOI 10.1016/j.jcv.2012.08.024.
- Julander J.G., Thibodeaux B.A., Morrey J.D., Roehrig J.T., Blair C.D. Humanized monoclonal antibody 2C9-cIgG has enhanced efficacy for yellow fever prophylaxis and therapy in an immunocompetent animal model. Antiviral Res. 2014;103:32-38. DOI 10.1016/j.antiviral.2013.12.011.
- Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E., Mercado J.C., Kuan G., Gordon A., Balmaseda A., Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. Science. 2017;358(6365):929-932. DOI 10.1126/science.aan6836.
- Lai H., Engle M., Fuchs A., Keller T., Johnson S., Gorlatov S., Diamond M.S., Chen Q. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107(6):2419-2424. DOI 10.1073/pnas.0914503107.
- Lambour J., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M., Pelegrin M. Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play. Emerg. Microbes Infect. 2016;5(8):e92. DOI 10.1038/emi.2016.97.
- Levanov L.N., Matveev L.E., Goncharova E.P., Lebedev L.R., Ryzhikov A.B., Yun T.E., Batanova T.A., Shvalov A.N., Baykov I.K., Shingarova L.N., Kirpichnikov M.P., Tikunova N.V. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus. Vaccine. 2010;28(32):5265-5271. DOI 10.1016/j.vaccine.2010.05.060.
- Olipphant T., Engle M., Nybakken G.E., Doane C., Johnson S., Huang L., Gorlatov S., Mehlhop E., Marri A., Chung K.M., Ebel G.D., Kramer L.D., Fremont D.H., Diamond M.S. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. Nat. Med. 2005;11(5):522-530.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. Adv. Virus Res. 2003;59:141-175.
- Salazar G., Zhang N., Fu T.M., An Z. Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. NPJ Vaccines. 2017;2:19. DOI 10.1038/s41541-017-0019-3.
- Sánchez M.D., Pierson T.C., McAllister D., Hanna S.L., Puffer B.A., Valentine L.E., Murtadha M.M., Hoxie J.A., Doms R.W. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. Virology. 2005;336(1):70-82.
- Sautto G., Mancini N., Gorini G., Clementi M., Burioni R. Possible future monoclonal antibody (mAb)-based therapy against arbovirus infections. Biomed. Res. Int. 2013;2013:838491. DOI 10.1155/2013/838491.
- Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). Virus Res. 1993;30(1):1-16.
- Zidane N., Dussart P., Breman L., Villani M.E., Bedouelle H. Thermodynamic stability of domain III from the envelope protein of flaviviruses and its improvement by molecular design. Protein Eng. Des. Sel. 2013;26(6):389-399. DOI 10.1093/protein/gzt010.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках гранта Президента РФ, проект № МК-6575.2018.4. Методика получения рекомбинантных доменов D3 вируса клещевого энцефалита была разработана при поддержке проекта РНФ 17-74-10146, при поддержке этого же проекта был создан рекомбинантный домен D3_Sof штамма «Софьин-Ru» вируса клещевого энцефалита. Химерное антитело ch14D5 наработано и очищено при поддержке проекта РНФ № 16-14-00083. Вирусная РНК и кДНК получены в рамках проекта РФФИ № 18-44-540021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.11.2018. После доработки 27.12.2018. Принята к публикации 23.01.2019.

Связь гаплотипов SNP LTR-области *BLV* с гематологическими показателями крови крупного рогатого скота

Н.В. Блажко¹, С.Х. Вышегуров¹, А.С. Донченко^{1, 2}, К.С. Шатохин¹ ✉, Т.И. Крыцына¹, В.А. Рябина¹

¹ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

² Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

✉ e-mail: true_genetic@mail.ru

Проведено молекулярно-генетическое типирование образцов вируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*), выделенного из образцов крови черно-пестрых голштинизированных коров, у которых были исследованы различные цитофлюорометрические и морфологические показатели крови. Оценивали общее содержание лейкоцитов (WBC), содержание лимфоцитов (lymf), гранулоцитов (gran), моноцитов (mon), эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB), гематокрит (HTC), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH), концентрацию гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC), индекс распределения эритроцитов (RDW), количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), индекс распределения тромбоцитов (PDW) и тромбоцитрит (PCT). Определены гаплотипы SNP LTR-области *BLV*. Из восьми возможных были обнаружены только вирусы гаплотипов I (0.33 ± 0.03) и III (0.67 ± 0.03). Соотношение гематологически больных, здоровых и подозрительных носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота I и III гаплотипов было сопоставимо с результатами других исследователей. Количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в крови носителей III гаплотипа превышало аналогичные параметры крупного рогатого скота, пораженного вирусом I гаплотипа. Интересно отметить, что разница гематологического статуса животных проявилась не только в концентрации лейкоцитов, непосредственных иммунных агентов, но и в содержании эритроцитов и тромбоцитов, не имеющих к иммунному ответу непосредственного отношения. Количество частиц III гаплотипа *BLV*, циркулирующих в крови зараженных особей, превышала таковое значение носителей I гаплотипа. В связи с этим выдвинуто предположение об эволюционном преимуществе III гаплотипа как более вирулентного. Впрочем, результаты настоящего исследования в совокупности с данными других ученых показывают, что высокая вирулентность отдельных штаммов вируса есть следствие стремления к реализации максимально возможной интенсивности синтеза вирусных частиц, а не достижения высокого поражающего эффекта как такового. Показано, что высокая смертоносность эволюционно невыгодна вирусам, так как вымирание носителя как биологического вида чревато исчезновением и самого вируса.

Ключевые слова: *BLV*; LTR-область; гаплотипы; гематологические показатели крови; лейкоциты; крупный рогатый скот.

Для цитирования: Блажко Н.В., Вышегуров С.Х., Донченко А.С., Шатохин К.С., Крыцына Т.И., Рябина В.А. Связь гаплотипов SNP LTR-области *BLV* с гематологическими показателями крови крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):262-269. DOI 10.18699/VJ19.491

Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle

N.V. Blazhko¹, S.Kh. Vyshegurov¹, A.S. Donchenko^{1, 2}, K.S. Shatokhin¹ ✉, T.I. Krytsyna¹, V.A. Ryabinina¹

¹ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

² Siberian Federal Research Centre for AgroBiotechnology, RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

✉ e-mail: true_genetic@mail.ru

Molecular typing of *BLV* samples isolated from Holsteinized Russian Black Pied cattle was carried out, and various cytofluorometric and morphological blood indices were examined. We performed the total count of white blood cells (WBC), lymphocyte (lymf), granulocyte (gran), monocyte (mon), red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HTC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red blood cell distribution width (RDW), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), and platelet crit count (PCT). The LTR-region of *BLV* was haplotyped. Only viruses of haplotypes I (0.33 ± 0.03) and III (0.67 ± 0.03) of the eight possible were detected. The ratio of hematologically sick, healthy, and suspected carriers of *BLV* of haplotypes I and II was comparable with the results of other researchers. The numbers of leukocytes, erythrocytes and platelets in the blood of carriers of haplotype III exceeded the corresponding parameters of cattle affected by the virus of haplotype I. It is interesting to note that the difference in the hemolytic status of animals was manifested not only by the concentration of leukocytes as direct immune agents

but also by the count of erythrocytes and platelets, which are not directly involved in the immune response. The number of particles of haplotype III of the *BLV* circulating in the blood of infected individuals exceeded that of the carriers of haplotype I. In this connection, an assumption was made about the evolutionary advantage of the more virulent haplotype III. However, the results of our own research in conjunction with the data of other scientists indicate that the high virulence of individual virus strains is a consequence of the tendency to implement the maximum possible intensity of the synthesis of virus particles but not of the high damaging effect alone. It is shown that high lethality is evolutionarily disadvantageous for viruses, since the extinction of the carrier as a biological species is fraught with the disappearance of the virus itself.

Key words: *BLV*; LTR-region; haplotypes; hematological indices; leukocytes; cattle.

For citation: Blazhko N.V., Vyshegurov S.Kh., Donchenko A.S., Shatokhin K.S., Krytsyna T.I., Ryabinina V.A. Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):262-269. DOI 10.18699/VJ19.491 (in Russian)

Введение

Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота способствует активной разработке профилактических стратегий, направленных на предотвращение распространения заболевания. Сущность их сводится к изоляции больных животных от здоровых или же к убою зараженных особей (Knapen et al., 1993; Nuotio et al., 2003; Acaite et al., 2007). Последний метод оказался весьма эффективным в странах Западной Европы, Новой Зеландии и Австралии, где наблюдается полное или практически полное очищение стад от возбудителя – вируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*) (Polat et al., 2017).

Несмотря на предпринимаемые меры, лейкоз крупного рогатого скота на сегодняшний день является наиболее распространенным эпизоотическим заболеванием в России и некоторых зарубежных странах (Juliarena et al., 2017). В 2017 г. он был выявлен в 28 субъектах Российской Федерации (175 неблагополучных пунктов). Наибольшее количество очагов лейкоза крупного рогатого скота выявлено в Калужской области – 45, Республике Крым – 32, Новосибирской области – 27, Московской области – 20 (Новикова и др., 2018). По некоторым данным (Козырева, Гулюкин, 2017), в 2015 г. лейкоз был причиной около 65–66 % случаев инфекционной патологии.

Одна из вероятных причин низкой эффективности борьбы с лейкозом крупного рогатого скота – высокая доля (от 70 до 90 %) животных с бессимптомной стадией (Эрнст и др., 1997; Смирнов Ю.П. и др., 2015; Gyles, 2016; Juliarena et al., 2017), характеризующейся, помимо прочего, нормальным не патологическим числом лейкоцитов, в частности лимфоцитов. Клиническая стадия, как правило, характерна для 4–5-летних животных, когда (в подавляющем большинстве случаев) близится к завершению период хозяйственного использования молочных коров (Смирнов П.Н. и др., 2015). Иногда латентный период может затягиваться и до 8-летнего возраста животных (Kettmann et al., 1994). В некоторых случаях фиксировался убой зараженных *BLV* животных, выбракованных по другим, не связанным с клиническими проявлениями лейкоза, причинам (Мищенко и др., 2018).

Эффективные методы идентификации *BLV*-носителей – ПЦР-диагностика (Смирнов П.Н. и др., 2015) и иммуноферментный анализ (Сюрин и др., 2001), однако их дороговизна существенно препятствует широкому практическому использованию.

Другая причина, осложняющая борьбу с *BLV*, – прищип вирусам высокий уровень мутационной изменчи-

вости (Lewin, 2008). В частности, выдвигалась гипотеза о накоплении *BLV* мутаций, позволяющих вирусу избежать иммунного ответа хозяина (Blood et al., 1979; Сюрин и др., 2001; Buehring et al., 2003; Смирнов, 2007; Смирнов и др., 2011; Батенёва, 2015). Непосредственно для самого вируса подобные мутации, вне сомнения, являются выгодными и потому с высокой вероятностью должны поддерживаться естественным отбором.

LTR-область *BLV* содержит в себе так называемые гены домашнего хозяйства, среди которых присутствуют регуляторы активности транскрипции и трансляции мРНК, коллинеарных нуклеотидной последовательности вируса. Проведенные исследования показывают, что, по крайней мере, некоторые из эволюционных фенотипических «приобретений» обязаны мутациям не в белок-кодирующих генах, а именно в генах домашнего хозяйства, благодаря которым происходит ускорение мутагенеза (Barrick et al., 2009). Мутации нуклеотидной последовательности LTR-области действительно могут активизировать мутагенез *BLV* (Merezak et al., 2001). Изучение LTR-области других вирусов дало схожие результаты (Moelling, 2016). Логично предполагать, что именно мутации в LTR-области *BLV* могли способствовать эволюционной пластичности вируса и спровоцировать его способность избегать иммунного ответа «хозяина». Вероятно, что максимальным преимуществом будут обладать более вирулентные штаммы вируса, активно транслирующие мРНК, тем самым причиняя наибольший ущерб крупному рогатому скоту как носителю. Цель наших исследований – оценка гипотезы об эволюционном преимуществе мутантных штаммов *BLV* за счет повышения вирулентности.

Материалы и методы

В работе использовали образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной крови 780 коров черно-пестрой голштинизированной породы. Пробы крови были отобраны в 2015–2016 гг. из хвостовой вены стерильными катетерами с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта. ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-Сорб-В» (ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Россия).

Цитофлюорометрические и морфологические показатели крови определяли при помощи автоматического ветеринарного гематологического анализатора PCE-90 Vet.

Праймеры были сконструированы при помощи автоматического синтезатора олигонуклеотидов с учетом мутационного статуса изолятов. Нуклеотиды для их синтеза были приобретены в компании «Сибэнзим». Температура

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих LTR область BLV, 443 п. н.

Критерий	Прямой праймер	Обратный праймер
Последовательность олигонуклеотидов	CCCCATRCGACCGGTTACAC	AGAGRRCTCRGGACCGAGAG
Сайт начала фланкирования	8021	8444
Сайт окончания фланкирования	8040	8463
Температура отжига, °C	60.18	60.11
Доля гуанина (G) и цитозина (C), %	60.00	60.00

Таблица 2. Режим амплификации, LTR 443 п. н.

Кол-во циклов	Температура, °C	Время, мин
1	95	3.0
	95	0.5
35	61	0.5
	72	0.5
1	72	3.0

Таблица 3. Состав ПЦР смеси (из расчета на одну реакцию)

Компоненты смеси	Необходимый объем, мкл
ПЦР буфер	2.5
MgCl ₂	1.0
dNTP	1.0
Прямой праймер, 50 нг	1.0
Обратный праймер, 50 нг	1.0
Taq-полимераза	1.5
Вода	15.0
ДНК, 50 нг	2

отжига праймеров рассчитана с учетом процентного состава нуклеотидов (табл. 1). Чистота праймеров (не менее 95 %) контролировалась методом высокоточной жидкостной хроматографии. Праймеры хранили при -20 °C не более 6 мес. Режим амплификации был задан исходя из рассчитанной температуры отжига (табл. 2).

Для приготовления ПЦР-смеси предварительно производили расчет необходимого количества компонентов реакции на нужное количество проб. Для этого сначала определяли общее количество реакций по следующей формуле: $n + 3 + 1$, где n – количество проб ДНК, для которых необходимо произвести диагностику вирусоносительства, 3 – количество используемых контролей в реакции (БК – внутренний контроль постановки ПЦР, ОК – отрицательный контроль реакции, ПК – положительный контроль реакции), 1 – расчет ПЦР-смеси на дополнительную расчетную пробу.

Расчет объема каждого компонента смеси производили в соответствии с табл. 3.

В контрольные пробирки вносили следующие реагенты: положительный контроль (ПК), внутренний контроль (БК) и отрицательный контроль (ОК). В качестве ПК использовали стандартный контроль ПЦР BLV FLK, в качестве БК – пару видоспецифических праймеров к ДНК коровы, в качестве ОК – ДНК-буфер.

Поверх смеси наслаивали 20 мкл минерального масла (в случае использования амплификаторов с непогреваемой крышкой). Результаты амплификации визуализировали – наносили продукты амплификации в лунки агарозного геля и проводили электрофорез, после чего просматривали на трансиллюминаторе.

Для очистки продуктов амплификации от неспецифических фрагментов светящиеся полоски вырезали из геля на трансиллюминаторе, затем выделяли ампликоны методом спин-колонок.

Составлены рестрикционные карты предположительных сайтов рестрикции LTR-области. Сайты рестрикции были следующими: *BstMAI* I (237 п. н.), *BseI* (378, 370 п. н.), *BspAC* I (262 п. н.). Для анализа возможных комбинаций

Таблица 4. Схема образования гаплотипов

Гаплотип	Фрагменты продуктов рестрикции		
	<i>BstMAI</i> I – GTCTCN↑CAGAG(N) ₅ ↓	<i>BseI</i> – ACTGGN↑TGAC↓CN	<i>BspAC</i> I – C↑CGC GGC↓G
I	237 (A)	378 (GC)	262 (CG)
II	237 (A)	378 (GC)	262 (AG)
III	237 (A)	370 (CN)	262 (CG)
IV	237 (A)	370 (CN)	262 (AG)
V	– (N)	378 (GC)	262 (CG)
VI	– (N)	378 (GC)	262 (AG)
VII	– (N)	370 (CN)	262 (CG)
VIII	– (N)	370 (CN)	262 (AG)

замен на выбранной последовательности участка генома *BLV* был разработан способ типирования. Замены на сайтах генома 8034 и 8139 п. н. анализировали методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. По результатам ПЦР было выявлено два вирусных гаплотипа: I и III (табл. 4).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась общепринятыми методами (Лакин, 1973; Животовский, 1991) при помощи пакета программ STATISTICA 10.

Результаты

Из возможных восьми гаплотипов вируса *BLV* инфицированные животные изученной популяции ($n = 780$) были представлены носителями I (0.33 ± 0.03) и III (0.67 ± 0.03) гаплотипов. При анализе показателей крови животных, инфицированных лейкозом разных гаплотипов, обнаружилось, что животные-носители III гаплотипа отличались более высоким ($p < 0.001$) абсолютным содержанием всех типов лейкоцитов, однако процентное соотношение моноцитов у животных сравниваемых выборок не имело достоверных различий (табл. 5). Оценивали гематологические показатели крови: общее содержание лейкоцитов (WBC), содержание лимфоцитов (lymf), гранулоцитов (gran), моноцитов (mon), эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB), гематокрит (HTC), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH), концентрацию гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC), индекс распределения эритроцитов

(RDW), количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), индекс распределения тромбоцитов (PDW) и тромбокрит (PCT) (см. табл. 5).

Примечательно, что разница была замечена не только в концентрации лейкоцитов, иммунных клеток крупного рогатого скота, но также в количестве эритроцитов и тромбоцитов, не имеющих к иммунитету животных непосредственного отношения (см. табл. 5).

Факты указывают на то, что распознавание конкретного штамма вируса лейкоза иммунной системой крупного рогатого скота начинается еще до перехода болезни в клиническую стадию. Уровень лейкоцитов в крови животных, пораженных вирусом III гаплотипа, был выше ($p < 0.001$) вне зависимости от того, отмечались ли у животных клинические симптомы лейкоза, была ли зафиксирована латентная стадия или же животное относилось к группе подозрительных, с указанием на лейкоз (табл. 6). У животных с повышенным содержанием лейкоцитов в крови, которых относят к группе подозрительных на лейкоз, уровень лейкоцитов у носителей разных гаплотипов *BLV* различался достоверно, однако за счет четкого ограничения уровня показателя в данной группе разница между группами составляла более $2 \times 10^9/\text{л}$ (см. табл. 6).

Разница содержания лейкоцитов в крови больных и подозрительных животных в среднем превышала таковую между подозрительными и здоровыми особями (см. табл. 6). Особенно наглядно это отражается при визуализации сравнения, где кластер больных особей располагался обособленно, а выборки подозрительных и

Таблица 5. Цитометрические и морфологические показатели крови животных-носителей разных гаплотипов *BLV*

Показатель	Гаплотип I				Гаплотип III				t_{ϕ}
	\bar{X}	$S_{\bar{X}}$	$D[\bar{X}]$	95 %	\bar{X}	$S_{\bar{X}}$	$D[\bar{X}]$	95 %	
WBC, $10^9/\text{л}$	8.87	0.10	5.47	0.26	14.12	0.27	18.65	0.54	$p < 0.001$
lymf, $10^9/\text{л}$	5.98	0.07	2.25	0.17	9.85	0.21	11.50	0.42	$p < 0.001$
mon, $10^9/\text{л}$	0.73	0.01	0.06	0.03	1.15	0.03	0.17	0.05	$p < 0.001$
gran, $10^9/\text{л}$	4.16	0.06	1.71	0.15	5.89	0.10	2.66	0.20	$p < 0.001$
lymf, %	54.33	0.42	93.28	1.09	67.72	0.76	147.13	1.50	$p < 0.001$
mon, %	8.43	0.08	3.55	0.21	8.55	0.19	9.11	0.37	нд
gran, %	43.24	0.42	92.25	1.09	33.56	0.73	132.16	1.43	$p < 0.001$
RBC, $10^{12}/\text{л}$	5.10	0.04	0.78	0.10	5.39	0.07	1.15	0.13	$p < 0.001$
HGB, г/л	90.23	0.75	293.64	1.93	93.20	1.21	365.85	2.38	$p < 0.05$
HTC, %	26.50	0.20	20.67	0.51	27.55	0.32	25.45	0.63	$p < 0.01$
MCV, фл	52.26	0.18	17.49	0.47	51.65	0.35	30.85	0.69	нд
MCH, пкг	17.78	0.13	9.50	0.35	17.57	0.23	13.75	0.46	нд
MCHC, г/л	341.58	2.30	2772.97	5.94	337.98	3.92	3875.45	7.72	нд
RDW, %	15.43	0.05	1.29	0.13	15.93	0.07	1.24	0.14	$p < 0.001$
PLT, $10^9/\text{л}$	236.78	4.52	10725.82	11.69	214.60	5.22	6854.52	10.27	$p < 0.001$
MPV, фл	6.93	0.03	0.47	0.08	6.78	0.04	0.44	0.08	нд
PDW	16.99	0.02	0.30	0.06	16.85	0.03	0.28	0.07	нд
PCT, %	1.26	0.64	211.71	1.64	0.13	0.00	0.00	0.01	нд

Примечание. t_{ϕ} – степень достоверности различий, определенная при помощи критерия Стьюдента; нд – различия недостоверны.

Таблица 6. Декомпозиция гипотезы влияния гаплотипа *LTR* на тип течения инфекции

Гаплотип	ГС	Содержание лейкоцитов, 10 ⁹ /л				Содержание лимфоцитов, 10 ⁹ /л				n
		\bar{X}	$S_{\bar{X}}$	-99.90 %	+99.90 %	\bar{X}	$S_{\bar{X}}$	-99.90 %	+99.90 %	
III	П	12.762	0.128	12.333	13.190	5.788	0.107	5.431	6.145	240
III	Г	21.889	0.938	18.536	25.243	12.982	0.697	10.490	15.473	7
III	З	10.900	0.125	10.711	11.240	3.700	0.105	3.500	4.000	281
I	П	10.423	0.104	10.077	10.769	4.682	0.086	4.396	4.969	211
I	Г	17.314	0.040	17.074	17.555	10.014	0.571	6.612	13.416	38
I	З	7.339	0.082	7.066	7.612	3.222	0.052	3.049	3.396	3

Примечание. ГС – гематологический статус; З – здоровые животные; Г – гематологически больные; П – подозрительные; $\lambda = 0.982$ при $p < 0.001$, $F(4.1546) = 3.3451$.

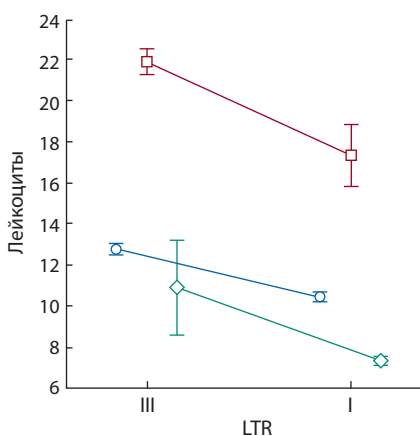


Рис. 1. Влияние гаплотипа на содержание лейкоцитов в крови у здоровых, подозрительных и гематологически больных лейкозом животных ($\lambda = 0.982$; $F(4.154) = 3.345$; $p = 0.0098$).

Количество лейкоцитов обозначено красной линией – у животных с клиническими симптомами лейкоза, синей – у особей с подозрением на лейкоз, зеленой – у здоровых животных.

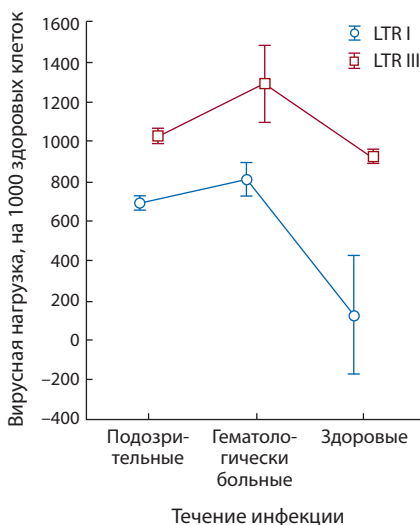


Рис. 2. Вирусная нагрузка у животных с разными гаплотипами *BLV*.

здоровых животных практически сливаются вне зависимости от того, каким гаплотипом *BLV* был поражен изучаемый крупный рогатый скот (рис. 1). Различия содержания лейкоцитов между животными разного гематолитического статуса, за исключением разницы здоровые – подозрительные III гаплотипа, оказались достоверными ($p < 0.001$). Доля гематолитически больных животных составляла 15.08 % у крупного рогатого скота, пораженного вирусом I гаплотипа вируса, и 1.33 % – у носителей III гаплотипа.

Схожая картина наблюдалась и по отношению содержания лимфоцитов в крови животных. Гаплотип, безусловно, оказывает влияние на изменение уровня лимфоцитов в крови животных, хотя группы и имели низкий уровень дискриминации (см. табл. 6).

Уровень вирусной нагрузки находился в прямой зависимости от статуса животных. Наибольшее количество вирусных частиц обнаружено в крови гематолитически больных животных, наименьшее – у животных без проявления клинических признаков инфекции. Интересно отметить, что в целом вирусная нагрузка оказалась выше у крупного рогатого скота, инфицированного вирусом III гаплотипа (рис. 2).

Для всесторонней оценки гипотезы влияния категориальных признаков на непрерывные переменные применяли многомерные критерии (табл. 7). Значения критериев Уилкса (Wilks' Lambda, WL), Пилая (Pillai's Trace, PT), Хотелла (Hotelling's Trace, HT) и Роя (Roy's Largest Root, RLR) указывают на значительную связь LTR-гаплотипов вируса *BLV* с типом течения инфекции, выражающемся, в том числе, и в количестве лейкоцитов.

Обсуждение

Большее количество различных типов лейкоцитов, обнаруженных у животных, зараженных *BLV* III гаплотипа, по сравнению с носителями I гаплотипа (см. табл. 5), свидетельствует о более сильном иммунном ответе организма крупного рогатого скота именно на эту разновидность вируса. Соответственно, есть основания утверждать, что вирус III гаплотипа более вирулентен, что также подтверждается большим количеством вирусных частиц по сравнению с вирусом I гаплотипа (см. рис. 2). Этот же гаплотип является более распространенным, что указывает на эволюционное преимущество более вирулентных штаммов над менее вирулентными. Схожие результаты были неоднократно получены в опытах с РНК-вирусами мышей, крыс и кроликов (Furió et al., 2012; Elsworth et al., 2014; Korboukh et al., 2014; Fitzsimmons et al., 2018). Причем в некоторых случаях имело место повышение эволюционной пластичности вирусов, например *H273R*, за счет изменения нуклеотидной последовательности генов-мутаторов, ускоряющих мутагенез (Korboukh et al., 2014).

Предположение об эволюционном преимуществе более вирулентных штаммов вируса *BLV* выглядит довольно убедительным. Главная задача вирусов, в том числе и *BLV*, – не уничтожение клеток организма хозяина, а продуцирование максимально возможного количества собственных частиц, что вполне логично (Агол, 2015). Доказано, что эволюционное преимущество любых му-

Таблица 7. Проверка нулевой гипотезы об отсутствии влияния гаплотипов на тип течения инфекции

Показатель	Критерий	Значение	F	dfEffect	dfError	p
Свободный член	WL	0.197743	1568.054	2	773	0.000000
	PT	0.802257	1568.054	2	773	0.000000
	HT	4.057061	1568.054	2	773	0.000000
	RLR	4.057061	1568.054	2	773	0.000000
LTR	WL	0.935624	26.593	2	773	0.000000
	PT	0.064376	26.593	2	773	0.000000
	HT	0.068805	26.593	2	773	0.000000
	RLR	0.068805	26.593	2	773	0.000000
Гематологический статус	WL	0.619193	104.675	4	1546	0.000000
	PT	0.380882	91.038	4	1548	0.000000
	HT	0.614883	118.672	4	1544	0.000000
	RLR	0.614686	237.884	2	774	0.000000
LTR + гематологический статус	WL	0.982912	3.345	4	1546	0.009764
	PT	0.017150	3.347	4	1548	0.009730
	HT	0.017322	3.343	4	1544	0.009799
	RLR	0.012124	4.692	2	774	0.009430

Примечание. dfEffect – степень свободы критерия; dfError – степень свободы остаточной ошибки.

таций определяется, в первую очередь, не качественными изменениями как таковыми, а выживаемостью наиболее возможного количества потомков-носителей мутации, причем правило распространяется не только на вирусы, но и на представителей всех царств живых организмов (Марков, Наймарк, 2015). А одним из собственно вредоносных качеств вирусов является не их вирулентность как таковая, а спровоцированные большим количеством чужеродных клетке хозяина вирусных частиц ответные меры: деградация РНК (вирусных, а также клеточных), угнетение синтеза белков (как вирусных, так и клеточных), самоликвидация (апоптоз и другие виды программируемой гибели) и, наконец, воспаление (Debasq et al., 2004; Lezin et al., 2009; Агол, 2015). В отношении вируса лейкоза крупного рогатого скота, который не изменяет присущий хозяину комплекс синтезируемых им белков, не привнося ничего «своего» (Kettmann et al., 1980), подобная теория выглядит вполне правдоподобной. Так как вирус *BLV* не представляет собой носителя программы кодирования посторонних белков, его вредоносность может повыситься только за счет ускорения синтеза его собственных копий, что и провоцирует саморазрушительный ответ иммунной системы крупного рогатого скота.

На то, что повышенная вирулентность *BLV* III гаплотипа есть следствие ускорения его репликации, а не наоборот, указывают некоторые факты. Вирус не только не программирует клетку носителя на синтез посторонних, тем более вредоносных белков, но и несет в себе генетические элементы, активирующие иммунитет скота (Lagarias, Radke, 1989; Juliarena et al., 2017). Такое, на первый взгляд «самоубийственное», эволюционное приобретение, казалось бы, должно было привести к вымиранию *BLV* как такового. В реальности же это спровоцировало создание

некоего комплекса сосуществования – крупный рогатый скот – *BLV*, где последний – носитель генетической системы, направленной на нейтрализацию неизбежного вредоносного присутствия вируса в организме носителя. Как следствие, 70–90 % особей крупного рогатого скота не проявляют клинических признаков лейкоза, что в целом и было показано в настоящем исследовании (см. табл. 6).

Таким образом, генетическая программа *BLV* предусматривает не только сам факт интенсификации синтеза собственных частиц, но и в некоторой степени нейтрализацию негативных последствий для крупного рогатого скота. И эволюционная стратегия прослеживается довольно четко: вирусу не выгодно вымирание крупного рогатого скота как биологического вида, так как это может повлечь за собой и его собственное исчезновение.

Закключение

Результаты исследования соответствуют представленной концепции. Мутации в генах домашнего хозяйства LTR-области *BLV* изначально спровоцировали ускорение синтеза вирусных частиц. Это, в свою очередь, интенсифицировало иммунный ответ крупного рогатого скота, что и показали результаты исследований (см. табл. 5, рис. 1). Таким образом, эволюционное преимущество III гаплотипа вируса *BLV* над I гаплотипом выражено в ускоренном воспроизводстве его копий, это в конечном счете отражено в более высокой распространенности III гаплотипа (0.67 ± 0.03) по сравнению с I гаплотипом (0.33 ± 0.03).

Список литературы / References

- Агол В.И. Природа патогенности вирусов. Природа. 2015;5:3-10.
[Agol V.I. Nature of virus pathogenicity. Priroda = Nature. 2015;5:3-10. (in Russian)]

- Батенёва Н.В. Особенности течения лейкозной инфекции у носителей 4-го и 7-го генотипов *BLV*. Инновации и продовольственная безопасность. 2015;4(10):5-8.
[Bateneva N.V. Features of the leukemic process in carriers of *BLV* genotypes 4 and 7. Innovatsii i Prodovolstvennaya Besopasnoct = Innovations and Food Safety. 2015;4(10):5-8. (in Russian)]
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991.
[Zhivotovskiy L.A. Populational Biometry. Moscow: Nauka Publ., 1991. (in Russian)]
- Козырева Н.Г., Гулюкин М.И. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской Федерации. Ветеринария Кубани. 2017;6:4-9.
[Kozyreva N.G., Gulyukin M.I. The prevalence of cattle leukemia and genetic variants of its causative agent in livestock farms of the Central Federal District of the Russian Federation. Veterinariya Kubani = Veterinary of Kuban. 2017;6:4-9. (in Russian)]
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973.
[Lakin G.F. Biometrics. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1973. (in Russian)]
- Марков А., Наймарк Е. Эволюция. Классические идеи в свете новых открытий. М.: Изд-во АСТ: CORPUS, 2015.
[Markov A., Naimark E. Evolution. Classical Ideas in the Light of New Discoveries. Moscow: AST: CORPUS Publ., 2015. (in Russian)]
- Мищенко В.А., Петрова О.Н., Караулов А.К., Мищенко А.В. Проблемы лейкоза крупного рогатого скота. Владимир, 2018.
[Mischenko V.A., Petrova O.N., Karaulov A.K., Mischenko A.V. Problems of Bovine Leukemia. Vladimir, 2018. (in Russian)]
- Новикова М.В., Боровой В.Н., Барсуков Ю.И., Коломьцев С.А. Эпизоотическая ситуация по социально значимым и особо опасным болезням животных в Российской Федерации за 2017 год. Бизнес Партнёр (Сельское хозяйство России). Ежегодный справочник для руководителей и специалистов АПК, 2018.
[Novikova M.V., Borovoy V.N., Barsukov Yu.I., Kolomytsev S.A. Epizootic situation with socially significant and highly infectious diseases of animals in the Russian Federation in 2017. Business Partner (Agriculture). Annual Handbook for Managers and Professionals in AIC, 2018. Available at: mvet/epizooticheskaya-situatsiya-posotsialno-znachimym-i-osobo-opasnym-boleznyam-zhivotnykh. (in Russian)]
- Смирнов П.Н. Болезнь века – лейкоз крупного рогатого скота. Новосибирск, 2007.
[Smirnov P.N. The Disease of the Century: Bovine Leukemia. Novosibirsk, 2007. (in Russian)]
- Смирнов П.Н., Батенёва Н.В., Белявская В.А. Генотипическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области и Краснодарского края. Вестник НГАУ. 2011;2(18):81-83.
[Smirnov P.N., Bateneva N.V., Belyavskaya V.A. Genotypic diversity of bovine leukemia virus in the Novosibirsk and Krasnodar regions. Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2011;2(18):81-83. (in Russian)]
- Смирнов П.Н., Батенёва Н.В., Князев С.П., Хрипко Ю.И., Скачков А.С. Метод изучения нуклеотидных последовательностей *BLV*. Международный научно-исследовательский журнал. 2015;7(38):95-98.
[Smirnov P.N., Bateneva N.V., Knyazev S.P., Khripko Yu.I., Skachkov A.S. Method for the study of nucleotide sequences *BLV*. Mezhdunarodnyy Nauchno-Issledovatel'skiy Zhurnal = International Research Journal. 2015;7(38):95-98. (in Russian)]
- Смирнов Ю.П., Суворова И.Л., Грязева Н.А. Динамика эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота в Кировской области и эффективность противолейкозных мероприятий. Аграрная наука Северо-Востока. 2015;1(44):60-65.
[Smirnov Yu.P., Suvorova I.L., Gryazeva N.A. Dynamics of the epizootic process of bovine leukemia in the Kirov region and the effectiveness of anti-leukemia measures. Agrarnaya Nauka Evro-Severo-
- Vostoka = Agricultural Science of the Euro-North-East. 2015;1(44):60-65. (in Russian)]
- Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 2001.
[Syurin V.N., Samuylenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomina N.V. Viral Diseases of Animals. Moscow, All-Russia Research and Technology Institute of Bioindustry, 2001. (in Russian)]
- Эрнст Л.К., Сулимова Г.Е., Орлова А.Р. Особенности распространения антигенов *BoLA-A* и аллелей гена *BoLA-DRB3* у чернопестрого скота в связи с ассоциацией с лейкозом. Генетика. 1997;33(1):87-95.
[Ernst L.K., Sulimova G.E., Orlova A.R. Peculiarities of distribution of *BoLA-A* antigens and alleles of *BoLA-DRB3* gene in black and white cattle due to association with leukemia. Russ. J. Genet. 1997;33(1):73-80.]
- Acaite J., Tamosiunas V., Lukauskas K., Milius J., Pieskus J. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. Prev. Vet. Med. 2007;82(1-2):83-89. DOI 10.1016/j.prevetmed.2007.05.01.
- Barrick J.E., Yu D.S., Yoon S.H., Jeong H., Oh T.K., Schneider D., Lenski R.E., Kim J.F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature. 2009;461(7268):1243-1247. DOI 10.1038/nature08480.
- Blood D.C., Henderson J.A., Radostits O.M. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, and horses. London: Balliere Tindall, 1979.
- Buehring G.C., Philpott S.M., Choi K.Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2003;19(12):1105-1113. DOI 10.1089/088922203771881202.
- Debaq C., Sanchez Alcaraz M.T., Mortreux F., Kerkhofs P., Kettmann R., Willems L. Reduced proviral loads during primoinfection of sheep by Bovine Leukemia virus attenuated mutants. Retrovirology. 2004;1(31). DOI 10.1186/1742-4690-1-31.
- Elsworth P., Cooke B.D., Kovaliski J., Sinclair R., Holmes E.C., Strive T. Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Virology. 2014;464-465:415-423. DOI 10.1016/j.virol.2014.06.037.
- Fitzsimmons W.J., Woods R.J., McCrone J.T., Woodman A., Arnold J.J., Yennawar M., Evans R., Cameron C.E., Luring A.S. A speed-fidelity trade-off determines the mutation rate and virulence of an RNA virus. PLoS Biol. 2018;16(6):e2006459. DOI 10.1371/journal.pbio.2006459.
- Furió V., Garijo R., Durán M., Moya A., Bell J.C., Sanjuána R. Relationship between within-host fitness and virulence in the vesicular stomatitis virus: correlation with partial decoupling. J. Virol. 2012;86(22):12228-12236. DOI 10.1128/JVI.00755-12.
- Gyles C. Should we be more concerned about bovine leukemia virus? Can Vet. J. 2016;57(2):115-116.
- Juliarena M.A., Barrios C.N., Lützelshwab C.M., Esteban E.N., Gutiérrez S.E. Bovine leukemia virus: current perspectives. Vir. Adapt. Treat. 2017;(9):13-26. DOI 10.2147/VAAT.S113947.
- Kettmann R., Burny A., Callebaut I., Drogmans L., Mammerickx M., Willems L., Portetelle D. Bovine leukemia virus. Ed. J.A. Levy. The Retroviridae. New York: Plenum Press, 1994;39-82.
- Kettmann R., Marbaix G., Cleuter Y., Portetelle D., Mammerickx M., Burny A. Genomic integration of bovine leukemia provirus and lack of viral RNA expression in the target cells of cattle with different responses to *BLV* infection. Leuk. Res. 1980;4(6):509-519.
- Knapen K., Kerkhofs P., Mammerickx M. Eradication of enzootic bovine leukosis in Belgium: results of the mass detection on the national cattle population in 1989, 1990 and 1991. Ann. Med. Vet. 1993;137:197-201.
- Korboukh V.K., Lee C.A., Acevedo A., Vignuzzi M., Xiao Y., Arnold J.J., Hemperly S., Graci J.D., August A., Andino R., Cameron C.E. RNA Virus population diversity, an optimum for maximal fitness and virulence. J. Biol. Chem. 2014;289(43):29531-29544. DOI 10.1074/jbc.M114.592303.

- Lagarias M., Radke K. Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *J. Virol.* 1989;63:2099-2107.
- Lewin B. *Genes IX*. Oxford: Jones and Bartlett Publ., 2008.
- Lezin A., Olindo S., Belrose G., Signate A., Cesaire R., Smadja D., Macallan D., Asquith B., Bangham C., Bouzar A., Gillet N., De-foiche J., Florins A., Verlaeten O., Burny A., Willems L. Gene activation therapy: from the *BLV* model to HAM/TSP patients. *Front. Biosci.* 2009; 1:205-215.
- Merezak C., Pierreux C., Adam E., Lemaigre F., Rousseau G.G., Ca-lomnie C., Van Lint C., Christophe D., Kerkhofs P., Burny A., Kett-mann R., Willems L. Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation *in vivo*: implications for viral latency. *J. Virol.* 2001;75:6977-6988. DOI 10.1128/JVI.75.15. 6977-6988.2001.
- Moelling K. *Viruses: More Friends Than Foes*. Singapore: World Sci-entific Publ., 2016. DOI 10.1142/10230.
- Nuotio L., Rusanen H., Sihvonen L., Neuvonen E. Eradication of en-zootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 2003;59(1-2): 43-49.
- Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol. J.* 2017;14:209. DOI 10.1186/s12985-017-0876-4.

Благодарности. Работа выполнена на средства финансирования по заданию Министерства сельского хозяйства РФ (№ АААА-А18-118101190004-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 09.11.2018. После доработки 17.12.2018. Принята к публикации 17.12.2018.

Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты

Д.Ю. Тяпкина¹, Е.З. Кочиева^{1, 2}, М.А. Слугина^{1, 2} 

¹ Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

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

 e-mail: mashinmail@mail.ru

L-аскорбиновая кислота (витамин С) – вторичный метаболит растений, выполняющий множество разнообразных функций как в растительных тканях, так и в организме человека. Основным источником витамина С в питании человека служат растения, и прежде всего плоды цитрусовых, шиповника, перца, смородины, томата, клубники, папайи, киви. Однако, несмотря на то что L-аскорбиновая кислота – важное биологически активное вещество, путь ее биосинтеза в растительной клетке был описан лишь в 2007 г. на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*. В настоящем обзоре рассмотрены известные на сегодняшний день пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в тканях растений. Это L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый пути. Наиболее изучен из них L-галактозный путь (путь Смирнова–Уилера), для которого определены все ферменты, катализирующие последовательную цепь реакций. Для других путей известна лишь предположительная последовательность метаболитов, при этом многие ферменты, катализирующие их превращение, еще не выявлены. Выделены ключевые гены, которые участвуют в биосинтезе и накоплении аскорбиновой кислоты в сочных плодах. Среди них ферменты L-галактозного пути (ГДФ-маннозофосфорилаза (GMP, VTC1), ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимераза (GME), ГДФ-L-галактозофосфорилаза (GGP, VTC2/VTC5), L-галактозо-1-фосфатфосфатаза (GPP/VTC4), L-галактозо-1-дегидрогеназа (GalDH) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (GalLDH)); ферменты D-галактуронового пути (NADPH-зависимая D-галактуронатредуктаза (GalUR)) и ферменты рециркуляции АК (дегидроаскорбатредуктаза (DHAR1) и монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR)). До сих пор нет однозначного описания всех путей биосинтеза и накопления L-аскорбиновой кислоты в плодах. В настоящее время нельзя однозначно утверждать, что какой-то из четырех известных путей биосинтеза аскорбиновой кислоты является преобладающим в плодах растений. Так, в плодах персика и киви основным является L-галактозный путь, тогда как в плодах винограда и клубники – по всей видимости, D-галактуроновый. В то же время у ряда растений, например цитрусовых или томата, по мере созревания плодов может происходить смена различных путей биосинтеза. Отмечается, что уровни накопления аскорбиновой кислоты зависят не только от биосинтеза, но и от скорости ее окисления и рециркуляции.

Ключевые слова: L-аскорбиновая кислота; витамин С; плоды; метаболизм; гены биосинтеза аскорбиновой кислоты.


Для цитирования: Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Накопление витамина С в сочных плодах: биосинтез и рециркуляция, гены и ферменты. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):270-280. DOI 10.18699/VJ19.492

Vitamin C in fleshy fruits: biosynthesis, recycling, genes, and enzymes

D.Y. Tyapkina¹, E.Z. Kochieva^{1, 2}, M.A. Slugina^{1, 2} 

¹ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, RAS, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

 e-mail: mashinmail@mail.ru

L-ascorbic acid (vitamin C) is a plant secondary metabolite that has a variety of functions both in plant tissues and in the human body. Plants are the main source of vitamin C in human nutrition, especially citrus, rose hip, tomato, strawberry, pepper, papaya, kiwi, and currant fruits. However, in spite of the biological significance of L-ascorbic acid, the pathways of its biosynthesis in plants were fully understood only in 2007 by the example of a model plant *Arabidopsis thaliana*. In the present review, the main biosynthetic pathways of vitamin C are described: the L-galactose pathway, L-gulose pathway, galacturonic and myo-inositol pathway. To date, the best studied is the L-galactose pathway (Smyrnoff–Wheeler pathway). Only for this pathway all the enzymes and the entire cascade of reactions have been described. For other pathways, only hypothetical metabolites are proposed and not all the catalyzing enzymes have been identified. The key genes participating in ascorbic acid biosynthesis and accumulation in fleshy fruits are highlighted. Among them are L-galactose pathway proteins (GDP-mannose phosphorylase (GMP, VTC1), GDP-D-mannose epimerase (GME), GDP-L-galactose phosphorylase (GGP, VTC2/VTC5), L-galactose-1-phosphate phosphatase (GPP/VTC4), L-galactose-1-dehydrogenase (GalDH), and L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)); D-galac-

turonic pathway enzymes (NADPH-dependent D-galacturonate reductase (GalUR)); and proteins, controlling the recycling of ascorbic acid (dehydroascorbate reductase (DHAR1) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR)). Until now, there is no clear and unequivocal evidence for the existence of one predominant pathway of vitamin C biosynthesis in fleshy fruits. For example, the L-galactose pathway is predominant in peach and kiwi fruits, whereas the D-galacturonic pathway seems to be the most essential in grape and strawberry fruits. However, in some plants, such as citrus and tomato fruits, there is a switch between different pathways during ripening. It is noted that the final ascorbic acid content in fruits depends not only on biosynthesis but also on the rate of its oxidation and recirculation. Key words: L-ascorbic acid; vitamin C; fruits; metabolism; the key genes of ascorbic acid biosynthesis.

For citation: Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Vitamin C in fleshy fruits: biosynthesis, recycling, genes, and enzymes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):270-280. DOI 10.18699/VJ19.492 (in Russian)

Введение

L-аскорбиновая кислота (витамин С) – вторичный метаболит растений, выполняющий множество разнообразных функций в клетке (Davey et al., 2000; Iqbal et al., 2009; Smirnoff, 2018). Она играет роль регулятора экспрессии многих генов, через фитогормоны воздействует на процессы роста и развития растений и, что не менее важно, участвует в формировании ответа растительной клетки на биотические и абиотические стрессовые факторы (Pastori et al., 2003; Gest et al., 2013; Li et al., 2013). У некоторых видов растений соли аскорбиновой кислоты (АК) могут использоваться в качестве субстрата для биосинтеза других метаболитов, например солей щавелевой и винной кислот (Loewus F.A., Loewus M.W., 1987; Loewus F.A., 1999; Cruz-Rus et al., 2010).

Витамин С представляет особую ценность в рационе человека, так как из-за произошедшей мутации в одном из ферментов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты человек и другие высшие приматы утратили возможность вырабатывать ее самостоятельно (Nishikimi, Yagi, 1996). Являясь коферментом ряда метаболических процессов, витамин С играет значимую роль для нормального функционирования организма: обладает антиоксидантными свойствами, устраняет свободные радикалы – одну из причин онкогенеза и старения организма (Figueroa-Méndez, Rivas-Arancibia, 2015); улучшает иммунитет человека за счет активации фагоцитарных клеток; предотвращает сердечно-сосудистые заболевания, связанные с атеросклерозом; способствует образованию коллагена и развитию хрящевой ткани (Diplock et al., 1998). Основным источником витамина С в питании человека служат растения. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты содержится в плодах цитрусовых, шиповника, актинидии (киви), облепихи, папайи, клубники, рябины, перца, томата (Iqbal et al., 2009; Стрельщина и др., 2010).

Биосинтез аскорбиновой кислоты в растительной клетке

Несмотря на несомненную важность аскорбиновой кислоты для жизни растений и здоровья человека, ее биосинтез в растительной клетке окончательно был описан лишь в 2007 г. на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana* (Linster et al., 2007). В отличие от животных, которые синтезируют L-аскорбиновую кислоту из глюконовой, в растительной клетке существует по меньшей мере четыре альтернативных пути ее биосинтеза: L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый пути (см. рисунок) (Li et al., 2010; Yang et al., 2011).

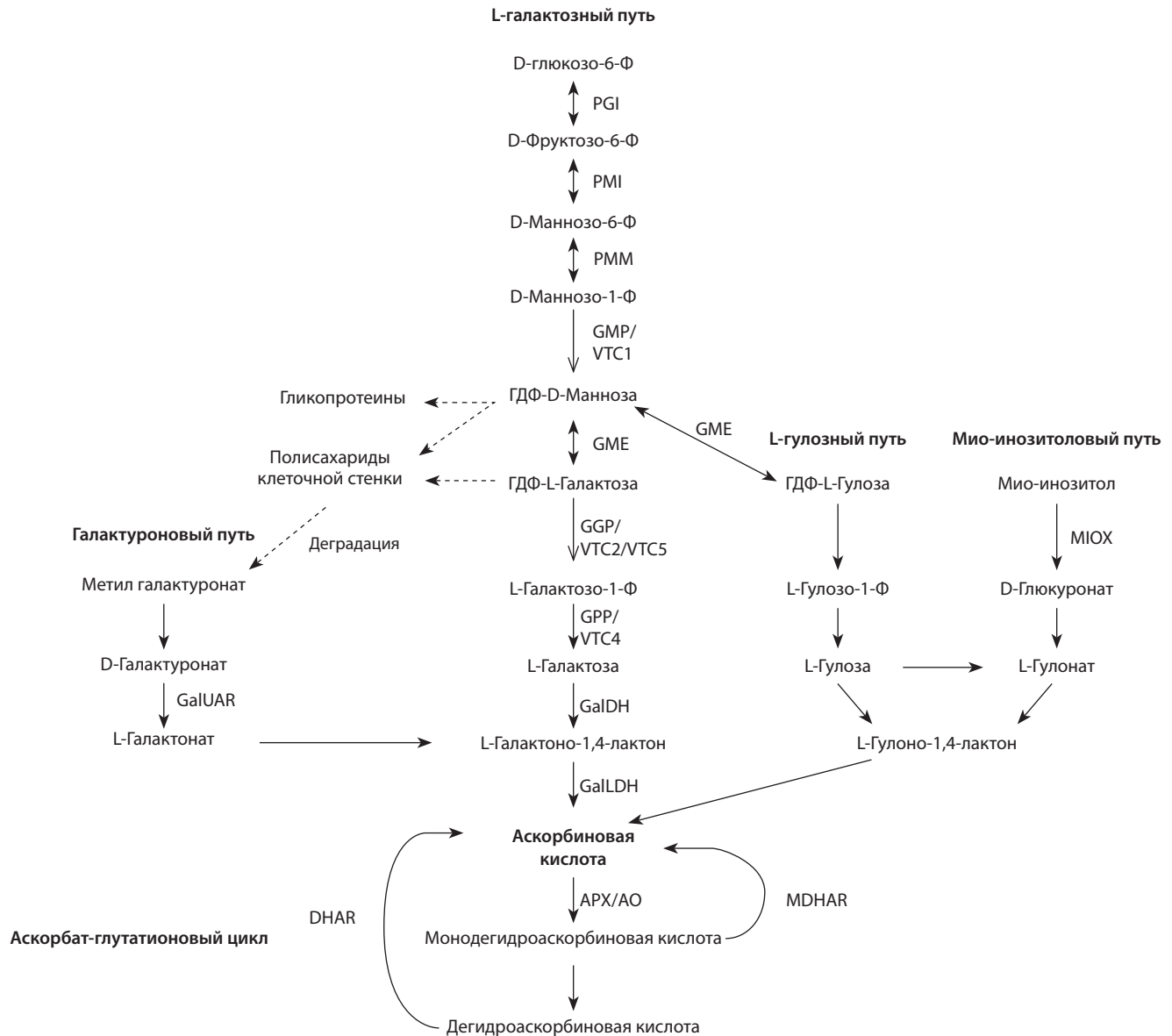
L-галактозный путь

На сегодняшний день L-галактозный путь, или путь Смирнова–Уилера (Wheeler et al., 1998), считается основным способом биосинтеза L-аскорбиновой кислоты у растений и включает десять последовательных стадий. Начальным субстратом служит молекула глюкозы. При этом первые восемь стадий нужны для того, чтобы преобразовать D-глюкозу в L-галактозу, которая отличается от D-глюкозы только пространственным расположением водородной и гидроксильной групп у четвертого атома углерода (Linster et al., 2007).

Важными метаболитами данного пути являются ГДФ-D-манноза и ГДФ-L-галактоза. Их взаимопревращение контролируется ферментом ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимеразой (GME). Стоит отметить, что основная часть продуктов этой реакции расходуется на реакции первичного метаболизма, а именно на биосинтез полисахаридов клеточной стенки (Roberts, 1971; Baydoun, Fry, 1988), который максимально активен в растущих органах и тканях. Из этого следует, что начальные этапы метаболического пути в основном задействованы во время роста органов (листьев, плодов и т.д.). В уже сформировавшихся (зрелых) органах происходит переключение на реакции вторичного метаболизма, и осуществляется дальнейшее превращение ГДФ-L-галактозы в аскорбиновую кислоту. Поэтому лимитирующим этапом на данном метаболическом пути синтеза витамина С считается последующая реакция, которая приводит непосредственно к синтезу L-аскорбиновой кислоты и кодируется ферментом ГДФ-L-галактозофосфорилазой (VTC2) (см. рисунок). Именно работа VTC2 имеет ключевое значение для образования витамина С, активность которого, в свою очередь, зависит от наличия у клетки потребности в синтезе полисахаридов клеточной стенки (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2014).

L-гулозный путь

На примере арабидопсиса было показано, что один из ферментов вышеописанного пути – ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимераза – помимо 3',5'-изомеразной активности, превращающей ГДФ-D-маннозу в ГДФ-L-галактозу, также может обладать только 5'-изомеразной активностью и катализировать реакцию превращения ГДФ-D-маннозы в ГДФ-L-гулозу (Wolucka, Van Montagu, 2003). Далее было предположено, что ГДФ-L-гулоза в ходе последующего превращения в L-гулозо-1-фосфат, L-гулозу и L-гулоно-1,4-лактон может быть также превращена в L-аскорбиновую кислоту (см. рисунок). Однако соответствующие каталитические ферменты L-гулозного пути синтеза



Пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в клетках растений, по (Li et al., 2010; Suekawa et al., 2017), с модификациями.

витамина С у растений еще не найдены, за исключением L-гулоно-1,4-лактонооксидазы арабидопсиса (Maruta et al., 2010). Интересно, что сверхэкспрессия L-гулоно-1,4-лактонооксидазы крысы (ALO) повышала содержание L-аскорбиновой кислоты в табаке и салате (Jain, Nessler, 2000). У мутантного по гену *VTC* растения арабидопсиса, характеризующегося дефицитом витамина С, сверхэкспрессия крысиного *ALO* привела к полному восстановлению содержания L-аскорбиновой кислоты (Radzio et al., 2003). Из этого следует вывод, что L-гулозный путь можно рассматривать как один из альтернативных путей биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях.

Мио-инозитоловый путь

Мио-инозитол представляет собой углеводный метаболит, синтезируемый большинством клеток и необходимый для нормального роста и развития растений. В форме различных инозитолфосфатов и фосфатидинозитоловых

липидов мио-инозитол принимает участие в трансдукции внутриклеточных сигнальных каскадов (Michell, 2007).

Мио-инозитоловый путь биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях состоит из четырех ферментативных стадий (см. рисунок). Мио-инозитол окисляется мио-инозитолоксигеназой до D-глюкуроновой кислоты, которая затем при катализе глюкуронаредуктазой превращается в L-гулоновую кислоту, которая под воздействием фермента альдонолактоназы преобразуется в L-гулоно-1,4-лактон. Последней реакцией является превращение L-гулоно-1,4-лактона в молекулу L-аскорбиновой кислоты под воздействием фермента L-гулонолактондегидрогеназы (Lorence et al., 2004).

Ключевым ферментом данного пути считается мио-инозитолоксигеназа (MIOX). Так, на примере арабидопсиса было представлено, что сверхэкспрессия MIOX приводит к двукратному увеличению содержания витамина С в цветках и листьях (Lorence et al., 2004). Остальные

ферменты, осуществляющие последующие реакции у растений, к настоящему времени не определены.

D-галактуроновый путь

В начале 1960-х гг. было показано, что метиловый эфир галактуроновой кислоты может превращаться в L-аскорбиновую кислоту. Впервые наличие данного метаболического пути было доказано с помощью радиометрического метода на примере простейшего *Euglena gracilis* (Shigeoka et al., 1979). В случае растений экзогенное добавление метилового эфира D-галактуроновой кислоты приводило к увеличению содержания АК в различных тканях и клеточной культуре арабидопсиса (Loewus, Kelly, 1961; Davey et al., 1999), что указывает на наличие у них данного пути синтеза аскорбиновой кислоты.

Стоит отметить, что начальными субстратами для D-галактуронового пути служат продукты разрушения полисахаридов клеточной стенки. D-галактуронозная кислота является необходимым элементом одновременно для двух биохимических процессов: синтеза пектинов – компонента клеточной стенки, и биосинтеза АК. Считается, что этот путь состоит из нескольких ключевых ферментативных стадий, которые заключаются в восстановлении D-галактуронозной кислоты галактуронатредуктазой до L-галактонозной кислоты или L-галактоно-1,4-лактона с последующим образованием L-аскорбиновой кислоты (см. рисунок). Важная роль данного метаболического пути показана для плодов таких растений, как клубника (Agius et al., 2003), виноград (Cruz-Rus et al., 2010), апельсин (Xu et al., 2013), яблоко (Mellidou et al., 2012). Поскольку D-галактуроновый путь значительно короче, чем L-галактозный, считающийся основным путем биосинтеза АК у большинства изученных растений, предполагают, что он может быть дополнительным путем в плодах при воздействии стресса (Cruz-Rus et al., 2011).

Рециркуляция АК (аскорбат-глутатионовый цикл)

Современный массив данных, накопленный в ходе изучения метаболизма АК в растительных тканях, показывает, что уровни ее конечного содержания зависят не только от биосинтеза, но также от окисления и последующей рециркуляции (Li et al., 2013).

Образовавшаяся в ходе одного из четырех вышеописанных циклов биосинтеза L-аскорбиновая кислота в растительной клетке выступает в качестве антиоксиданта, защищая ее от окислительного стресса (Akram et al., 2017). При этом образуются окисленные формы (монодегидроаскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты). В ходе рециркуляции окисленные формы восстанавливаются обратно до аскорбиновой кислоты при помощи двух редуктаз: монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR). Данный цикл известен как аскорбат-глутатионовый цикл (см. рисунок). Биологическая функция его существования обусловлена наличием в клетке активных форм кислорода, с одной стороны, и антиоксидативным свойством АК, с другой.

Первым этапом этого пути является детоксикация активных форм кислорода с помощью аскорбатпероксидазы (APX) или аскорбатоксидазы (АО). В результате образуется монодегидроаскорбиновая кислота, которая

восстанавливается обратно до АК монодегидроаскорбатредуктазой, либо дегидроаскорбиновая кислота, которая восстанавливается дегидроаскорбатредуктазой.

Таким образом, конечное содержание АК в органах и тканях растений зависит как от ее биосинтеза, так и от процесса рециркуляции.

Особенности биосинтеза и накопления аскорбиновой кислоты в плодах

L-аскорбиновая кислота выполняет множество разнообразных функций в жизни растительного организма. Процессы ее биосинтеза запускаются в ответ на разнообразные эндогенные и экзогенные воздействия и происходят практически во всех тканях и органах растений. Поэтому неудивительно наличие как минимум четырех путей синтеза аскорбиновой кислоты, переключение между которыми происходит в зависимости от конкретных потребностей и условий внутри клетки. Однако для человека наиболее интересен механизм накопления витамина С именно в съедобных частях растений, поэтому необходимо четко понимать, какой из метаболических путей синтеза АК имеет первоочередное значение в плодах различных видов растений. Несмотря на интерес, который представляет данная тема, количество исследований, посвященных особенностям накопления витамина С в плодах растений, ограничено. В настоящее время достаточно подробно рассмотрены пути синтеза и аккумуляции витамина С в плодах на примере некоторых сельскохозяйственных культур, таких как клубника, томат, виноград, киви, яблоко, груша, черешня, цитрус (Agius et al., 2003; Hancock et al., 2007; Bulley et al., 2009; Cruz-Rus et al., 2010; Di Matteo et al., 2010; Li et al., 2010; Walker et al., 2010; Vadejo et al., 2012; Alós et al., 2014).

Как правило, накопление АК происходит постепенно, по мере увеличения массы растущего плода. Наиболее быстро этот процесс осуществляется в период 75–100 дней после антезиса. Такой паттерн аккумуляции АК показан, например, у томата (Ioannidi et al., 2009). В то же время в плодах киви (Bulley et al., 2009) и черной смородины (Hancock et al., 2007) АК быстрее всего накапливается на ранних стадиях развития плодов, когда биосинтетическая активность клеток максимальная (Li et al., 2011).

Для некоторых культур существенную роль играет основной (L-галактозный) путь. Так, исследование содержания витамина С в плодах черной смородины (*Ribes nigrum*) показало вариабельность данного признака в зависимости как от климатических условий, так и от генотипа. При этом только для одного гена ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимеразы наблюдалась корреляция экспрессии с накоплением витамина С (Walker et al., 2010).

В плодах киви (*Actinidia deliciosa*, сорт Qinmei) измерение накопления витамина С показало максимальное его содержание на 30-й день после антезиса и постепенное уменьшение содержания к 60-му дню. Анализ экспрессии ключевых генов показал сходные паттерны для большинства исследуемых генов, за исключением генов L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (GalLDH) и L-галактозо-1-фосфатфосфатазы (GPP/VTC4). С накоплением АК коррелировала только экспрессия GPP (Li et al., 2010).

Для плодов томата (*Solanum lycopersicum*), в которых содержание витамина С составляет до 35 мг на 100 г, также было выявлено важное значение ферментов D-галактуранового пути. При этом показано, что увеличение содержания АК по мере созревания плодов томата сорта Миссо-Том находится в обратной зависимости от экспрессии генов основного (L-галактозного) пути (Badejo et al., 2012). Обработка растений томата L-галактозой и D-галактураном приводила к повышению содержания витамина С в созревших плодах, что не достигалось при обработке L-гулоно-1,4-лактоном, образующимся в L-гулозном и мио-инозитоловом путях (см. рисунок) (Badejo et al., 2012). Из этого можно сделать вывод, что при созревании плодов томата синтез АК может начинаться с пути Смирнова–Уилера с последующим переключением на D-галактурановый путь, ферменты которого работают уже на стадии полного созревания плодов. Нарботка D-галактурановой кислоты обеспечивается за счет расщепления пектина клеточной стенки, поэтому можно считать, что путь активируется во время процесса размягчения плодов томата (Badejo et al., 2012). Ранее также было показано, что в интрогрессивной линии IL 12-4 (*S. pennellii* и *S. lycopersicum*), отличавшейся от родительской линии куда большим содержанием витамина С, очень высока экспрессия генов пектинэстераз и полигалактуроназ, функция которых заключается в разрушении пектинов. Это еще раз свидетельствует о непосредственном участии D-галактуранового пути в процессе накопления витамина С в плодах томата (Di Matteo et al., 2010).

Аскорбиновая кислота является крайне ценным метаболитом плодов винограда (*Vitis vinifera*), поскольку служит субстратом для синтеза винной кислоты (Cholet et al., 2016). Так же как и в плодах клубники и томата, содержание АК растет по мере созревания винограда, достигая максимума в полностью спелых ягодах. Анализ экспрессии генов, контролирующих различные пути биосинтеза АК в плодах винограда, выявил сильную корреляцию транскрипции гена D-галактуранатредуктазы (*GalUR*) с количественным содержанием витамина С (Cruz-Rus et al., 2010). Таким образом, D-галактурановый путь был предложен в качестве основного пути биосинтеза витамина С во время роста и созревания плодов винограда (Cruz-Rus et al., 2010).

Известно, что спелые плоды клубники (*Fragaria* sp.) богаты витамином С и содержат в среднем 60 мг АК на 100 г свежей ткани (Agius et al., 2003). Существенное значение для накопления АК имеет также D-галактурановый путь. Экспрессия одного из ферментов данного пути – NADPH-зависимой D-галактуранатредуктазы, в плодах клубники увеличивается пропорционально накоплению в них витамина С. Сверхэкспрессия гена *GalUR* клубники в листьях арабидопсиса привела к двукратному увеличению содержания в них витамина С, что свидетельствует о важной роли именно этого фермента в биосинтезе аскорбиновой кислоты (Agius et al., 2003).

Надо отметить, что конечное содержание витамина С в плодах зависит не только от скорости биосинтеза АК, но и от наличия процессов ее рециркуляции (см. рисунок). Так, на примере клубники было показано, что экспрессия гена аскорбат-глутатионного цикла *MDHAR* положительно

коррелирует с накоплением витамина С в растущих плодах (Cruz-Rus et al., 2011).

В плодах черешни (*Prunus avium*, сорт Hongdeng) наблюдалось максимальное содержание АК в период образования завязи и постепенное снижение во время созревания плода, но с небольшим увеличением в зрелом плоде (Liang et al., 2017). Тем не менее АК продолжала накапливаться по мере увеличения веса свежих плодов. Описаны полноразмерные кДНК десяти генов, участвующих в L-галактозном пути биосинтеза АК, и десяти генов, участвующих в рециркуляции АК. Уровни экспрессии генов ГДФ-L-галактозофосфорилазы (GGP2), L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (GalLDH), аскорбатпероксидазы (APX3), аскорбатоксидазы (AO2), глутатионредуктазы (GR1) и дегидроаскорбатредуктазы (DHAR1) коррелировали с количественным содержанием витамина С во время развития плода, что указывает на то, что работа всех этих генов биосинтеза, деградации и рециркуляции аскорбиновой кислоты совместно регулирует накопление АК в плодах черешни (Liang et al., 2017).

В плодах груши (*Pyrus pyrifolia*, сорт Aikansui) детально исследовались активности ферментов, участвующих в синтезе через путь Смирнова–Уилера и в процессе рециркуляции витамина С в различных тканях плода (Huang et al., 2013). Результаты биохимического анализа показали, что содержание АК увеличивалось по мере развития плодов и достигло максимума через 30 дней после антезиса, затем уменьшалось и поддерживалось на одном уровне. Наибольшая концентрация АК обнаружена в кожуре, что является следствием высокой активности GalLDH и GalLDH, с одной стороны, и DHAR и MDHAR, работающих в цикле рециркуляции АК, с другой. Экзогенное введение предшественников синтеза АК продемонстрировало, что кожура обладает более сильной способностью биосинтеза через путь Смирнова–Уилера и D-галактурановый путь, тогда как мякоть и сердцевина имели более низкую способность синтезировать аскорбиновую кислоту (Huang et al., 2013).

Было показано, что в плодах яблони (*Malus domestica*) АК может синтезироваться по L-галактозному пути (Li et al., 2008). При дальнейших исследованиях динамики накопления витамина С в процессе созревания плодов у сорта Gala найдено, что уровни транскрипции генов ГДФ-L-галактозофосфорилазы, ГДФ-маннозопирофосфорилазы, D-галактуранатредуктазы и регулируемой на посттранскрипционном уровне L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы не коррелировали с накоплением витамина С. В то же время паттерны экспрессии L-галактозодегидрогеназы, L-галактозо-1-фосфатфосфатазы и ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимеразы в целом были сходны с паттерном накопления АК. Интересно, что экспрессия и активность генов монодегидроаскорбатредуктазы и дегидроаскорбатредуктазы, разрушающих АК в плодах, не коррелировали с накоплением АК в процессе развития плодов (Li et al., 2011).

Также был проведен поиск локусов количественных признаков, отвечающих за накопление витамина С в плодах *M. domestica* (Mellidou et al., 2012). Выявлена группа сцепления, включающая гены *GGP* и *DHAR*. Особый интерес представляют три паралогичных гена *GGP*, все они

находятся внутри АК-QTL кластера. Была найдена ассоциация между некоторыми аллельными вариантами гена *GGP* и повышенным содержанием витамина С. Сравнение паттернов экспрессии гена *GGP* у образцов, характеризующихся высоким и низким содержанием витамина С, указывает на ключевую роль *GGP* в накоплении витамина С. На основе найденных SNP созданы молекулярные маркеры, которые могут быть использованы для получения новых сортов с повышенным содержанием витамина С в плодах яблок (Mellidou et al., 2012). Была показана также связь между *DHAR* и QTL, ассоциированным с устойчивостью к потемнению плодов (Mellidou et al., 2012).

Известно, что цитрусовые являются важным источником витамина С. Были изучены паттерны экспрессии 13 генов метаболизма витамина С (как синтеза, так и деградации и рециркуляции) в плодах двух видов апельсина (*Citrus sinensis*) и мандарина (*C. unshiu*). Для анализируемых цитрусовых основным путем синтеза витамина С оказался L-галактозный путь. При этом накопление АК максимально в кожуре и мякоти, что коррелирует с профилями экспрессии генов L-галактозного пути, в то время как мио-инозитоловый путь преобладает при синтезе АК в кожуре незрелых плодов. В качестве ключевых генов, контролирующих синтез АК в мякоти, предложены *GGP* и *GPP*. В кожуре помимо них важна также работа генов *GMP* и мио-инозитолоксигеназы *MIOX* (Alós et al., 2014). Относительная экспрессия генов рециркуляции *MDHAR* и *DHAR* коррелировала с накоплением АК по мере созревания плода, и сорта с повышенным содержанием АК характеризовались повышенной экспрессией данных генов (Alós et al., 2014).

Таким образом, на сегодняшний день нельзя однозначно сказать, что какой-то из четырех известных путей биосинтеза АК является преобладающим в плодах растений. Так, например, в плодах персика (Imai et al., 2009) и киви (Bulley et al., 2009) преобладающим является L-галактозный путь, тогда как в плодах винограда (Cruz-Rus et al., 2010) и клубники (Agius et al., 2003), по всей видимости, основным является D-галактуроновый путь. В то же время у ряда растений, например цитрусовых или томата, по мере созревания плодов происходит смена доминирующих путей (Badejo et al., 2012; Alós et al., 2014).

Ключевые гены и ферменты, определяющие биосинтез и накопление L-аскорбиновой кислоты в ягодах, овощах и фруктах

Ферменты L-галактозного пути

ГДФ-маннозофосфорилаза (GMP, VTC1) (EC 2.7.7.22) обладает маннозо-1-фосфат-гуанилтрансферазной активностью. Впервые ген, кодирующий этот фермент, был детектирован и клонирован из мутантного растения арабидопсиса, характеризующегося пониженным содержанием аскорбиновой кислоты (Conklin et al., 1999). В дальнейшем было показано, что у томата ингибирование фермента GMP уменьшает содержание АК в плодах (Keller et al., 1999).

В базе данных NCBI представлены последовательности гена *VTC1* арабидопсиса (*A. thaliana*), томата (*S. lycopersicum*), репы (*Brassica rapa*), капусты огородной (*Brassica oleracea*), картофеля (*Solanum tuberosum*), папайи (*Carica papaya*), черешни (*P. avium*), риса (*Oryza sativa*), табака (*Nicotiana tabacum*), зизифуса (*Ziziphus jujuba*), перца (*Capsicum annuum*). Структура гена консервативна, он состоит из 4 экзонов, 4 интронов, общая протяженность гена около 2500 п. н.

ГДФ-D-маннозо-3'5'-эпимераза (GME) (EC 5.1.3.18) катализирует обратимую реакцию эпимеризации ГДФ-D-маннозы, которая является одной из основных на L-галактозном пути биосинтеза АК. В результате реакции происходит гидролиз высокоэнергетической гликозил-пирофосфорилазной связи. GME может катализировать две различные реакции с образованием из ГДФ-D-маннозы либо ГДФ-L-галактозы, либо ГДФ-L-гулозы. ГДФ-L-гулоза представляет собой начальный субстрат для альтернативного гулозного пути биосинтеза АК. Другой продукт реакции – ГДФ-L-галактоза, в дальнейшем может не только использоваться для синтеза витамина С, но и расходоваться на биосинтез клеточной стенки и гликопротеинов, что прежде всего необходимо для роста вегетативных органов (Lukowitz et al., 2001; Gilbert et al., 2009; Mounet-Gilbert et al., 2016). Работа данного фермента может оказывать влияние также на развитие пыльцы и семяобразование (Mounet-Gilbert et al., 2016).

На сегодняшний день GME считается одним из важнейших ферментов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты в растениях. Кодирующие его гены были выделены и охарактеризованы у арабидопсиса (Wolucka et al., 2001; Wolucka, Van Montagu, 2003), риса (Watanabe et al., 2006) и томата (Zhang C.J. et al., 2011; Zhang Y.Y. et al., 2011). При этом в геномах риса и томата выявлено по два паралогичных гена (Watanabe et al., 2006; Zhang C.J. et al., 2011; Zhang Y.Y. et al., 2011). Положительная корреляция экспрессии этого гена и содержания АК была показана для яблони (Li et al., 2010) и черники (Liu et al., 2015). Для киви (Bulley et al., 2009), персика (Imai et al., 2009) и томата (Ioannidi et al., 2009; Mellidou et al., 2012) такой закономерности не выявлено. Учитывая необходимость поддержания метаболического баланса между конкурирующими за общий субстрат (ГДФ-L-галактозу) процессами синтеза АК и клеточной стенки, авторы показали, что сверхэкспрессия гена *GME* не приводила к увеличению содержания АК у арабидопсиса (Yoshimura et al., 2014). В то же время совместная сверхэкспрессия генов *GME* и *GPP* вызывала гораздо большее увеличение накопления АК по сравнению со сверхэкспрессией одного только гена *GPP* (Bulley et al., 2009). Аналогичные данные получены и для плодов киви (Bulley et al., 2009). Это выявляет важнейшее значение генов *GME* и *GPP* и их роль в совместной регуляции L-галактозного пути.

У растений известно два паралогичных гена *GME1* и *GME2* протяженностью около 1500 п. н. Они имеют высокую степень гомологии, состоят из 6 экзонов и 5 интронов. Среди плодовоощных культур эти гены известны у винограда (*V. vinifera*), томата (*S. lycopersicum*), ананаса (*Ananas comosus*), дыни (*Cucumis melo*), шелковицы (*Morus notabilis*).

ГДФ-Л-галактозофосфоорилаза (GPP, VTC2/VTC5) (ЕС 2.7.7.69) катализирует реакцию фосфорилирования ГДФ-Л-галактозы до Л-галактозо-1-фосфата. Впервые важная роль гена *VTC2* была показана у арабидопсиса (Dowdle et al., 2007). Рекомбинантные аллели *VTC2* арабидопсиса дикого типа и двух мутантов были экспрессированы в *Escherichia coli*. Продукт одной мутантной аллели не приводил к синтезу витамина С, продукт другой аллели обладал всего 2 % от активности *VTC2* гена дикого типа. Однако при детальном анализе растений установлено, что *vtc2*-мутанты арабидопсиса, тем не менее, накапливают АК в количестве 10–20 % от уровня ее содержания в растении дикого типа. Это позволило предположить существование иных путей синтеза АК (Dowdle et al., 2007; Laing et al., 2007; Linster et al., 2007, 2008).

Кроме того, были проведены эксперименты по изучению изменения уровня АК в ответ на сверхэкспрессию *VTC2* у арабидопсиса, томата, клубники, картофеля и риса (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2014). В растениях, трансформированных конструкциями с геном *VTC2*, содержание АК значительно повышалось (Bulley et al., 2012; Wang et al., 2014).

По некоторым данным, на накопление АК в плодах оказывает влияние не только кодирующая последовательность гена *VTC2*, но также участок в промоторной области. Было показано, что синтез АК может контролироваться посттранскрипционной репрессией ГДФ-Л-галактозофосфоорилазы. Регуляция происходит за счет наличия дополнительной рамки считывания (uORF). «Выключение» этой uORF приводит к синтезу ГДФ-Л-галактозофосфоорилазы и, как следствие, увеличению концентрации АК. Такое посттрансляционное регулирование АК, вероятно, является достаточно древним механизмом контроля, поскольку uORF присутствует в генах *GPP* множества растений – от мхов до покрытосеменных (Laing et al., 2015).

Из вышеизложенного следует, что у ряда растений именно *GPP/VTC2* служит ключевым регулятором биосинтеза АК. С использованием этого гена выполнены многие биотехнологические работы, целью которых было увеличение содержания витамина С (Zhou et al., 2012).

На сегодняшний день в NCBI представлены последовательности нескольких паралогичных генов *GPP* у арабидопсиса (*A. thaliana*), репы (*B. rapa*), капусты (*B. oleracea*), кукурузы (*Zea mays*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*S. tuberosum*), табака (*N. attenuata*). Их протяженность составляет около 2740 п. н., а структура состоит из 7 экзонов и 6 интронов.

Л-галактозо-1-фосфатфосфатаза (GPP/VTC4) (ЕС 3.1.3.В9) осуществляет реакцию дефосфорилирования с образованием Л-галактозы. GPP считается также эффективным ферментом для регулирования синтеза АК. Это предположение было выдвинуто для киви (Laing et al., 2004; Bulley et al., 2009), яблока (Mellidou et al., 2012) и томата (Ioannidi et al., 2009). Однако следует отметить, что даже при покауте гена *GPP* АК синтезируется, хотя и в меньшем количестве, что указывает на присутствие в геноме других функциональных фосфатаз, участвующих в биосинтезе АК, или на наличие синтеза АК по иным путям (Conklin et al., 2006; Torabinejad et al., 2009).

GPP является бифункциональным ферментом, катализирующим биосинтез не только АК, но и мио-инозитола. Тем самым работа GPP может служить точкой соединения для Л-галактозного и мио-инозитолового путей биосинтеза АК (Torabinejad et al., 2009).

Для представителей царства растений известны гомологичные гены *GPP* у арабидопсиса (*A. thaliana*) с 12 экзонами и 11 интронами, протяженностью 2413 п. н. и у репы (*B. rapa*) с 9 экзонами и 9 интронами, протяженностью 7196 п. н.

Л-галактозо-1-дегидрогеназа (GalDH) (ЕС 1.1.1.316) и **Л-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (GalLDH)** (ЕС 1.3.2.3). GalDH окисляет Л-галактозу до Л-галактоно-1,4-лактона с использованием NAD⁺ в качестве акцептора электронов. GalLDH – конечный фермент Л-галактозного пути, приводящий непосредственно к синтезу АК. В настоящее время ген *GalDH* выделен из арабидопсиса, гороха, киви, яблока (Gatzek et al., 2002; Laing et al., 2004; Mieda et al., 2004). В плодах груши выявлено, что большие концентрации АК в кожуре являются в том числе следствием высокой активности GalDH и следующего в биохимическом пути фермента GalLDH (Huang et al., 2013). Фермент GalLDH был охарактеризован у нескольких видов растений, включая сладкий картофель (Imai et al., 1998), цветную капусту (Oesterhelt et al., 1997), шпинат (Mutsuda et al., 1995), табак (Yabuta et al., 2000), клубнику (do Nascimento et al., 2005), дыню (Pateraki et al., 2004), томат (Zhang C.J. et al., 2011; Zhang Y.Y. et al., 2011) и арабидопсис (Leferink et al., 2008). До открытия *VTC2* считалось, что именно эти ферменты, осуществляющие конечные этапы биосинтеза АК, могут иметь ключевое значение, по крайней мере у томатов (Alhagdom et al., 2007; Mellidou et al., 2012). Однако недавно выдвинуто предположение, что GalDH может влиять на аккумуляцию АК за счет участия в транспорте АК между различными органами (Mellidou, Kanellis, 2017; Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

Для гена *GalDH* известны гомологи в геномах кукурузы (*Z. mays*), черешни (*P. avium*), ячменя (*Hordeum vulgare*) и арабидопсиса (*A. thaliana*). Протяженность данного гена в среднем составляет 4300 п. н., а его структура представлена 5 экзонами и 4 интронами. Что же до гомологов гена *GalLDH*, то они аннотированы в геномах черешни (*P. avium*), сладкого перца (*C. annuum*) и яблони (*M. domestica*) и имеют протяженность в 5139, 7667 и 6329 п. н. соответственно. Ген состоит из 6 экзонов и 5 интронов.

Ферменты D-галактуронового пути

NADPH-зависимая D-галактуронатредуктаза (GalUR). Субстратом для работы этого фермента является D-галактуронат – продукт распада пектинов клеточной стенки, в результате проводимой GalUR реакции образуется Л-галактонат (см. рисунок). В плодах винограда (*V. vinifera*) была показана взаимозависимость экспрессии *GalUR* с накоплением витамина С по мере созревания плодов (Cruz-Rus et al., 2010). Аналогичные данные приведены для плодов клубники (*Fragaria sp.*), у которой GalUR также играет ключевую роль в биосинтезе АК (Agius et al., 2003). Следует отметить, что реакции D-галактуронового пути в растениях недостаточно изучены и необходимы

дальнейшие биохимические, физиологические и генетические исследования. Гомологи гена *GalUR* были аннотированы в геномах подсолнечника (*H. annuus*) и табака (*N. attenuata*) с протяженностью в 2671 и 12453 п. н. соответственно. Оба гомолога состоят из 4 экзонов и 3 интронов.

Ферменты, участвующие в рециркуляции АК

Дегидроаскорбатредуктаза (DHAR1) и монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR). Ферментативная активность *MDHAR* тесно коррелирует с накоплением АК в томате при пониженной температуре, что говорит о значимой роли *MDHAR* в регуляции синтеза АК при стрессах.

Идентификация генов *MDHAR* и *DHAR* и дальнейший функциональный анализ показали, что сверхэкспрессия гена *DHAR* приводила к увеличению содержания АК в 1.6 раза в плодах томата, выращенных при относительно низкой освещенности. В исследовании уровней экспрессии двух изоформ *MDHAR* было показано, что увеличение транскрипции этого гена отрицательно коррелирует с повышением уровня АК во время созревания плодов томата (Li et al., 2013). Однако высказано предположение, что *MDHAR* является важной детерминантой изменения уровня АК в условиях стресса (Ioannidi et al., 2009). Так, при холодовом (Li et al., 2013) и окислительном стрессе (Gest et al., 2013) активность *MDHAR* значительно увеличивает уровень содержания АК в плодах.

Роль *MDHAR* в повышении содержания АК однозначно показана для томатов с помощью QTL-картирования (Sauvage et al., 2014), а также определения экспрессионных профилей и активности фермента в процессе созревания (Mellidou et al., 2012). Экспрессия данного гена коррелирует с накоплением витамина С в плодах черники (Liu et al., 2015). Супрессия *MDHAR* в плодах томата приводила к уменьшению содержания АК, из чего можно предположить, что контроль процесса рециркуляции посредством увеличения активности *MDHAR* может быть эффективным способом повышения содержания витамина С (Truffault et al., 2017). Более того, как показано с использованием siRNA, уменьшение активности данного фермента приводит к неспособности растений томата противостоять холодовому стрессу (El Airaj et al., 2013).

Экспрессия гена *DHAR* коррелировала с накоплением АК в плодах шиповника (Huang et al., 2014) и черники (Liu et al., 2015).

У растений известно три паралогичных гена *DHAR1*, *DHAR2* и *DHAR3*. Гены-паралоги имеют низкую степень гомологии. Ген *DHAR1* протяженностью около 6000 п. н. состоит из 6 экзонов и 5 интронов.

Среди плодовоовощных культур гены *DHAR* известны у винограда (*V. vinifera*), томата (*S. lycopersicum*), черешни (*P. avium*), перца (*C. annuum*), яблони (*M. domestica*).

Гены-паралоги *MDHAR* имеют низкую степень гомологии. Количество экзонов варьирует от 9 до 17. Известны у томата (*S. lycopersicum*), арабидопсиса (*A. thaliana*), перца (*C. annuum*).

Таким образом, работа ферментов рециркуляции АК требует дальнейшего изучения, что обусловлено их возможной непосредственной связью с устойчивостью к холодовому и окислительному стрессу.

Закключение

В статье рассмотрены основные пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты и пути ее рециркуляции в тканях растений. Выделены ключевые гены, участвующие в биосинтезе и накоплении АК в плодах. Вместе с тем огромный массив полученных в этом направлении данных показывает нам, что наиболее значимую роль (изменения) в биосинтезе, накоплении и рециркуляции АК играет синергетическое взаимодействие всех этих составляющих. Вполне возможно, что изучение именно этих взаимодействий определит направление для следующего десятилетия научных работ, посвященных изучению метаболизма витамина С в растениях.

Список литературы / References

- Стрельцина С.А., Бурмистров Л.А., Никитина Е.В. Питательные и биологически активные вещества плодов рябины (*Sorbus L.*) в условиях северо-западной зоны садоводства России. Аграр. Россия. 2010;3:10-17.
- [Streltsina S.A., Burmistrov L.A., Nikitina E.V. Nutritious and biologically active substances of mountain ash fruits (*Sorbus L.*) in the conditions of the northwestern zone of horticulture in Russia. Agrar-naya Rossiya = Agricultural Russia. 2010;3:10-17. (in Russian)]
- Agius F., Gonzalez-Lamothe R., Caballero J., Munoz-Blanco J., Botella M., Valpuesta V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *NatBiotechnol.* 2003;21:177-181. DOI 10.1038/nbt777.
- Akram N., Shafiq F., Ashraf M. Ascorbic acid – a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 2017;8:613. DOI 10.3389/fpls.2017.00613.
- Alhagdow M., Mounet F., Gilbert L., Nunes-Nesi A., Garcia V., Just D., Petit J., Beauvoit B., Fernie A.R., Rothan C., Baldet P. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol.* 2007;145:1408-1422. DOI 10.1104/pp.107.106500.
- Alós E., Rodrigo M.J., Zacarías L. Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. *Planta.* 2014;239:1113-1128. DOI 10.1007/s00425-014-2044-z.
- Badejo A.A., Wada K., Gao Y.S., Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J. Exp. Bot.* 2012;63:229-239. DOI 10.1093/jxb/err275.
- Baydoun E.A.H., Fry S.C. [2-³H]Mannose incorporation in cultured plant cells: investigation of L-galactose residues of the primary cell wall. *J. Plant Physiol.* 1988;132:484-490. DOI 10.1016/S0176-1617(88)80068-3.
- Bulley S.M., Rassam M., Hoser D., Otto W., Schünemann N., Wright M., MacRae E., Gleave A., Laing W. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanylyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 2009;60(3):765-778. DOI 10.1093/jxb/ern327.
- Bulley S., Wright M., Rommens C., Yan H., Rassam M., Lin-Wang K., Andre C., Brewster D., Karunairatnam S., Allan A.C., Laing W.A. Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol. J.* 2012;10:390-397. DOI 10.1111/j.1467-7652.2011.00668.x.
- Cholet C., Claverol S., Claisse O., Rabot A., Osowsky A., Dumot V., Ferrari G., Gény L. Tartaric acid pathways in *Vitis vinifera* L. (cv. Ugni blanc): a comparative study of two vintages with contrasted climatic conditions. *BMC Plant Biol.* 2016;16:144. DOI 10.1186/s12870-016-0833-1.

- Conklin P.L., Gatzek S., Wheeler G.L., Dowdle J., Raymond M.J., Rolinski S., Isupov M., Littlechild J.A., Smirnov N. *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* 2006;281:15662-15670. DOI 10.1074/jbc.M601409200.
- Conklin P.L., Norris S.R., Wheeler G., Williams E.H., Smirnov N., Last R.L. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:4198-4203. DOI 10.1073/pnas.96.7.4198.
- Cruz-Rus E., Amaya I., Sanchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Valpuesta V. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 2011;62:4191-4201. DOI 10.1093/jxb/err122.
- Cruz-Rus E., Botella M.A., Valpuesta V., Gomez-Jimenez M.C. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. *J. Plant Physiol.* 2010;167:739-748. DOI 10.1016/j.jplph.2009.12.017.
- Davey M.W., Gilot C., Persiau G., Østergaard J., Han Y., Bauw G.C., Van Montagu M.C. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiol.* 1999;121:535-543. DOI 10.1104/pp.121.2.535.
- Davey M.W., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnov N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 2000;80:825-860. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
- Di Matteo A., Sacco A., Anacleria M., Pezzotti M., Delledonne M., Ferrarini A., Frusciante L., Barone A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biol.* 2010;10:163. DOI 10.1186/1471-2229-10-163.
- Diplock A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* 1998;80:77-112. DOI 10.1079/BJN19980106.
- do Nascimento J.R.O., Higuchi B.K., Gomez M.L.P.A., Oshiro R.A., Lajolo F.M. L-ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 2005;38:34-42. DOI 10.1016/j.postharvbio.2005.05.014.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnov N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.* 2007;52:673-689. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03266.x.
- El Airaj H., Gest N., Truffaut V., Garchery C., Riqueau G., Gouble B., Page D., Stevens R. Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels. *Postharvest Biol. Technol.* 2013;86:502-510. DOI 10.1016/j.postharvbio.2013.07.035.
- Figuerola-Méndez R., Rivas-Arancibia S. Vitamin C in health and disease: its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front. Physiol.* 2015;6:397. DOI 10.3389/fphys.2015.00397.
- Gatzek S., Wheeler G.L., Smirnov N. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J.* 2002;30(5):541-553. DOI 10.1046/j.1365-313X.2002.01315.x.
- Gest N., Garchery C., Gautier H., Jiménez A., Stevens R. Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnol. J.* 2013;11:344-354. DOI 10.1111/pbi.12020.
- Gilbert L., Alhaghdow M., Nunes-Nesi A., Quemener B., Guillon F., Bouchet B., Faurobert M., Gouble B., Page D., Garcia V., Petit J., Stevens R., Causse M., Fernie A.R., Lahaye M., Rothan C., Baldet P. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J.* 2009;60:499-508. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.03972.x.
- Hancock R.D., Walker P.G., Pont S.D.A., Marquis N., Vivera S., Gordon S.L., Brennan R.M., Viola R. L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by *in situ* biosynthesis via the L-galactose pathway. *Funct. Plant Biol.* 2007;34:1080-1091. DOI 10.1071/FP07221.
- Huang M., Xu Q., Deng X.X. L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *J. Plant Physiol.* 2014;171(14):1205-1216. DOI 10.1016/j.jplph.2014.03.010.
- Huang W., Qing G., Zhang H., Wu J., Zhang S. Distribution and metabolism of ascorbic acid in pear fruit (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Aikansui). *Afr. J. Biotechnol.* 2013;12:1952-1961. DOI 10.5897/AJB11.4048.
- Imai T., Ban Y., Terakami S., Yamamoto T., Moriguchi T. L-ascorbate biosynthesis in peach: cloning of six L-galactose pathway-related genes and their expression during peach fruit development. *Physiol. Plant.* 2009;136:139-149. DOI 10.1111/j.1399-3054.2009.01213.x.
- Imai T., Karita S., Shiratori G., Hattori M., Nunome T., Oba K., Hirai M. L-galactono-γ-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol.* 1998;39:1350-1358. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029341.
- Ioannidi E., Kalamaki M.S., Engineer C., Pateraki I., Alexandrou D., Mellidou I., Giovannonni J., Kanellis A.K. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J. Exp. Bot.* 2009;60:663-678. DOI 10.1093/jxb/ern322.
- Iqbal Y., Ihsanullah I., Shaheen N., Hussain I. Significance of vitamin C in plants. *J. Chem. Soc. Pakistan.* 2009;31:169-170.
- Jain A.K., Nessler C.L. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol. Breed.* 2000;6(1):73-78. DOI 10.1023/A:1009680818138.
- Keller R., Springer F., Renz A., Kossmann J. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J.* 1999;91:131-141. DOI 10.1046/j.1365-313X.1999.00507.x.
- Laing W.A., Frearson N., Bulley S., MacRae E. Kiwifruit L-galactose dehydrogenase: molecular, biochemical and physiological aspects of the enzyme. *Funct. Plant Biol.* 2004;31:1015-1025. DOI 10.1071/FP04090.
- Laing W.A., Martinez-Sanchez M., Wright M.A., Bulley S.M., Brewster D., Dare A.P., Rassam M., Wang D., Storey R., Macknight R.C., Hellens R.P. An upstream open reading frame is essential for feedback regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2015;27:772-786. DOI 10.1105/tpc.114.133777.
- Laing W.A., Wright M.A., Cooney J., Bulley S.M. The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104:9534-9539. DOI 10.1073/pnas.0701625104.
- Lefterink N.G., van den Berg W.A., van Berkel W.J. L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS J.* 2008;275:713-726. DOI 10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x.
- Li J., Li M., Liang D., Cui M., Ma F. Expression patterns and promoter characteristics of the gene encoding *Actinidia deliciosa* L-galactose-1-phosphate phosphatase involved in the response to light and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 2013;40:1473-1485. DOI 10.1007/s11033-012-2190-y.
- Li M., Chen X., Wang P., Ma F. Ascorbic acid accumulation and expression of genes involved in its biosynthesis and recycling in developing apple fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2011;136:231-238.
- Li M., Ma F., Liang D., Li J., Wang Y. Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumula-

- tion in kiwi. *PLoS One*. 2010;5(12):e14281. DOI 10.1371/journal.pone.0014281.
- Li M.J., Ma F.W., Zhang M., Pu F. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant Sci*. 2008;174:606-612. DOI 10.1016/j.plantsci.2008.03.008.
- Liang D., Zhu T., Ni Z., Lin L., Tang Y., Wang Z., Wang X., Wang J., Lv X., Xia H. Ascorbic acid metabolism during sweet cherry (*Prunus avium*) fruit development. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172818. DOI 10.1371/journal.pone.0172818.
- Linster C.L., Adler L.N., Webb K., Christensen K.C., Brenner C., Clarke S.G. A second GDP-L-galactose phosphorylase in *Arabidopsis* en route to vitamin C: covalent intermediate and substrate requirements for the conserved reaction. *J. Biol. Chem*. 2008;283:18483-18492. DOI 10.1074/jbc.M802594200.
- Linster C.L., Gomez T.A., Christensen K.C., Adler L.N., Young B.D., Brenner C., Clarke S.G. *Arabidopsis VTC2* encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J. Biol. Chem*. 2007;282:18879-18885. DOI 10.1074/jbc.M702094200.
- Liu F., Wang L., Gu L., Zhao W., Su H., Cheng X. Higher transcription levels in ascorbic acid biosynthetic and recycling genes were associated with higher ascorbic acid accumulation in blueberry. *Food Chem*. 2015;188:399-405. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.05.036.
- Loewus F.A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*. 1999;52:193-210. DOI 10.1016/S0031-9422(99)00145-4.
- Loewus F.A., Kelly S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. *Arch. Biochem. Biophys*. 1961;95:483-493. DOI 10.1016/0003-9861(61)90180-1.
- Loewus F.A., Loewus M.W. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Crit. Rev. Plant Sci*. 1987;5:101-119. DOI 10.1080/07352688709382235.
- Lorence A., Chevone B.I., Mendes P., Nessler C.L. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol*. 2004;134:1200-1205. DOI 10.1104/pp.103.033936.
- Lukowitz W., Nickle T.C., Meinke D.W., Last R.L., Conklin P.L., Somerville C.R. *Arabidopsis cyt1* mutants are deficient in a manose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98(5):2262-2267. DOI 10.1073/pnas.051625798.
- Maruta T., Ichikawa Y., Mieda T., Takeda T., Tamoi M., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. The contribution of *Arabidopsis* homologs of L-gulonol-1,4-lactone oxidase to the biosynthesis of ascorbic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2010;74:1494-1497. DOI 10.1271/bbb.100157.
- Mellidou I., Chagné D., Laing W., Keulemans J., Davey M.W. Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit. *Plant Physiol*. 2012;160:1613-1629. DOI 10.1104/pp.112.203786.
- Mellidou I., Kanellis A.K. Genetic control of ascorbic acid biosynthesis and recycling in horticultural crops. *Front. Chem*. 2017;5:50. DOI 10.3389/fchem.2017.00050.
- Michell R.H. Evolution of the diverse biological roles of inositols. *Biochem. Soc. Symp*. 2007;74:223-246. DOI 10.1042/BSS0740223.
- Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol*. 2004;45:1271-1279. DOI 10.1093/pcp/pch152.
- Mounet-Gilbert L., Dumont M., Ferrand C., Bournonville C., Monier A., Jorly J., Lemaire-Chamley M., Mori K., Atienza I., Herould M., Stevens R., Lehner A., Mollet J.C., Rothan C., Lerouge P., Baldet P. Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *J. Exp. Bot*. 2016;67:4767-4777. DOI 10.1093/jxb/erw260.
- Mutsuda M., Ishikawa T., Takeda T., Shigeoka S. Subcellular-localization and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1995;59:1983-1984. DOI 10.1271/bbb.59.1983.
- Nishikimi M., Yagi K. Biochemistry and Molecular Biology of Ascorbic Acid Biosynthesis. In: Harris J.R. (Ed.). *Subcellular Biochemistry (Ascorbic Acid: Biochemistry and Biochemical Cell Biology)*. Springer, Boston, MA, 1996;25:17-39. DOI 10.1007/978-1-4613-0325-1_2.
- Oesterhelt C., Schnarrenberger C., Gross W. The reaction mechanism of phosphomannomutase in plants. *FEBS Lett*. 1997;401:35-37. DOI 10.1016/S0014-5793(96)01425-1.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*. 2003;15:939-951. DOI 10.1105/tpc.010538.
- Pateraki I., Sanmartin M., Kalamaki M.S., Gerasopoulos B., Kanelis A.K. Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *J. Exp. Bot*. 2004;55:1623-1633. DOI 10.1093/jxb/erh186.
- Radzio J.A., Lorence A., Chevone B.I., Nessler C.L. L-Gulonol-1,4-lactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient *Arabidopsis (vtc)* mutants. *Plant Mol. Biol*. 2003;53(6):837-844. DOI 10.1023/B:PLAN.0000023671.99451.1d.
- Roberts R.M. The metabolism of D-mannose-¹⁴C to polysaccharide in corn roots. Specific labelling of L-galactose, D-mannose, and L-fucose. *Arch. Biochem. Biophys*. 1971;145:685-692. DOI 10.1016/S0003-9861(71)80029-2.
- Rodríguez-Ruiz M., Mateos R.M., Codesido V., Corpas F.J., Palma J.M. Characterization of the galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biol*. 2017;12:171-181. DOI 10.1016/j.redox.2017.02.009.
- Sauvage C., Segura V., Bauchet G., Stevens R., Do P.T., Nikoloski Z., Fernie A.R., Causse M. Genome-wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. *Plant Physiol*. 2014;165:1120-1132. DOI 10.1104/pp.114.241521.
- Shigeoka S., Nakano Y., Kitaoka S. The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid in *Euglena gracilis* z. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 1979;25:299-307. DOI 10.3177/jnsv.25.299.
- Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radic. Biol. Med*. 2018;122:116-129. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
- Suekawa M., Kondo T., Fujikawa Y., Esaka M. Regulation of Ascorbic Acid Biosynthesis in Plants. In: Hossain M.A. et al. (Eds.). *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer, 2017;157-176. DOI 10.1007/978-3-319-74057-7_6.
- Torabinejad J., Donahue J.L., Gunesekera B.N., Allen-Daniels M.J., Gillaspay G.E. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiol*. 2009;150:951-961. DOI 10.1104/pp.108.135129.
- Truffault V., Fry S.C., Stevens R.G., Gautier H. Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *Plant J*. 2017;89(5):996-1008. DOI 10.1111/tpj.13439.
- Walker P.G., Viola R., Woodhead M., Jorgensen L., Gordon S., Brennan R., Hancock R. Ascorbic acid content of blackcurrant fruit is influenced by both genetic and environmental factors. *Func. Plant Sci. Biotech*. 2010;1:40-52.
- Wang L.Y., Meng X., Yang D.Y., Wang G.D., Meng Q.W. Overexpression of tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene in tobacco improves tolerance to chilling stress. *Plant Cell Rep*. 2014;33(9):1441e1451. DOI 10.1007/s00299-014-1627-2.
- Watanabe K., Suzuki K., Kitamura S. Characterization of a GDP-D-mannose 3",5"-epimerase from rice. *Phytochemistry*. 2006;67:338-346. DOI 10.1016/j.phytochem.2005.12.003.

- Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393:365-369. DOI 10.1038/30728.
- Wolucka B.A., Persiau G., Van Doorselaere J., Davey M.W., Demol H., Vandekerckhove J., Van Montagu M., Zabeau M., Boerjan W. Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98:14843-14848. DOI 10.1073/pnas.011578198.
- Wolucka B.A., Van Montagu M. GDP-mannose 3,5-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem*. 2003;278:47483-47490. DOI 10.1074/jbc.M309135200.
- Xu Q., Chen L., Ruan X., ... Nagarajan N., Deng X., Ruan Y. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet*. 2013;45:59-66. DOI 10.1038/ng.2472.
- Yabuta Y., Yoshimura K., Takeda T., Shigeoka S. Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono- γ -lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*. 2000;41:666-675. DOI 10.1093/pcp/41.6.666.
- Yang X.Y., Xie J.X., Wang F.F., Zhong J., Liu Y.Z., Li G.H., Peng S.A. Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two citrus species with obvious difference in ascorbate content in pulp. *J. Plant Physiol*. 2011;168:2196-2205. DOI 10.1016/j.jplph.2011.07.015.
- Yoshimura K., Nakane T., Kume S., Shiomi Y., Maruta T., Ishikawa T., Shigeoka S. Transient expression analysis revealed the importance of *VTC2* expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2014;78:60-66. DOI 10.1080/09168451.2014.877831.
- Zhang C.J., Liu J.X., Zhang Y.Y., Cai X.F., Gong P.J., Zhang J.H., Wang T.T., Li H.X., Ye Z.B. Overexpression of *SIGMEs* leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep*. 2011;30:389-398. DOI 10.1007/s00299-010-0939-0.
- Zhang Y.Y., Li H.X., Shu W.B., Zhang C.J., Zhang W., Ye Z.B. Suppressed expression of ascorbate oxidase gene promotes ascorbic acid accumulation in tomato fruit. *Plant Mol. Biol. Rep*. 2011;29:638-645. DOI 10.1007/s11105-010-0271-4.
- Zhou Y., Tao Q.C., Wang Z.N., Fan R., Li Y., Sun X.F., Tang K.X. Engineering ascorbic acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis* leaves by single and double gene transformation. *Biol. Plant*. 2012;56:451-457. DOI 10.1007/s10535-012-0119-x.

ORCID ID


E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-316-00033 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.09.2018. После доработки 24.11.2018. Принята к публикации 25.11.2018.


Изучение посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования

Е.С. Беспалова¹, Ю.В. Ухатова¹, Н.Н. Волкова¹, Е.В. Овэс², Н.А. Гаитова², Т.А. Гавриленко^{1,3} 

¹ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, Кусково, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия


 e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Криоконсервация обеспечивает долгосрочное хранение генофонда селекционных сортов картофеля в криобанках при сверхнизких температурах. В настоящее время для криоконсервации сортов картофеля наиболее широко используется метод капель-витрификации, который постоянно совершенствуется с целью повышения регенерационной способности сохраняемого растительного материала. В ведущих мировых генбанках картофеля используются различные модификации этого метода. В данной работе представлены результаты изучения влияния условий культивирования после замораживания–оттаивания апексов побегов и пазушных почек *in vitro* растений на их способность к посткриогенному восстановлению. Для криоконсервации был использован метод капель-витрификации, модифицированный в ВИР. Фактор «длительная темновая инкубация эксплантов» не оказывал существенного влияния на частоту посткриогенной регенерации изученных сортов, за исключением одного сорта (Крепыш), для которого отмечено достоверное ($p < 0.05$) увеличение частоты регенерации в варианте культивирования апексов микропобегов в темноте по сравнению с вариантом культивирования при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота). Фактически у всех сортов частота посткриогенной регенерации апексов микропобегов была выше, чем у пазушных почек, однако достоверное превышение ($p < 0.05$) данного показателя для апексов побегов отмечено только в двух случаях: для сорта Удача – культивирование эксплантов при фотопериоде 16/8 ч и для сорта Крепыш – культивирование в условиях темновой инкубации. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа указывают на отсутствие значимого эффекта совместного действия двух факторов (темновая инкубация и тип экспланта) на способность сортов к посткриогенному восстановлению. С учетом полученных результатов дальнейшую криоконсервацию расширенной выборки из девяти селекционных сортов проводили с использованием только одного типа эксплантов – апексов микропобегов, которые после замораживания–оттаивания культивировали при фотопериоде 16/8 ч. Частота посткриогенной регенерации этих сортов варьировала от 30 до 60 %. Установлено достоверное влияние генотипа на регенерационную способность сортов после замораживания–оттаивания. Способность сортов к посткриогенному восстановлению не связана со значениями морфогенетических показателей *in vitro* растений, которые используются в оригинальном семеноводстве картофеля. Возраст мериклона (2–4 года) не оказывал существенного влияния ни на показатели морфогенеза, ни на частоту посткриогенной регенерации сортов.

Ключевые слова: картофель; *Solanum tuberosum*; длительное хранение; криоконсервация; условия *in vitro* культивирования; морфогенез *in vitro* растений.

Для цитирования: Беспалова Е.С., Ухатова Ю.В., Волкова Н.Н., Овэс Е.В., Гаитова Н.А., Гавриленко Т.А. Изучение посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):281-286. DOI 10.18699/VJ19.500


Investigation of the post-cryogenic regeneration ability of potato varieties under different cultivation conditions

E.S. Bespalova¹, Yu.V. Ukhatova¹, N.N. Volkova¹, E.V. Oves², N.A. Gaitova², T.A. Gavrilenko^{1,3} 

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

² Lorch Potato Research Institute, Kuskovo, Moscow, Russia

³ Saint Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

 e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Cryopreservation provides long-term storage of the gene pool of potato varieties in cryobanks at extremely low temperatures. Currently, droplet vitrification is the most widely used method for cryopreservation of potato varieties, which is constantly improving to increase the regeneration rates of the stored plant material. Different modifications of this method are used in the world's leading potato genebanks. This paper presents the results of studying the effect of cultivation conditions after plunging into liquid nitrogen and thawing of shoot tips and axillary buds of *in vitro* plants on their post-cryogenic recovery. The droplet-vitrification method modified at VIR was used for cryopreservation. The factor "prolonged dark incubation of explants" did not have a significant effect on the frequency of post-cryogenic regeneration of the studied varieties except for one variety (Krepysh), for which a significant increase in the regeneration rate was observed for the shoot tips cultivated in the darkness compared to the cultivation under the photoperiod 16/8 hours (light/darkness). The

frequency of post-cryogenic regeneration of shoot tips was higher than that of the axillary buds for all varieties; however, these differences were significant ($p < 0.05$) only in two cases: for the variety Udacha (a photoperiod of 16/8 hours) and for the variety Krepysh (the dark incubation). The results of two-factor analysis of variance indicate that there is no effect of interaction of factor 1 (prolonged dark incubation) and factor 2 (explant type) on the ability of varieties to post-cryogenic recovery. Taking into account the obtained results, the further cryopreservation of an extended subset of 9 varieties was carried out using shoot tips, which, after freezing-thawing, were cultivated under the photoperiod of 16/8 hours. The frequency of post-cryogenic regeneration of these varieties varied from 30 to 60 %. A significant effect of genotype on post-cryogenic recovery has been established. The ability of varieties to regenerate shoots after freezing and thawing was not related to the values of morphogenic indices of *in vitro* plants. The age of the meriklons (2–4 years) did not significantly affect either the morphogenic indices or the frequency of post-cryogenic regeneration.

Key words: potato; *Solanum tuberosum*; long-term preservation; cryoconservation; *in vitro* cultivation conditions; *in vitro* morphogenesis.

For citation: Bespalova E.S., Ukhatova Yu.V., Volkova N.N., Oves E.V., Gaitova N.A., Gavrilenko T.A. Investigation of the post-cryogenic regeneration ability of potato varieties under different cultivation conditions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):281–286. DOI 10.18699/VJ19.500 (in Russian)

Введение

Важнейшей вегетативно размножаемой продовольственной культурой является возделываемый картофель *Solanum tuberosum*. Генофонд селекционных сортов картофеля сохраняется в полевых коллекциях, а также в дублетных – *in vitro* и криоколлекциях. Гарантированное сохранение обеспечивается при наличии в генбанке всех трех типов коллекций (Гавриленко и др., 2007; Филипенко, 2007; FAO, 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015). Долгосрочное хранение генофонда селекционных сортов картофеля в контролируемых условиях проводят при сверхнизких температурах в криобанках.

Для криоконсервации картофеля используют различные методы: витрификации, дроблет-замораживания, сгуорлате, дроблет-витрификации (Kaczmarczyk et al., 2011; Niino, Valle Arizaga, 2015; Ухатова, Гавриленко, 2018). В настоящее время наиболее часто применяется метод дроблет-витрификации, разработанный Panis et al. (2005) для криоконсервации образцов банана. Данный метод был многократно модифицирован в разных лабораториях и используется в крупнейших мировых генбанках для создания криоколлекций картофеля (Kim et al., 2006; Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016, 2017; Ухатова и др., 2017; Jenderek, Reed, 2017; Гавриленко и др., 2019). Подробное сравнение различных модификаций метода дроблет-витрификации проведено в нашей другой работе (Гавриленко и др., 2019).

Наиболее крупная по численности (1 533 образца) криоколлекция находится в Международном центре картофеля (CIP) в Перу (Vollmer et al., 2017). Первая в России криоколлекция селекционных и аборигенных сортов картофеля, насчитывающая 230 образцов, сохраняется в криобанке ВИР. Эта коллекция создается с использованием модифицированного в 2011 г. метода дроблет-витрификации (Дунаева и др., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011).

Метод дроблет-витрификации, модифицированный в CIP, включает этап длительного (в течение одной недели) культивирования в темноте апексов *in vitro* растений после их замораживания–оттаивания. В генбанке NAC, NAAS, Кореи для криоконсервации используются и пазушные почки микрорастений. В модифицированном в ВИР методе этап длительной темновой инкубации не применяется, культивирование эксплантов с момента замораживания–оттаивания до получения полностью сформированных

регенерантов проходит при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) (Дунаева и др., 2011; Гавриленко и др., 2019). Отметим, что работ по изучению влияния темновой инкубации на индукцию и эффективность посткриогенной регенерации картофеля в доступной нам литературе нет.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния длительной темновой инкубации на эффективность посткриогенной регенерации различных типов эксплантов (апексов и пазушных почек *in vitro* растений). С учетом полученных результатов в дальнейшем проводились эксперименты по криоконсервации расширенной выборки селекционных сортов картофеля.

Материалы и методы

В качестве материала были использованы *in vitro* растения 13 селекционных российских сортов картофеля, полученных из Банка здоровых сортов картофеля (БЗСК) Всероссийского НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха: Антонина, Василек, Гулливер, Ильинский, Ирбитский, Крепыш, Кузнечанка, Любава, Накра, Удача, Тулеевский, Фрителла, Югана. Исходные *in vitro* растения выращивали три-четыре недели на питательной среде MS без гормонов для получения выровненных по физиологическому состоянию микрорастений.

Для изучения влияния длительной темновой инкубации на посткриогенное восстановление эксплантов отобрали четыре сорта картофеля (Ильинский, Крепыш, Накра, Удача), контрастных по способности к посткриогенному восстановлению (Ухатова и др., 2017). У микрорастений этих четырех сортов вычленили как апексы микропобегов, так и пазушные почки (из верхних двух междоузлий).

Криоконсервацию сортов картофеля проводили в отделе биотехнологии ВИР с использованием модифицированного метода дроблет-витрификации (Дунаева и др., 2011), детальное описание которого приведено в работе (Гавриленко и др., 2019). Изолированные экспланты помещали в жидкую среду MS, затем переносили в жидкую среду LS (MS с 0.4M сахарозой и 2M глицеролом) на 20 мин, после чего экспланты помещали в раствор PVS2 с криопротекторами (MS с добавлением 3.26 M глицерола, 2.42 M этиленгликоля, 1.9 M ДМСО и 0.4 M сахарозы) и оставляли на 30 мин на льду. Экспланты, погруженные в капли раствора PVS2, переносили в заполненные жидким азотом криопробирки, которые помещали на один час в

сосуд Дьюара с жидким азотом. Оттаивание материала проводили при комнатной температуре в жидкой среде RS (MS с добавлением 1.2 М сахарозы) в течение 15 мин. Затем экспланты переносили в чашки Петри со средой MSTo (MS с добавлением 0.5 мг/л зеатин рибозида, 0.5 мг/л ИУК, 0.2 мг/л ГК, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агар-агара) и культивировали при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) (Гавриленко и др., 2019).

В вариантах опыта с темновой инкубацией экспланты после замораживания–оттаивания переносили в чашки Петри со средой MSTo, которые плотно заворачивали алюминиевой фольгой и оставляли на тех же светоустановках на 7 дней. Через одну неделю фольгу снимали и продолжали культивирование эксплантов при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота).

В конце восьмой недели культивирования после замораживания–оттаивания учитывали регенерационную способность эксплантов в каждом варианте опыта (число эксплантов, сформировавших побеги). Данные представляли в процентах к общему числу криоконсервированных эксплантов. Эксперименты выполняли в трех повторностях.

После получения результатов изучения влияния темновой инкубации и типа эксплантов на посткриогенное восстановление была проведена еще одна серия экспериментов по криоконсервации девяти дополнительных сортов (Антонина, Любава, Тулеевский, Фрителла, Югана, Ирбитский, Василек, Гулливер, Кузнечанка). В этой серии экспериментов в каждой повторности опыта изолировали по 20 эксплантов на сорт для контроля посткриогенной регенерации и дополнительно еще 30 эксплантов с последующей их закладкой на длительное криохранилище в биокриоконсерватории ВИР.

Данные посткриогенного восстановления девяти сортов сравнивали с четырьмя показателями морфогенеза растений в культуре *in vitro* (Овэс и др., 2018): 1) продолжительностью периода от черенкования до формирования микрорастениями двух-трех междоузлий; 2) продолжительностью периода от черенкования до формирования микрорастениями четырех-шести междоузлий; 3) продолжительностью периода активного роста микрорастениями; 4) продолжительностью всего вегетационного периода микрорастениями – от черенкования до формирования ими микроклубней. Кроме того, учитывали «возраст мериклона» – общую продолжительность пребывания данного клона в культуре *in vitro*.

Обработку полученных результатов и оценку достоверности различий между вариантами опытов проводили с помощью методов вариационной статистики (*t*-критерий Стьюдента, коэффициент корреляции), а также компьютерной программы STATISTICA 6.0 (модули одно- и двухфакторного анализа).

Результаты

Изучение влияния условий культивирования различных типов эксплантов на частоту их посткриогенной регенерации. Уже на третьей неделе после замораживания–оттаивания наблюдали появление первых регенерантов и на апексах микропобегов, и на пазушных почках в двух вариантах опыта – культивирование эксплантов в темноте и при фотопериоде 16/8 ч (см. рисунок). К концу

восьмой недели культивирования, когда проводился учет частоты посткриогенного восстановления, число регенерирующих эксплантов, как правило, возрастало.

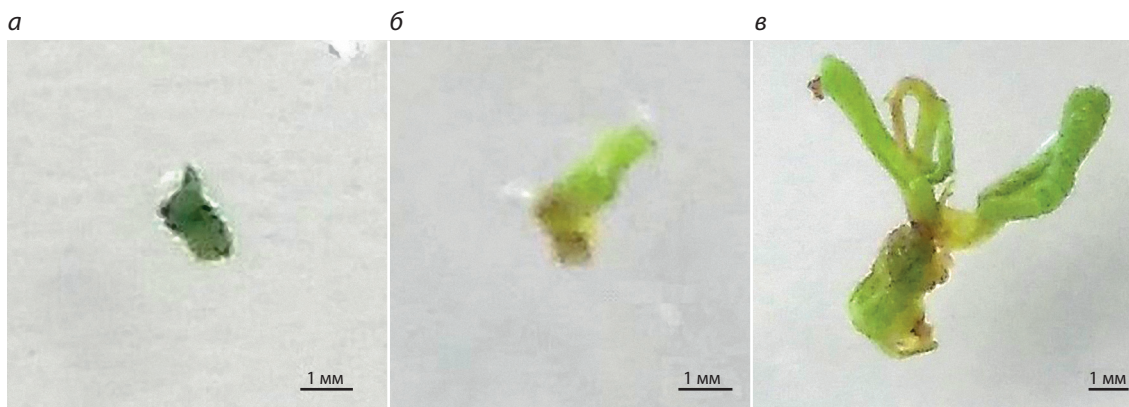
В табл. 1 представлены результаты изучения влияния условий культивирования после замораживания–оттаивания апексов микропобегов и пазушных почек *in vitro* растений на их способность к посткриогенному восстановлению. Длительная темновая инкубация эксплантов не оказывала существенного влияния на частоту посткриогенной регенерации изученных сортов, за исключением сорта Крепыш, для которого отмечено достоверное увеличение частоты регенерации в варианте культивирования апексов микропобегов в темноте по сравнению с вариантом культивирования при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) ($t_{st} = 2.8, p < 0.05$) (см. табл. 1). В среднем по суммарным данным, полученным для всех четырех сортов, существенного влияния темновой инкубации на посткриогенное восстановление как апексов микропобегов, так и пазушных почек выявлено не было ($t_{st} = 0.85, p > 0.05$). Результаты однофакторного анализа подтвердили отсутствие достоверного влияния фактора «темновая инкубация» на уровень посткриогенной регенерации изученных сортов ($p = 0.154$).

Влияние типа экспланта на уровень регенерации после оттаивания четырех сортов было статистически значимым ($p = 0.002$). Частота посткриогенной регенерации апексов микропобегов была достоверно выше ($p < 0.05$), чем у пазушных почек, у сорта Удача (культивирование при фотопериоде 16/8 ч) и у сорта Крепыш (культивирование в условиях темновой инкубации) (см. табл. 1). Результаты двухфакторного дисперсионного анализа указывают на отсутствие значимого эффекта совместного действия двух факторов на способность сортов к посткриогенному восстановлению. Отмечено статистически значимое влияние генотипа ($p = 0.039$) на частоту посткриогенной регенерации.

С учетом полученных результатов дальнейшую криоконсервацию расширенной выборки из девяти селекционных сортов проводили с использованием апексов микропобегов, которые после замораживания–оттаивания культивировали при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота).

Изучение показателей морфогенеза *in vitro* и способности к посткриогенному восстановлению у селекционных сортов картофеля. В табл. 2 представлены данные по регенерационной способности апексов микропобегов девяти сортов картофеля после замораживания–оттаивания. По уровню посткриогенной регенерации изученные сорта можно разделить на две группы: образцы с регенерационной способностью менее 40% (сорта Любава, Тулеевский, Фрителла), и сорта, регенерационная способность которых была выше 40% (Антонина, Ирбитский, Василек, Гулливер, Кузнечанка). Полученные результаты указывают на существенное ($p < 0.05$) влияние генотипа на показатель посткриогенной регенерации, что отмечается и в большинстве работ по криоконсервации разных видов растений, включая картофель (Bamberg et al., 2016; Volk et al., 2016; Ухатова и др., 2017; Vollmer et al., 2017).

В нашей работе была изучена связь между различными морфогенетическими признаками – способностью сортов к посткриогенному восстановлению и показателями фаз



Формирование посткриогенных регенерантов у сорта Крепыш в процессе культивирования апексов микропобегов на питательной среде MSTo, фотопериод 16/8 ч (свет/темнота).

а – эксплант на первой неделе после оттаивания; б – появление регенеранта на третьей неделе; в – развитие регенеранта на восьмой неделе культивирования.

Таблица 1. Частота посткриогенной регенерации (%) в разных условиях культивирования двух типов эксплантов (апексы микропобегов и пазушные почки) сортов картофеля

Сорт	Варианты опыта			
	16/8 ч (свет/темнота)		Длительная темновая инкубация (1 неделя)	
	Апексы микропобегов	Пазушные почки	Апексы микропобегов	Пазушные почки
Ильинский	33.3 ± 22.0 b	16.7 ± 11.0 bc	40.8 ± 15.8 ab	12.5 ± 7.2 bc
Крепыш	43.3 ± 6.7 b	36.7 ± 12.0 b	62.5 ± 1.4 a	30.0 ± 11.5 bc
Накра	20.0 ± 10.0 bc	20.0 ± 10.0 bc	35.0 ± 5.0 b	17.5 ± 7.5 bc
Удача	30.0 ± 5.8 b	14.2 ± 3.0 c	46.7 ± 16.7 ab	17.5 ± 6.3 bc
$\bar{X} \pm m_x$	31.7 ± 4.8 b	21.9 ± 5.9 bc	46.3 ± 5.9 b	19.4 ± 3.7 bc

Примечание. Значения, отмеченные разными буквами, достоверно отличаются ($p < 0.05$).

Таблица 2. Частота посткриогенной регенерации сортов картофеля и показатели фаз роста и развития *in vitro* растений в процессе их микроразмножения

Сорт	Частота посткриогенной регенерации, %	Морфогенетические показатели (период достижения микрорастениями различных фаз роста и развития, дней)				Возраст исходного мериклона, лет
		Фаза интенсивного роста микрорастений		3	4	
		1	2			
Любава	30.0 ± 15.3	12–15	30–35	30–45	45–85	3
Тулеевский	35.0 ± 5.0	12–15	30–35	30–45	45–75	4
Фрителла	35.0 ± 5.0	20–23	38–45	45–55	55–80	3
Югана	40.0 ± 10.0	12–15	25–30	25–45	45–80	4
Антонина	41.7 ± 8.4	12–15	25–30	25–45	45–80	4
Ирбитский	45.0 ± 5.0	20–23	38–45	45–55	55–80	4
Василек	45.0 ± 5.0	12–15	30–35	30–45	45–65	3
Гулливер	50.0 ± 16.7	12–15	25–30	25–45	45–80	2
Кузнечанка	60.0 ± 10.0	15–20	30–35	30–65	65–90	4

Примечание. Морфогенетические показатели: 1 – продолжительность периода от черенкования до формирования микрорастениями двух-трех междоузлий; 2 – продолжительность периода от черенкования до формирования микрорастениями четырех-шести междоузлий; 3 – продолжительность периода активного роста микрорастений; 4 – продолжительность всего вегетационного периода микрорастений – от черенкования до формирования ими микроклубней.

роста и развития *in vitro* растений в процессе их микро-размножения (см. табл. 2). Данные морфогенетические показатели применяются при выращивании микро-растений с целью дальнейшего получения мини-клубней и в настоящее время начинают использоваться в коммерческих компаниях, производящих микро-растения картофеля в больших объемах (Овэс и др., 2018).

Три сорта из девяти (Гулливер, Югана, Антонина) характеризовались ускоренным протеканием фаз интенсивного роста микро-растений (показатели 1 и 2), поэтому период достижения микро-растениями этих сортов стандартных размеров (4–6 междоузлий) не превышал одного календарного месяца (см. табл. 2). Эти три сорта выделялись также наиболее короткой продолжительностью периода активного роста *in vitro* растений (показатель 3). Поздний срок наступления фазы интенсивного роста микро-растений отмечен для сортов Ирбитский и Фри-телла. Наибольшая продолжительность всего вегетационного периода в культуре *in vitro* отмечена для микро-растений сорта Кузнечанка (см. табл. 2). Наличие статистически значимой положительной корреляции отмечено для морфогенетических показателей 1 и 2 ($r = 0.90$), 1 и 3 ($r = 0.96$), 2 и 3 ($r = 0.88$), 3 и 4 ($r = 0.93$). В то же время статистически достоверной корреляции между способностью изученных девяти сортов к ускоренному морфогенезу в условиях *in vitro* и частотой их посткриогенной регенерации не выявлено. Возраст мериклона не оказывал существенного влияния ни на показатели морфогенеза, ни на частоту посткриогенной регенерации сортов (см. табл. 2).

Заключение

Результаты изучения посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования указывают на отсутствие существенного влияния длительной темновой инкубации эксплантов и значительный эффект типа экспланта: фактически у всех сортов частота посткриогенной регенерации апексов микро-побегов была выше, чем у пазушных почек. Установлено достоверное влияние генотипа на регенерационную способность сортов после замораживания–оттаивания. Способность сортов к посткриогенному восстановлению не связана со значениями морфогенетических показателей *in vitro* растений; возраст мериклона также не оказывал существенного влияния ни на показатели морфогенеза, ни на частоту посткриогенной регенерации сортов. В практическом плане для дальнейшего пополнения криоколлекции сортов картофеля можно рекомендовать модифицированный в ВИР метод дроплет-витрификации. При его применении следует использовать апексы микро-побегов, регенерация которых проводится при стандартных для этого метода условиях (Гавриленко и др., 2019). Данный метод эффективен для криоконсервации сортов различного происхождения, контрастных по морфогенетическому потенциалу в культуре *in vitro*.

Список литературы / References

Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., Швачко Н.А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно

размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2007;164:273-283.

[Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Truskinov E.V., Antonova O.Yu., Pendinen G.I., Lupysheva Yu.V., Rogovaya V.V., Shvachko N.A. A strategy of long-term conservation of vegetatively propagated crops under controlled conditions. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. St. Petersburg, 2007;164:273-283. (in Russian)]

Гавриленко Т.А., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Ухатова Ю.В. Модифицированный метод дроплет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23. DOI 10.18699/VJ19.505.

[Gavrilenko T.A., Shvachko N.A., Volkova N.N., Ukhatoeva Yu.V. A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from the potato *in vitro* plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23. DOI 10.18699/VJ19.505. (in Russian)]

Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях. СПб.: ВИР, 2011.

[Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of Vegetatively Propagated Crops *in vitro* and in Cryocollections. St. Petersburg: VIR Publ., 2011. (in Russian)]

Овэс Е.В., Анисимов Б.В., Симаков Е.А., Жевора С.В., Гаитова Н.А. Особенности морфогенеза *in vitro* и оценка фенотипической идентичности сортовых признаков картофеля. Картофель и овощи. 2018;7:33-36. DOI 10.25630/PAV.2018.7.18246.

[Oves E.V., Anisimov B.V., Simakov E.A., Zhevora C.V., Gaitova N.A. Peculiarities of morphogenesis *in vitro* and evaluation of potato cultivars for compliance. Kartofel i Ovoshchi = Potato and Vegetables. 2018;7:33-36. DOI 10.25630/PAV.2018.7.18246. (in Russian)]

Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. Биотехнология и селекция растений. 2018;1(1):52-63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63.

[Ukhatoeva Yu.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). Biotechnologiya i Selektsiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding. 2018;1(1):52-63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63 (in Russian)]

Ухатова Ю.В., Овэс Е.В., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2017;178(3):13-20. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20.

[Ukhatoeva Yu.V., Oves E.V., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Cryoconservation of potato breeding cultivars at VIR. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. St. Petersburg, 2017;178(3):13-20. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20 (in Russian)]

Филипенко Г.И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР имени Н.И. Вавилова. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2007;164:263-272.

[Filipenko G.I. Development of the system of low-temperature storage and cryopreservation of plant genetic resources at VIR. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. St. Petersburg, 2007;164:263-272. (in Russian)]

Bamberg J.B., Martin M.W., Abad J., Jenderek M.M., Tanner J., Donnelly D.J., Nassar M.K., Veilleux R.E., Novy R.G. *In vitro* technology at the US Potato Genebank. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2016;52:213-225. DOI 10.1007/s11627-016-9753-x.

FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome. 2014;182.

Jenderek M.M., Reed B.M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. In Vitro Cell.

- Dev. Biol. Plant. 2017;53(4):299-308. DOI 10.1007/s11627-017-9828-3.
- Kaczmarczyk A., Rokka V.M., Keller E.R.J. Potato shoot tip cryopreservation. A review. Potato Res. 2011;54:45-79. DOI 10.1007/s11540-010-9169-7.
- Kim H.H., Yoon J.W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. CryoLetters. 2006; 27(4):223-234.
- Niino T., Valle Arizaga M. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. Breed. Sci. 2015;65(1):41-52. DOI 10.1270/jsbbs.65.41.
- Panis B., Piette B., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Sci. 2005;168:45-55. DOI 10.1016/j.plantsci.2004.07.022.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2015;120:117-125. DOI 10.1007/s11240-014-0585-2.
- Shvachko N., Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method. In: Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. (Eds.). Cryopreservation of Crop Species in Europe: Proc. of COST Action 871 Final meeting. Angers, France, 2011;135-137.
- Volk G.M., Henk A.D., Jenderek M.M., Richards C.M. Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks. Genet. Resour. Crop Evol. 2016;64(7): 1613-1622. DOI 10.1007/s10722-016-0460-6.
- Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N.L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2017;53(4):309-317. DOI 10.1007/s11627-017-9846-1.
- Vollmer R., Villagaray R., Egusquiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N.A., Ellis D. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP): a model for long term conservation of clonal plant genetic resources collections of the future. CryoLetters. 2016;37(5):318-329.

ORCID ID

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.т.н. Л.Ю. Новиковой за помощь в статистической обработке данных. Работа выполнена при поддержке подпрограммы КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 годы (№ 0481-2018-0023). *In vitro* коллекцию картофеля, входящую в состав ЦКП УНУ «Коллекция ВИР», образцы которой были использованы для криоконсервации, поддерживали в рамках программы 0662-2019-0004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.11.2018. После доработки 06.03.2019. Принята к публикации 10.03.2019.

Polymorphism of ITS sequences in 35S rRNA genes in *Elymus dahuricus* aggregate species: two cryptic species?

A.V. Rodionov^{1, 2}✉, K.S. Dobryakova¹, N.N. Nosov¹, A.A. Gnutikov^{1, 3}, E.O. Punina¹, A.A. Kriukov⁴, V.S. Shneyer¹

¹ Komarov Botanical Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

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

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

⁴ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, Saint-Petersburg, Russia

✉ e-mail: avrodionov@mail.ru

Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences were sequenced for 23 species and subspecies of *Elymus sensu lato* collected in Russia. The Neighbor-Net analysis of ITS sequences suggested that there are four ribotypes called Core Northern St-rDNA, Core Southern St-rDNA, Northern dahuricus St-rDNA and Southern dahuricus St-rDNA. The Core Southern variant of St-rDNA is closely related to rDNA of diploid *Pseudoroegneria stipifolia* (PI 313960) and *P. spicata* (PI 547161). The Core Northern St-rDNA is closely related to rDNA of *P. cognata* (PI 531720), a diploid species of Kyrgyzstan carrying St^Y variant of the St genome. The Core Northern St-rDNA is widespread among the *Elymus* species of Siberia and the Far East, including Yakutia and Chukotka. The Core Southern St-ribotype is typical of southern *Elymus* and *Pseudoroegneria* of the South Caucasus, Primorye, Pakistan, and South Korea. The Northern dahuricus St-ribotype and Southern dahuricus St-ribotype are derivatives of the Core Northern and Core Southern St-ribotypes, correspondingly. Both of them were found in all four studied species of the *E. dahuricus* aggregate: *E. dahuricus* Turcz. ex Griseb., *E. franchetii* Kitag., *E. excelsus* Turcz. ex Griseb. and Himalayan *E. tangutorum* (Nevski) Hand.-Mazz. In other words, there are at least two population groups (two races) of the *Elymus dahuricus* aggregate species that consistently differ in their ITS-sequences in Siberia, the Far East and Northern China. Each contains all morphological forms, which taxonomists now attribute either to different species of *E. dahuricus* aggr. (*E. dahuricus sensu stricto*, *E. franchetii*, *E. tangutorum*, *E. excelsus*) or subspecies of *Campeiostrachys dahurica* (Turcz. ex Griseb.) B.R. Baum, J.L. Yang et C.C. Yen. At the moment it is unknown if there are any morphological differences between plants carrying either Northern or Southern dahuricus rDNA. Probably, they are cryptic species, but it is certain that if differences in morphology between the two races exist, they are not associated with signs that are now considered taxonomically significant and are used to separate *E. dahuricus* s. s., *E. franchetii*, *E. tangutorum*, and *E. excelsus*.

Key words: *Elymus dahuricus* aggr.; interspecific hybridization; rDNA; 35S rRNA; Triticeae.

For citation: Rodionov A.V., Dobryakova K.S., Nosov N.N., Gnutikov A.A., Punina E.O., Kriukov A.A., Shneyer V.S. Polymorphism of ITS sequences in 35S rRNA genes in *Elymus dahuricus* aggregate species: two cryptic species? Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):287-295. DOI 10.18699/VJ19.493

Полиморфизм ITS-последовательностей генов 35S рРНК у видов *Elymus dahuricus* aggr.: два криптических вида?

А.В. Родионов^{1, 2}✉, К.С. Добрякова¹, Н.Н. Носов¹, А.А. Гнутиков^{1, 3}, Е.О. Пунина¹, А.А. Крюков⁴, В.С. Шнейер¹

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

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

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: avrodionov@mail.ru

Секвенированы последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) 23 видов и подвидов *Elymus sensu lato*. При анализе молекулярно-филогенетической сети Neighbor-Net все последовательности ITS образцов *Elymus* s. l. были разделены на четыре типа: основной северный *Elymus*-риботип, основной южный *Elymus*-риботип, северный dahuricus-риботип и южный dahuricus-риботип. рДНК основного южного риботипа родственна рДНК диплоидного вида *Pseudoroegneria stipifolia* (PI 313960) и *P. spicata* (PI 547161). рДНК основного северного риботипа родственна рДНК *P. cognata* (PI 531720), диплоидного вида из Казахстана, несущего St^Y – вариант St-генома. Основной северный риботип широко распространен у видов *Elymus* Сибири и Дальнего Востока, включая Якутию и Чукотку. Основной южный St-риботип характерен для относительно южных популяций *Elymus* и *Pseudoroegneria*, включая Закавказье, Приморье, Пакистан, Южную Корею. Отметим, что северный *Elymus dahuricus*-риботип и южный *Elymus dahuricus*-риботип были обнаружены у всех четырех видов группы родства *E. dahuricus* aggr.: *E. dahuricus* Turcz. ex Griseb., *E. franchetii* Kitag., *E. excelsus* Turcz. ex Griseb. и у гималайского вида *E. tangutorum* (Nevski) Hand.-Mazz. Иными словами, молекулярно-филогенетические исследования образцов, относимых к *E. dahuricus* aggr., говорят о том, что в Сибири, на Дальнем Востоке и в Северном Китае существуют по крайней мере две группы популяций (две расы), надежно различающиеся

по ITS-последовательностям, в каждой из которых представлены все морфологические формы, относимые сейчас одними систематиками к четырем разным видам *E. dahuricus* aggr. (*E. dahuricus sensu stricto*, *E. franchetii*, *E. tangutorum*, *E. excelsus*), а другими – к одному виду *Campeiostrachys dahurica* (Turcz. ex Griseb.) B.R. Baum, J.L. Yang et C.C. Yen. Имеются ли между этими группами морфологические различия, или это криптические виды (подвиды) – неизвестно, но с уверенностью можно сказать, что если различия в морфологии между этими двумя расами есть, то они не связаны с признаками, которые сейчас считаются таксономически значимыми и используются для разделения *E. dahuricus* s. s., *E. franchetii*, *E. excelsus*, *E. tangutorum*.

Ключевые слова: *Elymus dahuricus* aggr.; межвидовая гибридизация; 35S рНК; Triticeae.

Introduction

The beginning of the 21 century was marked by very wide using of DNA sequencing in systematics and phylogeny of animals and plants. Remarkable result of this was an exponential rise in the discovery of cryptic species in different groups of animals (Bickford et al., 2007). However, such discoveries are much rarer in plants, especially in angiosperms (Shneyer, Kotseruba, 2015). We suggest that cryptic species may exist in particular, in the genus *Elymus* L. (Triticeae).

Now it is considered the genus *Elymus* is represented in Russia by 53 species (Tzvelev, Probatova, 2010). All these species are allopolyploids with St, Y, H subgenomes and haplomes StY ($2n = 28$), StH ($2n = 28$) and StYH ($2n = 42$), whereas primary diploids ($2n = 14$) are absent in the genus (Agafonov et al., 2001; Agafonov, 2007). Based on the results of interspecies hybridization, DNA sequencing and GISH, it has been suggested that all the *Elymus* species share a common St subgenome originated from the genus *Pseudoroegneria* (Nevski) A. Löve species and H subgenome from an ancestor of the genus *Hordeum* L. (Dewey, 1984; Sun, Zhang, 2011; Yan et al., 2011; Mason-Gamer, 2013). It was suggested that North American perennial bunchgrass *Pseudoroegneria spicata* (Pursh) A. Löve was most likely donor of the Y subgenome, although Asiatic species *P. cognata* (Hackel) A. Löve (syn.: *Agropyron ferganense* Drobov) and *P. libanotica* (Hack.) D.R. Dewey also could not be excluded (Okito et al., 2009), particularly for the Asiatic *Elymus* species with StY and StHY genome compositions.

C. Yen et al. (2005) divided the genus *Elymus* s. l., strictly in accordance with their genomic constitution, into six genera: *Douglasdeweya* C. Yen, J.L. Yang et B.R. Baum (StStPP); *Roegneria* C. Koch (StStYY); *Anthosachne* Steudel (StSt WWYY); *Kengylia* C. Yen et J.L. Yang (StStPPYY); allohexaploid species with the StStYYHH karyotypes (Yen et al., 2005; Baum et al., 2011) were referred to the genus *Campeiostrachys* Drobov, and *Elymus* L. in this treatment included only the species with the StStHH/StStHHHH/StStStHH karyotypes (Yen et al., 2005; Yen, Yang, 2009). Though the separation of species into genera based on the karyotype constitution is attractive from a genetic point of view (Dewey, 1984; Tzvelev, 1991; Agafonov, 2007), it should be noted that the division species into genera only based on their genome composition does not always correlate with morphological criteria by which species and genera defined and delimited (Jensen, Chen, 1992; Baum et al., 2011). Internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of the nuclear genes 35S rRNA were widely employed in molecular phylogenetic studies of *Elymus* of China and North America (Liu et al., 2006; Wang et al., 2009; Mason-Gamer, 2013; Rabey, 2014; Gao et al., 2015; and others).

The main objective of our study is an assessment of inter-specific ITS-polymorphism of *Elymus* of Siberian and the Far

Eastern flora. This is interesting from the genetic point of view because, the phenomenon of interspecific and introgressive hybridization is widespread among Siberian and Far Eastern populations/natural races of *Elymus* (Agafonov, 1997; Wu et al., 2015). East Eurasian species of *Elymus* have all the features of a syngameon (Lotsy, 1925). It was necessary to ascertain how this fact effects on genetic distances between the Siberian *Elymus* ‘varieties’ which taxonomists delimitate as several morphologically discrete species. Also, the aim of our study was to study relationships in *Elymus dahuricus* aggr. to which Tzvelev, Probatova (2010) referred four species, also treated as subspecies of species *Campeiostrachys dahurica* (Turcz. ex Griseb.) B.R. Baum, J.L. Yang et C.C. Yen (Baum et al., 2011).

Material and methods

Nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences (ITS) were sequenced from 34 accessions belonging to 23 species and subspecies of *Elymus* s. l. (Table 1). The plant samples were collected in the Altai Krai and Altai Republic, Khakassia, the Kemerovo Oblast, Yakutia and the Northern Caucasus from 2004 to 2013. Herbarium specimens are stored in the herbarium of the Laboratory of Biosystematics and Cytology and in the Herbarium LE of the Komarov Botanical Institute.

Total genomic DNA was isolated using the CTAB method (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987), with minor modifications described previously (Rodionov et al., 2008). Amplification of the ITS region was performed using primers ITS 1P (Ridgway et al., 2003) and ITS 4 (White et al., 1990). The PCR reaction was carried out in a total volume of 50 μ L containing 1 \times SE-buffer AS (SibEnzyme, Russia), 2.5 mM Mg^{2+} , 2 mM each of dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Helicon, Russia), 0.01 μ M of each primer (Beagle, Russia), 1–2 μ L total DNA, 5 units of Taq-polymerase (SibEnzyme, Russia) and distilled water to the final volume. PCR amplification was done also using 1 \times Maxima Hot Start Taq buffer (Thermo Scientific, Sweden), 2.5 mM Mg^{2+} (Thermo Scientific, Sweden), 2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Helicon, Russia), 0.01 μ M of each primer, 1–2 μ L total DNA, 5 units of Maxima Hot Start Taq polymerase (Thermo Scientific, Sweden), and distilled water. Amplification parameters: primary denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, 52 $^{\circ}$ C for 1 min and 72 $^{\circ}$ C for 1 min, with a final extension step at 72 $^{\circ}$ C for 10 min. The PCR products were electrophoresed in 1 % agarose gel. The QiaGen Extraction Kit (Qiagen, Germany) was used to extract the DNA from the gel. Sanger sequencing was performed in The Core Facilities Center “Cell and Molecular Technologies in Plant Science” at the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences. The PCR products were sequenced in both directions on ABI

Table 1. Types of ITS sequences in species of *Elymus* and *Pseudoroegneria*, our data

No.	Species	Genome/Haplome	Origin	GenBank	Ribotype
Section Turczaninovia (Nevski) Tzvel. (syn. genus <i>Campeioestachys</i> Drobov)					
1	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	RF: Khakassia	KJ540222	Southern dahuricus St-rDNA
2	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	RF: Altai Republic	KJ540223	
Section Goulardia (Husn.) Tzvel.					
3	<i>E. amurensis</i> (Drob.) Czer.	StY	RF: Primorsky Krai	KM871828	Southern dahuricus St-rDNA
4	<i>E. caninus</i> (L.) L.	StH	RF: Altai Republic	KJ561233	Northern St-rDNA
5	<i>E. caninus</i> (L.) L.	StH	RF: North Caucasus	KJ561234	
6	<i>E. ciliaris</i> (Trin.) Tzvel.	StY	RF: Primorsky Krai	KM871829	Southern St-rDNA
7	<i>E. fibrosus</i> (Schrenk) Tzvel.	StH	RF: Altai Republic	KM363383	Northern St-rDNA
8	<i>E. fibrosus</i> (Schrenk) Tzvel.	StH	Finland	KM871830	
9	<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvel.	StY	RF: Kemerovo Oblast	KJ755831	
10	<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvel.	StY	RF: Altai Republic	KM363382	
11	<i>E. jacutensis</i> (Drob.) Tzvel.	Unknown	RF: Yakutia	KM363381	
12	<i>E. jacutensis</i> (Drob.) Tzvel.	Unknown	RF: Altai Republic	KM575844	
13	<i>E. komarovii</i> (Nevski) Tzvel.	StH		KJ561236	
14	<i>E. macrourus</i> (Turcz.) Tzvel.	StH		KM379150	
15	<i>E. macrourus</i> (Turcz.) Tzvel.	StH	RF: Yakutia	KM502299	
16	<i>E. mutabilis</i> (Drob.) Tzvel.	StH	RF: Altai Republic	KM871827	
17	<i>E. nevskii</i> Tzvel.	StY	RF: Altai Krai	KJ540224	
18	<i>E. probatovae</i> Tzvel.	Unknown	RF: Chukotka	KM871831	
19	<i>E. sajanensis</i> (Nevski) Tzvel.	StH	RF: Altai Republic	KM502300	
20	<i>E. sajanensis</i> (Nevski) Tzvel.	StH	RF: Tuva	KM871825	
21	<i>E. scandicus</i> (Nevski) Tzvel.	StH	RF: Altai Republic	KJ561237	
22	<i>E. subfibrosus</i> (Tzvel.) Tzvel.	StH	RF: Yakutia	KM975705	
23	<i>E. trachycaulus</i> (Link) Gould et Shinners	StH	RF: Primorsky Krai	KM975706	
24	<i>E. transbaicalensis</i> (Nevski) Tzvel.	StH	RF: Altai Republic	KJ561235	
25	<i>E. transbaicalensis</i> (Nevski) Tzvel.	StH		KM363385	
26	<i>E. transbaicalensis</i> (Nevski) Tzvel.	StH		KM575845	
27	<i>E. vernicosus</i> (Nevski ex Grub.) Tzvel.	StY		KJ540221	
28	<i>E. vernicosus</i> (Nevski ex Grub.) Tzvel.	StY		KM871821	Northern dahuricus St-rDNA
Section Elymus					
29	<i>E. peschkovae</i> Tzvel.	StH	RF: Yakutia	KM871824	Northern St-rDNA
30	<i>E. schrenkianus</i> (Fisch. et C.A. Mey.) Tzvel.	StHY	RF: Altai Republic	KM502297	
31	<i>E. schrenkianus</i> (Fisch. et C.A. Mey.) Tzvel.	StHY	RF: Tuva	KM502298	
32	<i>E. schrenkianus</i> (Fisch. et C.A. Mey.) Tzvel.	StHY	RF: Altai Republic	KM502301	
33	<i>E. sibiricus</i> L.	StH		KJ540220	
The hybrid					
34	<i>Elymus</i> sp.	Unknown	RF: Altai Republic	KJ561239	Northern St-rDNA
Genus <i>Pseudoroegneria</i> (Nevski) A. Löve					
35	<i>P. geniculata</i> (Trin.) A. Löve (syn. <i>Elytrigia geniculata</i> (Trin.) Nevski)	StSt	RF: Khakassia	KJ561242	Northern St-rDNA

Prism 3130 (Applied Biosystems, USA). All sequences were submitted to the GenBank (NCBI) database. The sequences were aligned with ClustalW using the MEGA 6 (Tamura et al., 2013) software package with subsequent visual verification. The SplitsTree4 algorithm Neighbor-Net (Huson, Bryant, 2006), proposed for the study of network evolution (Bryant, Moulton, 2004; Huson, Bryant, 2006) was used.

Results

We studied variability of ITS-sequences of *E. dahuricus*, *E. excelsus*, *E. franchetii*, *E. tangutorum*, species that constitute *Elymus dahuricus* aggr. (Tzvelev, Probatova, 2010). ITS-sequences of these species, as well as of some other species of *Elymus*, *Elytrigia*, *Pseudoroegneria* and *Hordeum* are provided in Table 1 and Table 2.

Table 2. Types of ITS sequences in species of the genus *Elymus*, *Elytrigia*, *Pseudoroegneria* and *Hordeum*. ITS1-genes 5.8S rRNA-ITS2 sequences from the international database GenBank used in our work

No.	Species	Genome	Origin	GenBank	Ribotype
Section Turczaninovia (Nevski) Tzvel. (syn. Genus <i>Campeiostrachys</i> Drobov)					
36	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	South Korea	HQ600520 (Kim Y.D. et al., unpubl.)	Southern dahuricus St-rDNA
37	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	China?	JN009816	Northern St-rDNA
38	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	South Korea: Taeangun, Choongcheongnam-do	KF713222 (Lee J. et al., unpubl.)	Southern dahuricus St-rDNA
39	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	China: Shandan, Gansu	KF905152 (Song et al., 2015)	Northern dahuricus St-rDNA
40	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	China: Yuzhong, Gansu	KF905178 (Song et al., 2015)	
41	<i>E. dahuricus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	China	KJ526338 (Gao et al., 2015)	Southern dahuricus St-rDNA
42	<i>E. excelsus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	China: Neimenggu	KJ526341	
43	<i>E. excelsus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY		KJ526342	Northern dahuricus St-rDNA
44	<i>E. excelsus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY		KJ526343	
45	<i>E. excelsus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY	China	JN009803 (Li X. et al., unpubl.)	Southern dahuricus St-rDNA
46	<i>E. excelsus</i> Turcz. ex Griseb.	StHY		JN009809 (Li X. et al., unpubl.)	
47	<i>E. franchetii</i> Kitag. (<i>E. dahuricus</i> var. <i>cylindricus</i> Franch.)	StHY	China?	JN009805 (Li X. et al., unpubl.)	
48	<i>E. franchetii</i> Kitag.	StHY	China: Haiyuan	KF905180 (Song et al., 2015)	Northern dahuricus St-rDNA
49	<i>E. franchetii</i> Kitag.	StHY	China: Xinjiang	KJ526336 (Gao et al., 2015)	Southern dahuricus St-rDNA
50	<i>E. franchetii</i> Kitag.	StHY		KJ526337 (Gao et al., 2015)	
51	<i>E. tangutorum</i> (Nevski) Hand.-Mazz.	StHY		KJ526351 (Gao et al., 2015)	
52	<i>E. tangutorum</i> (Nevski) Hand.-Mazz.	StHY		KJ526352 (Gao et al., 2015)	Northern dahuricus St-rDNA
Section Goulardia (Husn.) Tzvel.					
53	<i>E. caninus</i> (L.) L.	StH	China: Nei Monggol, Xilinhot	KJ526335 (Dong et al., 2015)	Northern St-rDNA
54	<i>E. dolichatherus</i> (Keng) S.L. Chen	StY	China	EU617242 (Liu Q. et al., unpubl.)	Southern dahuricus St-rDNA
55	<i>E. dolichatherus</i> (Keng) S.L. Chen	StY		EU617245 (Liu Q. et al., unpubl.)	Northern St-rDNA
56	<i>E. fedtschenkoi</i> Tzvel.	StY	China: Xinjiang, Habahe	AY740838 (Liu et al., 2006)	
57	<i>E. gmelinii</i> (Ledeb.) Tzvel.	StY	China: Xinjiang, Altay	AY740842 (Liu et al., 2006)	Northern dahuricus St-rDNA
Section Clinelymopsis (Nevski) Tzvel.					
58	<i>E. caucasicus</i> (K. Koch) Tzvel.	StY	Armenia: Dilidjan	AY740808 (Liu et al., 2006)	Southern St-rDNA
Section Elymus					
59	<i>E. confusus</i> (Roshev.) Tzvelev	StH	Mongolia	FJ040160 (Wang et al., 2009)	Northern St-rDNA
60	<i>E. sibiricus</i> L.	StH	China: Gansu, Hezuo	EF396962 (Wang et al., 2009)	
Gen. <i>Elytrigia</i> Desv.					
61	<i>E. repens</i> (L.) Nevski	StStH	South Korea: Yungyanggun	KF713228 (Lee J. et al., unpubl.)	Southern St-rDNA
62	<i>E. repens</i> (L.) Nevski	StStH	China	MF893161 (Yang et al., 2017)	
<i>Pseudoroegneria</i> (Nevski) A. Löve					
63	<i>P. cognata</i> (Hackel) A. Löve	St	Kyrgyzstan: Osh	EF014226 (Yu et al., 2008)	Northern St-rDNA
64	<i>P. elytrigioides</i> (C. Yen & J.L. Yang) B.R. Lu	StSt	China: Tibet, Changdu	AY740798 (Liu et al., 2006)	
65	<i>P. geniculata</i> (Trin.) A. Löve	StSt	RF: Altai Republic	EF014228 (Yu et al., 2008)	
66	<i>P. geniculata</i> (Trin.) A. Löve	StSt		EU617141 (Liu Q. et al., unpubl.)	
67	<i>P. kosanini</i> (Nabelek) A. Löve	Unknown (2n = 56)	Turkey	EF014235 (Yu et al., 2008)	Southern St-rDNA

Table 2 (end)

No.	Species	Genome	Origin	GenBank	Ribotype
68	<i>P. kosanini</i> (Nabelek) A. Löve	Unknown (2n = 56)	Turkey	EF014236 (Yu et al., 2008)	Northern St-rDNA
69	<i>P. sosnowskyi</i> (Hack.) A. Löve	St		GQ365150 (Dizkirici et al., 2010)	
70	<i>P. sosnowskyi</i> (Hack.) A. Löve	St		GQ365151 (Dizkirici et al., 2010)	
71	<i>P. spicata</i> (Pursh) A. Löve	St and StX	USA: Oregon	AY740793 (Liu et al., 2006)	Southern St-rDNA
72	<i>P. spicata</i> (Pursh) A. Löve	St and StX	USA: Wyoming, Half Moon Lake	EF014239 (Yu et al., 2008)	Northern St-rDNA
73	<i>P. stipifolia</i> (Czern. ex Nevski) A. Löve	St	RF: Stavropol Botanical Garden	EF014240 (Yu et al., 2008)	
74	<i>P. stipifolia</i> (Czern. ex Nevski) A. Löve	St		EU617041 (Liu Q. et al., unpubl.)	Southern St-rDNA
75	<i>P. strigosa</i> (Bieb.) A. Löve	St? 2n = 28	Crimea, Ai-Petri	EF014241 (Yu et al., 2008)	
76	<i>P. tauri</i> (Boiss. & Bal.) A. Löve	StP	Iran	EU617155 (Liu Q. et al., unpubl.)	Northern St-rDNA
77	<i>P. tauri</i> (Boiss. & Bal.) A. Löve	StP		EU617173 (Liu Q. et al., unpubl.)	Southern St-rDNA
<i>Gen. Hordeum</i>					
78	<i>H. bogdanii</i> Wilensky	H	China	AY740876 (Liu et al., 2006)	<i>Hordeum</i> spp.
79	<i>H. murinum</i> ssp. <i>leporinum</i> (Link) Arcang.	HH	Iran: Tehran	KP126672 (Makhoul M.T. et al., unpubl.)	
80	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>murinum</i> (Hack.) H. Scholz et Raus	HH	Germany	KC193786 (Rabey, 2014)	
81	<i>H. vulgare</i> L.	H		FJ593180 (Daniel C. and Knoess W., unpubl.)	
82	<i>H. vulgare</i> var. <i>distichon</i> (L.) Hook. f.	H	Egypt	KC193783 (Rabey, 2014)	
83	<i>H. vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i> K. Koch	H	Afghanistan	KM217265 (Georgiev O. et al., unpubl.)	

Traditional evolution models, implying a gradual accumulation of mutations followed by dichotomous branching of phylogenetic trees, are ill-suited for describing species divergence in these taxa (Dobryakova, Nosov, 2015; Rodionov et al., 2017, 2018). Therefore, the results of ITS sequencing results were processed with the Neighbor-Net algorithm by the program SplitsTree4, suggested for reconstruction of reticulate evolution (Huson, Bryant, 2006). The Neighbor-Net algorithm builds a network called a split graph. The split graph (Fig. 1) shows several possible ways of grouping DNA sequences with varying degrees of probability, known as “splits”, and reflects the presence of *homoplasy* in the data.

Fig. 1 shows that all species carrying St genomes, *Elymus*, *Pseudoroegneria* and *Elytrigia*, are distributed between two main clusters. We called them according their geographical location, respectively, “Northern” and “Southern” (Fig. 2). Each of these clusters then split into two separated ribotypes groups called “Core Northern St-ribotype”/“Northern dahuricus St-ribotype” and “Core Southern St-ribotype”/“Southern dahuricus St-ribotype”, respectively. The Core Northern *Elymus* ribotype is widespread among the *Elymus* taxa of Eurasia, including Yakutia, Mountain Altai and Northern and High Mountain China (Tibet, Nei Mongol, Xinjiang, Gansu). It was found also in Finland, the Far East of the Russian Federation, and Mongolia. The Core Southern St-ribotype is typical mostly for more southern populations, including the Caucasus, Primorsky Krai (RF), Pakistan, South Korea, a part of China and Turkey. The Core Southern rDNA was found in *Elytrigia repens* and

in diploid *Pseudoroegneria strigosa*, as well as in some other *Pseudoroegneria* species: *P. spicata* (haplome St or StX – Wang et al., 1986), and *P. sosnowskyi* (haplome St – Assadi, 1994). On the other hand, the Core Northern St-ribotype is characteristic feature of *P. cognata* (2n = 14 – Lu et al., 1991) and *P. spicata* (PI 232134, 2n = 14 – Okino et al., 2009), both carry the haplome St^Y (Okino et al., 2009).

The “Northern dahuricus” St-rDNA and “Southern dahuricus” St-rDNA (ribotypes) are derivatives of these two base types of rDNA, “Core Southern” and “Core Northern”. There are 6 SNPs and one deletion that delimited consensus sequences of the “Core Southern” and “Core Northern” ribotypes (Fig. 3). The consensus sequence “Southern dahuricus” St carries 5 SNPs and one deletion that differ from that of “Core Southern” St-ribotype. Differences between consensus “Core Northern” St-ribotype and consensus “Northern dahuricus” St-ribotype consist of 5 SNPs. As results, consensus sequences of the “Northern dahuricus” St-ribotype and the “Southern dahuricus” St-ribotype differ in 11 STPs and two indels.

It should be noted that two different variants of rDNA were found in many species. For example, one of the plants *P. tauri* belongs to the “Core Northern” ribotype, another – to the “Core Southern” ribotype (see Fig. 1, Table 2). One can see the same phenomenon in *P. stipifolia* from Stavropol, *P. spicata* of USA, *P. kosanini* of Turkey, *E. dolichatherus* of China (see Table 2). It appears that this can be correlated with the allopolyploid karyotypes of these tetraploid species.

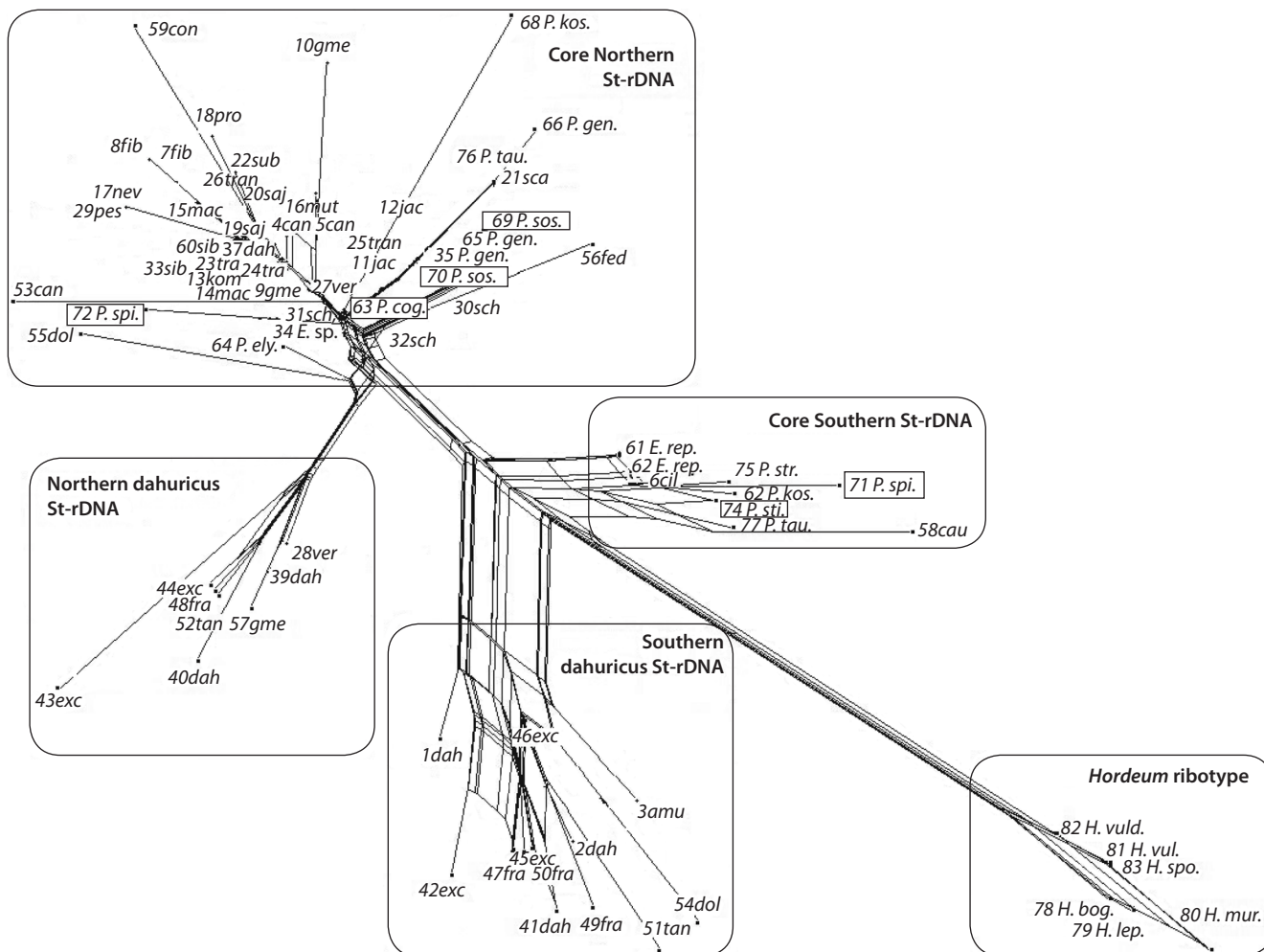


Fig. 1. Split graph for the ITS sequences of *Elymus* species and some other species of the tribe Triticeae generated by SplitsTree4 (Huson, Bryant, 2006). Species names and numbers of accessions see Tables 1 and 2. Positions of the diploid species with St genome are indicated by boxes. *amu* – *Elymus amurensis*, *can* – *E. caninus*, *cau* – *E. caucasicus*, *cil* – *E. ciliaris*, *con* – *E. confuses*, *dah* – *E. dahuricus*, *dol* – *E. dolichatherus*, *exc* – *E. excelsus*, *fed* – *E. fedtschenkoi*, *fib* – *E. fibrosus*, *fra* – *E. franchetii*, *gme* – *E. gmelinii*, *jac* – *E. jacutensis*, *kom* – *E. komarovii*, *mac* – *E. macrorourus*, *mut* – *E. mutabilis*, *nev* – *E. nevskii*, *pes* – *E. peschkovae*, *pro* – *E. probatovae*, *saj* – *E. sajanensis*, *sca* – *E. scandicus*, *sch* – *E. schrenkianus*, *sib* – *E. sibiricus*, *sub* – *E. subfibrosus*, *tan* – *E. tangutorum*, *tra* – *E. trachycaulus*, *tran* – *E. transbaicalensis*, *ver* – *E. vernicosus*, and *E. sp.* – *Elymus sp.*, *E. rep.* – *Elytrigia repens*, *H. bog.* – *Hordeum bogdanii*, *H. lep.* – *H. murinum* ssp. *leporinum*, *H. mur.* – *H. murinum* L. ssp. *murinum*, *H. spo.* – *H. vulgare* subsp. *spontaneum*, *H. vul.* – *H. vulgare*, *H. vuld.* – *H. vulgare* var. *distichon*, *P. cog.* – *Pseudoroegneria cognata*, *P. ely.* – *P. elytrigoides*, *P. gen.* – *P. geniculata*, *P. kos.* – *P. kosanini*, *P. sos.* – *P. sosnowskyi*, *P. spi.* – *P. spicata*, *P. sti.* – *P. stipifolia*, *P. str.* – *P. strigose*, *P. tau.* – *P. tauri*.

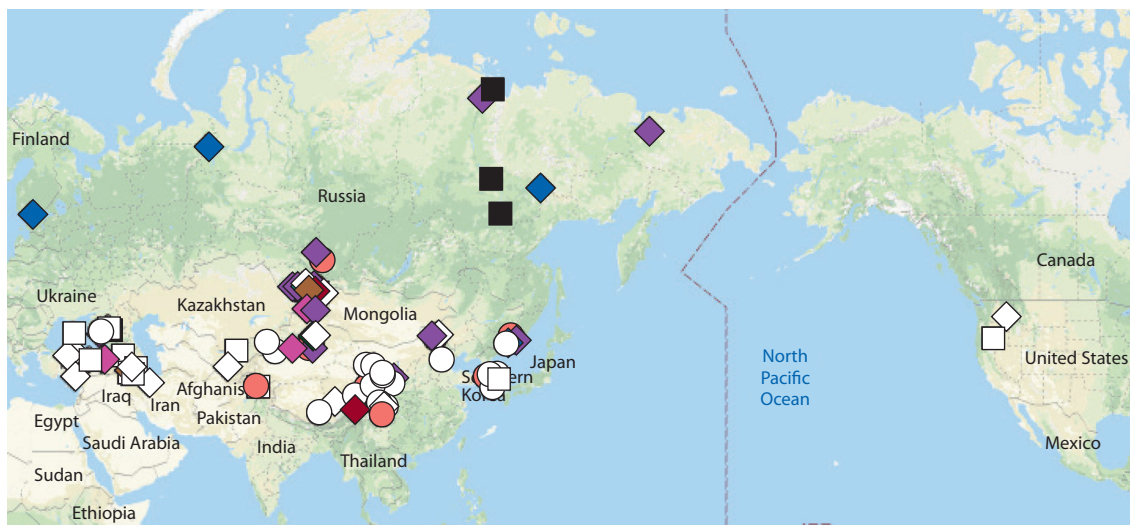


Fig. 2. Distribution of species *Elymus s. l.* with Northern (squares) and Southern (cycles) ribotypes.

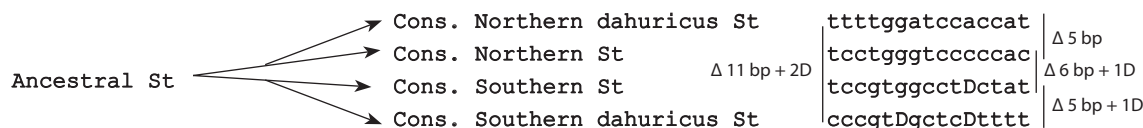


Fig. 3. The origin of St-ribotypes of the genus *Elymus*.

In the figure are shown only positions that are different in the consensus sequences of “Core Northern”, “Core Southern”, “Northern dahuricus” and “Southern dahuricus” ribotypes. D – deletion.

Discussion

In the present study we have shown that all species of *Elymus* in eastern Eurasia can be divided, according to their ITS sequences, into two families of ribotypes, conventionally called by us as the “Northern” and the “Southern” variants of St-rDNA. Each of these families is reliably divided into two subfamilies, the main, or “Core” variant of St-rDNA, and a modification of the St-ribotype distributed mainly between species *Elymus dahuricus* aggr. that we called “Northern dahuricus” and the “Southern dahuricus” ribotypes. Comparison of ITS sequences of *Elymus* and of *Pseudoroegneria* species showed that the “Core Northern” St-ribotype is close to rDNA of diploid *Pseudoroegneria cognata* with St genomes, accession PI 531720, collected in Kyrgyzstan (Dewey, 1990a; Yu et al., 2008). The “Southern” rDNA variant is closely related to that of *Elytrigia strigosa* PI 531752 (Dewey, 1990b; Yu et al., 2008) of Crimea and of *P. stipifolia* PI 313960 of Stavropol (Hyland, 1969).

The fact that there are *Pseudoroegneria* species with different St genomes have been shown earlier by Yan and co-workers (Yan et al., 2011) that studied nuclear genes *RPB2* and *EF-G*. They shown that *P. libanotica* and *P. tauri* St genomes are separated from the St genome of other *Pseudoroegneria* species, in particular *P. spicata* and *P. strigosa*.

The existence of significant uncertainty in the genome composition of the studied *Pseudoroegneria* species makes it difficult to interpret the results of the comparison between rDNA of *Pseudoroegneria* and *Elymus*. Thus, *P. strigosa* studied by Petrova (1967) was diploid with $2n = 14$. However, Dewey (1990a) observed $2n = 28$ in his sample of this species. In both cases the plants were from Crimea. Later, Khuat and co-workers studied *P. strigosa* from Mongolia and China and showed that they are hexaploids ($2n = 42$) (Khuat et al., 2015). Another *Pseudoroegneria*, *P. spicata* can be diploids ($2n = 14$) and tetraploids ($2n = 28$) (Wang et al., 1996; Khuat et al., 2015). Meiotic analysis and GISH showed that second genome of tetraploid *P. spicata* and second and third genomes of hexaploid *P. strigosa* are not St genomes (Wang et al., 1996; Khuat et al., 2015). So, according to genomic concept of the genus, these tetraploids and hexaploids should not be classified as *Pseudoroegneria*.

The occurrence in eastern Asia of plants of *E. dahuricus* with two different variants of rDNA Northern dahuricus and Southern dahuricus ribotypes implies that these two variants have a common pattern of morphological characters, some *E. dahuricus* syndrome, but they are reproductively isolated. This suggestion can be confirmed by the results of hybridological experiments performed earlier by Agafonov and coauthors (Agafonov et al., 2001; Savchkova et al., 2003). These authors revealed that seed fertility in crossings with

various combinations of *E. dahuricus* aggr. parents does not depend primarily on the combination determined by the taxa morphology. It is important that some combinations of seed and pollen parents, delimited by their morphological characters as the same species, were almost sterile: *E. dahuricus* MES-8709 (Primorye, near Posyet) × *E. dahuricus* CHI-8635 (Siberia, Chitinskij region) – only 4.8 % seed fertility, for comparison: *E. dahuricus* POP-8403 (Primorye, Popov island) × *E. woroschilowii* VLA-8642 (Primorye, Vladivostok) – 69 % seed fertility (Agafonov et al., 2001).

We suggest that there are probably not five different species but only two species in the *E. dahuricus* aggr. in Siberia and Northern China, one of them with the “Northern dahuricus” ribotype and another with the “Southern dahuricus” ribotype. Very likely, they are completely or almost completely genetically isolated from each other. It is unknown if there are any morphological distinctions between plants with different ribotypes or if these are cryptic species. However, it can be said with certainty that if there are differences in morphology, they are not connected with characters that are considered to be taxonomically significant to delimitation of the current species of *E. dahuricus* aggr.

It is appeared that morphological characters currently used for differential diagnosis of *Elymus dahuricus* aggr. species, do not allow to delimit plants with different ribotypes and even current traditional species because the diagnostic characters are weak. For example, various authors indicate curved glumes awns and the thicker stems of *E. excelsus* as diagnostic characters, delimiting *E. dahuricus sensu stricto* from *E. excelsus* (Tzvelev, Probatova, 2010). However, Savchkova et al. (2003) showed that hybrids have an intermediate state between direct and curved awns of lemma (inheritance type is unknown). F2 hybrids are more likely to show curved awns. This character is manifested in varying degrees at the plants’ different stages of maturity: as spicules ripen, the awns of lemmas become more curved. Specimens with non-curved awns (an *E. dahuricus* diagnostic character) were collected among the Far Eastern populations, usually considered as *E. excelsus* populations, while examples with curved awns were found among the Altai populations of *E. dahuricus sensu stricto* (Savchkova et al., 2003). Similarly, the differences between *E. franchetii* and *E. excelsus* are insignificant, the first exhibit leaf blade widths of 3–8 mm and the second 8–18 mm (Tzvelev, Probatova, 2010).

Conclusion

In conclusion, we suppose that it is important to determine distribution areas of *Elymus* with the “Northern dahuricus” and the “Southern dahuricus” St-rDNA genomes (ribotypes). After this, it is necessary to reconsider the system of taxonomically

significant characters and try to find unique morphological characteristics appropriate only for plants with the “Northern dahuricus” St-rDNA or with the “Southern dahuricus” St-rDNA ribotypes. There is reason to believe that within this complex, there are at least two different, probably reproductively isolated, cryptic species or two reproductively isolated groups of species and these species (groups of species) may have different origin.

References

- Agafonov A.V. The principle of recombining and introgressive gene pools in biosystematics of genus *Elymus* L. in Northern Eurasia. *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal = Sib. Ecol. J.* 1997;4(1):81-89. (in Russian)
- Agafonov A.V. Differentiation of the genus *Elymus* L. (Triticeae: Poaceae) in the Asiatic part of Russia in the view of taxonomical genetics. *Sibirskiy Botanicheskiy Vestnik = Siberian Botanical Bulletin.* 2007;2(1):5-15. (in Russian)
- Agafonov A.V., Baum B.R., Bailey L.G., Agafonova O.V. Differentiation in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae): evidence from grain proteins, DNA, and crossability. *Hereditas.* 2001;135(2-3): 277-289.
- Assadi M. Experimental hybridization and genome analysis in *Elymus* L. Sect. Caespitosae and Sect. Elytrigia (Poaceae: Triticeae). Herbarium Publications. 1994; Paper 21. https://digitalcommons.usu.edu/herbarium_pubs/21
- Baum B.R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A.V. A taxonomic synopsis of the genus *Campeiostrachys* Drobov. *J. Syst. Evol.* 2011;49(2):146-159. DOI 10.1111/j.1759-6831.2010.00106.x.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 2007;22:148-155. DOI 10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Bryant D., Moulton V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(2):255-265. DOI 10.1093/molbev/msh018.
- Dewey D.R. The Genomic System of Classification as a Guide to Inter-generic Hybridization with the Perennial Triticeae. In: Gustafson J.P. (Ed.). *Gene Manipulation in Plant Improvement.* Springer, Boston, MA, 1984;209-279. DOI 10.1007/978-1-4613-2429-4_9.
- Dewey D.R. PI 531720. *Elytrigia geniculata* subsp. *ferganensis* (Drobov) Tzvelev, POACEAE. In: Plant Inventory No. 198, Pt. I. Plant Materials Introduced January 1 to June 30, 1989 (Nos. 527507 to 532832). Beltsville: Agricult. Res. Center, 1990a:429-430.
- Dewey D.R. PI 531752 origin: Soviet Union, origin institute: Institute of Zoology and Botany, Tartu, Estonian S.S.R., other id: J-14. locality: Hill, Ai-Petri, Crimea. elevation: 1200m. In: Plant Inventory No. 198, Pt. I. Plant Materials Introduced January 1 to June 30, 1989 (Nos. 527507 to 532832). Beltsville: Agricult. Res. Center, 1990b:435.
- Dizkirci A., Kaya Z., Cabi E., Dogan M. Phylogenetic relationships of *Elymus* L. and related genera (Poaceae: Triticeae Dumort.) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Turk. J. Bot.* 2010;34(6):467-478. DOI 10.3906/bot-0912-249.
- Dobryakova K.S., Nosov N.N. ITS1-gene 5.8S rRNA-ITS2 and *trnL-trnF* sequence variability during the divergence of *Elymus* L. species of the flora of Siberia and Russian Far East. *Vestnik Sankt-Petersburgskogo Universiteta = Vestnik of Saint Petersburg University. Ser. 3: Biology.* 2015;4:4-17. (in Russian)
- Dong Z.Z., Fan X., Sha L.N., Wang Y., Zeng J., Kang H.-Y., Zhang H.-Q., Wang X.-L., Zhang L., Ding C.-B., Yang R.-W., Zhou Y.-H. Phylogeny and differentiation of the St genome in *Elymus* L. sensu lato (Triticeae; Poaceae) based on one nuclear DNA and two chloroplast genes. *BMC Plant Biol.* 2015;15(1):179. DOI 10.1186/s12870-015-0517-2.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19:11-15.
- Gao G., Deng J., Gou X., Wang Q., Ding C., Zhang L., Zhou Y., Yang R. Phylogenetic relationships among *Elymus* and related diploid genera (Triticeae: Poaceae) based on nuclear rDNA ITS sequences. *Biologia.* 2015;70(2):183-189. DOI 10.1515/biolog-2015-0019.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23(2):254-267. DOI 10.1093/molbev/msj030.
- Hyland H.L. (Ed.) 313960 *Agropyron gracillimum* Nevski, Gramineae. Seen from Botanical Garden, Stavropol. Received April 28, 1966. Plant Inventory No. 174. Washington, 1969;1270.
- Jensen K.B., Chen S.-L. An overview: Systematic relationships of *Elymus* and *Roegneria* (Poaceae). *Hereditas.* 1992;116:127-132.
- Khuat T.M.L., Divashuk M.G., Kroupin P.Y., Nguen P.A., Kiseleva A.V., Karlov G.I. Differences in ploidy level and genome constitution revealed by cytogenetic analysis of *Pseudoroegneria* germplasm accessions: case study. *Izvestiya TSKhA = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy.* 2015;2:29-34.
- Liu Q., Ge S., Tang H., Zhang X., Zhu G., Lu B.R. Phylogenetic relationships in *Elymus* (Poaceae: Triticeae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* sequences. *New Phytol.* 2006;170(2):411-420.
- Lotsy J.P. Species or Linneon? *Genetica.* 1925;7:487-506. DOI 10.1007/BF01676287.
- Lu B.R., Salomon B., von Bothmer R. Meiotic studies of the hybrids among *Pseudoroegneria cognata*, *Elymus semicostatus* and *E. pendulinus* (Poaceae). *Hereditas.* 1991;114:117-124.
- Mason-Gamer R.J. Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (Poaceae) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. *PLoS One.* 2013; 8(11):e78449. DOI 10.1371/journal.pone.0078449.
- Okito P., Mott I.W., Wu Y., Wang R.R.-C. A Y-genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus species* (Triticeae: Gramineae). *Genome.* 2009;52(4):391-400. DOI 10.1139/g09-015.
- Petrova O.A. Chromosome set of some species of the genus *Elytrigia* Desv. of the flora of Ukraine. *Biologicheskie Nauki = Biological Sciences.* 1967;6:86-99 (in Russian)
- Rabey H.E. Comparison of the internal transcribed spacer region (ITS) of the ribosomal RNA genes in wild and cultivated two and six-rowed barleys (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Biol. Rep.* 2014;41(2):849-854. DOI 10.1007/s11033-013-2925-4.
- Ridgway K.P., Duck J.M., Young J.P.W. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid *trnL* (UAA) intron. *BMC Ecol.* 2003;3:8. DOI 10.1186/1472-6785-3-8.
- Rodionov A.V., Dobryakova K.S., Nosov N.N., Punina E.O. The system of ribotypes in species of *Elymus* (Poaceae) does not agree with any system of sections and subsections proposed by taxonomists on the basis of comparative morphology. In: Conference on Taxonomy and Evolutionary Plant Morphology Dedicated to 85 Anniversary of V.N. Tikhomirov. Moscow, 31 January – 03 February 2017. Moscow, 2017;331-337.
- Rodionov A.V., Dobryakova K.S., Punina E.O. Polymorphic sites in ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region in hybridogenic genus *Elyhordeum* and putative interspecific hybrids *Elymus* (Poaceae: Triticeae). *Russ. J. Genet.* 2018;54:1025-1039. DOI 10.1134/S1022795418090120.
- Rodionov A.V., Kim E.S., Nosov N.N., Rajko M.P., Machs E.M., Punina E.O. Molecular phylogenetic study of the genus *Colpodium* sensu lato (Poaceae: Poaeae). *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics.* 2008;6(4):34-46. DOI 10.17816/ecogen6434-46. (in Russian)
- Savchikova E.P., Bailey L.G., Baum B.R., Agafonov A.V. Differentiation of the StHY-genomic *Elymus dahuricus* complex (Triticeae: Poaceae), revealed with the use of SDS electrophoresis of storage seed proteins and the AFLP analysis. *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal = Siberian Journal of Ecology.* 2003;1:33-42. (in Russian)
- Shneyer V.S., Kotseruba V.V. Cryptic species in plants and their detection by genetic differentiation between populations. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5:528-541. DOI 10.1134/S2079059715050111.

- Song H., Nan Z.B., Tian P. Phylogenetic analysis of *Elymus* (Poaceae) in western China. *Genet. Mol. Res.* 2015;14(4):12228-12239. DOI 10.4238/2015.October.9.11.
- Sun G.L., Zhang X.D. Origin of H genome in StH-genome *Elymus* species based on single copy nuclear gene *DMC1*. *Genome.* 2011; 54(8):655-662. DOI 10.1139/g11-036.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tzvelev N.N. About genomic criterion of genera in higher plants. *Botanicheskii Zhurnal = Botanical Journal.* 1991;76(5):669-675. (in Russian)
- Tzvelev N.N., Probatova N.S. The genera *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski and *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the flora of Russia. V.L. Komarov Memorial Lectures. Vladivostok: Dal'nauka Publ., 2010,57:5-102. (in Russian)
- Wang R.R.C., Dewey D.R., Hsiao C. Genome analysis of the tetraploid *Pseudoroegneria tauri*. *Crop Sci.* 1986;26(4):723-727.
- Wang X., Fan X., Zhang C., Sha L., Zhang H., Zhou Y. Phylogeny of species with the StH genome in Triticeae (Poaceae) inferred from nuclear rDNA ITS sequences. *Acta Prataculturae Sinica.* 2009;18(6): 82-90 (in Chinese)
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* New York: Acad. Press, 1990;315-322. DOI 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- Wu P.P., Zuo H.W., Sun G., Wu D.X., Salomon B., Hu Q.W., Dong Z.R. Comparison of gene flow among species that occur within the same geographic locations versus gene flow among populations within species reveals introgression among several *Elymus* species. *J. Syst. Evol.* 2015;54(2):152-161. DOI 10.1111/jse.12172.
- Yan C., Sun G., Sun D. Distinct origin of the Y and St genome in *Elymus* species: evidence from the analysis of a large sample of St genome species using two nuclear genes. *PLoS One.* 2011;6(10):e26853. DOI 10.1371/journal.pone.0026853.
- Yang Y., Fan X., Wang L., Zhang H.Q., Sha L.N., Wang Y., Kang H.Y., Zeng J., Yu X.F., Zhou Y.H. Phylogeny and maternal donors of *Elytrigia* Desv. sensu lato (Triticeae; Poaceae) inferred from nuclear internal-transcribed spacer and *trnL-F* sequences. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):207. DOI 10.1186/s12870-017-1163-7.
- Yen C., Yang J.L., Yen Y. Hitoshi Kihara, Åskell Löve and modern genetic concept of the genera in the tribe Triticeae (Poaceae). *Acta Phytotaxon. Sin.* 2005;43(1):82-93.
- Yen C., Yang J.L. Historical review and prospect of taxonomy of tribe Triticeae Dumortier (Poaceae). *Breed. Sci.* 2009;59(5):513-518. DOI 10.1270/jsbbs.59.513.
- Yu H.Q., Fan X., Zhang C., Ding C.B., Wang X.L., Zhou Y.H. Phylogenetic relationships of species in *Pseudoroegneria* (Poaceae: Triticeae) and related genera inferred from nuclear rDNA ITS (internal transcribed spacer) sequences. *Biologia.* 2008;63(4):498-505. DOI 10.2478/s11756-008-0091-2.

ORCID ID

A.V. Rodionov orcid.org/0000-0003-1146-1622
K.S. Dobryakova orcid.org/0000-0002-5468-6883
N.N. Nosov orcid.org/0000-0002-7096-9242
A.A. Gnutikov orcid.org/0000-0002-5264-5594
E.O. Punina orcid.org/0000-0001-9745-4604
A.A. Kriukov orcid.org/0000-0002-8715-6723
V.S. Shneyer orcid.org/0000-0002-6122-6770

Acknowledgements. We thank [N.N. Tzvelev](#) of the Komarov Botanical Institute and N.S. Probatova of the Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences for their interest to the work and expert help in the taxonomic identification of *Elymus* species. The authors also would like to acknowledge the funding by the Russian Foundation for Basic Research Projects No. 15-04-06438 and 18-04-01040 as well as the Ministry of Education and Sciences of the Russian Federation (AAAA-A18-118040290161-3, 0126-2016-0001, BIN RAS). The research was done using equipment of The Core Facilities Center "Cell and Molecular Technologies in Plant Science" at the Komarov Botanical Institute RAS (St. Petersburg, Russia).

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

Received December 13, 2018. Revised January 11, 2019. Accepted January 11, 2019.

Molecular identification of the stem rust resistance genes in the introgression lines of spring bread wheat

O.A. Baranova¹✉, S.N. Sibikeev², A.E. Druzhin²

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

² Agricultural Research Institute of the South-East Region, Saratov, Russia

✉ e-mail: baranova_oa@mail.ru

A total of 57 introgression lines and 11 cultivars of spring bread wheat developed by All-Russian Institute of Plant Protection and cultivated in the Volga Region were analyzed. The lines were obtained with the participation of CIMMYT synthetics, durum wheat cultivars, direct crossing with *Agropyron elongatum* (CI-7-57) and have introgressions from related species of bread wheat, namely translocations from *Ag. elongatum* (7DS-7DL-7Ae#1L), *Aegilops speltoides* (2D-2S), *Ae. ventricosum* (2AL-2AS-2MV#1), *Secale cereale* (1BL-1R#1S), 6Agⁱ (6D) substitution from *Ag. intermedium* and triticale Satu. Cultivars and lines were assessed for resistance to Saratov, Lysogorsk, Derbent and Omsk stem rust pathogen populations (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), and analyzed for the presence of the known *Sr* resistance genes using molecular markers. The analysis of the cultivars' and lines' resistance to the Saratov pathogen population in the field, as well as to Omsk, Derbent and Lysogorsk populations at the seedling stage, showed the loss of efficiency of the *Sr25* and *Sr6Agⁱ* genes. The *Sr31* gene remained effective. Thirty one wheat lines out of 57 (54.4 % of samples) were resistant to all pathogen populations taken into analysis. The *Sr31/Lr26*, *Sr25/Lr19*, *Sr28*, *Sr57/Lr34* and *Sr38/Lr37* genes were identified in the introgression lines. The *Sr31/Lr26* gene was identified in 19 lines (33.3 % of samples). All lines carrying the 1RS.1BL translocation (*Sr31/Lr26*) were resistant to all pathogen populations taken into analysis. The *Sr25/Lr19* gene was identified in 49 lines (86 %). The gene combination *Sr31/Lr26* + *Sr25/Lr19* was identified in 15 lines (26.3 %). The gene combinations *Sr38/Lr37* + *Sr25/Lr19*, *Sr57/Lr34* + *Sr25/Lr19* and *Sr31/Lr26* + *Sr25/Lr19* + *Sr28* were identified in 3 introgression lines. These three lines were characterized by resistance to the pathogen populations studied in this work. The *Sr2*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr36* and *Sr39* genes were not detected in the analyzed wheat lines.

Key words: spring bread wheat; introgression lines; *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; *Sr* genes.

For citation: Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E. Molecular identification of the stem rust resistance genes in the introgression lines of spring bread wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(2):296-303. DOI 10.18699/VJ19.494

Молекулярная идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине в интрогрессивных линиях яровой мягкой пшеницы

O.A. Баранова¹✉, С.Н. Сибикеев², А.Е. Дружин²

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

² Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия

✉ e-mail: baranova_oa@mail.ru

Проанализированы 57 интрогрессивных линий и 11 сортов яровой мягкой пшеницы селекции НИИ сельского хозяйства Юго-Востока, возделываемых на территории Поволжья. Линии получены с участием синтетиков селекции CIMMYT, сортов твердой пшеницы, прямого скрещивания с *Agropyron elongatum* (CI-7-57) и имеют интрогрессии от родственных видов мягкой пшеницы, а именно транслокации от *Ag. elongatum* (7DS-7DL-7Ae#1L), *Aegilops speltoides* (2D-2S), *Ae. ventricosum* (2AL-2AS-2MV#1), ржи культурной (1BL-1R#1S), замещения от *Ag. intermedium* 6Agⁱ (6D) и тритикале Satu. Сорта и линии были оценены на устойчивость к саратовской, лысогогорской, дербентской и омской популяциям возбудителя стеблевой ржавчины, а также проанализированы на наличие идентифицированных *Sr* генов устойчивости с использованием известных молекулярных маркеров. Анализ устойчивости сортов и линий к саратовской популяции патогена в полевых условиях, а также к омской, дербентской и лысогогорской популяциям *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* на стадии проростков показал потерю эффективности генов *Sr25* и *Sr6Agⁱ*. Ген *Sr31* пока сохраняет свою эффективность. Ко всем взятым в анализ популяциям патогена была устойчива 31 линия пшеницы из 57 (54.4 % образцов). У исследуемых интрогрессивных линий идентифицированы гены *Sr31/Lr26*, *Sr25/Lr19*, *Sr28*, *Sr57/Lr34* и *Sr38/Lr37*. Ген *Sr31/Lr26* определен у 19 линий (33.3 % образцов). Все линии, несущие транслокацию 1RS.1BL (*Sr31/Lr26*), были устойчивы ко всем взятым в анализ популяциям патогена. Ген *Sr25/Lr19* идентифицирован у 49 линий

(86 % образцов). Сочетание генов *Sr31/Lr26*+*Sr25/Lr19* идентифицировано у 15 линий (26.3 %). У одной линии идентифицировано сочетание генов *Sr38/Lr37*+*Sr25/Lr19*; у другой линии – сочетание генов *Sr57/Lr34*+*Sr25/Lr19*, и еще у одной – *Sr31/Lr26*+*Sr25/Lr19*+*Sr28*. Все они были устойчивы ко всем взятым в анализ популяциям патогена. Гены *Sr2*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39* у анализируемых линий обнаружены не были.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница; интрогрессивные линии; *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; гены *Sr*.

Introduction

In recent years, the increasing severity of wheat stem rust (caused by the biotrophic fungus *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. and E. Henn.) both on the territory of Africa and America, and countries of the Eurasian continent is observed. The emergence of the new highly aggressive stem rust race in Uganda in 1999 – Ug99 (TTKSK), infecting wheat cultivars which contain gene *Sr31* (Pretorius et al., 2000), caused great concern of world wheat producers, because with epiphytotic development of this pathogen on susceptible cultivars yield losses can reach 100 % (Hailu et al., 2015). Currently, there are 13 biotypes of this race (http://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22). The Ug99 race is common in the countries of Africa and the Middle East, it spread in the direction of Central and Southeast Asia and it is possible to spread it into the territory of the Russian Federation.

On the other hand, new aggressive races of stem rust that differ from Ug99 have appeared in the world. So, in 2012 in Ethiopia, a new race TKTTF was identified and called Digalu, after the name of the wheat cultivar that it overcome. Crop losses of this cultivar in 2013–2014 reached almost 100 %. In Germany during 2013, 6 races: TKTTF, TKKTF, TKPTF, TKKTP, PKPTF and MMMTF, which are not part of the Ug99 racial group, were allocated from 48 isolates of *P. graminis* (Olivera et al., 2017). German isolates of race TKTTF differed from the Ethiopian race TKTTF in virulence to the lines with genes *Sr7a*, *Sr45* and *SrTt-3*. Another isolated race, TKKTP, turned out to be virulent to the lines with the genes *Sr24*, *SrTnp* and *SrIRSAmigo*. It is known that 55 % of North American and international cultivars and breeding lines resistant to the TTKSK race (Ug99) are susceptible to the TKKTP race (Olivera et al., 2017). The TKTTF race is found in the countries of the Middle East and Europe (www.wheatrust.org/stem-rust-tools-maps-and-charts/race-frequency-map), including the UK (Lewis et al., 2018). In 2016, the new race of stem rust (TTTTF) injured several thousand hectares of durum wheat in Sicily. It was the largest epiphytotic of stem rust in Europe in recent decades. The race TTTTTF is virulent to the lines with the genes *Sr9e*, *Sr13* and avirulent to the genes *Sr31*, *Sr24* and *Sr25* (Bhattacharya, 2017). Also in 2016 in Ecuador, the race RRTTF virulent to genes *Sr38* and *Sr13* was discovered which became a real threat to wheat production in North and South America, since much of the modern commercial cultivars turned out to be susceptible to it. The origin of the race RRTTF in Ecuador is unknown; earlier race RRTTF was identified in Asia (Pakistan), East Africa (Ethiopia) and the Middle East (Yemen) (<http://rusttracker.cimmyt.org/?p=7143>). In the summer of 2017 in Sweden, the epiphytotic development of stem rust was observed in wheat fields of Almunge, Uppland. Moreover, the last major epiphytotics of stem rust in Sweden was in 1951. In 2015, 2016, epiphytotic development of stem rust was observed in northern Kazakhstan (Koyschybaev, 2017).

On the territory of the Russian Federation, the epiphytotic development of the disease was noted in 2015, 2016 and 2017 in Western Siberia, the Central Region of the European part of the Russian Federation and in Lower Volga Region. In 2016, race TTTTTF different from the Sicilian race was identified in Western Siberia (according to Global Rust Reference Center http://wheatrust.org/fileadmin/www.grcc.au.dk/International_Services/Pathotype_SR_Results/Country_report_Russia_-_August2017.pdf). In the Lower Volga Region on the territory of the Saratov Oblast, the strong epiphytotics of stem rust was observed in 2004 and 2006, the severity of disease development was 50–60 %, in 2013–2014 the severity of disease was moderate, up to 30 % (Markelova, 2015). However, in 2016 in the Saratov Oblast, especially in the Right-Bank part of Volga river, epiphytotic of stem rust began during the milky ripeness of the grain (early July) and continued until full maturity and harvest. The degree of development reached 80 %, the affected cultivars reduced the yield by 50 %, and the mass of 1000 seeds was at the level of 18–19 grams (Sibikeev et al., 2017b; Sibikeev, unpubl. data). Also in 2016, the spread of stem rust on spring bread wheat in the period of earing was noted throughout the territory of the Republic of Tatarstan. All wheat cultivars, recommended for cultivation in Tatarstan, were susceptible, except for the Tulaikovskaya 5 and Belka cultivars, as well as samples of *Triticum dicoccum* (Vasilova et al., 2017).

It should be noted that often there is an alternation of years with epiphytotics of stem rust with the years of epiphytotic development of leaf rust. So in the Saratov region, as already noted, in 2016 the strong stem rust epiphytotics, and in 2017 the strong leaf rust epiphytotics were observed. Thus, in order to prevent economically significant losses, the cultivars and promising lines with resistance to both diseases are necessary, that complicates the breeding work and may lead to the narrowing of genetic diversity. Complexes (linkages) of genes that determine resistance to stem, leaf and yellow rust and powdery mildew of various origins, including introgressed from related species, take on special significance.

Wild relatives of wheat are the valuable reservoir of genetic diversity (Wulff, Moscou, 2014). Studies of introgression lines and the use of their genetic potential in the breeding process are carried out both in Russia (Salina et al., 2015; Baranova et al., 2016; Lapochkina et al., 2017; Leonova, Budashkina, 2017; Sibikeev et al., 2017a) and abroad (Wulff, Moscou, 2014; Ali et al., 2016; Rakszegi et al., 2017). Molecular markers are widely used to identify alien introgression and loci for economically valuable traits, including resistance to disease genes (Miedaner, Korzun, 2012; Leonova, 2013; Yaniv et al., 2015; Ali et al., 2016).

The aim of this work was to evaluate the spring bread wheat cultivars and introgression lines by ARISER breeding and widespread in the Lower Volga Region, for resistance to

leaf and stem rust, and to identify effective *Sr* genes using molecular markers.

Materials and methods

Phytopathological analysis. Breeding material from the ARISER (57 introgression lines) and 11 cultivars of spring bread wheat which cultivated in the Volga Region and related to the analyzed lines were used in this work. All lines were obtained with the participation of genetic material from related species of bread wheat, namely, translocation from tall wheatgrass *Agropyron elongatum* (7DS-7DL-7Ae#1L), substitution from intermediate wheatgrass *Ag. intermedium* (6Agⁱ (6D)), rye *Secale cereale* (1BL-1R#1S), and also with the participation of synthetic lines from CIMMYT, cultivars of durum wheat, translocations from *Aegilops speltoides* (2D-2S), *Ae. ventricisum* (2AL-2AS-2MV#1), triticale Satu and direct crossing with tall wheatgrass *Ag. elongatum* (2n = 70) CI-7-57.

The Omsk, Derbent, and Lysogorsk populations of the pathogen, collected in 2017 from the spring bread wheat cultivar Favorit, which carries the 6Agⁱ (6D) substitution, were used for laboratory evaluation of resistance at the seedling stage. Virulence of populations was evaluated using the set of 20 differentiators (North American differential set) (Cereal Disease Laboratory) and additional near isogenic lines (21 lines) (Suppl. Material 4)¹. The cultivars Avrora (gene *Sr31*) and Hakasskaya (susceptible control) were also used in the analysis. Inoculation of plants was carried out in accordance with the methods adopted in world practice (Jin et al., 2007) (http://www.fao.org/fileadmin/templates/rust/img/race_analysis_web.pdf).

The analyzed samples were grown in plastic cuvettes of size 11 × 15 × 6 cm filled with “Terra Vita” peat soil, using grow light systems, at 21–23 °C with a 14-hour photoperiod. Eleven samples (three plants per sample) plus susceptible control – wheat cultivar Hakasskaya, were placed in a cuvette. Ten-day old seedlings with the first leaf fully unfolded were inoculated with the urediniospores suspension of pathogen populations collected from the cultivar Favorit in 2017. Infectious load was 1 mg of spores in 1 ml (Singh et al., 2008). 5 ml of spore suspension was used per cuvette (12 samples = 36 plants), which was approximately 0.14 mg spores per plant. Inoculated plants were placed in the dark moist chambers for 16 hours at 21–23 °C and a relative humidity of 100 %, and then returned to the grow light system with same temperature. The reaction of seedlings to inoculation (IT) with the spores suspension of stem rust pathogen was taken into account on the 10–12th day after infection on the standard scale (Stackman et al., 1962) (Suppl. Material 5). The resistance or susceptibility of the sample was judged based on the types of reaction (IT) in two replications. Plants with ITs “0”, “0;”, “1”, “2”, “X” were considered as resistant and as susceptible with IT = “3”, “4”. As criteria for evaluation of adult plants resistance were the ITs and the degree of plant damage on the scale recommended by CIMMYT (Roelfs et al., 1992): R – resistance to infection; MR – medium resistance; MS – medium susceptibility; S – susceptible reaction.

DNA isolation and PCR analysis. DNA was isolated from five-day wheat seedlings using cetyltrimethylammonium bro-

mid (CTAB) (Murray, Thompson, 1980). The composition of the reaction mixtures and the conditions of PCR are presented in the Suppl. Material 2.

DNA markers recommended for marker-assisted selection (MAS) were used to identify resistance genes (*Sr2*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr28*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr38* and *Sr39*) (Suppl. Material 1). Amplification was performed on C1000 Thermal Cycler amplifiers (BioRad), separation of PCR products was carried out in 2 % agarose gels with addition of ethidium bromide. Near isogenic lines and cultivars with *Sr* genes served as positive control (Suppl. Material 3), susceptible cultivar Hakasskaya served as negative control. GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas) was used as a molecular weight marker. The amplification products were visualized using the ChemiDoc™ XRS+ imaging system (Bio-Rad). PCR was carried out in 2 replicates.

Results

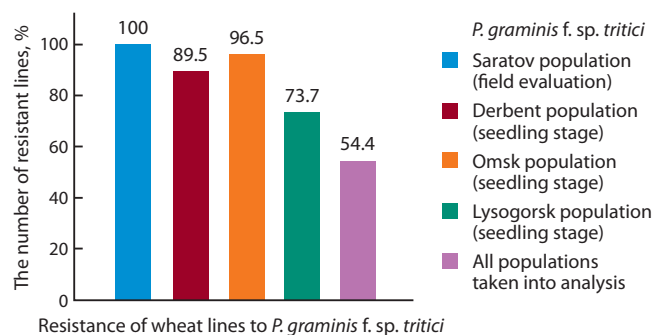
Phytopathological analysis

of resistance to causative agent of stem rust

At the first stage of work, 57 lines and 11 wheat cultivars were evaluated for resistance to the Saratov population of stem rust under field conditions and for resistance to the Derbent, Omsk and Lysogorsk pathogen populations at the seedling stage under laboratory conditions. The stem rust populations were previously evaluated for virulence. Against the Omsk population of 2017, the genes *Sr11*, *Sr31*, *Sr13*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr35* and the combinations of genes *Sr26* + *Sr9g*, *Sr31* + *Sr36* and *Sr31* + *Sr24* were effective; against Lysogorsk population – *Sr13*, *Sr17*, *Sr31*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr35*, *Sr24* + *Sr31*, *Sr36* + *Sr31*, *Sr24* + *Sr36* and *Sr26* + *Sr9g*; against Derbent population – genes *Sr13*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr35*, *Sr40* and the combinations of genes *Sr24* + *Sr31*, *Sr36* + *Sr31*, *Sr24* + *Sr36*, *Sr26* + *Sr9g*.

All lines were resistant to the Saratov population of stem rust in the field conditions. During evaluation at the seedling stage, 6 lines susceptible to the Derbent pathogen population, 2 lines susceptible to the Omsk pathogen population and 15 lines susceptible to the Lysogorsk pathogen population were identified. Thirty one lines (54.4 %) were resistant to all the populations taken in the analysis (see the Figure).

From the 11 analyzed cultivars almost all were susceptible in the field – namely: cultivars Saratovskaya 55, Saratovskaya 68, Saratovskaya 70, Saratovskaya 73, Albidum 32, Favorit, Voevoda and Lebyodushka. The cultivars Prokho-



Results of the phytopathological analysis of introgression lines.

¹ Supplementary Materials 1–8 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx5.pdf>

rovka, Yugo-Vostochnaya 2 and Dobrynya were heterogeneous for resistance, the susceptible plants were observed among resistant. During laboratory analysis of cultivars the following results were obtained: Prokhorovka, Yugo-Vostochnaya 2 and Dobrynya cultivars are resistant to the Derbent population of stem rust; the cultivars Prokhorovka, Yugo-Vostochnaya 2, Dobrynya and Saratovskaya 55 are resistant to the Lysogorsk population, the cultivar Saratovskaya 73 turned out to be heterogeneous. Almost all cultivars are resistant to the Omsk pathogen population, Albidum 32, Dobrynya, and Voyevoda are heterogeneous. Heterogeneity for the genes of resistance to stem rust can be explained by the fact that in the breeding process there was no selection for resistance to this disease, which allows for the presence of several biotypes in the cultivar.

Identification of resistance genes

The gene *Sr31* was identified as gene ineffective to Ug99, but effective against local stem rust populations. The scm9 marker, developed for rye translocation 1BL.1RS carrying the gene complex resistant to stem (*Sr31*), leaf (*Lr26*) and yellow (*Yr9*) rust and powdery mildew (*Pm8*), was used to identify it. The translocation 1BL.1RS (gene *Sr31*) was identified in 19 lines out of 57 (33.3 %) (Suppl. Material 8). All samples carrying the 1BL.1RS translocation were resistant to the Saratov population of stem rust during the field evaluation and to all analyzed pathogen populations during evaluation of resistance at the seedling stage. The gene *Sr31* was identified in the Prokhorovka and Yugo-Vostochnaya 2 cultivars. However, during evaluation of resistance to the Saratov population of pathogen, susceptible plants of these cultivars were identified. A question arose about the possible appearance of fungal pathotypes in the Saratov population of pathogen that virulent to the gene *Sr31*. DNA from 10 individual grains of the infected cultivar Prokhorovka was tested for the presence of amplification fragments using the primer scm9 to confirm the present or absence of 1BL.1RS translocation in susceptible plants. Diagnostic fragment 207 bp was obtained only from the control cultivar Avrova (carrier of *Sr31*) that means the absence of 1RS.1BL (*Sr31*) translocation in analyzed susceptible plants. According to morphological characteristics (plant height, type of ear) admixture of another plant is unlikely. Moreover, this fact was observed (IT = 0 and 3) at different seed sources, including the original ones, the heterogeneity is most likely as the loss of 1RS.1BL translocation. It was also concluded that the gene *Sr31* still retains its effectiveness.

The gene *Sr25*, which effective for Ug99, was identified in 49 lines (86 %). For identification this gene was used the Gb marker recommended for the marker-assisted selection. The *Sr25* gene was also identified in the cultivars Dobrynya and the Lebyodushka. The gene *Sr38* was detected only in one line (Tselinnaya20/Dobr//Dobr/3/DobrLr9/4/Milan/Prinia*//4Dobr) using the VENTRIUP-LN2 primers. In this line, the combination of genes *Sr25/Lr19 + Sr38/Lr37* was identified (Suppl. Material 7). In one line (L505*2//Croc/Ae.squar(224)//Yaco) using the csLV34 marker in addition to the *Sr25* gene, the gene of adult resistance *Sr57/Lr34* was identified. Both of these lines were resistant to all analyzed populations of pathogen.

In addition, using markers wPt-7004-PCR and Xwmc332, the gene *Sr28* was identified in one of the lines; however,

this fact should be verified during further work using other markers. In this line, the combination of the *Sr31/Lr26 + Sr25/Lr19 + Sr28* genes provided resistance to all analyzed populations of the pathogen. The CAPS marker csSr2 was used to identify the *adult plant resistance* gene – *Sr2*. Amplification product with primers csSr2F/R was observed in almost all analyzed samples. After restriction of amplification product by restriction endonuclease *BspHI*, the diagnostic fragment 172 bp was observed only in control cultivars Arthur and Oasis. The genes from *Ae. speltoides* were not found in the wheat accessions, although the presence of introgressions from this species in the pedigree of lines suggested that genes such as *Sr32* and *Sr39/Lr35* could be present. However, it is likely that specific markers, other than markers for *Sr32* and *Sr39*, are needed for identification the *Sr* genes of the studied lines.

Thus, the genes *Sr31/Lr26* and *Sr25/Lr19* were mainly identified in the introgression lines. The combination of these genes – *Sr31 + Sr25* was found in 15 lines (26.3 %). The genes *Sr2*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39* were not detected in the analyzed lines.

Discussion

In the Volga region of Russia, one of the factors limiting the grain yield of wheat are the epiphytotics of rust fungi – leaf and stem rust, and the harmfulness of stem rust in recent years has increased significantly. The success of anticipatory breeding for resistance to these pathogens is largely determined by the diversity of used resistance genes. For targeted wheat breeding, the identification of resistance genes in cultivars, identification of their effectiveness and join its in combinations is necessary.

The analyzed in this research cultivars of spring bread wheat occupy over 95 % of the area in the Saratov Oblast and Volgograd Oblast and are also widespread in the Middle Volga Region, Ural Region and partially in the Central Black Soil Region of Russia. Thus, it is their genotypes for rust resistance genes that determine (inhibit or not) the development of the epiphytotics of these pathogens. It should be noted that the substitution of 6Agⁱ (6D) from *Ag. intermedium* was previously identified in the cultivars Favorit and Voevoda, while the Lebyodushka cultivar had the genes *Sr6Agⁱ + Lr19/Sr25* (combination of substitution 6Agⁱ (6D) and translocation 7DS-7DL-7Ae#1L) (Sibikeev et al., 2017a), and the translocation 7DS-7DL-7Ae#1L from tall wheatgrass with gene *Sr25/Lr19* was identified in the Dobrynya cultivar (Badaeva et al., 2018). The presence of the gene *Sr25* in the Dobrynya and Lebyodushka cultivars is confirmed in this work (Table 1).

It is known that the gene *Sr25* (cultivars L503, L505, Dobrynya) showed the susceptible type of reaction and the percentage of lesion was 15–20 % in 2006, and in 2016 the IT = 2, 3 and degree of lesion was 15–25 %. For the gene(s) *Sr6Agⁱ* (cultivars Belyanka, Favorit, Voevoda) in 2006 IT = 3 and severity 50–60 %, in 2016 – 70–80 %. For cultivars with gene *Sr31* (Prokhorovka), already in 2006, 0/3 single pustules reaction was observed (Sibikeev et al., 2008, 2009, 2017b). The fact that the field evaluation of these cultivars in 2016 and 2017 showed their susceptibility to the Saratov population of the pathogen, as well as to the Derbent and Lysogorsk populations of *P. graminis* in the laboratory conditions (see Table 1) shows the loss of efficiency of both the gene *Sr6Agⁱ*

Table 1. Results of phytopathological analysis and identification of *Sr* genes in the cultivars

Cultivar	Resistance to <i>P. graminis</i>				Identified genes
	Saratov population (field evaluation)*	Laboratory evaluation to <i>P. graminis</i> populations at the seedling stage			
		I	II	III	
Saratovskaya 55	70S	3–	2	2	–
Saratovskaya 68	60S	3	3	X	–
Saratovskaya 70	70S	3	3	2–	–
Saratovskaya 73	60S	3	2+3	2–	–
Albidum 32	70S	3	4	2+4	–
Prokhorovka	R and 3S	1	1;	1;2+	<i>Sr31</i>
Yugo-Vostochnaya 2	R and 3S	0	0;	1–	<i>Sr31</i>
Dobrynya	MS, 25S	2	2–	2+3+	<i>Sr25</i>
Favorit	75S	3	3	0	<i>Sr6Ag</i> ^{***}
Voevoda	75S	3=	3+	2 3–	<i>Sr6Ag</i> ^{***}
Lebyodushka	70S	4	3–	2–	<i>Sr25</i> + <i>Sr6Ag</i> ^{***}

Notes: I – Derbent pathogen population; II – Lysogorsk pathogen population (from cultivar Favorit); III – Omsk pathogen population; * degree of development in 2016, type of reaction; ** according to (Sibikeev et al., 2017a).

Table 2. Results of phytopathological analysis and identification of *Sr* genes (susceptible lines)

Pedigree	Resistance to <i>P. graminis</i> populations				Identified genes
	Saratov population (field)	at the seedling stage			
		I	II	III	
Dobr*5//Milan/Prinia L653	15MR	2+	3–	1	<i>Sr25</i>
Dobr*5//Milan/Prinia L654	15MR	0	3–	2	<i>Sr25</i>
S55/Agr.el*4//S29/3/L1015 ?Ag ^e (3B)?Ag ^e (3D)	R, 10MR	0	3–	2+	<i>Sr25</i>
L505*2//L503*2/Kukushka L195	10MR	4	3	4	–
Dobr/Prokh//Dobr	R	2	3–	1	<i>Sr25</i>
S55/Agr. el *6//S29	10MR	2	2+	3	<i>Sr25</i>
Dobr*4/Nik	R	0	3–	X	<i>Sr25</i>
Dobr*4/3/Croc/Ae.squar(205)//Weaver	20MR	2	3	2–	<i>Sr25</i>
Croc/Ae.squar(205)//Weaver/3/L505/4/DobrLr25	20MR	2++	3	2	<i>Sr25</i>
S55/Agr. el *5//S29(? Ag ^e -7D)/3/S68	15MR	X	3–	2+	<i>Sr25</i>
S55/Agr. el *5//S29(? Ag ^e -7D)/3/S68	15MR	2	3	X	<i>Sr25</i>
Bel/3/Altar84/Ae.squar(224)//Pgo/4/S68(L481/16)	20MR	2++	3+	1	<i>Sr25</i>
Dobr//6R/Agis181(L426/16)	R	1	3–	1	–
DobrLr25/Bel//L505	20MR	3=	3	2–	<i>Sr25</i>
Dobr/Zol.volna//Dobr/3/Dobr	R	4	2	2–	<i>Sr25</i>
S55/Agr. el *6//S29	R	3–	2+	1	<i>Sr25</i>
Prokh*2/L164*2//L164	R	3–	2+	1	<i>Sr25</i>
Croc/Ae.squar//Weaver/3/*4L505/4/S73	R	2;	3–	2	<i>Sr25</i>
S70*4/3/Croc/Ae.squar(224)//Yaco	R	3	3	2	<i>Sr25</i>
S55/Agr. el *6//S29	15MR	2+	2 3	2	<i>Sr25</i>
Lyud//S55*2/T.dic-s//S.zol./L164//S55	10MR	2	2+3	2+	<i>Sr25</i>
L528//S55*4/T.dic-s	R	2++	2–3	1	<i>Sr25</i>
S74/T.dicocum k7507*3//S73	R	0	3 2	X	<i>Sr25</i>
LC-SR25-ARS [#]	–	12	3–	12	<i>Sr25</i>

Notes: I – Derbent pathogen population; II – Lysogorsk pathogen population (inoculum from cultivar Favorit); III – Omsk pathogen population; # control line with *Sr25*.

Table 3. Identification of *Sr* genes in resistant lines

Lineage	<i>Sr</i> genes	Lineage	<i>Sr</i> genes
L2032*6/Curinda87	<i>Sr25 + Sr31</i>	Sar.zol/T.dic-s//S58/3/*2 Bel/4/Voevoda	<i>Sr25 + Sr31</i>
Dobrynya*4/TsLr25	<i>Sr25</i>	L503Lr26/Ottan(RI1,RI2)//Revansh	<i>Sr25</i>
L503Lr19Lr26	<i>Sr25 + Sr31</i>	L18(L503Lr26)/S68//Revansh	<i>Sr25 + Sr31</i>
L505//L503//L583/Kukushka//L505L200	<i>Sr25</i>	Tulaykovskaya10//Agis181/S29+Agis181/S58	<i>Sr25 + Sr31 + Sr28</i>
S55*3/T.dic-s//L2032	<i>Sr31</i>	ThatcherLr37*4/L503	<i>Sr25</i>
L2032*5/Seri82	<i>Sr25 + Sr31</i>	L503Lr26/Ottan(RI1,RI2)//Revansh	<i>Sr25 + Sr31</i>
L505*2//Croc/Ae.squar(224)//Yaco	<i>Sr25 + Sr57</i>	Yu-V-2/L505//L503Lr26/3/L505/4/S68	<i>Sr25 + Sr31</i>
L505/3/Croc/Ae.squar(205)//Weaver/4/L505/5/S68	<i>Sr25 + Sr31</i>	Milan/Prinia//*4Dobr/3/Favorit	<i>Sr25</i>
L505/3/Croc/Ae.squar(205)//Weaver/4/L505/5/L505	<i>Sr25 + Sr31</i>	Tselinnaya20/Dobr//Dobr/3/DobrLr9/4/Milan/ Prinia//*4Dobr	<i>Sr25 + Sr38</i>
Bel/3/Croc/Ae.squar(205)//Weaver/4/Bel	<i>Sr31</i>	Dobr*5//Milan/Prinia/3/Belyanka/4/S68	<i>Sr25</i>
L12(DobrLr24)/S68//S68	<i>Sr25</i>	L503/Sr35//L503/3/L503	<i>Sr25</i>
L505*2/Prokh//Bel(L496/16)	<i>Sr31</i>	Satu/S70//S74/3/S74	–
S55*3/T.dic-s//L2032(L501/16)	<i>Sr31</i>	Sar.zol/T.dic-s//S58/3/*2Bel/4/Voevoda	<i>Sr25 + Sr31</i>
Dobr/Zol.volna//DobrLr24/3/Dobrynya	<i>Sr25</i>	L503Lr26/Ottan(RI1,RI2)//Revansh	<i>Sr25</i>
Prokh/MultiLr6R//S68/3/Dobr	<i>Sr25</i>	L18(L503Lr26)/S68//Revansh	<i>Sr25 + Sr31</i>
L505/S42/4/L505*3//Prokh//L505/3/S70/4/DobrLr24	<i>Sr25 + Sr31</i>	Tulaykovskaya10//Agis181/S29+Agis181/S58	<i>Sr25 + Sr31 + Sr28</i>
L505/L164/4/L503//Trap#1/Bow/3/L503/5/L505/6/S68	<i>Sr25 + Sr31</i>	ThatcherLr37*4/L503	<i>Sr25</i>
Yu-V-2/L505//L503Lr26/3/L505/4/S68	<i>Sr25 + Sr31</i>	L503Lr26/Ottan(RI1,RI2)//Revansh	<i>Sr25 + Sr31</i>
Croc/Ae.squar(205)//Weaver/3/L505/4/DobrLr25	<i>Sr25</i>	Yu-V-2/L505//L503Lr26/3/L505/4/S68	<i>Sr25 + Sr31</i>
Croc/Ae.squar(205)//Weaver/3/L505/4/Bel	<i>Sr25 + Sr31</i>	Milan/Prinia//*4Dobr/3/Favorit	<i>Sr25</i>
Dobr*5/TcLr9//L505//L503*3/TRAP≠BOW//Prokh/S55	<i>Sr25 + Sr31</i>	Tselinnaya20/Dobr//Dobr/3/DobrLr9/4/Milan/ Prinia//*4Dobr	<i>Sr25 + Sr38</i>
Dobr*5//Milan/Prinia/3/Belyanka/4/S68	<i>Sr25</i>	L503/Sr35//L503/3/L503	<i>Sr25</i>

from the *Ag. intermedium* and gene *Sr25* on the territory of the Volga Region. This is consistent with the data of Vasilova and co-authors on the loss of efficiency of the genes *Sr6Agⁱ* and *Sr25* during stem rust epiphytotic in 2016 in Tatarstan (Vasilova et al., 2017). However, under stem rust epiphytotic in 2013–2015 in the Novosibirsk region, the gene *Sr6Agⁱ* (*SrBel*) inhibited the development of the disease in cultivar Favorit (type of reaction to the pathogen R) (Sochalova, 2016). This agrees with the evaluation data of the cultivar Favorit resistance to the Omsk population of the pathogen at the seedling stage (see Table 1). According to our data, gene *Sr31* still retains its effectiveness.

The whole set of introgressive lines, taken in the analysis, was previously evaluated for resistance to the causative agent of stem rust under strong epiphytotic conditions in 2016 in the experimental field of the Laboratory of Genetics ARISER, Saratov, and in the phyt nurseries, located in the South-West of the Saratov oblast. As already noted, the degree of disease development in cultivars Favorit and Voevoda reached 80 %, which led to significant yield losses (Sibikeev, unpubl. data). The IT in the studied set of lines mainly ranged from 0 to 2 (R, MR). In 2017 during the field evaluation, the lines were

also resistant to pathogen, however, during the laboratory evaluation, 15 lines showed susceptible type of reaction (3) to inoculums of the Lysogorsk pathogen population taken from the cultivar Favorit (Table 2). Perhaps this is due to the fact that the pathogen population from the cultivar Favorit is 100 % virulent to *Sr6Agⁱ*.

As can be seen from the table, only the gene *Sr25* was identified in all susceptible lines, which indicates a loss in the efficiency of this gene. However, the combination of gene *Sr25* with the genes *Sr31/Lr26*, *Sr38/Lr37* and the adult resistant gene *Sr57/Lr34* provided resistance to all populations of *P. graminis* taken in the analysis.

Lines resistant to all populations of the pathogen, with the identified *Sr* genes are presented in Table 3. The phytopathological evaluation of these lines is provided in the Suppl. Material 6.

Of interest are the spring bread wheat lines shown in Table 3, resistant to all populations of the pathogen, but with an identified *Sr25* gene. The analysis of these lines lineages suggests that they contain other resistance genes. Thus, the cultivars Prinia and Weaver carry the 1RS.1BL translocation (*Sr31*) according to the GRIS database (Genetic Resources

Information System for Wheat and Triticale). It is possible that the gene *Sr31* is present in the lines with the participation of these cultivars, but they are heterogeneous according to this gene. The cultivar Dobrynya, participating in the lineage of resistant lines in which only *Sr25* was identified, was heterogeneous in resistance to the Saratov (field) and Omsk populations of the pathogen and resistant to the Derbent and Lysogorsk populations (see Table 1). Probably, besides *Sr25*, there are other genes in it that influence the manifestation of the trait. In addition, the lines Dobrynya *Lr24*, Dobrynya *Lr25*, L503 *Lr26* (participating in lineages) and Thatcher *Lr37*4/L503* were obtained from crosses with the corresponding isogenic lines of the Thatcher cultivar, which carries the gene complex *Sr5 + Sr9g + Sr12 + Sr16* (McIntosh et al., 2013). The possibility of transferring these genes or their combination in a hybrid progeny is not excluded. As can be seen from the lineage, in the line (L503/Sr35//L503/3/L503) the presence of the *Sr35* gene is possible, it will be clarified in the further research.

Conclusion

Thus, genes *Sr31* and *Sr25* were mainly identified in the analyzed introgression lines. The combination of these genes – *Sr31/Lr26 + Sr25/Lr19* was identified in 15 lines (26.3 %). The combination of genes *Sr38/Lr37 + Sr25/Lr19* was identified in one line; *Sr31/Lr26 + Sr25/Lr19 + Sr28* – in one line; gene *Sr25/Lr19* with the adult resistant gene *Sr57/Lr34* – in one line. These lines were resistant to all analyzed populations of the pathogen, which makes them promising for further use in breeding. The genes *Sr2*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39* were not detected in the analyzed lines. It is also necessary to note the promising use of triticale cultivar Satu, which carries the genes linkage *LrSatu/SrSatu*, in protection against stem rust pathogen (McIntosh et al., 1995).

References

Ali N., Heslop-Harrison J.S., Ahmad H., Graybosch R.A., Hein G.L., Schwarzacher T. Introgression of chromosome segments from multiple alien species in wheat breeding lines with wheat streak mosaic virus resistance. *Heredity* (Edinb). 2016;117:114-123. DOI 10.1038/hdy.2016.36.

Badaeva E.D., Ruban A.S., Shishkina A.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Surzhikov S.A., Dragovich A.Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. ($2n = 4x = 28, U^U X^X$) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat *Ae. columnaris* introgression lines. *Genome*. 2018;61(2):131-143.

Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016;6(3):344-350. DOI 10.1134/S2079059716030011.

Bhattacharya S. Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. *Nature*. 2017;542:145-146.

Hailu E., Woldaeb G., Denbel W., Wubishet Alemu, Tekelay Abebe, Agengehu Mekonnen. Distribution of stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) races in Ethiopia. *Plant*. 2015;3(2):15-19. DOI 10.11648/j.plant.20150302.11.

Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A., Yahyaoui A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 2007;91:1096-1099.

Koishybayev M. Features of the development of rust and Septoria leaf spot on spring wheat in Northern Kazakhstan. *Zashchita i Karantin*

Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2017;11:21-24 (in Russian)

Lapochkina I.F., Baranova O.A., Shamanin V.P., Volkova G.V., Gajnullin N.R., Lazareva E.N., Gladkova E.V., Anisimova A.V., Galinger D.N., Vaganova O.F. The development of the initial material of spring common wheat for selective breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including the Ug99 race in Russia. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(3):308-317. DOI 10.1134/S207905971703008X.

Leonova I.N. Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2013;3(6):464-473. DOI 10.1134/S2079059713060051.

Leonova I.N., Budashkina E.B. The study of agronomical traits determining the productivity of the *Triticum aestivum/Triticum timopheevii* introgression lines with resistance to fungal diseases. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(3):299-307. DOI 10.1134/S2079059717030091.

Lewis C.M., Persoons A., Beber D.P., Kigathi R.N., Maintz J., Findlay K., Corredor-Moreno P., Harrington S.A., Kangara N., Berlin A., Garcia R., German S.E., Hanzalova A., Hodson D., Hovmoller M.S., Huerta-Espino J., Imtiaz M., Iqbal Mirza J., Justesen A.F., Niks R.E., Omarani A., Patpour M., Pretorius Z.A., Roohparvar R., Sela H., Singh R.P., Steffenson B., Visser B., Fenwick P.M., Thomas J., Wulff B.B., Saunders D.G.O. Potential for re-emergence of wheat stem rust in the United Kingdom. *Communications Biology*. 2018;1:13. DOI 10.1038/s42003-018-0013-y.

Markelova T.S. Phytosanitary situation in the agrocenosis of grain crops in the Volga Region. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2015;5:22-23 (in Russian)

McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. (Eds.). *Wheat Rusts. An Atlas of Resistance Genes*. CSIRO Australia, 1995.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Appels R., Devos K.M. *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*. 2013. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>

Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. *Phytopathology*. 2012;102:560-566. DOI 10.1094/PHYTO-05-11-0157.

Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4326. DOI 10.1093/nar/8.19.4321.

Olivera P., Newcomb M., Flath K., Sommerfeldt-Impe N., Szabo L., Carter M., Luster D., Jin Y. Characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates derived from an unusual wheat stem rust outbreak in Germany in 2013. *Plant Pathol.* 2017;66:1258-1266. DOI 10.1111/ppa.12674.

Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance genes *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 2000;84(2):203. DOI 10.1094/PDIS.2000.84.2.203B.

Rakszegi M., Molnár I., Lovegrove A., Darko E., Farkas A., Lang L., Bedo Z., Dolezel J., Molnar-Lang M., Shewry P. Addition of *Aegilops* U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1529. DOI 10.3389/fpls.2017.01529.

Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. *Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1992.

Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Y., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica*. 2015;204:91-101. DOI 10.1007/s10681-014-1344-5.

Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Golubeva T.D., Kalintseva T.V. The evaluation of spring bread wheat cultivars, NILs and promise lines to stem rust. *Annual Wheat Newsletter*. KSU, USA. 2008;54:113.

- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Golubeva T.D., Kalintseva T.V. The evaluation of spring bread wheat cultivars, NILs and promise lines to leaf, stem and stripe rusts in 2008 year. Annual Wheat Newsletter. KSU, USA. 2009;55:174.
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Gulyaeva E.I., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Ag¹ and 6Ag¹² chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat–wheatgrass substitutions. Russ. J. Genet. 2017a;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115.
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Vlasovec L.T., Golubeva T.D., Kalintseva T.V. The reaction of introgression lines of soft spring wheat to leaf rust, stem rust and tan spot in 2016. Annual Wheat Newsletter. KSU, USA. 2017b;63:57-58.
- Singh D., Park R.F., McIntosh R.A., Bariana H.S. Characteristic of stem rust and stripe rust seedling resistance genes in selected wheat cultivars from the United Kingdom. J. Plant Pathol. 2008;90(3): 553-562.
- Sochalova L.P. Sources of wheat resistance genes to leaf and stem pathogens on the territory of the Novosibirsk Region. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2016;2:45-49 (in Russian)
- Stackman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of Physiologic Races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. US Department of Agriculture; Agric. Res. Service, 1962.
- Vasilova N.Z., Askhadullin Dam.F., Askhadullin Dan.F. Stem rust epiphytotic on soft spring wheat in Tatarstan. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2017;2:27-28. (in Russian)
- Wulf B.B.H., Moscou J.M. Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. Front. Plant Sci. 2014; 5:692.
- Yaniv E., Raats D., Ronin Y., Korol A.B., Grama A., Bariana H., Dubcovsky J., Schulman A.H., Fahima T. Evaluation of marker-assisted selection for the stripe rust resistance gene *Yr15*, introgressed from wild emmer wheat. Mol. Breed. 2015;35:43. DOI 10.1007/s11032-015-0238-0.

ORCID ID

O.A. Baranova orcid.org/0000-0001-9439-2102
S.N. Sibikeev orcid.org/0000-0001-8324-9765
A.E. Druzhin orcid.org/0000-0002-3968-2470

Acknowledgements. This work was supported by the RFBR grant No. 18-016-00170a.

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

Received September 10, 2018. Revised December 24, 2018. Accepted December 26, 2018.

Мозаичные вирусы картофеля, поражающие растения клубненосных видов рода *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР

Е.В. Рогозина¹✉, Н.В. Мироненко², Н.А. Чалая¹, Ю. Мацухита³, Х. Янагисава⁴

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

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

³ Институт овощеводства и цветоводства Национальной организации сельского хозяйства и исследований пищевых продуктов, Цукуба, Япония

⁴ Центральный сельскохозяйственный научно-исследовательский центр Национальной организации сельского хозяйства и исследований пищевых продуктов, Цукуба, Япония

✉ e-mail: erogozina@vir.nw.ru

Вирусные болезни наносят большой ущерб картофелеводству, и особую проблему повсеместно представляет вирус картофеля Y (potato virus Y – PVY), отличающийся разнообразием штаммового состава. Для создания отечественных сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), устойчивых к вирусным болезням, исходным материалом служат дикие и культурные клубнеобразующие виды рода *Solanum* L., сохраняемые в коллекции генетических ресурсов картофеля ВИР. Сохранение и рациональное использование коллекции основано на регулярном фитосанитарном мониторинге, в том числе карантинных объектов, в первую очередь – вириода веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid – PSTVd). Цель работы – обследование растений клубненосных видов *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР на наличие PSTVd и мозаичных вирусов PVX (potato virus X), PVS (potato virus S), PVM (potato virus M) и PVY, наиболее распространенных на картофеле в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Обследованы клоновые растения 137 генотипов, представляющие 31 вид секции Petota рода *Solanum* L. Диагностика проведена методами ELISA, ОТ-ПЦР и растений-индикаторов. Среди изученных растений PSTVd не обнаружен, но диагностировано массовое поражение мозаичными вирусами, более половины тестированных клонов инфицировано двумя и более вирусами. Выявлено 17 генотипов (12 %) с отрицательной реакцией ELISA на PVX, PVS, PVM и PVY. Различия в поражении мозаичными вирусами растений *Solanum* spp., относящихся к разным филогенетическим группам, статистически значимы (по критерию χ^2 Пирсона). Среди исследованных генотипов южноамериканских видов доля пораженных PVY достоверно больше, чем среди генотипов североамериканских видов ($\chi^2 = 4.56$, $p = 0.03$), PVX, напротив, чаще детектирован у генотипов из группы североамериканских видов ($\chi^2 = 8.81$, $p = 0.003$). Штаммы PVY идентифицировали у 37 генотипов *Solanum* spp. методом мультиплексной ОТ-ПЦР. Выявлено 27 генотипов, пораженных обычным штаммом PVY^O, по одному генотипу – пораженные штаммами PVY^{NW} (A) и PVY^{NW} (B), семь генотипов, пораженных смесью штаммов PVY^O + PVY^{NW} (A), и один – смесью штаммов PVY^O + PVY^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII. Рекомбинантные штаммы PVY^{NW} (A), PVY^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII впервые обнаружены в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Обсуждается согласованность результатов диагностики штаммов PVY разными (иммунологический, молекулярный и биологический) методами.

Ключевые слова: дикие клубненосные *Solanum* spp.; вириод веретеновидности клубней картофеля; мозаичные вирусы картофеля; штаммы PVY; рекомбинантные изоляты; ELISA; ОТ-ПЦР; растение-индикатор; смешанная инфекция.

Для цитирования: Рогозина Е.В., Мироненко Н.В., Чалая Н.А., Мацухита Ю., Янагисава Х. Мозаичные вирусы картофеля, поражающие растения клубненосных видов рода *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):304-311. DOI 10.18699/VJ19.495

Potato mosaic viruses which infect plants of tuber-bearing *Solanum* spp. growing in the VIR field gene bank

E.V. Rogozina¹✉, N.V. Mironenko², N.A. Chalaya¹, Yu. Matsushita³, H. Yanagisawa⁴

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

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

³ Institute of Vegetable and Floriculture Science, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

⁴ Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

✉ e-mail: erogozina@vir.nw.ru

Potato crop is particularly affected by virus diseases, and potato virus Y (PVY) currently considered the most important pathogen distributed worldwide as a diversity of strains. Wild and cultivated tuber-bearing species of the genus *Solanum* L., stored in the VIR collection, are used as the initial material in creation domestic potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) resistant to virus diseases. The preservation and rational utilization of the potato collection is based on regular phytosanitary monitoring, including quarantine objects, foremost PSTVd (potato spindle tuber viroid). The aim of the work is to examine plants of tuber-bearing *Solanum* species in the field gene bank of VIR for the presence of PSTVd and PVX (potato virus X),

PVS (potato virus S), PVM (potato virus M) and PVY (potato virus Y), which are the most common viruses on potatoes in the North-West District of Russia. We examined clonal plants of 137 genotypes representing 31 species of the section Petota of the genus *Solanum* L. A diagnostic was carried out using ELISA, RT-PCR and indicator plants. No PSTVd was found in the studied plants, but a plural infestation by mosaic viruses was detected, more than half of the tested clones are infected with two or more viruses. In the studied samples, only 17 genotypes (12 %) are not infected by PVX, PVS, PVM and PVY according to the ELISA test. There are statistically significant differences in the virus infestation of *Solanum* species with different origins, according to Pearson's chi-squared test. Among the studied genotypes of wild relatives of potatoes, the proportion of those affected by PVY was significantly higher in the South American than in the North American species ($\chi^2 = 4.56$, $p = 0.03$); the proportion of genotypes affected by PVX was significantly higher in the North American species ($\chi^2 = 8.81$, $p = 0.003$), the critical value was $\chi^2 = 3.841$. PVY strains were identified by multiplex RT-PCR in 37 genotypes of *Solanum* spp. We found that 27 genotypes are infected by a common PVY⁰ strain, two genotypes are infected by PVY^{NW} (A) and PVY^{NW} (B) strains, respectively, seven genotypes are infected by a mixture of PVY⁰ + PVY^{NW} (A) strains, and one is infected by a mixture of PVY⁰ + PVY^{NTN-NW} (SYRI) + SYRIII strains. The recombinant strains of PVY are detected in the North-West District of Russia for the first time. Coherency of the results of PVY strains detection by various (immunological, molecular and biological) methods is discussed.

Key words: wild tuber-bearing *Solanum* spp.; potato spindle tuber viroid; potato mosaic viruses; PVY strains; recombinant strains; ELISA; RT-PCR; indicator plant; mixed infection.

For citation: Rogozina E.V., Mironenko N.V., Chalaya N.A., Matsushita Yu., Yanagisawa H. Potato mosaic viruses which infect plants of tuber-bearing *Solanum* spp. growing in the VIR field gene bank. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):304-311. DOI 10.18699/VJ19.495 (in Russian)

Введение

В условиях изменяющегося климата для обеспечения населения Земли продовольствием необходимо устойчивое сельскохозяйственное производство разнообразных продуктов питания высокого качества и в достаточном объеме.

Одна из ведущих сельскохозяйственных культур в мировом земледелии – картофель – вегетативно размножаемая культура, уязвимая для вирусных инфекций. Известно не менее 40 видов вирусов, поражающих картофель (Potato Biology..., 2007), из которых 6 наиболее вредоносны и распространены повсеместно: вирус скручивания листьев картофеля (potato leaf roll virus – PLRV) и мозаичные вирусы: вирус картофеля X (potato virus X – PVX), вирус картофеля S (potato virus S – PVS), вирус картофеля M (potato virus M – PVM), вирус картофеля A (potato virus A – PVA) и вирус картофеля Y (potato virus Y – PVY). Вирусные болезни, в особенности возникающие при смешанных инфекциях PVY и других вирусов мозаичной группы, приводят к существенным потерям в товарном производстве и затрудняют процесс семеноводства. PVY отличается разнообразием штаммов, среди которых различают пять нерекombinantных и более трех десятков рекомбинантных (Green et al., 2018). Во многих странах, где выращивают картофель, в том числе в Российской Федерации, в последние годы отмечено значительное распространение, иногда доминирование, рекомбинантных штаммов PVY (Karasev, Gray, 2013; Усков и др., 2016; Green et al., 2017). Рекомбинантные изоляты PVY представляют особую проблему для картофелеводства, так как многие из них вызывают некротические поражения или трещиноватость клубней картофеля.

Экологически безопасная и эффективная стратегия защиты картофеля от вирусных инфекций основана на создании и внедрении в производство устойчивых сортов. Исходным материалом для селекции картофеля на устойчивость к вирусным болезням служат дикие и культурные клубнеобразующие виды рода *Solanum* L. В сравнении с другими сельскохозяйственными растениями картофель имеет наибольшее число дикорастущих клубненоносных

видов-сородичей (Vincent et al., 2013). Сегодня в мире, по данным ФАО, 30 стран поддерживают обширные *ex situ* коллекции картофеля, в которых сохраняется около 98 тыс. образцов (Machida-Hirano, 2015). Коллекция генетических ресурсов картофеля ВИР – одна из наиболее представительных: в ней около 8 тыс. образцов диких, примитивных и культурных видов, сортов и селекционных клонов картофеля. Важным аспектом работы по сохранению и воспроизводству образцов культурных форм и дикорастущих родичей картофеля являются фитосанитарный мониторинг коллекции и контроль над нераспространением карантинных объектов, в первую очередь вириода веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid – PSTVd). PSTVd передается контактно, с соком инфицированных растений или ботаническими семенами, которые становятся инфицированными, если формируются у растений с зараженной пылью или семяпочками. Кроме сортового картофеля, большую опасность PSTVd представляет для столоно- и клубнеобразующих *Solanum* spp., образцы которых сохраняются в коллекциях генных банков (Jeffries, 1998). Цель проведенного нами исследования – мониторинг PSTVd и PVX, PVS, PVM и PVY (мозаичные вирусы, наиболее распространенные на картофеле в Северо-Западном регионе Российской Федерации) на растениях диких клубненоносных *Solanum* spp. в полевом генном банке ВИР.

Материалы и методы

Изучены 137 растений, представляющих 31 вид клубненоносных дикорастущих *Solanum* spp., относящихся к североамериканской группе, серии: Demissa Buk. (*S. iopetalum*), Longipedicellata Buk. (*S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum*), Pinnatisecta Rydb. (*S. jamesii*, *S. pinnatisectum*), Cardiophylla Buk. (*S. cardiophyllum*, *S. ehrenbergii*) и южноамериканской группе, серии: Acaulia Juz. (*S. acaule*), Yungasensia Corr. (*S. arnezii*), Glabrescentia Buk. (*S. chacoense*), Bukasoviana Gorbat. (*S. alandiae*, *S. avilesii*, *S. gourlayi*, *S. hondelmannii*, *S. kurtzianum*, *S. leptophyes*, *S. okadae*, *S. oplocense*, *S. sparsipilum*, *S. spegazzinii*, *S. venturii*, *S. vernei*), Tarijensia Corr.

Таблица 1. Классификация штаммов PVY согласно мультиплексной ОТ-ПЦР (Chikh Ali et al., 2010)

Размер диагностических продуктов амплификации, п. н.	Идентифицированный штамм PVY
853 + 532	PVY ^O
1307 + 633 + 398	PVY ^N
1307	NA-PVY ^N
853 + 633 + 441	PVY ^{NW} (A)
853 + 441	PVY ^{NW} (B)
1307 + 633 + 441	PVY ^{NTN} (A)
1307 + 441	PVY ^{NTN} (B)
1076 + 633 + 441	PVY ^{NTN-NW} (SYRI)
1076 + 441	PVY ^{NTN-NW} (SYRII)
1076 + 441 + 278	SYRIII

(*S. berthaultii*, *S. neocardenasii*, *S. tarjense*), *Simpliciora* (Buk.) Gorbat. (*S. microdontum*, *S. simplicifolium*) и *Maglia* Bitt. (*S. molinae*). Названия видов приведены согласно классификации С.М. Букасова (1978) и Л.Е. Горбатенко (1990).

Виды были представлены 2–16 генотипами, сохраняемыми как клоновые растения. Изученные генотипы *Solanum* spp. составляют признаковую коллекцию диких родичей картофеля, охарактеризованных по устойчивости к фитопатогенам и наличию маркеров соответствующих R-генов устойчивости (Рогозина и др., 2014), или входят в состав рабочей коллекции генотипов, изучаемых по комплексу селекционно-ценных признаков. Тестировали растения в полевых условиях, используя для посадки клубневую репродукцию, полученную в защищенном грунте.

Диагностика вириода. Тотальную РНК выделяли из 100 мг свежих листьев растений дикорастущих *Solanum* spp. с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия), следуя рекомендациям производителя. Использовали РНК для идентификации вириода PSTVd методом ОТ-ПЦР в реальном времени, согласно протоколу (Yanagisawa et al., 2017) с помощью набора праймеров 6Pospi-F и 6Pospi-R. В качестве положительного контроля взяли растение картофеля сорта Осень, инфицированное вириодом PSTVd и сохраняемое в коллекции Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ВНИИКХ).

Диагностика вирусов. Метод ELISA в модификации «двойной сэндвич» (Clark, Adams, 1977) применяли для детекции вирусов PVX, PVS, PVM и PVY в листьях растений дикорастущих *Solanum* spp. Использовали диагностические наборы НПО «Биотехнология» ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Коренево, Московская область).

Дополнительную детекцию PVY проводили с помощью метода ОТ-ПЦР со специфичными праймерами (San et al., 2009). Штаммовый состав PVY определяли методом мультиплексной ОТ-ПЦР с использованием набора из 12 праймеров (Logenzen et al., 2006), который позволяет идентифицировать 10 отдельных штаммов: PVY^O, PVY^N, NA-PVY^N, PVY^{NW} (два генотипа), PVY^{NTN} (два генотипа), PVY^{NTN-NW} (два генотипа) и SYRIII (табл. 1),

а также случаи смешанного заражения этими штаммами (Chikh Ali et al., 2010). Для ОТ-ПЦР использовали набор Kit Prime Script One Step RT-PCR (TaKaRa, Япония), ПЦР продукты разделяли в агарозных гелях и окрашивали бромистым этидием.

Тест на растениях-индикаторах *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун) проводили для верификации результатов ОТ-ПЦР по диагностике и определению штаммового состава PVY (Jeffries, 1998).

Результаты

Диагностика PSTVd. Тестирование 137 генотипов 31 вида дикорастущих клубнеобразующих *Solanum* spp. методом RT-PCR не выявило PSTVd в исследуемых образцах листовой ткани, за исключением положительного контроля. Полученные результаты согласуются с ранее проведенной диагностикой PSTVd других генотипов дикорастущих *Solanum* spp. из коллекции ВИР (Т.Б. Кастальева, устное сообщение) и свидетельствуют об отсутствии PSTVd среди образцов коллекции дикорастущих видов картофеля в полевом генном банке ВИР.

Диагностика мозаичных вирусов картофеля. У растений клубненосных дикорастущих *Solanum* spp., тестированных методом ELISA, выявлено массовое поражение PVX, PVS, PVM и PVY (табл. 2).

Не были инфицированы мозаичными вирусами только 17 (12 % протестированных) генотипов, относящихся к видам: *S. acaule* (к-23004), *S. cardiophyllum* (к-16827, к-16828), *S. gourlayi* (к-11446, к-12416), *S. hjertingii* (к-23366), *S. hondelmanii* (к-20023), *S. leptophyes* (к-5764), *S. polytrichon* (к-19164, к-24410), *S. sparsipilum* (к-9798, к-19344), *S. spagazzinii* (к-11422, к-11975, к-12688), *S. stoloniferum* (к-24420) и *S. vernei* (к-11447). Следует заметить, что у других генотипов *S. acaule* (к-23004) и *S. vernei* (к-11447) были детектированы PVY и смешанная инфекция PVY и PVS соответственно. Установлено, что клоны *Solanum* spp., отобранные как источники устойчивости к фитофторозу или золотистой нематоде, поражены моноинфекцией или смесью PVX, PVS и PVY.

Наибольшее распространение на растениях изученной выборки клубнеобразующих *Solanum* spp. имеет PVY – 58 % тестированных генотипов поражены этим вирусом. Поражение PVX обнаружено у 22 %, поражение PVM и PVS – у 36–37 % генотипов (см. табл. 1). Обнаружены статистически значимые различия двух групп *Solanum* spp. по пораженности мозаичными вирусами: доля пораженных PVY достоверно больше среди исследованных генотипов южноамериканских видов, тогда как PVX чаще детектирован у генотипов видов картофеля, относящихся к североамериканской группе. Нуль-гипотезу отвергаем на основании критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, значение которого при сопоставлении двух групп *Solanum* spp. по частоте поражения PVY $\chi^2 = 4.56$ ($p = 0.03$), по частоте поражения PVX $\chi^2 = 8.81$ ($p = 0.003$), критическое значение критерия $\chi^2 = 3.841$ (при уровне значимости $p = 0.05$ и числе степеней свободы 1).

Более половины генотипов изученной выборки клубнеобразующих *Solanum* spp. поражено двумя и более мозаичными вирусами. Смешанная инфекция всех четырех мозаичных вирусов обнаружена у растений девяти

Таблица 2. Поражение растений клубненосных *Solanum* spp. мозаичными вирусами картофеля (Санкт-Петербург, Пушкин, 2016–2017 гг.)

Серия (число видов)	Кол-во проверенных генотипов	Кол-во генотипов с положительной реакцией ELISA на мозаичные вирусы			
		PVY	PVX	PVS	PVM
Североамериканская группа					
Demissa (1)	2	2	0	2	0
Longipedicellata (5)	40	23	17	19	21
Pinnatisecta (2)	11	2	2	1	5
Cardiophylla (2)	8	2	2	1	1
Итого	61	29 ^a	21 ^b	23	27
Южноамериканская группа					
Yungasensia (1)	2	2	0	1	0
Glabrescentia (1)	10	5	1	8	5
Acaulia (1)	2	1	0	0	0
Bukasoviana (12)	46	30	4	9	6
Tarijensia (3)	4	3	0	2	2
Simpliciora (2)	10	8	4	6	9
Maglia (1)	2	2	0	2	1
Итого	76	51 ^a	9 ^b	28	23
Всего генотипов (%)	137 (100)	80 (58)	30 (22)	51 (37)	50 (36)

Примечание. Буквами отмечены значимые различия (по критерию χ^2 Пирсона).

генотипов, относящихся к видам *S. alandiae*, *S. fendleri*, *S. microdontum*, *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium* и *S. stoloniferum*. Комплекс из трех вирусов выявлен у 15 генотипов, относящихся к видам *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, *S. microdontum*, *S. molinae*, *S. pinnatisectum*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium* и *S. stoloniferum*.

Диагностика штаммов PVY. Растения 40 генотипов, представляющие виды *S. alandiae*, *S. avilesii*, *S. cardiophyllum*, *S. chacoense*, *S. ehrenbergii*, *S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. iopetalum*, *S. jamesii*, *S. kurtzianum*, *S. leptophyes*, *S. neocardenasii*, *S. pinnatisectum*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium*, *S. spgazzinii*, *S. stoloniferum*, дополнительно тестировали на наличие PVY методом ОТ-ПЦР (Sun et al., 2009). Вирус PVY не обнаружен у растений *S. leptophyes* (к-5764) и *S. neocardenasii* (к-24612), что согласуется с результатами ELISA. Штаммы PVY идентифицировали по наличию диагностических продуктов амплификации разного размера, полученных в результате мультиплексной ОТ-ПЦР (Chikh Ali et al., 2010). На рис. 1 представлены выборочные результаты идентификации штаммов PVY.

Нужно отметить, что результаты мультиплексной ОТ-ПЦР не всегда позволяют однозначно идентифицировать штаммы PVY. Например, «лишний» продукт амплификации размером 278 п. н. на дор. 3 и 4 (см. рис. 1); на дор. 6 кроме диагностируемых штаммов NA-PVY^N (1307 п. н.) и PVY^O (853 и 532 п. н.), четко проявляются фрагменты 1076, 633 и 278 п. н., но для идентификации других рекомбинантных штаммов не достает фрагмента 441 п. н.

Всего выявлено 27 генотипов, пораженных обычным штаммом PVY^O, по одному генотипу, пораженному рекомбинантными штаммами PVY^{NW} (A) и PVY^{NW} (B), семь генотипов, пораженных смесью штаммов PVY^O+PVY^{NW} (A) и один – смесью штаммов PVY^O, +PVY^{NTN-NW} (SYRI)

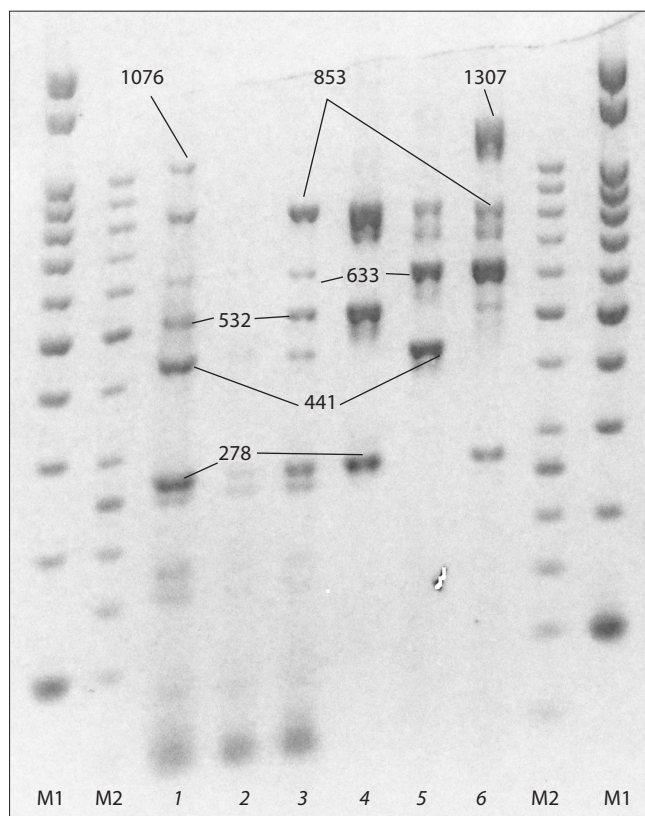


Рис. 1. Идентификация штаммов вируса PVY в образцах диких *Solanum* spp. методом мультиплексной ОТ-ПЦР.

Маркеры молекулярных весов: M1 и M2 – GeneRuler™ 1 кб и 50 п. н. DNA Ladder (Fermentas, Литва) соответственно. Образцы диких *Solanum* spp.: 1 – *S. cardiophyllum*; 2 – *S. jamesii*; 3 – *S. polytrichon*; 4 – *S. avilesii*; 5 – *S. iopetalum*; 6 – *S. jamesii*. Цифрами указаны размеры диагностических продуктов амплификации в п. н. Идентификация штаммов PVY представлена в табл. 3.

Таблица 3. Идентификация штаммов PVY в образцах *Solanum* spp. по наличию продуктов амплификации мультиплексной ОТ-ПЦР (Chikh Ali et al., 2010) (по рис. 1)

№	Вид	К-ВИР	Размер, п.н.	Штамм PVY
1	<i>S. cardiophyllum</i>	24375	1076, 853, 633, 532, 441, 278	PVY ^O , PVY ^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII
2	<i>S. jamesii</i>	24920	Не определено	Не определен
3	<i>S. polytrichon</i>	24410	853, 633, 532, 441, 278	PVY ^O и PVY ^{NW} (A)
4	<i>S. avilesii</i>	20884	853, 532, 278	PVY ^O
5	<i>S. iopetalum</i>	24393	853, 633, 441	PVY ^{NW} (A)
6	<i>S. jamesii</i>	24920	1307, 1076, 853, 633, 532, 278	PVY ^O и NA-PVY ^N



Рис. 2. Симптомы поражения *N. tabacum* L., сорт Самсун после инокуляции соком растений *Solanum* spp.

Растение сверху с симптомами некротизации жилок листа (некротический штамм PVY^N); растение внизу с симптомами посветления жилок (обычный штамм PVY^O).

и SYRIII. Результаты диагностики PVY иммунологическим и молекулярным методами совпали в 68 % случаев. Расхождение наблюдалось по результатам диагностики 13 генотипов, относящихся к *S. cardiophyllum*, *S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. kurtzianum*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum* и *S. pinnatisectum*, с отрицательной реакцией ELISA, но положительным результатом по данным ОТ-ПЦР.

Индикаторный тест. Для верификации результатов иммунологического и молекулярного анализов 21 генотип *Solanum* spp. проверили на зараженность PVY в биологи-

ческом тесте с помощью растений индикаторов *N. tabacum* L., сорта Самсун. На растениях *N. tabacum* L. после инокуляции соком растений 13 генотипов *Solanum* spp., у которых был обнаружен PVY, на седьмой день отмечены симптомы поражения. У одной группы растений табака наблюдали белое окаймление жилок, затем мозаику, симптомы которой сохранялись и через месяц, появляясь постепенно на новых листьях по мере их роста и развития (рис. 2, растение внизу). Такие симптомы свидетельствуют о поражении табака обычным штаммом вируса PVY^O. На других растениях *N. tabacum* наблюдали некрозы жилок, морщинистость листовой ткани с последующей некротизацией листа и замедлением роста растения (см. рис. 2, растение сверху). Такие симптомы свидетельствуют о поражении табака некротическим штаммом PVY^N. Видимые симптомы вирусной инфекции на растениях *N. tabacum* L. отчетливо различались в зависимости от генотипов *Solanum* spp., использованных в качестве источников вирусного инокулома. В соответствии с местной и системной реакцией, наблюдаемой на листьях растений индикаторов после инокуляции соком соответствующего растения дикого картофеля, мы идентифицировали поражение восьми генотипов *Solanum* spp. обычным штаммом и пяти генотипов – *Solanum* spp. некротическим штаммом Y-вируса (табл. 4).

Не обнаружено симптомов вирусного поражения на растениях табака после их инокуляции соком растений *S. leptophyes* и *S. neocardenasii*, которые, по данным ELISA и мультиплексной ОТ-ПЦР, свободны от PVY. Результаты детекции PVY иммунологическим и биологическим методом совпали при анализе 19 (90 % тестированных) генотипов *Solanum* spp. Инокуляция соком растений пяти генотипов: *S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. pinnatisectum* (двух генотипов), *S. cardiophyllum* (инфицированных PVY, по данным мультиплексной ОТ-ПЦР) и *S. simplicifolium* (с положительной реакцией ELISA и ОТ-ПЦР) не вызвала видимого эффекта на растениях *N. tabacum*. Совпадение результатов индикаторного теста и ОТ-ПЦР по диагностике Y-вируса установлено для 15 (71 % тестированных) генотипов, диагностики штаммового состава Y-вируса – для 9 (62 % тестированных) генотипов *Solanum* spp.

Растения *N. tabacum*, сорт Самсун, инокулированные соком *Solanum* spp., протестировали на наличие PVY методом ОТ-ПЦР. Анализ 12 фенотипически различных растений табака подтвердил наличие вируса в 10 тестируемых пробах (см. табл. 4). Результаты определения

Таблица 4. Диагностика PVY у растений *Solanum* spp. и *N. tabacum* L. комплексом методов

Вид	К-ВИР	Тестирование растений <i>Solanum</i> spp.			Тестирование <i>N. tabacum</i> методом ОТ-ПЦР
		ELISA	ОТ-ПЦР	<i>N. tabacum</i> (симптомы)	
<i>S. alandiae</i>	21240	PVY	PVY ^o	Мозаика	–
<i>S. avilesii</i>	20158	PVY	PVY ^o	»	PVY ^o
<i>S. avilesii</i>	20884	PVY	PVY ^o	»	PVY ^o
<i>S. cardiophyllum</i>	24375	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII	Отсутствуют	PVY ^o , PVY ^{NTN-NW}
<i>S. chacoense</i>	21321	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	PVY ^o
<i>S. chacoense</i>	22687	PVY	PVY ^o	»	–
<i>S. fendleri</i>	5751	Н.о.	PVY ^o	Отсутствуют	–
<i>S. hjertingii</i>	15194	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	»	–
<i>S. iopetalum</i>	24393	PVY	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	Мозаика	PVY ^{NW(A)}
<i>S. jamesii</i>	24920 (221)	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	PVY ^o , PVY ^N
<i>S. jamesii</i>	24920 (223)	PVY ?	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	Мозаика	Н.о.
<i>S. kurtzianum</i>	20038	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	PVY ^o
<i>S. leptophyes</i>	5764	Н.о.	Н.о.	Отсутствуют	–
<i>S. neocardenasii</i>	24612	Н.о.	Н.о.	»	–
<i>S. pinnatisectum</i>	21955 (387)	Н.о.	PVY ^o ?	»	–
<i>S. pinnatisectum</i>	21955 (401)	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	»	–
<i>S. polytrichon</i>	18142	PVY	PVY ^o	Мозаика	PVY ^o
<i>S. polytrichon</i>	24410	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	»	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}
<i>S. polytrichon</i>	24462	PVY	PVY ^o	»	PVY ^o
<i>S. simplicifolium</i>	12658	PVY	PVY ^o	Отсутствуют	Н.о.
<i>S. spgazzinii</i>	11431	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	–

Примечание. PVY ? – реакция слабая; Н.о. – PVY не обнаружен; «–» – ПЦР не проводилась.

штаммового состава по симптомам и методом ОТ-ПЦР индикаторных растений совпали (или частично совпали) для семи генотипов: *S. avilesii* (к-20884 и к-20158), *S. iopetalum* (к-24393), *S. jamesii* (к-24920) (221), *S. polytrichon* (к-18142, к-24410 и к-24462). Для генотипов *S. chacoense* к-21321 и *S. kurtzianum* к-20038 некротический штамм Y-вируса, идентифицированный по реакции индикаторного растения, не соответствовал результатам ОТ-ПЦР. Для *S. cardiophyllum* к-24375, инфицированного смесью штаммов Y-вируса, результаты индикаторного теста не подтверждают данные ОТ-ПЦР.

Обсуждение

Сохранение, изучение и воспроизводство диких родичей картофеля – клубненосных *Solanum* spp. – осуществляются в полевом генном банке ВИР, расположенном на территории Научно-производственной базы Пушкинских и Павловских лабораторий ВИР (г. Пушкин). В течение длительного (более 40 лет) периода на опытных полях полевого генного банка ВИР занимаются воспроизводством и изучением коллекции сортов, селекционных клонов и видов секции Petota рода *Solanum* L., получением семенной репродукции растений клубненосных культурных и диких *Solanum* spp. Характерная особенность сформировавшегося агроценоза – генетическое разнообразие культурных

форм и дикорастущих родичей картофеля на локальном участке, благоприятное для проявления болезней и развития вредителей. Вероятно, популяции фитопатогенов, поражающих коллекционные посадки картофеля, высоко полиморфны, что обеспечивает выживаемость паразитов во взаимодействии с популяцией растения-хозяина. Это предположение подтверждают результаты сравнительного анализа изолятов *Phytophthora infestans* (возбудителя фитофтороза), собранных на листьях коллекционных образцов в полевом генном банке ВИР и коммерческих посадках сортового картофеля в Ленинградской области (Кузнецова и др., 2016; Sokolova et al., 2017).

Нами обнаружено разнообразие изолятов Y-вируса, в том числе рекомбинантного типа, на растениях разных *Solanum* spp. Впервые изоляты PVY^{NW(A)}, PVY^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII выявлены на растениях-сородичах картофеля на территории Северо-Западного региона Российской Федерации. Ранее в семенном картофеле из центральных регионов России и Беларуси были отмечены изоляты, относящиеся к рекомбинантным штаммам PVY^{NTN} и PVY^{N:O} (Усков и др., 2016).

При тестировании некоторых растений *Solanum* spp. (генотипы *S. cardiophyllum*, *S. chacoense*, *S. hjertingii*, *S. fendleri*, *S. kurtzianum*, *S. pinnatisectum*, *S. simplicifolium* и *S. spgazzinii*) на PVY комплексом методов (иммуно-

логический, молекулярный и биологический) получены противоречивые результаты.

Мультиплексная ПЦР для идентификации 10 штаммов PVY, включая редкие рекомбинантные, была разработана с учетом возможности выявления смешанных инфекций (Chikh Ali et al., 2010). Однако авторы отмечали невозможность в некоторых случаях смешанной инфекции идентифицировать генотип каждого штамма. В нашем эксперименте мы также столкнулись с примерами несоответствия в полной мере полученных нами продуктов амплификации с диагностическими фрагментами, указанными в (Chikh Ali et al., 2010) для точной диагностики всех генотипов штаммов PVY. Очевидно, что в мультиплексной ПЦР для смешанных инфекций важную роль может играть количественное соотношение разных генотипов штаммов вируса на пораженном растении, что может приводить к «нехватке» или наоборот к «избытку» некоторых диагностических продуктов амплификации для точной диагностики штаммов. В биологическом смысле можно предположить, что штаммы разного генотипа различаются по конкурентоспособности на разных видах растений-хозяев. Последнее обстоятельство может объяснить несоответствие диагностики штаммов вируса на картофеле и табаке после его инокуляции.

Противоречивые результаты детекции штаммов Y-вируса на растениях *Solanum* spp. и *N. tabacum* L. могут быть обусловлены генетическими отличиями диких родичей от сортового картофеля (*Solanum tuberosum* L.), на котором разрабатываются и апробируются методы диагностики. При современной классификации штаммов PVY, поражающих картофель, в первую очередь учитывают реакцию сортов с генами сверхчувствительности к определенным штаммам вируса и молекулярную характеристику изолята вируса, тогда как появление некрозов на растениях *N. tabacum* рассматривают как второстепенный признак (Karasev, Gray, 2013). Вероятно, при взаимодействии с растением-хозяином с другой генетической основой – дикими родичами картофеля, представителями других видов *Solanum*, происходят изменения биологических или иммунологических свойств отдельных изолятов Y-вируса. Нарушенная структура белка оболочки вируса у рекомбинантных штаммов, например, препятствует прохождению теста ELISA.

Разнообразие штаммов PVY, в особенности рекомбинантных, активно исследуется с помощью иммунологических и молекулярно-генетических методов, тогда как биологические свойства изучены лишь у ограниченного числа изолятов (Karasev, Gray, 2013; Green et al., 2017). PVY рассматривают как интересную модель для изучения эволюции вируса, который находится под действием отбора во взаимодействии с генетически различающимися растениями-хозяевами и в разных условиях среды. Эволюционируя за счет мутаций и рекомбинаций между разными штаммами, PVY способен преодолевать устойчивость сортов картофеля с N-генами. Установлено, что распространявшиеся на картофеле с недавнего времени штаммы PVY^{N-W} или PVY^{N:O} возникли в результате рекомбинации изолятов, относящихся к обычному PVY^O и некротическому PVY^N штаммам. Обнаружено более 30 вариантов рекомбинантных штаммов, появление ко-

торых объясняют рекомбинацией между изолятами разных подгрупп штаммов, в том числе между ранее возникшими рекомбинантами изолятами (Green et al., 2018). Изоляты PVY с нетипичными признаками, обнаруженные нами на растениях *S. cardiophyllum*, *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, представляют особый интерес для дальнейших исследований.

Заключение

В коллекции полевого генного банка ВИР на растениях клубненосных видов рода *Solanum* L. не выявлен PSTVd, обнаружено широкое распространение мозаичных вирусов картофеля. Большая часть клонов диких родичей картофеля – *Solanum* spp., отобранных по устойчивости к фитофторозу и золотистой нематоду, восприимчивы к PVX, PVS, PVM и PVY.

В изученной выборке растений клубненосных *Solanum* spp., пораженных PVY, преобладает обычный PVY^O штамм, второй по частоте распространения – рекомбинантный штамм PVY^{NW(A)}. На растениях *Solanum* spp. обнаружены изоляты PVY с разными биологическими и иммунологическими свойствами.

Список литературы / References

- Букасов С.М. Принципы систематики картофеля. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1978;62(1):3-35.
[Bukasov S.M. Principles of potato taxonomy. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 1978;62(1):3-35. (in Russian)]
- Горбатенко Л.Е. Южноамериканские виды картофеля (секция *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.). Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 569. Л., 1990.
[Gorbatenko L. South-American potato species (*Petota* Dumort. section, *Solanum* L. genus). Catalog of the VIR Global Collection, No 569. Leningrad, 1990. (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. Микол. и фитопатол. 2016;50(3): 175-184.
[Kuznetsova M.A., Kozlovsky B.E., Beketova M.P., Sokolova E.A., Malychenko O.P., Alekseev Ya.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Phytopathological and molecular characteristics of *Phytophthora infestans* isolates collected on resistant and susceptible potato genotypes. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2016;50(3):175-184. <https://elibrary.ru/item.asp?id=26040085>. (in Russian)]
- Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е., Кузнецова М.А., Гавриленко Т.А., Чалая Н.А., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Антонова О.Ю., Фадина О.А., Сметанина Т.И. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 816. Клоновая коллекция диких видов картофеля. СПб., 2015.
[Rogozina E.V., Khavkin E.E., Kuznetsova M.A., Gavrilenko T.A., Chalaya N.A., Beketova M.P., Sokolova E.A., Antonova O.Yu., Fadina O.A., Smetanina T.I. Catalog of the VIR World Collection, No. 816. Clonal Collection of Wild Potato Species. St. Petersburg, 2015. (in Russian)]
- Усков А.И., Варицев Ю.А., Бирюкова В.А., Галушка П.А., Варицева Г.П., Шмыгля И.В., Кравченко. Изучение штаммового состава Y-вируса картофеля из различных регионов Российской Федерации и Беларуси. Земледелие. 2016;8:36-38.
[Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Biryukova V.A., Galushka P.A., Varitseva G.P., Shmyglya I.V., Kravchenko D.V. Study of the strain composition of potato Y virus from different regions of the Russian

- Federation and Belarus. *Zemledelie = Agriculture*. 2016;8:36-38. (in Russian)]
- Chikh Ali M., Maokac T., Natsuakid K.T., Natsuaki T. The simultaneous differentiation of Potato virus Y strains including the newly described strain PVYNTN-NW by multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2010;165:15-20. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.12.010.
- Clark M., Adams A. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 1977;34(3):475-483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/323416>.
- Green K., Brown C., Gray S., Karasev A. Phylogenetic study of recombinant strains of potato virus Y. *Virology*. 2017;507:40-52. DOI 10.1016/j.virol.2017.03.018.
- Green K., Brown C., Karasev A. Genetic diversity of potato virus Y (PVY): sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures. *Arch. Virol.* 2018;163:23-32. DOI 10.1007/s00705-017-3568-x.
- Jeffries C. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Potato. Rome: IPGRI, 1998;19.
- Karasev A., Gray S. Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013;51:571-586. DOI 10.1146/annurev-phyto-082712-102332.
- Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Shiel P. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis.* 2006;90:935-940. DOI 10.1094/PD-90-0935.
- Machida-Hirano R. Diversity of potato genetic resources. *Breed. Sci.* 2015;65(1):26-40. DOI 10.1270/jsbbs.65.26.
- Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives. Eds. D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, M. Taylor, D. MacKerron, H. Ross. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Ulanova T.I., Rogozhin A.N., Smetanin A.T.I., Demidova V.N., Beketova M.P., Malyuchenko O.P., Alekseev Ya.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Pathogenicity of East European strains of *Phytophthora infestans* vs. resistance of colonized potato plants: the profiles of *AVR* genes vs. *R* gene pyramids. PPO-Special Report. 2017;18:259-268. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/448972#page=261>.
- Sun Q., Zhang C.Q., Meng Z.D., Zhang F.J., Mu C.H., Li W.C., Zhang Q.W. Establishment on the methods of detecting potato virus X and Y by complex RT-PCR. *J. Agr. Biotech.* 2009;17:737-738.
- Vincent H., Wiersema J., Kell S., Fielder H., Dobbie S., Castañeda-Álvarez N.P., Guarino L., Eastwood R., Leo B., Maxted N. A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security. *Biol. Conserv.* 2013;167:265-275. DOI 10.1016/j.biocon.2013.08.011.
- Yanagisawa H., Shiki Y., Matsushita Y., Oishi M., Takaue N., Tsuda S. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight potyviroids. *Eur. J. Plant Pathol.* 2017;149(1):11-23. DOI 10.1007/s10658-017-1157-1.

ORCID ID

E.V. Rogozina 0000-0002-2743-068X

Благодарности. Работа по диагностике растений клубненосных *Solanum* spp. на наличие мозаичных вирусов PVX, PVS, PVM и PVY методами ELISA и растений-индикаторов выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ВИР № 0662-2019-0004; молекулярная идентификация PSTVd и штаммов PVY выполнена в рамках КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля» в ВИЗР. Авторы благодарны И.В. Шмыгле, ведущему научному сотруднику лаборатории биоинженерии ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, за предоставленные *in vitro* растения картофеля сорта Осень, инфицированные PSTVd и использованные как положительный контроль.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2018. После доработки 03.01.2019. Принята к публикации 14.01.2019.

Приоритизация генов картофеля, вовлеченных в формирование селекционно-значимых признаков, с использованием базы знаний SOLANUM TUBEROSUM

П.С. Деменков^{1,2}✉, О.В. Сайк¹, Т.В. Иванисенко¹, Н.А. Колчанов¹, А.В. Кочетов¹, В.А. Иванисенко¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: demps@bionet.nsc.ru

Развитие высокоэффективных технологий в геномике, транскриптомике, протеомике и метаболомике, а также новых технологий в сельском хозяйстве привело к «информационному взрыву» в биологии растений и растениеводстве, включая производство картофеля. Лишь небольшая часть информации попадает в формализованные базы данных (например, Uniprot, NCBI Gene, BioGRID, IntAct и др.). Один из основных источников достоверных биологических данных – научная литература. Объем литературы велик, так, известная база данных PubMed содержит более 18 тыс. тезисов статей, посвященных картофелю. Эффективное получение знаний, представленных в таком количестве неформализованных текстовых документов, требует применения современных интеллектуальных методов анализа. Однако в литературе нет свидетельств широкого применения интеллектуальных методов автоматического извлечения знаний из научных публикаций по таким культурам, как картофель. В рамках настоящей работы использовалась разработанная нами ранее база знаний SOLANUM TUBEROSUM (<http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/>). Интегрированная в базу знаний информация о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе селекционно-значимых признаков, способствует ускорению идентификации генов-кандидатов для селекционно-значимых характеристик картофеля и разработки диагностических маркеров для селекции. В статье выполнен поиск новых потенциальных участников молекулярно-генетических механизмов устойчивости к неблагоприятным факторам у растений. Приоритизация генов-кандидатов показала, что гены *PHYA*, *GF14*, *CNIH1*, *RC11A*, *ABIS*, *CPK1*, *RGS1*, *NHL3*, *GRF8* и *CYP21-4* наиболее перспективны для дальнейшей проверки их связей с устойчивостью к неблагоприятным факторам. В результате проведенного анализа выявлено, что молекулярно-генетические взаимоотношения, ответственные за формирование значимых сельскохозяйственных признаков, являются комплексными и включают множество как прямых, так и опосредованных взаимодействий. Построение ассоциативных генных сетей и их анализ с использованием базы знаний SOLANUM TUBEROSUM – это основа поиска генов-мишеней для направленного мутагенеза и маркер-ориентированной селекции сортов картофеля, обладающих ценными сельскохозяйственными признаками. Ключевые слова: картофель; *Solanum tuberosum*; ANDSystem; анализ текстов; база данных; методы автоматического извлечения знаний из текстов; приоритизация генов; ассоциативные генные сети.

Для цитирования: Деменков П.С., Сайк О.В., Иванисенко Т.В., Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Иванисенко В.А. Приоритизация генов картофеля, вовлеченных в формирование селекционно-значимых признаков, с использованием базы знаний SOLANUM TUBEROSUM. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):312-319. DOI 10.18699/VJ19.501

Prioritization of potato genes involved in the formation of agronomically valuable traits using the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base

P.S. Demenkov^{1,2}✉, O.V. Saik¹, T.V. Ivanisenko¹, N.A. Kolchanov¹, A.V. Kochetov¹, V.A. Ivanisenko¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: demps@bionet.nsc.ru

The development of highly efficient technologies in genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics, as well as new technologies in agriculture has led to an “information explosion” in plant biology and crop production, including potato production. Only a small part of the information reaches formalized databases (for example, Uniprot, NCBI Gene, BioGRID, IntAct, etc.). One of the main sources of reliable biological data is the scientific literature. The well-known PubMed database contains more than 18 thousand abstracts of articles on potato. The effective use of knowledge presented in such a number of non-formalized documents in natural language requires the use of modern intellectual methods of analysis. However, in the literature, there is no evidence of a widespread use of intelligent methods for automatically extracting knowledge from scientific publications on cultures such as potatoes. Earlier we developed

the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base (<http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/>). Integrated into the knowledge base information about the molecular genetic mechanisms underlying the selection of significant traits helps to accelerate the identification of candidate genes for the breeding characteristics of potatoes and the development of diagnostic markers for breeding. The article searches for new potential participants of the molecular genetic mechanisms of resistance to adverse factors in plants. Prioritizing candidate genes has shown that the *PHYA*, *GF14*, *CNIH1*, *RC11A*, *ABI5*, *CPK1*, *RGS1*, *NHL3*, *GRF8*, and *CYP21-4* genes are the most promising for further testing of their relationships with resistance to adverse factors. As a result of the analysis, it was shown that the molecular genetic relationships responsible for the formation of significant agricultural traits are complex and include many direct and indirect interactions. The construction of associative gene networks and their analysis using the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base is the basis for searching for target genes for targeted mutagenesis and marker-oriented selection of potato varieties with valuable agricultural characteristics.

Key words: potato; *Solanum tuberosum*; ANDSystem; text mining; knowledge base; automatic extraction of knowledge from texts; prioritization of genes; associative gene networks.

For citation: Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Kochetov A.V., Ivanisenko V.A. Prioritization of potato genes involved in the formation of agronomically valuable traits using the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):312-319. DOI 10.18699/VJ19.501 (in Russian)

Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) имеет высокую пищевую, техническую, кормовую ценность и является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Такая пищевая ценность картофеля достигается благодаря большому содержанию углеводов, аскорбиновой кислоты, солей калия, кальция, магния и других микроэлементов, а также хорошей усвояемостью белков. Картофельный крахмал служит сырьем для производства спирта, патоки, декстринов, глюкозы, мальтозы и ряда других продуктов для химической промышленности (Khlestkin et al., 2018). Крахмал клубней картофеля также широко используется в бумажной, текстильной и других отраслях промышленности (Kraak, 1992; Ellis et al., 1998; Jobling, 2004).

Развитие высокопроизводительных технологий в области геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, а также новые технологии в сельском хозяйстве привели к «информационному взрыву» в биологии растений и растениеводстве. Лишь небольшая часть информации попадает в формализованные фактографические базы данных (например, NCBI Gene, Uniprot, IntAct, BioGRID и др.). Один из основных источников надежных биологических знаний – научная литература. Хорошо известная база данных PubMed содержит более 18 тыс. рефератов статей, посвященных картофелю, что делает чрезвычайно трудным для исследователей вручную анализировать такие объемы информации.

Отсутствие единого ресурса, интегрирующего всю доступную информацию, приводит к сильному усложнению работ, связанных с выявлением связей между наборами данных, описывающих важные и практически полезные свойства растений, их строение и процессы на молекулярном уровне (Хлесткин и др., 2017). Таким образом, снижается эффективность использования полученных результатов, не полностью используется генетический потенциал природных ресурсов.

Проблема обработки больших и сверхбольших данных возникает все чаще в различных сферах деятельности человека (Kilicoglu, 2017). В настоящее время большое распространение получили методы автоматического интеллектуального анализа текстов (text mining). Обычно эти методы разделяют на две группы: методы, основанные на правилах, и методы, использующие машинное

обучение. Методы, основанные на правилах, позволяют достигать высокой точности извлечения информации, однако полнота извлечения имеет относительно низкий уровень (Aggarwal, 2012). Другой подход к автоматическому извлечению информации – методы машинного обучения. Эти методы не требуют использования вручную созданных правил и получили широкое распространение в последнее время. К недостаткам таких методов можно отнести требование наличия больших обучающих выборок, содержащих размеченные вручную тексты.

Методы автоматического анализа текстов нашли широкое применение при решении различных задач биомедицины, системной и интегративной биологии (Friedman et al., 1999; Meystre et al., 2008; Cao et al., 2011; Shetty, Dalal, 2011; Rebholz-Schuhmann et al., 2012; Li et al., 2013; Wei et al., 2013; Sarker et al., 2015).

В литературе встречается описание использования методов автоматического интеллектуального анализа текстов только для модельных растений. Например, система PLAN2L (Krallinger et al., 2009) содержит результаты автоматического извлечения информации из полнотекстовых публикаций по *Arabidopsis thaliana* о белок-белковых взаимодействиях и генетической регуляции, а также об ассоциациях генов с некоторыми клеточными процессами и процессами развития (цветка, корня и т. д.). E. da Costa с коллегами (2018) создали интерактивную систему, которая позволяет выявлять вредителей и болезни риса на основе информации, полученной от фермеров в виде коротких текстовых сообщений (SMS).

Ранее нами была разработана компьютерная платформа для комплексного интеллектуального анализа научных публикаций в области картофелеводства – база знаний SOLANUM TUBEROSUM, доступная по адресу <http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/> (Сайк и др., 2017; Иванисенко и др., 2018). Программные средства этой платформы обеспечивают решение всех необходимых шагов для автоматического извлечения и формализованного представления в базе знаний информации по генетике, ДНК-маркерам, селекции, семеноводству, диагностике заболеваний, средствам защиты и технологиям хранения картофеля. Для доступа к этим данным, построения запросов и визуализации результатов служит графический пользовательский интерфейс SOLANUM TUBEROSUM.

Автоматический анализ текстов проводился адаптированными методами системы ANDSystem (Demenkov et al., 2012; Ivanisenko et al., 2015; Saik et al., 2016).

Интеграция сведений о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе селекционно-значимых признаков, способствует ускорению идентификации генов-кандидатов для селекционно-значимых характеристик картофеля и разработки диагностических маркеров для селекции.

В настоящее время в биоинформатике для выявления генов-кандидатов, потенциально вовлеченных в какой-либо признак и/или биологический процесс, широко используются методы приоритизации (Chen et al., 2009). Анализ генных сетей – один из таких подходов. Ранее нами были разработаны критерии приоритизации генов, основанные на анализе структуры ассоциативных генных сетей ANDSystem (Янкина и др., 2018; Saik et al., 2018). В настоящей работе была проведена приоритизация генов, направленная на выявление перспективных кандидатов для исследования их связи с устойчивостью к неблагоприятным факторам.

Материалы и методы

База знаний SOLANUM TUBEROSUM доступна в интернете по адресу <http://www-bionet.sssc.ru/and/plant/>. В ее состав входят три основных модуля.

Модуль автоматического анализа текстов (text mining) используется для извлечения из научных публикаций информации о взаимоотношениях между объектами. Модуль основан на программных инструментах ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015). Программные инструменты ANDSystem проводят многоэтапный анализ текстов, состоящий из предобработки текстов, извлечения информации о взаимоотношениях между объектами с помощью семантико-лингвистических шаблонов и сохранения результатов в формализованном виде. Существующая на сегодняшний день версия ANDSystem работает только с текстами на английском языке. Кроме инструментов анализа текстов, ANDSystem содержит средства для сбора и интеграции информации из фактографических баз данных.

Модуль базы данных SOLANUM TUBEROSUM состоит из разделов Dictionary (словари объектов и понятий) и Associative networks (информация о взаимоотношениях между объектами и понятиями).

Раздел Dictionary включает:

- молекулярно-генетические данные по картофелю и модельным растениям (гены, белки, метаболиты, микроРНК, биологические процессы);
- генетические биомаркеры;
- сорта картофеля;
- селекционно-значимые качества, хозяйственно ценные признаки и потребительские свойства картофеля и модельных растений;
- физиологические, фенотипические признаки и болезни картофеля;
- молекулярно-генетические данные по возбудителям заболеваний и вредителям картофеля (гены, белки, метаболиты, биологические процессы);
- генетические маркеры резистентности к средствам защиты растений;

- молекулярные мишени для химических средств защиты растений;
- биотические факторы окружающей среды;
- абиотические факторы окружающей среды (почва, влажность, температура, свет, воздух, климат и микроклимат и т. д.);
- методы и технологии:
 - селекция;
 - диагностика заболеваний;
 - защита от заболеваний;
 - возделывание, переработка и хранение картофеля.

Раздел Associative networks содержит:

- физические взаимодействия (молекулярные комплексы белок/белок, белок/лиганд, белок/ДНК);
- химические взаимодействия (каталитические реакции и процессы) по типу субстрат–фермент–продукт;
- регуляторные взаимодействия и ассоциации (регуляция экспрессии гена, регуляция активности белка, ассоциация ген/признак и т. д.);
- взаимоотношения между понятиями селекции, фенотики и семеноводства, заболеваниями, приемами диагностики и средствами защиты.

Модуль визуализации и биоинформатики используется для интерактивного построения ассоциативных генных сетей и их анализа с применением методов биоинформатики.

Реконструкция ассоциативных генных сетей выполнялась с помощью программы ANDVisio (Demenkov et al., 2012) с использованием информации из базы знаний SOLANUM TUBEROSUM (Сайк и др., 2017; Иванисенко и др., 2018).

Приоритизация генов проводилась на основании показателя центральности CTC (cross-talk centrality), рассчитываемого с использованием функции Intelligent Filtration программы ANDVisio по формуле:

$$CTC_j = N_j/M,$$

где N_j – число связей j -го гена/белка с участниками ассоциативной генной сети; M – число вершин ассоциативной генной сети (Янкина и др., 2018). При ранжировании генов-кандидатов сортировка проводилась по убыванию значения показателя CTC. Таким образом, гены с наибольшим показателем CTC получают максимальный приоритет.

Результаты

На основании информации из базы знаний SOLANUM TUBEROSUM были проведены реконструкция и анализ ассоциативных генных сетей, описывающих биологические процессы, вовлеченные в формирование селекционно-значимых сельскохозяйственных признаков, таких как устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды, ответ на различные стрессы (избыток солей, холод, засуха, повышенная температура). Ассоциативная генная сеть устойчивости к неблагоприятным факторам показана на рисунке. Сеть включает 542 гена, 544 белка, 34 биологических процесса и 2406 взаимодействий между ними.

В табл. 1 представлен список биологических процессов, которые отвечают за устойчивость к неблагоприятным факторам у картофеля. Из данных, представленных в

табл. 1, видно, что наибольшее число генов и белков ассоциировано с процессом «ответ на окислительный стресс» (Gene Ontology идентификатор – GO:0006979). У растений окислительный стресс наблюдается при действии большинства неблагоприятных факторов среды, включая заморозки, засуху, засоление почв, высокие температуры и патогены (Mittler, 2002; Ramirez et al., 2018).

Для картофеля уже выполнен ряд исследований, в которых ведется обсуждение возможности создания линий растений, устойчивых к различным неблагоприятным условиям среды, полученных путем модификации биологических процессов, представленных в табл. 1 (Jones et al., 2014; Kikuchi et al., 2015). Например, показано, что трансгенный картофель, в котором экспрессировались гены Cu- и Zn-супероксиддисмутаза томата, обладал повышенной устойчивостью к окислительному (Perl et al., 1993), а также холодному и солевому (Shafi et al., 2017) стрессам. В работе Р. Моппеуеу с коллегами (2013) обсуждаются связь 14 генов картофеля с устойчивостью к засухе и возможности их использования для создания трансгенных растений. Была изучена связь между генами картофеля *ACS4*, *ACS5* и ответом на биотический стресс (Schlaghnauffer et al., 1997). Создание трансгенных линий картофеля с различным уровнем экспрессии гена *PHYV* откроет возможность для изучения механизмов устойчивости картофеля к воздействию повышенных температур (Трагеро-Мозос et al., 2018).

Приоритизация, выполненная с использованием показателя центральности СТС (cross-talk centrality), позволила выявить гены-кандидаты, наиболее перспективные для дальнейшего изучения их связи с устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, а также ответом на различные стрессы. В табл. 2 приведены 10 наиболее приоритетных генов-кандидатов. Эти гены отранжированы согласно значениям показателя СТС, который выражает степень связности генов в генной сети, показанной на рисунке.

На первом месте в табл. 2 оказался ген *PHYA*, который кодирует фоторецептор фитохром А, участвующий в различных биологических процессах, в том числе в контроле циркадного ритма, цветения и движений листьев в ответ на воздействие света с различными длинами волн

Таблица 1. Топ 10 биологических процессов, обеспечивающих устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды, упорядоченных согласно числу ассоциированных с ними генов

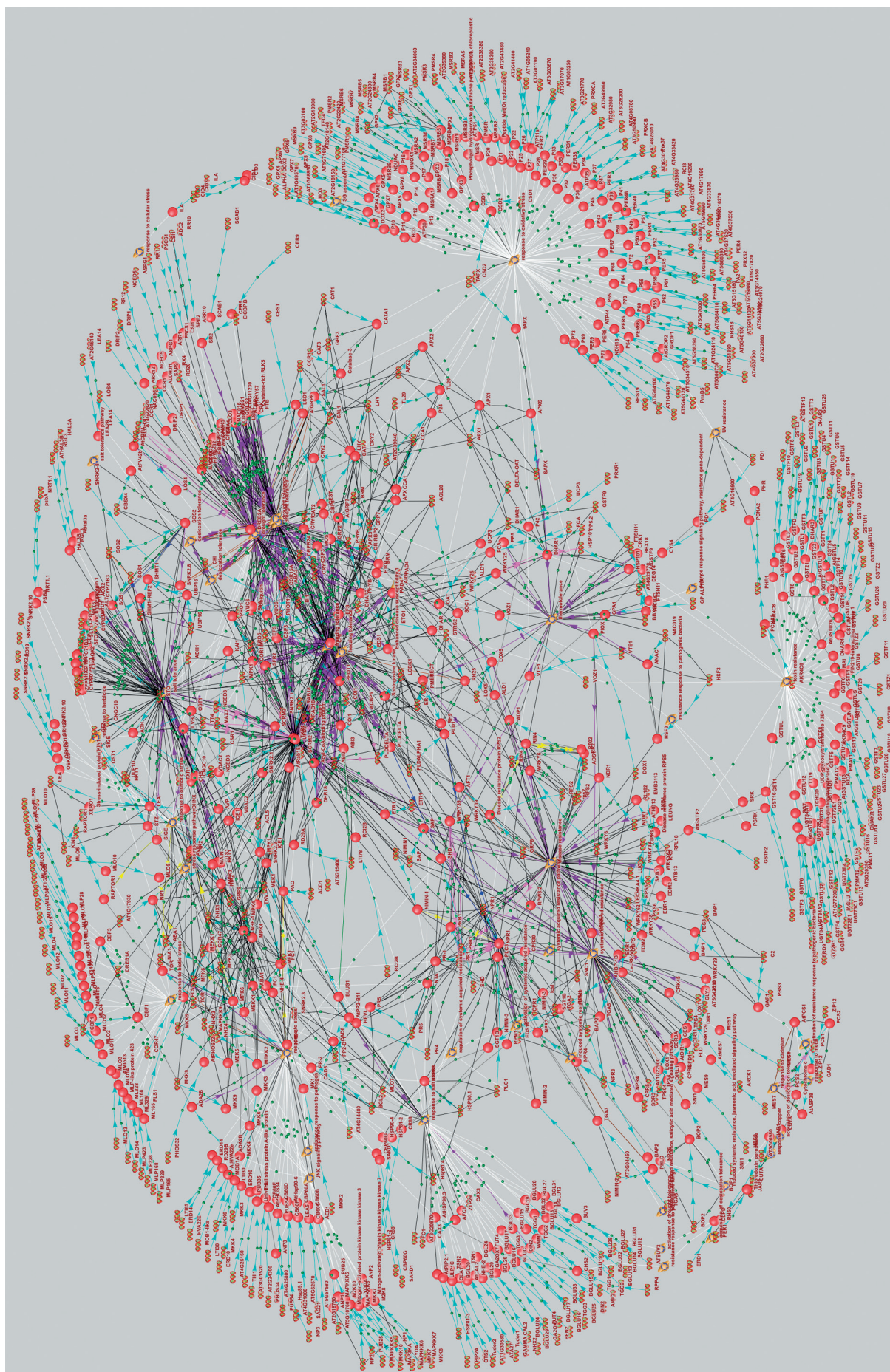
Название биологического процесса	Идентификатор Gene Ontology	Гены/белки
Ответ на окислительный стресс	GO:0006979	118
Ответ на биотический стресс	GO:0009607	71
Устойчивость к токсинам	GO:0009636	68
Устойчивость к засухе	GO:0009633	62
Устойчивость к засолению	GO:0009651	49
Устойчивость к заболеваниям	GO:0009614	39
Устойчивость к холоду	GO:0009409	29
Приобретенная системная устойчивость к стрессам	GO:0009627	26
Ответ на осмотический стресс	GO:0006970	23
Устойчивость к высоким температурам	GO:0010286	14

(Yanovsky et al., 2000). В работе (Sawers et al., 2005) обсуждаются возможности использования фитохромов в программах селекции зерновых культур для разработки сортов, которые обладают устойчивостью к негативным факторам роста в условиях загущенного посева. Другие примеры исследования влияния мутаций фитохромов на фенотипы растений приведены в работах (Zhang et al., 2013; Chen et al., 2014). В исследовании (Zhang et al., 2013) изучалось влияние мутаций *phyB* у *A. thaliana* на ряд фенотипических признаков растений, а в работе (Chen et al., 2014) показано, что потеря функциональной активности РНУС у пшеницы приводила к изменениям циркадного ритма и резкой задержке цветения в условиях длинного светового дня.

Второе, четвертое и девятое места заняли гены из семейства 14-3-3-подобных белков (*GF14*, *RC11A* и *GRF8* соответственно). 14-3-3-подобные белки регулируют клеточный цикл, апоптоз, иммунные процессы, метаболизм азота и углерода, участвуют в регуляции синтеза крах-

Таблица 2. Десять наиболее приоритетных генов-кандидатов, потенциально вовлеченных в устойчивость к неблагоприятным факторам

Ранг	Ген	Название белка	Центральность СТС
1	<i>PHYA</i>	Фитохром А	0.011514615
2	<i>GF14</i>	14-3-3-подобный белок	0.011514615
3	<i>CNIH1</i>	Антипортер CNIH1	0.011514615
4	<i>RC11A</i>	14-3-3-подобный белок GF14 пси	0.010628875
5	<i>ABI5</i>	Гомолог транскрипционного фактора ABI5 bZIP-типа	0.009743136
6	<i>CPK1</i>	Кальций-зависимая протеинкиназа С	0.008857396
7	<i>RGS1</i>	Регулятор сигнального пути G-белка типа 1	0.008857396
8	<i>NHL3</i>	NDR1/HIN1-подобный белок 3	0.008857396
9	<i>GRF8</i>	14-3-3-подобный белок GF14 каппа	0.008857396
10	<i>CYP21-4</i>	Пептидил-пролил-цис-транс изомераза CYP21-4	0.007971656



Ассоциативная генная сеть устойчивости к неблагоприятным факторам у картофеля.
Гены обозначены спиральками; Белки – красными шарами; биологические процессы – коричневыми овалами; взаимодействия между ними – линиями.

мала, производства аденозинтрифосфата, детоксикации пероксидом и в некоторых других биохимических путях. Развитие растений и прорастание семян контролируются факторами, активация которых происходит при взаимодействии с 14-3-3-подобными белками (Fulgosi et al., 2002). Снижение уровня белка GF14 приводило к увеличению содержания кальция, крахмала и отношения растворимых сахаров к крахмалу в клубнях картофеля, а также к значительному росту содержания метионина, пролина и аргинина в клетках картофеля (Świądrych et al., 2002). Было показано, что подавление экспрессии гена *GF14e* методом РНК интерференции приводило к повышению устойчивости риса к вирулентному штамму бактериального фитопатогена *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Хоо) (Manosalva et al., 2011). Известно, что растения с мутациями в генах *RC11A* и *GRF8* проявляли повышенную устойчивость к заморозкам (Catalá et al., 2014; Liu et al., 2017).

Третье место получил ген *CNIH1*, который у растений кодирует белок, взаимодействующий с транспортером натрия НКТ1 и обеспечивающий правильное расположение транспортера на мембране аппарата Гольджи (Rosas-Santiago et al., 2017). В работе (Wudick et al., 2018) изучалось влияние мутаций в гене *CNIH1* на пылецу и гомеостаз кальция у *A. thaliana*. Интересно отметить, что был получен сорт картофеля Юбилей Жукова, который обладал повышенной соле- и засухоустойчивостью, благодаря сверхэкспрессии вакуолярного Na^+/H^+ -антипортера NHX2 (Беляев и др., 2011).

Гомолог транскрипционного фактора ABI5 bZIP-типа (*ABI5*) занял пятое место. ABI5 имеет большое значение для прорастания семян, которое регулируется абсцизовой кислотой (Finkelstein, 1994; Lopez-Molina, et al., 2002). Транскрипционный фактор ABI5 bZIP-типа участвует в активации генов, ответственных за накопление белков при развитии семян. Снижение экспрессии гена *ABI5* активирует рост меристемы (Lopez-Molina et al., 2002). У *A. thaliana* мутации в гене *ABI5* были связаны со сниженной чувствительностью к абсцизовой кислоте, а также к солевому и осмотическому стрессу при прорастании (Finkelstein, Lynch, 2000; Carles et al., 2002; Tezuka et al., 2013).

На шестом месте был ген *CPK1*, который кодирует кальций-зависимую протеинкиназу С, участвующую в иммунном ответе, устойчивости к грибковым заболеваниям и патогенам (Gravino et al., 2015). Известно, что мутации в гене *CPK1* *A. thaliana* приводили к гиперчувствительности к солевому стрессу и засухе, в то время как линии трансгенных растений с повышенной экспрессией *CPK1* обладали значительной устойчивостью к солевому стрессу и засухе (Huang et al., 2018).

Седьмое место занял ген *RGS1*, кодирующий отрицательный регулятор сигнального пути G-белка типа 1. Известно, что экспрессия этого гена снижается в ответ на дефицит воды (Campbell et al., 2012). В работе (Chen et al., 2006) для *A. thaliana* было показано, что трансгенные растения, в которых был сверхэкспрессирован ген *RGS1*, обладали повышенной устойчивостью к засухе.

На восьмом месте оказался ген *NHL3*, кодирующий NDR1/HIN1-подобный белок 3, вовлеченный в ответ на

воздействие патогенов (Chong et al., 2008). Трансгенная линия *A. thaliana*, в которой наблюдалась повышенная экспрессия гена *NHL3*, показала повышенную устойчивость к патогену *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Varet et al., 2003).

Десятое место в табл. 2 занял ген *CYP21-4*, кодирующий циклофилин, локализованный в аппарате Гольджи, который участвует в толерантности к окислительному стрессу (Park et al., 2017). Авторы рассматривают сверхэкспрессию гена *CYP21-4* в сельскохозяйственных культурах как новый перспективный способ увеличения продуктивности и урожайности растений. Для картофеля и риса показано, что трансгенные растения, в которых сверхэкспрессируется ген *CYP21-4*, имели повышенную урожайность, стебли и корни растений были длиннее, а листья толще. У картофеля образовывалось большее число клубней и они были крупнее, а микроклубни формировались быстрее по сравнению с растениями дикого типа (Park et al., 2017).

Заключение

В настоящей работе осуществлен поиск новых потенциальных участников молекулярно-генетических механизмов устойчивости к неблагоприятным факторам у растений. Приоритизация генов-кандидатов показала, что наиболее перспективными для дальнейшей проверки их связей с устойчивостью к неблагоприятным факторам являются гены *PHYA*, *GF14*, *CNIH1*, *RC11A*, *ABI5*, *CPK1*, *RGS1*, *NHL3*, *GRF8* и *CYP21-4*. Проведенный анализ показал, что молекулярно-генетические взаимоотношения, ответственные за формирование значимых сельскохозяйственных признаков, являются комплексными и включают множество как прямых, так и опосредованных взаимодействий. Визуализация этих взаимодействий в виде ассоциативных генных сетей и их анализ с использованием базы знаний SOLANUM TUBEROSUM – основа для поиска генов-мишеней для направленного мутагенеза и маркер-ориентированной селекции сортов картофеля, с устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Список литературы / References

- Беляев Д.В., Носова А.Е., Кривошеева А.Б., Терешонок Д.В., Юрьева Н.О., Рудас В.А., Кучук Н.В. Экспрессия вакуолярного антипортера ячменя повышает солеустойчивость и засухоустойчивость трансгенного картофеля. Сборник трудов конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений». Киев, 30 мая–1 июня 2011.
- [Belyaev D.V., Nosova A.E., Krivosheeva A.B., Tereshonok D.V., Yur'eva N.O., Rudas V.A., Kuchuk N.V. Expression of the vacuolar antiporter of barley increases the salt tolerance and drought tolerance in transgenic potatoes. Proceedings of the Conference "Modern Aspects of Plant Genetic Engineering". Kiev, May 30–June 1, 2011. (in Russian)]
- Иванисенко Т.В., Сайк О.В., Деменков П.С., Хлесткин В.К., Хлесткина Е.К., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. База знаний SOLANUM TUBEROSUM: раздел по молекулярно-генетической регуляции метаболических путей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):8-17. DOI 10.18699/VJ18.32.
- [Ivanisenco T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Khlestkin V.K., Khlestkina E.K., Kolchanov N.A., Ivanisenco V.A. The SOLANUM TUBEROSUM knowledge base: the section on molecular-genetic regulation of metabolic pathways. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i

- Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1): 8-17. (in Russian)]
- Сайк О.В., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. Разработка методов автоматического извлечения знаний из текстов научных публикаций для создания базы знаний SOLANUM TUBEROSUM. С.-х. биология. 2017;52(1):63-74. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.63rus.
- [Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Development of methods for automatic extraction of knowledge from texts of scientific publications for the creation of a knowledge base SOLANUM TUBEROSUM. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):63-74. (in Russian)]
- Хлесткин В.К., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Гены-мишени для получения сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с заданными свойствами крахмала. С.-х. биология. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.25rus.
- [Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):25-36. (in Russian)]
- Янкина М.А., Сайк О.В., Иванисенко В.А., Деменков П.С., Хуснутдинова Э.К. Оценка методов приоритизации генов внешнего пути апоптоза в качестве кандидатов, ассоциированных с большим депрессивным расстройством. Генетика. 2018;54(11): 1338-1348.
- [Yankina M.A., Saik O.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Khusnutdinova E.K. Evaluation of prioritization methods of extrinsic apoptotic signaling pathway genes for retrieval of the new candidates associated with major depressive disorder. Genetika = Genetics (Moscow). 2018;54(11):1338-1348. (in Russian)]
- Aggarwal C.C., Zhai C. Mining Text Data. Springer Science & Business Media, 2012.
- Campbell M.A., Gleichsner A., Hilldorfer L., Horvath D., Suttle J. The sprout inhibitor 1, 4-dimethylnaphthalene induces the expression of the cell cycle inhibitors KRP1 and KRP2 in potatoes. *Funct. Integr. Genomics*. 2012;12(3):533-541. DOI 10.1007/s10142-011-0257-9.
- Cao Y., Liu F., Simpson P., Antieau L., Bennett A., Cimino J.J., Ely J., Yu H. AskHERMES: An online question answering system for complex clinical questions. *J. Biomed. Inform.* 2011;44:277-288. DOI 10.1016/j.jbi.2011.01.004.
- Carles C., Bies-Etheve N., Aspart L., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M., Echeverria M., Delseny M. Regulation of *Arabidopsis thaliana* *Em* genes: role of ABI5. *Plant J.* 2002;30(3):373-383.
- Catalá R., López-Cobollo R., Castellano M.M., Angosto T., Alonso J.M., Ecker J.R., Salinas J. The *Arabidopsis* 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation. *Plant Cell*. 2014;26(8):3326-3342. DOI 10.1105/tpc.114.127605.
- Chen A., Li C., Hu W., Lau M.Y., Lin H., Rockwell N.C., Martin S.S., Jernstedt J.A., Lagarias J.C., Dubcovsky J. Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111(28):10037-10044. DOI 10.1073/pnas.1409795111.
- Chen J., Bardes E.E., Aronow B.J., Jegga A.G. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucl. Acids Res.* 2009;37(Suppl. 2):W305-W311.
- Chen Y., Ji F., Xie H., Liang J. Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2006;57(9):2101-2110.
- Chong J., Le Henanff G., Bertsch C., Walter B. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol. Biochem.* 2008;46(4):469-481. DOI 10.1016/j.plaphy.2007.09.010.
- da Costa E., Tjandrasa H., Djanali S. Text mining for pest and disease identification on rice farming with interactive text messaging. *Int. J. Elec. & Comp. Eng. (IJECE)*. 2018;8(3):1671-1683.
- Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biology*. 2012;11(3-4):149-161. DOI 10.3233/ISB-2012-0449.
- Ellis R.P., Cochrane M.P., Dale M.F.B., Duffus C.M., Lynn A., Morrison I.M., Prentice R.D.M., Swanston J.S., Tiller S.A. Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* 1998;77(3):289-311. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<289::AID-JSFA38>3.0.CO;2-D.
- Finkelstein R.R. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* 1994;5:765-771.
- Finkelstein R.R., Lynch T.J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*. 2000;12(4):599-609.
- Friedman C., Hripsak G., Shagina L., Liu H. Representing information in patient reports using natural language processing and the extensible markup language. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 1999;6:76-87. DOI 10.1136/jamia.1999.0060076.
- Fulgosi H., Soll J., de Faria Maraschin S., Korthout H.A., Wang M., Testerink C. 14-3-3 proteins and plant development. *Plant Mol. Biol.* 2002;50(6):1019-1029.
- Gravino M., Savatin D.V., Macone A., De Lorenzo G. Ethylene production in *Botrytis cinerea*- and oligogalacturonide-induced immunity requires calcium-dependent protein kinases. *Plant J.* 2015;84(6): 1073-1086. DOI 10.1111/tpj.13057.
- Huang K., Peng L., Liu Y., Yao R., Liu Z., Li X., Yang Y., Wang J. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK1 plays a positive role in salt/drought-stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;498(1):92-98.
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* 2015;9(Suppl. 2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
- Jobling S. Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004;7(2):210-218. DOI 10.1016/j.pbi.2003.12.001.
- Jones J.D., Witek K., Verweij W., Jupe F., Cooke D., Dorling S., Tomlinson L., Smoker M., Perkins S., Foster S. Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2014;369(1639):20130087. DOI 10.1098/rstb.2013.0087.
- Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. *Carbohydr. Polymers*. 2018;181(1):460-476. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.
- Kikuchi A., Huynh H.D., Endo T., Watanabe K. Review of recent transgenic studies on abiotic stress tolerance and future molecular breeding in potato. *Breed. Sci.* 2015;65(1):85-102.
- Kilicoglu H. Biomedical text mining for research rigor and integrity: tasks, challenges, directions. *Brief. Bioinform.* 2017, Jan 1. DOI 10.1101/108480.
- Kraak A. Industrial applications of potato starch products. *Ind. Crops Prod.* 1992;1(2-4):107-112. DOI 10.1016/0926-6690(92)90007-I.
- Krallinger M., Rodriguez-Penagos C., Tendulkar A., Valencia A. PLAN2L: a web tool for integrated text mining and literature-based bioentity relation extraction. *Nucleic Acids Res.* 2009;11; 37(Suppl. 2):W160-W165. DOI 10.1093/nar/gkp484.
- Li C., Liakata M., Rebholz-Schuhmann D. Biological network extraction from scientific literature: state of the art and challenges. *Brief. Bioinform.* 2013;15(5):856-877. DOI 10.1093/bib/bbt006.
- Liu Z., Jia Y., Ding Y., Shi Y., Li Z., Guo Y., Gong Z., Yang S. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response. *Mol. Cell*. 2017;66(1):117-128.
- Lopez-Molina L., Mongrand S., McLachlin D.T., Chait B.T., Chua N.H. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* 2002;32:317-328.
- Manosalva P.M., Bruce M., Leach J.E. Rice 14-3-3 protein (GF14e) negatively affects cell death and disease resistance. *Plant J.* 2011; 68(5):777-787.

- Meystre S.M., Savova G.K., Kipper-Schuler K.C., Hurdle J.F. Extracting information from textual documents in the electronic health record: a review of recent research. *Yearb. Med. Inform.* 2008;35:128-144.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7(9):405-410. DOI 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
- Monneveux P., Ramírez D.A., Pino M.T. Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.): can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant Sci.* 2013;205:76-86.
- Park H.J., Lee A., Lee S.S., An D.J., Moon K.B., Ahn J.C., Kim H.S., Cho H.S. Overexpression of Golgi protein CYP21-4s improves crop productivity in potato and rice by increasing the abundance of mannosidic glycoproteins. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1250.
- Perl A., Perl-Treves R., Galili S., Aviv D., Shalgi E., Malkin S., Galun E. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.* 1993;85(5):568-576.
- Ramirez E., Ducreux L.J., Redfern C., Morris W.L., Wiese C., Morris J.A., Paterson C., Hedley P.E., Hancock R.D., Taylor M. A reversible light- and genotype-dependent acquired thermotolerance response protects the potato plant from damage due to excessive temperature. *Planta.* 2018;247(6):1377-1392.
- Rebholz-Schuhmann D., Oellrich A., Hoehndorf R. Text-mining solutions for biomedical research: enabling integrative biology. *Nat. Rev. Genet.* 2012;13:829-839. DOI 10.1038/nrg3337.
- Rosas-Santiago P., Lagunas-Gomez D., Yáñez-Domínguez C., Vera-Estrella R., Zimmermannová O., Sychrová H., Pantoja O. Plant and yeast cornichon possess a conserved acidic motif required for correct targeting of plasma membrane cargos. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2017;1864(10):1809-1818. DOI 10.1016/j.bbamcr.2017.07.004.
- Saik O.V., Ivanisenco T.V., Demenkov P.S., Ivanisenco V.A. Interaction of the hepatitis C virus: Literature mining with ANDSystem. *Virus Res.* 2016;218:40-48. DOI 10.1016/j.virusres.2015.12.003.
- Sarker A., Ginn R., Nikfarjam A., O'Connor K., Smith K., Jayaraman S., Upadhaya T., Gonzalez G. Utilizing social media data for pharmacovigilance: A review. *J. Biomed. Inform.* 2015;54:202-212. DOI 10.1016/j.jbi.2015.02.004.
- Sawers R.J., Sheehan M.J., Brutnell T.P. Cereal phytochromes: targets of selection, targets for manipulation? *Trends Plant Sci.* 2005;10(3):138-143.
- Schlaginhauser C.D., Artega R.N., Pell E.J. Sequential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in response to biotic and abiotic stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. *Plant Mol. Biol.* 1997;35(6):683-688.
- Shafi A., Pal A.K., Sharma V., Kalia S., Kumar S., Ahuja P.S., Singh A.K. Transgenic potato plants overexpressing SOD and APX exhibit enhanced lignification and starch biosynthesis with improved salt stress tolerance. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2017;35(5):504-518.
- Shetty K.D., Dalal S.R. Using information mining of the medical literature to improve drug safety. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2011;18:668-674. DOI 10.1136/amiajnl-2011-000096.
- Świądrych A., Prescha A., Matysiak-Kata I., Biernat J., Szopa J. Repression of the 14-3-3 gene affects the amino acid and mineral composition of potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50(7):2137-2141. DOI 10.1021/jf0112825.
- Tezuka K., Taji T., Hayashi T., Sakata Y. A novel *abi5* allele reveals the importance of the conserved Ala in the C3 domain for regulation of downstream genes and salt tolerance during germination in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(3):e23455.
- Trapero-Mozos A., Ducreux L.J., Bita C.E., Morris W., Wiese C., Morris J.A., Taylor M. A reversible light- and genotype-dependent acquired thermotolerance response protects the potato plant from damage due to excessive temperature. *Planta.* 2018;247(6):1377-1392. DOI 10.1007/s00425-018-2874-1.
- Varet A., Hause B., Hause G., Scheel D., Lee J. The *Arabidopsis NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Plant Physiol.* 2003;132(4):2023-2033.
- Wei C.-H., Kao H.-Y., Lu Z. PubTator: a web-based text mining tool for assisting biocuration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:W518-W522. DOI 10.1093/nar/gkt441.
- Wudick M.M., Portes M.T., Michard E., Rosas-Santiago P., Lizzio M.A., Nunes C.O., Campos C., Damineli D.S., Carvalho J.C., Lima P.T., Pantoja O. CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science.* 2018;360(6388):533-536.
- Yanovsky M.J., Izaguirre M., Wagmaister J.A., Gatz C., Jackson S.D., Thomas B., Casal J.J. Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant J.* 2000;23(2):223-232. DOI 10.1046/j.1365-3113x.2000.00775.x.
- Zhang J., Stankey R.J., Vierstra R.D. Structure-guided engineering of plant phytochrome B with altered photochemistry and light signaling. *Plant Physiol.* 2013;161(3):1445-1457. DOI 10.1104/pp.112.208892.

ORCID ID

A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Благодарности. Работа выполнена за счет средств, выделенных на выполнение плана научно-исследовательской работы ИЦиГ СО РАН на 2018 год в рамках комплексного плана научных исследований «Развитие селекции и семеноводства картофеля» (№ 0259-2018-0010-C-01).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.11.2018. После доработки 20.12.2018. Принята к публикации 11.01.2019.

Оптимизация параметров качества зерна для селекции озимой ржи

М.А. Пономарева^{1, 2}✉, С.Н. Пономарев¹

¹ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ e-mail: smponomarev@yandex.ru

Цель настоящей работы – оценить фенотипическую изменчивость показателей качества зерна и выявить комплекс наиболее информативных признаков для селекции разнообразных по направлению использования сортов озимой ржи. Исследования выполнены в Татарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства – обособленном структурном подразделении Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» в 2001–2015 гг. на 15 сортах озимой ржи. Оценены 20 параметров, определяющих качество зерна и сырьевую ценность: технологические показатели (масса 1000 зерен, натурная масса и выравненность зерна), параметры устойчивости к прорастанию зерна (число падения, высота амилограммы, температура пика клейстеризации крахмала), кинематическая вязкость водного экстракта (ВВЭ) зернового шрота, хлебопекарные свойства (органолептическая оценка пробной выпечки хлебцев). Наибольшее влияние генотипа выявлено по ВВЭ (34.8 %) и содержанию белка (27.8 %). Эти признаки должны быть в первую очередь предметом фенотипической оценки в селекционном процессе. Фенотипическая изменчивость критериев углеводно-амилазного комплекса и активности α-амилазы и технологических параметров определялась преимущественно (68.6 ... 82.5 %) средовыми факторами. Между числом падения (ЧП) и содержанием белка отсутствовала значимая связь. ЧП существенно коррелировало с высотой амилограммы и температурой пика клейстеризации. Выявлена положительная сопряженность средней силы ВВЭ с высотой амилограммы и ЧП. На основании многолетней фенотипической оценки с помощью метода главных компонент проведена оптимизация анализируемых показателей качества зерна озимой ржи. Для селекционной оценки озимой ржи предлагается использовать четыре интегральных показателя, имеющих наибольшую весовую нагрузку: содержание белка, число падения, вязкость водного экстракта и масса 1000 зерен. Этот комплекс признаков будет обеспечивать объективность и полноту оценки создаваемого селекционного материала. Показано, что кинематическая вязкость водного экстракта должна стать важным селекционным показателем как для определения хлебопекарных качеств ржи, так и для выявления кормовых достоинств зерна.

Ключевые слова: озимая рожь; качество зерна; число падения; вязкость водного экстракта; белок; амилограмма; метод главных компонент.

Для цитирования: Пономарева М.А., Пономарев С.Н. Оптимизация параметров качества зерна для селекции озимой ржи. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):320-327. DOI 10.18699/VJ19.496

Optimization of grain quality parameters for winter rye breeding

M.L. Ponomareva^{1, 2}✉, S.N. Ponomarev¹

¹ Tatar Scientific Research Institute of Agriculture – Subdivision of the “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

✉ e-mail: smponomarev@yandex.ru

The purpose of this work was to evaluate the phenotypic variability of grain quality indicators and to identify the set of the most informative indicators for the selection of different use varieties of winter rye. The research was carried out in Tatar Scientific Research Institute of Agriculture – Subdivision of the “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences” in 2001–2015 on 15 varieties of winter rye. Twenty parameters defining quality of grain and raw value were estimated: technological indicators (thousand grain mass, full-scale weight and grain uniformity), parameters preharvest sprouting (falling number, rate of amylogram, temperature of peak of starch gelatinization), kinematic water extract viscosity (WEV) of grain meal, baking properties (organoleptic assessment of trial baking bread). The greatest influence of genotype was found on WEV (34.8 %) and protein content (27.8 %). These features should be primarily the subject of phenotypic evaluation in the breeding process. Phenotypic variability of criteria of carbohydrate-amylase complex, α-amylases activity and technological parameters was determined predominantly (68.6 ... 82.5 %) by environmental factors. There was no significant relationship between falling number and protein content. The falling number correlated with the rate of amylogram and the temperature of gelatinization. Positive conjugation of the average power of WEV with the rate of amylogram and falling number was found. On the basis of a prolonged phenotypic evaluation using principal component analysis we have optimized the analyzed indicators of quality properties of winter rye grain. For breeding evaluation of winter rye it is proposed to use four integral indi-

cators having the greatest weight load: protein content, falling number, water extract viscosity and thousand grain mass. This complex of features will provide objectivity and completeness of the evaluation of the breeding material. It was shown that the kinematic viscosity of the water extract should become an important selection index, both for determining the baking qualities of rye, and for revealing the fodder grain advantages.

Key words: winter rye; grain quality; falling number; water extract viscosity; protein; amylogram; principal component analysis.

For citation: Ponomareva M.L., Ponomarev S.N. Optimization of grain quality parameters for winter rye breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):320-327. DOI 10.18699/VJ19.496 (in Russian)

Введение

Мировое производство ржи в 2016 г. составило 13 млн тонн с площади посева 5.4 млн га. Основными районами возделывания этой культуры остаются умеренно холодные и малоплодородные зоны Центральной и Восточной Европы. Р. Шлегель утверждает, что рожь является преимущественно культурой европейского континента, поскольку на его долю приходится 85 % производимого зерна (Schlegel, 2013).

Россия – одно из крупнейших государств мира, занимающее второе место по производству зерна ржи после Германии. В нашей стране рожь занимает пятое место по объему производства зерна (2.0 %). За последние четыре десятилетия посевные площади озимой ржи в Российской Федерации сократились в шесть раз (с 7.75 млн га в 1970 г. до 1.25 млн га в 2016 г.). Негативный процесс привел к тому, что стал наблюдаться спад товарного предложения зерна ржи на рынке в связи со снижением объемов его производства как в Российской Федерации в целом, так и в отдельных регионах страны. Регрессионный анализ показал, что средняя ежегодная потеря валового сбора зерна этой культуры составляла 342 тыс. тонн. Главной причиной подобной ситуации был низкий спрос на зерно со стороны потребителей в связи с узкой сферой использования ржи (Пономарева и др., 2014).

Современное состояние производства ржи характеризуется сложностью и противоречивостью. Несмотря на нежелательные тенденции, происходящие в ржесейнии, Россия продолжает занимать лидирующие позиции как по площади посева, так и по валовому сбору зерна.

В связи с этим важной задачей селекции озимой ржи является комплексное изучение качественных свойств зерна для создания сортов хлебопекарного направления, производства кормов для животных, спирта и сырья для глубокой переработки (Гончаренко, 2014).

По мнению А.И. Алтухова (2012), рыночный спрос формируется не на продовольственное зерно в целом, а на партии разного качества и целевого использования. Согласно критериям ЕС, ржаное зерно обладает хлебопекарными качествами, если число падения более 120 с, максимальная вязкость, оцениваемая по высоте амилограммы больше 200 е. а. и максимальная температура пика клейстеризации больше 63 °С (Muenzing et al., 2014). Доля ржи, соответствующая указанным выше нормативам, варьировала от 25 до 100 % в течение 1992–2014 гг., составила в среднем 80 %. Это обусловлено тем, что качество ржи очень отличается по годам (Buehmer, 2005; Kusegova, 2009).

В отличие от пшеницы, где ключевую роль в определении качества играют концентрация белка, количество

и свойства клейковины, для ржи наиболее важные характеристики – содержание пентозанов и крахмала, а также активность фермента альфа-амилазы.

За последние 20 лет все больше исследователей стали уделять особое внимание наряду с традиционным изучением процесса деградации крахмала под действием эндогенных ферментов зерна количественной оценке содержания пентозанов (высокомолекулярных арабиноксиланов), их состоянию (водопоглощение, вязкость и растворимость), а также их деятельности и последующих модификациях (Bengtsson et al., 1992; Nowotna et al., 2007).

Качество ржаной муки, используемой для хлебопечения, зависит от трех главных факторов: 1) количества и функциональных свойств арабиноксиланов; 2) особенностей крахмала; 3) присутствия и концентрации ферментов, используемых для гидролиза.

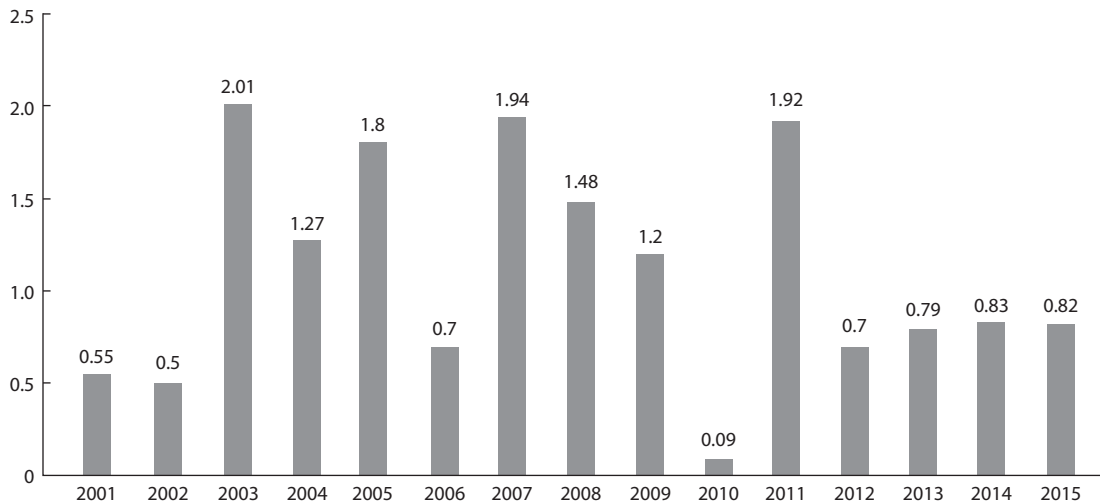
Многочисленными исследованиями подтверждено, что положительный эффект от общего содержания пентозанов и их водорастворимой фракции выражается в улучшении реологических показателей ржаного теста в процессе выпечки хлеба (D'Appolonia, 1973; Delcour, 1995; Weipert, 1995).

Несмотря на то, что биохимические исследования зерна ржи довольно широко ведутся в нашей стране и за рубежом, многие вопросы селекционной направленности разработаны слабо. При этом возникает необходимость развития комплексных исследований селекционного плана, в частности методических подходов к созданию сортов с высоким качеством зерна целевого назначения.

Цель настоящей работы – оценить фенотипическую изменчивость показателей качества зерна и выявить комплекс наиболее информативных показателей для селекции разнообразных по направлению использования сортов озимой ржи.

Материалы и методы

Работа выполнена в Татарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства – обособленном структурном подразделении Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН) в 2001–2015 гг. Опытные поля находятся в Лаишевском районе (55°38'60" с. ш., 49°18'25" в. д.) Республики Татарстан, находящейся на стыке Центральной России и Поволжья по среднему течению р. Волги и нижнему течению р. Камы. Агробиохимические показатели селекционного севооборота являются типичными для среднесуглинистой серой лесной почвы. Сумма активных температур в зоне исследования колеблется в пределах 1700–2000°. Период активной вегетации растений равен 130–



Гидротермический коэффициент в период налива и созревания зерна озимой ржи (июнь-июль) 2001–2015 гг.

135 дням. Среднегодовое количество осадков за год составляет 430–500 мм, за период май–сентябрь – 290–300 мм, но оно крайне неравномерно. Средняя высота снежного покрова за зиму составляет 35–45 см. Глубина промерзания почвы колеблется от 38 до 180 см.

Гидротермический коэффициент, характеризующий степень увлажнения территории в период с момента образования зерновки до полной спелости за 2001–2015 гг., показан на рисунке.

Из приведенных данных видно, что в наиболее ответственный период формирования качественных характеристик зерна складывались разнообразные условия: крайне засушливые (2002, 2010), сильно засушливые (2001, 2006, 2012), умеренно засушливые (2013, 2014, 2015), слабо засушливые (2009), влажные (2004, 2008) и избыточно влажные (2003, 2005, 2008, 2011) годы.

Для анализа было использовано 15 сортов озимой ржи конкурсного сортоиспытания, среди которых 9 – собственной селекции (Татарская 1, Эстафета Татарстана, Радонь, Огонек, Тантана, Спутник, перспективные популяции 8, 9, 10) и сорта других селекционных учреждений России (Антарес, Безенчукская 87, Саратовская 7, Марусенька, Татьяна, Роксана). Полевые эксперименты проведены на делянках 20 м², в четырех повторениях.

Всего оценивалось 20 параметров, определяющих качество зерна и сырьевую ценность. Технологические (масса 1000 зерен (МТЗ), натурная масса зерна (НЗ) и выравненность зерна (ВЗ)) и хлебопекарные свойства (органолептическая оценка пробной выпечки хлебцев) изучены по соответствующим методикам, принятым для государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (Методика..., 1988). У всех сортов исследовались параметры устойчивости к прорастанию зерна (число падения (ЧП), высота амилограммы (ВА), температура пика клейстеризации крахмала (ТПК)).

Размол зерна осуществляли на лабораторной мельнице Perten Instruments Laboratory Mill 3100. Для помола использована средняя проба зерна массой 300 г. Число падения определяли на приборе Falling Number 1500 (Hagberg-Perten) в соответствии с требованиями между-

народного стандарта ISO 3093 (2009), максимальную вязкость суспензии и температуру клейстеризации – на амилографе Brabender (ГОСТ ISO 7973-2013). Определение массовой доли белка (Б) проводили по методу Кьельдаля (ICC 167).

Вязкость водного экстракта (ВВЭ) ржаного шрота (кинематическая вязкость) оценивалась вискозиметрическим методом на приборе ВПЖ 1, согласно методике, опубликованной нами ранее (Пonomareva и др., 2017), соотношение шрота и воды было 1:5.

Корреляционный и дисперсионный анализы проведены с использованием пакета Excel 7.0. Критическое значение коэффициента корреляции при 5 % уровне значимости равно 0.444. В качестве математической модели для многомерного анализа применяли метод главных компонент (пакет программ AGROS 2.13), который позволил выделить коррелирующие и взаимозависимые показатели качества зерна и выбрать из них самые информативные, а также снизить их размерность. Для построения биplot графика использована программа XLSTAT 2018.6.54644.

Результаты

Показатели качества зерна обусловлены большой группой сцепленных генов, экспрессия которых подвержена значительному влиянию генетических и средовых факторов, а также их взаимодействию. Согласно полученным данным, доля дисперсии, характеризующая влияние условий года на изменчивость обсуждаемых признаков, очень высока и ранжируется в порядке убывания следующим образом: высота амилограммы – 82.5 %, температура пика клейстеризации – 80.3 %, число падения – 73.7 %, выравненность зерна – 77.7 %, масса 1000 зерен – 77.2 %, натурная масса зерна – 68.6 %, вязкость водного экстракта – 49.0 %, содержание белка – 35.2 % (табл. 1).

Наибольшее влияние выявлено по ВВЭ и Б – соответственно 34.8 и 27.8 %. Суммарный эффект генотипа и генотип-средовых взаимодействий объяснял 64.8 % общего варьирования содержания белка и 51 % фенотипической изменчивости ВВЭ зернового шрота сортов озимой ржи. Это означает, что среди исследуемых в течение 15 лет

Таблица 1. Доля влияния факторов генотипа, среды и их взаимодействия на изменчивость признаков качества зерна озимой ржи, 2001–2015 гг.

Признак	Доля влияния факторов, %		
	Генотип	Год	Взаимодействие генотип–год
Масса 1000 зерен	20.2	77.2	2.6
Натурная масса зерна	21.8	68.6	9.6
Выравненность зерна	15.5	77.7	6.8
Содержание белка	27.8	35.2	37.0
Высота амилограммы	12.0	82.5	5.5
Температура пика клейстеризации	6.9	80.3	12.8
Число падения	11.2	73.7	15.1
Вязкость водного экстракта	34.8	49.0	16.2

Таблица 2. Коэффициент парной корреляции признаков качества зерна у озимой ржи

Признак	МТЗ	НЗ	ВЗ	Б	ВА	ТПК	ЧП	ВВЭ	Н/Д*	ОХ**
МТЗ	1.000	0.757	0.929	-0.480	-0.107	-0.079	-0.315	-0.522	-0.118	-0.210
НЗ		1.000	0.753	-0.575	0.294	0.416	0.133	-0.141	0.346	-0.336
ВЗ			1.000	-0.504	-0.267	-0.151	-0.404	-0.624	-0.261	-0.116
Б				1.000	-0.189	-0.208	0.072	-0.200	-0.098	0.242
ВА					1.000	0.835	0.774	0.621	0.856	-0.563
ТПК						1.000	0.821	0.386	0.750	-0.397
ЧП							1.000	0.471	0.774	-0.162
ВВЭ								1.000	-0.211	0.450
Н/Д*									1.000	-0.449
ОХ**										1.000

* Н/Д – отношение высоты хлеба к диаметру; ** ОХ – объем хлеба.

генотипов имеется значительное сортовое разнообразие как по средней величине названных признаков, так и по конкретным значениям в отдельные годы испытаний.

Для селекционных целей важно знать не только генотипическую и средовую изменчивость, но и взаимосвязь между качественными показателями зерна ржи, выраженную коэффициентами парной корреляции (табл. 2).

Как и следовало ожидать, сопряженная изменчивость признаков МТЗ, НЗ и ВЗ имеет сильную корреляционную зависимость между собой ($r = 0.753–0.929$). Между ЧП и содержанием белка отсутствовала значимая связь ($r = 0.072$). ЧП коррелировало с ВА ($r = 0.774$) и ТПК ($r = 0.821$). Эти три признака находились в тесной связи с показателем отношения высоты хлеба к его диаметру: коэффициент парной корреляции ЧП с показателем отношения высоты хлеба к его диаметру составил 0.774, у признака «высота амилограммы» – $r = 0.856$, у признака «температура пика клейстеризации» – $r = 0.750$.

По годам мы наблюдали значительную вариацию тесноты корреляционной связи между анализируемыми признаками, поскольку их величина в сильной степени зависит от условий среды. Кроме того, при определении числа падения и показаний амилографа имеются существенные

методические различия, связанные с продолжительностью анализа и температурой определения вязкости. ВВЭ была взаимосвязана умеренной отрицательной связью с МТЗ ($r = -0.522$) и ВЗ ($r = -0.624$).

В селекции сортов целевого использования очень большое значение имеют знания корреляционных отношений между числом падения (основной показатель качества, нормируемый ГОСТом РФ) и такими дополняющими параметрами, как вязкость водно-мучной суспензии, регистрируемая на амилографе, и вязкость водного экстракта зернового шрота, определяемая на вискозиметрах.

Выявлена положительная сопряженность средней силы ВВЭ с высотой амилограммы ($r = 0.621$) и ЧП ($r = 0.471$) (см. табл. 2). Однако достоверная связь между ЧП, ВА и ВВЭ зернового шрота прослеживалась только в отдельные годы, либо отсутствовала совсем.

Эффективность селекции озимой ржи на качественные характеристики зерна определяется тем, на каком этапе селекционного процесса и по каким признакам идет отбор в питомниках, поскольку начальным этапом формирования технологических свойств зерна озимой ржи является селекция. Пороговые значения тестируемых показателей и результаты селекции будут на многие годы предопреде-

Таблица 3. Значения факторных нагрузок признаков качества зерна озимой ржи, 2001–2010 гг.

Признак	Главная компонента				
	1	2	3	4	5
Масса 1000 зерен, г	0.171	-0.459	0.331	0.287	-0.753
Натурная масса зерна, г/л	-0.498	-0.376	0.617	-0.035	-0.478
Выравненность зерна, %	-0.010	0.120	0.847	-0.341	-0.389
Белок, %	0.644	0.442	-0.372	0.383	0.324
Высота амилограммы, е. а.	-0.421	-0.129	0.890	-0.095	-0.073
Температура пика вязкости, °С	-0.723	0.197	0.637	-0.097	-0.151
Число падения, с	-0.871	0.101	0.468	-0.108	0.032
Вязкость водного экстракта, сантистокс	0.176	-0.669	0.679	0.196	-0.147
Поверхность хлеба, балл	0.122	-0.096	-0.918	-0.362	-0.050
Симметричность хлеба, балл	-0.780	-0.608	-0.018	-0.012	-0.145
Внешний вид, балл	0.160	-0.939	-0.008	0.306	0.001
Цвет корки, балл	-0.321	-0.850	-0.399	-0.039	-0.120
Цвет мякиша, балл	0.436	-0.794	-0.303	0.241	-0.170
Пористость, балл	-0.214	-0.452	-0.856	-0.027	-0.124
Эластичность, балл	0.616	0.025	-0.646	-0.120	-0.434
Вкус хлеба, балл	-0.018	0.106	0.049	-0.992	-0.039
Распльвчатость, отношение высоты к диаметру подового хлеба	-0.212	-0.454	0.767	-0.289	-0.277
Объем хлеба, мм	-0.082	0.958	-0.097	-0.054	0.252
Объем хлеба, балл	0.309	0.922	-0.170	0.087	-0.135
Общая хлебопекарная оценка, балл	0.200	-0.545	-0.407	0.673	-0.208
Дисперсия	3.738	6.175	6.263	2.246	1.577
Дисперсия, %	18.7	30.9	31.3	11.2	7.9
Накопленная дисперсия, %	18.7	49.6	80.9	92.1	100.0

лять качество зерна в соответствии с направлением его использования.

В селекционной работе мы анализировали восемь технологических параметров (включая ВВЭ) и двенадцать хлебопекарных показателей, получаемых при пробной выпечке хлебцев. Последние характеристики отличаются трудоемкостью, требуют значительного количества зерна и имеют некоторую оценочную субъективность, вследствие чего число анализируемых сортообразцов обычно ограничено. Если хотя бы часть перекрывающихся (избыточных) признаков будет отсеяна, это, несомненно, приведет к оптимизации селекционного процесса на качество зерна. В условиях возрастающего объема селекционного материала и скудности материальных ресурсов выражение множества показателей качества через меньшее их число чрезвычайно важно. Фенотипическая оценка изучаемых показателей качества за годы исследований (средние значения для 15 сортов озимой ржи) приведена в Приложении 1¹.

На основе анализа вычисленной корреляционной матрицы получены вклады, с которыми признаки включены в главные компоненты, т. е. новые характеристики каче-

ства. Главные компоненты отражают несколько причин изменчивости качественных характеристик, а их значимость оценивается по доле дисперсии в общей дисперсии признака.

Значения факторных нагрузок на пять главных компонент показаны в табл. 3. Исходя из представленных данных, первая компонента описывала 18.7 % общей дисперсии. Мы назвали ее «белково-амилазной характеристикой зерна». Две следующие главные компоненты переменных имели примерно равные дисперсии: 30.9 и 31.3 %. Для визуализации группы тесно коррелирующих признаков метод главных компонент дополнен биplot анализом взаимосвязей признаков качества в системе двух основных компонент с наибольшей долей в дисперсии (Приложение 2). Для оптимизации оценки качественных характеристик желательнее выбрать показатели из разных четвертей графика.

Вторая компонента охватывала признаки, обуславливающие «органолептические свойства хлеба»: внешний вид, симметричность, цвет корки и мякиша, объемные характеристики.

Третья компонента интегрировала в себе мукомольные качества (натурная масса, выравненность) и формоустойчивость хлеба, основанная на вязких свойствах водного

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx6.pdf>

экстракта и клейстеризованной суспензии (высота амилограммы и температура максимальной вязкости). Это доказывает, что перечисленные признаки изменяются согласованно. Независимо от генотипа, сорта сходным образом реагируют на изменение внешних факторов, но знаки их факторных нагрузок не одинаковы. Структура первых трех главных компонент оставалась неизменной при варимакс-вращении, что свидетельствует об их взаимной нескоррелированности.

Остальные главные компоненты ранжировались по мере уменьшения описываемых ими дисперсий. На четвертую компоненту приходилось 11.2 % общей дисперсии, где превалировали вкус и общая хлебопекарная оценка. Последнюю компоненту определяла масса 1000 зерен.

Необходимо отметить важность признака «вязкость водного экстракта», который присутствовал в двух компонентах, имеющих значительную долю изменчивости. Отсюда следует, что в селекционных исследованиях показатель ВВЭ может стать базовым, так как является обобщающей характеристикой хлебопекарных свойств зерна, в которой учтены многие слагающие их параметры.

Следующий шаг исследований – выявление наиболее информативных показателей, которые можно применять на самых ранних этапах селекции. По нашему убеждению, ими должны стать: белок, число падения, вязкость водного экстракта, масса 1000 зерен. Эти показатели приняты за основу при оценке и браковке селекционного материала по качеству зерна. Показатели, выявляемые в ходе традиционного хлебопекарного анализа, вполне заменимы легко определяемой вязкостью.

Обсуждение

В результате проведенных исследований сортов озимой ржи различного эколого-географического происхождения на протяжении 15 различающихся лет испытания установлено, что наибольшую генотипическую изменчивость имеют признаки Б и ВВЭ. Варьирование содержания белка на 27.8 % от общей дисперсии признака в исследуемом комплексе определялось генотипом, на 37 % взаимодействием генотип–среда и на 35.2 % условиями года. По вязкости водного экстракта одноименные источники варьирования составили 34.8, 16.2 и 49 % соответственно. Следовательно, названные признаки (Б и ВВЭ) должны быть, в первую очередь, предметом фенотипической оценки в селекционном процессе. Фенотипическая изменчивость критериев углеводно-амилазного комплекса и активности α -амилаз (ЧП, ВА, ТПК) и технологических параметров (МТЗ, ВЗ, НЗ) определялась преимущественно (68.6...82.5 %) средовыми факторами, что значительно превышает влияние генотипа (6.9...21.8 %). В исследовании был взят пятнадцатилетний временной отрезок, в который попали годы, значительно различающиеся по гидротермическому режиму в период созревания зерна (молочная и восковая спелость). Поэтому погодные условия сыграли первостепенную роль в вариабельности качества зерна, а различия между сортами на фоне влияния средовых факторов были относительно невелики.

При исследовании 19 различных гибридных и популяционных сортов, выращенных в течение трех лет, Н.В. Hansen с коллегами (2004) обнаружили, что вариация

концентрации белка зависела в основном от генотипа, а масса 1000 зерен и содержание пентозанов в большей степени – от года испытания. Авторы выявили также, что свойства крахмала, измеряемые ЧП и ТПК, были сильнее подвержены влиянию условий года сбора урожая. В.М. Бебякин (2008) предлагает пересмотреть подходы к тестированию селекционного материала, поскольку роль углеводно-амилазного комплекса в определении хлебопекарных качеств ржи преувеличена. Согласно проведенным нами исследованиям, высокая средовая вариация показателей ЧП, ВА и ТПК затрудняет выявление перспективных форм.

Встает резонный вопрос, на какие признаки следует ориентироваться в селекции на целевое использование – хлебопечение или кормовые цели? Обобщение ряда публикаций показывает, что имеются умеренно сильные положительные взаимосвязи между ЧП и ТПК и между ЧП и вязкостью. В то же время не выявляются или существуют слабые корреляции между концентрацией белка и числом падения, а также между максимальной амилографической вязкостью и температурой клейстеризации (Rattunde et al., 1994; Gomez et al., 2009; Laidig et al., 2017). А. Repeckiene с коллегами (2001) обнаружили, что высокие значения ЧП соответствовали высоким значениям вязкости клейстеризованной суспензии ($r = 0.87$). В исследованиях А.А. Гончаренко с коллегами (2002), напротив, показано, что, несмотря на положительную корреляцию ЧП с ВА ($r = 0.56$), содержанием водорастворимых пентозанов ($r = 0.46$) и качеством мякиша формового хлеба ($r = 0.53$), оценивать качество ржаного хлеба только по ЧП можно лишь косвенно. Это обусловлено тем, что хлебопекарные качества зерна ржи и качество конечного продукта (ржаной хлеб) определяются большой группой свойств: вязкость по амилографу и уровень активности амилолитических ферментов отражают особенности ретроградации крахмала, а содержание водорастворимых пентозанов, регистрируемое по ВВЭ, – водопоглощительную способность различных компонентов набухания ржаной муки. При выпечке ржаного теста пористая и эластичная структура мякиша поддерживается благодаря высокой вязкости слизистых веществ, закрепляемых клейстеризованным крахмалом. Изменение крахмала при клейстеризации имеет решающее значение для образования пористого мякиша хлеба. Структура теста, создаваемая главным образом пентозанами, формируется при температуре 30 °С, тогда как роль крахмала превалирует при температурах выше 45 °С, поскольку крахмал ржи образует желеобразную структуру при более низкой температуре, чем крахмал пшеницы (Gudmundsson, Eliasson, 1991). Поэтому особый интерес представляет создание методами селекции сортов ржи с контрастной ВВЭ. Разнонаправленный отбор позволяет изменить биохимическую структуру некрахмальных полисахаридов в соответствии с задачами селекции: 1) увеличить содержание трудногидролизуемых арабиноксиланов, улучшив хлебопекарные свойства, или 2) снизить их долевое участие, улучшив кормовую ценность зерна (Гончаренко, 2014).

ВВЭ не связана с крахмалом ржи, клейстеризационные свойства которого проявляются под влиянием температурного фактора, а также с активностью амилолитических

ферментов, гидролизующих его, поэтому не прослеживается достоверная взаимосвязь между ВВЭ и показателями, определяющими вязкость водно-мучной суспензии ($r = 0.03...-0.29$) (Гончаренко и др., 2005).

В наших исследованиях выявлена положительная сопряженность средней силы вязкости водного экстракта с высотой амилограммы ($r = 0.621$) и числом падения ($r = 0.471$).

Объяснением неординарных результатов, полученных разными авторами в отношении ВВЭ, служат несколько причин. Во-первых, взаимосвязи между параметрами технологической и хлебопекарной оценки зерна, муки и факторами среды произрастания неоднозначны. Это связано с тем, что каждый признак формируется под действием множества внешних факторов и сам по себе является интегральной характеристикой группы свойств и признаков, изменение которых может иметь как однонаправленные, так и противоположные векторы, причем значимость их далеко не одинакова. Во-вторых, разные авторы при анализе ВВЭ используют неодинаковые методики и аппаратуру для ее определения, что также отражается на получаемых результатах.

Заключение

С помощью метода главных компонент проведена редукция анализируемых показателей качества зерна. Поиск структуры в матрице нагрузок и использование варимакс-вращения в пространстве главных компонент позволили дать их интерпретацию: белково-амилазная характеристика, органолептические свойства хлеба, мукомольные качества и формоустойчивость, вкус и общая хлебопекарная оценка, масса 1000 зерен. Для селекционной оценки озимой ржи предлагается использовать четыре интегральных показателя, имеющих наибольшую весовую нагрузку: содержание белка, число падения, вязкость водного экстракта и масса 1000 зерен.

Результаты наших исследований показали необходимость обязательной оценки селекционного материала по содержанию белка и вязкости водного экстракта. Чем раньше начинается селекция на эти качественные характеристики, а не только на урожайность, тем результативнее будет работа по созданию высококачественных сортов. Кинематическая вязкость вытяжек из ржаного шрота должна стать важным селекционным показателем как для определения хлебопекарных качеств ржи, так и для выявления кормовых достоинств зерна.

Среди множества направлений в работах по селекции ржи на первый план выдвигается следующее требование – соответствие качества зерна требованиям рынка. Каждому сорту должны быть присущи свои генетически детерминированные технологические свойства, позволяющие выявить его пригодность как сырья для конкретной отрасли. Только селекционная работа позволяет направленно создавать сорта для целевого использования и расширения технологий, связанных с переработкой ржи. Именно в этом нам видится реновация ржи – переоткрытие ржи с новых позиций, что должно привести к изменениям в отношении к культуре в целом и ее производству.

На основании многолетней фенотипической оценки проведена оптимизация показателей качества зерна озимой ржи и обоснован полноценный комплекс признаков (белок, число падения, вязкость водного экстракта, масса 1000 зерен), который будет обеспечивать объективность и полноту оценки создаваемого селекционного материала.

мой ржи и обоснован полноценный комплекс признаков (белок, число падения, вязкость водного экстракта, масса 1000 зерен), который будет обеспечивать объективность и полноту оценки создаваемого селекционного материала.

Список литературы / References

- Алтухов А.И. Развитие рынка продовольственного зерна в России. Нива Поволжья. 2012;4(25):2-12.
[Altukhov A.I. The development of the food grain market in Russia. Niva Povolzhya = Volga Region Farmland. 2012;4(25):2-12. (in Russian)]
- Бебякин В.М. Методические подходы к оценке качества зерна озимой ржи в процессе селекции. Озимая рожь: селекция, семеноводство, технологии и переработка. Саратов, 2008;90-94.
[Bebyakin V.M. Methodology of the evaluation of winter rye grain quality during breeding. Winter Rye: Breeding, Production, Technology and Processing. Saratov, 2008;90-94. (in Russian)]
- Гончаренко А.А. Актуальные вопросы селекции озимой ржи. М., 2014.
[Goncharenko A.A. Topical Issues of Winter Rye Breeding. Moscow, 2014. (in Russian)]
- Гончаренко А.А., Беркутова Н.С., Тимошенко А.С. Сравнительная оценка сортов озимой ржи по различным показателям качества зерна. Докл. РАСХН. 2002;5:3-7.
[Goncharenko A.A., Berkutova N.S., Timoshenko A.S. Comparative evaluation of winter rye cultivars with regard to various grain quality indicators. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2002;5:3-7. (in Russian)]
- Гончаренко А.А., Исмагилов Р.Р., Беркутова Н.С., Ванюшина Т.Н., Аюпов Д.С. Оценка хлебопекарных качеств зерна озимой ржи по вязкости водного экстракта. Докл. РАСХН. 2005;1:6-9.
[Goncharenko A.A., Ismagilov R.R., Berkutova N.S., Vanyushina T.N., Ayupov D.S. Evaluation of the bread-making quality of rye grain by viscosity of water extract. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2005;1:6-9. (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (технологическая оценка зерновых, крупяных и зернобобовых культур). М., 1988.
[Methods of the State Testing of Agricultural Crop Varieties: Technological Evaluation of Grain, Cereal, and Leguminous Crops. Moscow, 1988. (in Russian)]
- Пономарева М.Л., Пономарев С.Н., Тагиров М.Ш. Динамика факторов производства и использования зерна ржи в Российской Федерации и Республике Татарстан. Земледелие. 2014;8:6-9.
[Ponomareva M.L., Ponomarev S.N., Tagirov M.Sh. Dynamics of indices of rye grain production and use in the Russian Federation and the Republic of Tatarstan. Zemledelie = Agriculture. 2014;8:6-9. (in Russian)]
- Пономарева М.Л., Пономарев С.Н., Тагиров М.Ш., Гильмуллина Л.Ф., Маннапова Г.С. Генотипическая изменчивость содержания пентозанов в зерне озимой ржи. С.-х. биология. 2017;52(5):1041-1048.
[Ponomareva M.L., Ponomarev S.N., Tagirov M.Sh., Gilmullina L.F., Mannapova G.S. Pentosan content genotypic variability in winter rye grain. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(5):1041-1048. DOI 10.15389/agrobiol.2017.5.1041rus. (in Russian)]
- Bengtsson S., Andersson R., Westerlund E., Aman P. Content, structure and viscosity of soluble arabinoxylans in rye grain from several countries. J. Sci. Food Agric. 1992;58:331. DOI 10.1002/jsfa.2740580307.
- Bruemmer J.M. Rye and its baking behavior. Cereal Technol. 2005;59:95-106.

- D'Appolonia B.L. Comparison of pentosans extracted from conventional and continuous bread. *Cereal Chem.* 1973;50:27.
- Delcour J.A. Structure of water- and alkali-extractable rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans. *International Rye Symposium: Technology and Products*. Espoo: VTT Biotechnology and Food Reserch. 1995; 161:103-111.
- Gomez M., Pardo J., Oliete B., Caballero P.A. Effect of the milling process on quality characteristics of rye flour. *J. Sci. Food Agric.* 2009; 89:470-476. DOI 10.1002/jsfa.3475.
- Gudmundsson M., Eliasson A.C. Thermal and viscous properties of rye starch extracted from different varieties. *Cereal Chem.* 1991;68: 172-177.
- Hansen H.B., Moller B., Andersen S.B., Jorgensen J.R., Hansen A. Grain characteristics, chemical composition, and functional properties of rye (*Secale cereale* L.) as influenced by genotype and harvest year. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:2282-2291. DOI 10.1021/jf0307191.
- Kucerova J. Effects of location and year on technological quality and pentosan content in rye. *Czech J. Food Sci.* 2009;27:418-424.
- Laidig F., Piepho H.P., Rentel D., Drobek T., Meyer U., Huesken A. Breeding progress, variation, and correlation of grain and quality traits in winter rye hybrid and population varieties and national on-farm progress in Germany over 26 years. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130(5):981-998. DOI 10.1007/s00122-016-2810-3.
- Muenzing K., Huesken A., Unbehend G., Begemann J., Arent L., Wolf K., Lindhauer M.G. Die Qualität der deutschen Roggenernte 2014. *Mühle Mischfutter.* 2014;155:745-754.
- Nowotna A., Buksa K., Gambus H., Ziobro R., Krawontka J., Sabat R., Grysztyn A. Retrogradation of rye starch pastes. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2007;6(4):95-102.
- Rattunde H.F., Geiger H.H., Weipert D. Variation and covariation of milling-and baking-quality characteristics among winter rye single-cross hybrids. *Plant Breed.* 1994;113(4):287-293. DOI 10.1111/j.1439-0523.1994.tb00738.x.
- Repeckiene A., Eliasson A.-C., Juodeikiene G., Gunnarsson E. Predicting baking performance from rheological and adhesive properties of rye meal suspensions during eating. *Cereal Chem.* 2001;78:193-199. DOI 10.1094/CCHEM.2001.78.2.193.
- Schlegel Rolf H.J. *Rye: Genetics, Breeding and Cultivation*. London: CRC Press Taylor and Francis Group, 2013.
- Weipert D. Processing performance of rye as influenced by sprouting resistance and pentosans contents. *International Rye Symposium: Technology and Products*. Espoo: VTT Biotechnology and Food Research. 1995;161:39-49.

ORCID ID

M.L. Ponomareva orcid.org/0000-0002-1648-3938
S.N. Ponomarev orcid.org/0000-0001-8898-4435

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН АААА-А18-118031390148-1 и частично при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-29-08023 офи_м.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.08.2018. После доработки 06.01.2019. Принята к публикации 11.01.2019.

Направленная селекция психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы

И.И. Новикова , Ю.А. Титова , И.В. Бойкова, И.Л. Краснобаева

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

 e-mail: irina_novikova@inbox.ru; juli1958@yandex.ru

Штаммы рода *Trichoderma* – природные биодеструкторы растительных остатков, высокоактивные антагонисты почвенных фитопатогенов и фиторегуляторы с широчайшим диапазоном оптимальных для своего развития условий, масштабно используются в создании биопрепаратов. Огромное значение в северных регионах России, особенно при выращивании озимых культур, имеет способность штамма микроорганизма, используемого в агротехнологиях, сохранять жизнеспособность и целевую биологическую активность при низких температурах. В связи с этим цель данной работы – отбор психротолерантного штамма *T. asperellum* для ускоренной утилизации основных полимеров растительных остатков и оздоровления почвы при низкой температуре, а также оценка его активности в лабораторных и полевых условиях. В процессе работы решали задачи по отбору психротолерантных штаммов *T. asperellum* с высокой целлюлозолитической активностью; дальнейшей направленной селекции психрофильных штаммов, способных к быстрому росту, активной колонизации растительного субстрата и высокой споропродуктивности при 4–8 °С; оценке целевой активности отселектированного психрофильного штамма в качестве целлюлозолитика и антагонистической активности в отношении фитопатогенов зерновых культур; получению лабораторных образцов препаративных форм путем глубинно-поверхностного культивирования на нестерильном торфе и мультikonверсионных отходах производства съедобных грибов при их последовательном культивировании на одном и том же субстрате и оценке их эффективности в полевых мелкоделяночных опытах. Использовали методы культивирования и создания инокулюма, определения споропродуктивности, модифицированной влажной камеры, оценки антагонистической активности и качества биопрепаратов, организации полевых испытаний, количественных оценок потерь биомассы и содержания целлюлозы и лигнина. Селекцию активного психрофильного штамма для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы осуществили в процессе четырехступенчатого скрининга 29 штаммов *T. asperellum* из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР) с высокими целлюлозолитической и антагонистической активностями. По показателям линейной скорости роста, антагонистической и гиперпаразитической активности при 4–8 °С, высокой скорости колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы отобран перспективный психрофильный штамм *T. asperellum* Г-034 для наработки на его основе лабораторных образцов биопрепаратов и проведения полевых опытов. В полевых испытаниях выявили активное разложение пожнивных остатков кукурузы под воздействием *T. asperellum* Г-034, приводящее к биодеструкции более 80 % целлюлозы и более 20 % лигнина, а за 12 месяцев – к полной потере растительными остатками интактного состояния. Максимальные потери биомассы пожнивными остатками кукурузы за 12 месяцев составили более 70 %. Штамм-продуцент *T. asperellum* Г-034 находился в активном состоянии после перезимовки в полевых условиях в количестве $\times 10^4$ КОЕ/г, приводящем к нарастанию титра с сезонными возрастанием температуры и расширением доступности трофической базы.


Ключевые слова: *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР; направленная селекция; психротолерантный штамм-продуцент; психрофильные штаммы-продуценты; мультikonверсионные биопрепараты; биопрепараты для оздоровления почвы; биодеструкторы пожнивных остатков; целевая активность штаммов-продуцентов; эффективность биопрепаратов; разложение растительных остатков.

Для цитирования: Новикова И.И., Титова Ю.А., Бойкова И.В., Краснобаева И.Л. Направленная селекция психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* Г-034 ВИЗР для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):328-336. DOI 10.18699/VJ19.497

Controlled breeding of the psychrophilic strain G-034 VIZR of *Trichoderma asperellum* for fast crop residues' polymers utilization and soil enhancement

I.I. Novikova , J.A. Titova , I.V. Boykova, I.L. Krasnobaeva

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

 e-mail: irina_novikova@inbox.ru; juli1958@yandex.ru

Genus *Trichoderma* strains as the natural plant residues' biodestructors, highly active antagonists of soil phytopathogens and phyto regulators with the widest range of optimum conditions for their development, are widely used in biologics development. Of particular importance in Russia's northern regions, especially in winter crop cultivation, is the ability of a

microorganism's strain used in agro-technologies to maintain viability and target biological activity at low temperatures. In this connection, this work purpose is to select a psychrotolerant strain of *T. asperellum* for the rapid crop residues' polymer utilization and soil enhancement at low temperature, as well as to evaluate its activity under laboratory and field conditions. In the work process, the following tasks were addressed: selecting psychrotolerant strains of *T. asperellum* with high cellulolytic activity; further controlled breeding of psychrophilic strains capable of rapid growth, active colonization of plant substrates and high sporulation at 4–8 °C; evaluating the target activity of the selected psychrophilic strain as a cellulolytic as well as antagonistic activity against cereal pathogens; obtaining laboratory samples of bioformulations by deep-surface cultivation on non-sterile peat and multirecycled wastes from the edible mushrooms production and assessing their efficacy in field small-plot trials. The methods for inoculum cultivation, sporulation capacity determination, modified wet chamber, estimating antagonistic activity and biologics' quality, field small-plot trials management, quantitative estimates of biomass losses, cellulose and lignin content were used in the work. The active psychrophilic strain for the rapid crop residues' polymer utilization and soil enhancement controlled breeding was selected during a four-step screening of 29 *T. asperellum* strains from All-Russian Research Institute of Plant Protection (VIZR) State Microorganisms' Collection with high cellulolytic and antagonistic activities. In terms of linear growth rate, antagonistic and hyperparasitic activities at 4–8 °C, a high rate of wheat and maize stubble residues' colonization, a perspective psychrophilic strain G-034 of *T. asperellum* was selected for developing the laboratory samples of biologics and for running field trials. In small-plot trials, the active maize crop residues' decomposition under the *T. asperellum* G-034 influence was revealed, resulting in the complete loss of plant intact state in 12 months due to more than 80 % cellulose and 20 % lignin biodestruction. The maximum loss of maize crop residues biomass for 12 months was more than 70 %. The *T. asperellum* strain G-034 was active after field hibernation in an amount of $\times 10^4$ cfu/g, resulting in a titer increase with seasonal temperature rising and the trophic base bioavailability growth.

Key words: *Trichoderma asperellum* G-034 VIZR; controlled breeding; psychrotolerant strain-producer; psychrophilic strain-producers; multirecycled biologics; biologics for soil inancement; stubble residues' biodestructors; producer strains' target activity; biologics' efficacy; plant residues' destruction.

For citation: Novikova I.I., Titova J.A., Boykova I.V., Krasnobaeva I.L. Controlled breeding of the psychrophilic strain G-034 VIZR of *Trichoderma asperellum* for fast crop residues' polymer utilization and soil enhancement. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):328-336. DOI 10.18699/VJ19.497 (in Russian)

Введение

Улучшению структуры почвы и накоплению гумуса способствует запахивание пожнивных остатков или внесение соломы на поля. При этом снижается эрозия почвы, улучшаются водный и воздушный режимы, ее впитывающая способность, а также стимулируются процессы азотфиксации. При разложении пожнивных остатков в почву поступает на 1 га около 12–15 кг азота, до 7 кг фосфора, 30 кг калия, 4 кг натрия (Лабынцев, Целуйко, 2013). Пожнивные остатки – источник питания почвенных микроорганизмов, которые в значительной степени обеспечивают доступность отдельных нутриентов для сельскохозяйственных растений (Зиганшин и др., 2016). Вместе с тем растительные остатки на полях являются резерватом и источником фитопатогенов – возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Без создания необходимого пула антагонистов, способствующих восстановлению и усилению супрессивности почвы, невозможно стабилизировать фитосанитарную ситуацию в агроценозах, сохранить плодородие и получить высокие урожаи (Новикова, 2007, 2016).

Решению этой проблемы способствует все возрастающее использование микробиологического метода в защите растений. Современные биопрепараты обладают ростостимулирующей активностью, их продуценты выделяют множество биологически активных веществ, подавляющих развитие популяций фитопатогенов, повышающих болезнестойчивость и урожайность сельскохозяйственных растений (Whipps, Lumsden, 2001; Садыкова и др., 2010). Успешность применения микробиологического метода зависит от эффективности агентов биоконтроля. Для создания биопрепаратов наибольший интерес представляют виды и штаммы микроорганизмов, обладающие разнообразием метаболических процессов,

неприхотливостью к условиям культивирования, высокой технологичностью и экологической пластичностью (Nagan et al., 1996; Новикова, 2007, 2016; Зиганшин, Сироткин, 2017). Всеми этими качествами обладают штаммы рода *Trichoderma* – природные биодеструкторы растительных остатков и других целлюлозосодержащих материалов, занимающие особое положение как продуценты полифункциональных биопрепаратов (Коломбет и др., 2001; Boureghda, Renane, 2011). Они способны быстро осваивать органический субстрат путем активного разложения простых и сложных соединений, в десятки раз ускоряя процесс их минерализации и улучшая физико-химические свойства почвы (Алимова, 2005; Vheemaraya et al., 2011; Рязанова и др., 2014). Благодаря высокой антагонистической и гиперпаразитической активности в отношении почвообитающих возбудителей болезней, штаммы *Trichoderma* в 2.5–3 раза снижают заболеваемость растений, повышают их болезнестойчивость, проявляют фиторегуляторную активность за счет стимуляции развития азотфиксирующих бактерий, способствуя обогащению почвы аминным азотом, связыванию солей минеральных удобрений, усилению мобилизации фосфора и калия (Садыкова и др., 2009; Alamri et al., 2012; Devi et al., 2012; Heidi, Abo-Elnaga, 2012; Parra, Maniscalco, 2012). Особое значение в условиях северных регионов России имеет способность штамма микроорганизма, используемого в агротехнологиях, сохранять жизнеспособность и целевую биологическую активность при низких температурах, особенно при выращивании озимых культур.

Целью работы были отбор психрофильного штамма *Trichoderma asperellum* для ускоренной утилизации основных полимеров растительных остатков, оздоровления почвы при низкой температуре и оценка его активности в лабораторных и полевых условиях. Для этого решались

следующие задачи: отбор из «Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей» (ГКМ) Центра коллективного пользования научным оборудованием «Инновационные технологии защиты растений» (ВИЗР) ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР) ФАНО, сайт <http://www.vizrspb.chat.ru> (Постановление Правительства РФ № 725-47 от 24 июня 1996 г., приказ по Министерству сельского хозяйства и Правительству РФ от 15 августа 1996 г., зарегистрирована в WFCC WDCM 760 (Япония) 28.01.98) психрофилерантных штаммов *T. asperellum* с высокой целлюлозолитической активностью; дальнейшая направленная селекция психрофильных штаммов, способных к быстрому росту, активной колонизации растительного субстрата и высокой споропродуктивности при 4–8 °С; оценка целевой активности отобранного психрофильного штамма в качестве целлюлозолитика при колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы, а также антагонистической активности в отношении фитопатогенов зерновых культур; получение лабораторных образцов препаративных форм (ЛЮ) путем глубинно-поверхностного культивирования на различных органических субстратах, в том числе отходах производства съедобных грибов, и оценка их эффективности в полевых мелкоделяночных опытах.

Материалы и методы

Работу проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений с использованием чистых культур из ГКМ ФГБНУ ВИЗР. Объектами исследований были штаммы *T. asperellum* с высокой целлюлозолитической и антагонистической активностью, тест-объектами служили штаммы фитопатогенов зерновых культур – возбудители наиболее вредоносных болезней, и сухие пожнивные остатки пшеницы и кукурузы (табл. 1). Для получения и хранения чистых культур микромицетов для лабораторных опытов *in vitro* использовали питательные среды: синтетическую среду Чапека (ООО «Биокомпас-С», Углич, Россия); полусинтетические (селективные) агаризованные среды на основе растительных экстрактов (картофеля, зерна злаков и т. п.). Растительный субстрат предварительно измельчали и кипятили в течение часа в объеме 200 г/л, фильтровали, восстанавливали до исходного объема с добавлением агар-агара (20 г/л), в некоторых случаях – с добавлением сахарозы (20 г/л). Режим стерилизации для всех сред, содержащих сахара в низкомолекулярной форме, – 30 мин при 0.5–0.8 атм (Методы..., 1982).

Материалами исследований были субстраты для опытно-промышленного культивирования съедобного макромицета *Lentinula edodes* (шии-таке) на основе отходов техногенной сферы, блоки с развивающимся мицелием шии-таке, а также отработанные в процессе жизнедеятельности последнего целлюлозо-лигнинсодержащие отходы. Кроме того, материалами служили мультиконверсионные субстраты, полученные после последовательного культивирования на отработанном отходе производства плодовых тел шии-таке другого вида съедобного макромицета – *Pleurotus ostreatus* НК-35 (вешенка). Используемые для мультибиоконверсии субстраты в интактном и отработанном состояниях имеют оформленный состав

(табл. 2). В отработанных (конверсионных) субстратах все ингредиенты (см. табл. 2) находятся в переработанном предыдущим участником биоконверсии состоянии, происходит накопление водорастворимых легко усваиваемых веществ – аминокислот, витаминов, моносахаридов и др.

При этом наблюдается сужение соотношения азота к углероду, что делает отработанные субстраты наиболее доступными для последующей утилизации как макро-, так и микромицетами и бактериями (Бисько и др., 1986; Бисько, Дудка, 1987; Титова, 2013; Титова и др., 2014, 2017а–в). Превалировал в конверсионных субстратах грибной белок в виде мицелия предыдущего участника биоконверсии, пронизывающего практически всю толщу используемого субстрата (как компонент в табл. 2).

В работе использовали следующие методы исследований: культивирования и создания инокулюма, определения споропродуктивности (титра), модифицированной влажной камеры, оценки антагонистической активности, оценки качества лабораторных образцов биопрепаратов, организации полевых испытаний, количественных оценок потерь биомассы и содержания целлюлозы и лигнина.

Культуры микромицетов поддерживали на агаре Чапека с обеспечением необходимой чистоты материала. Чистые культуры вводили в работу по созданию инокулюмов путем жидкофазной и твердофазной ферментаций при температуре 24–28 °С. Для определения линейного роста изучаемый штамм высевали в центр поверхности агаризованной питательной среды одинакового слоя многочисленным инокулюмом практически однородной плотности. Культивирование вели в условиях холодильной камеры при 4–8 °С. Через определенные промежутки времени (двое суток) измеряли диаметр колоний в двух взаимоперпендикулярных направлениях от точки инокулирования до конца зоны роста мицелия. Повторность пятикратная. Расчетные параметры линейного роста мицелия и споропродуктивности: дифференциальная скорость роста мицелия, представляемая как производная функции приращения диаметра в единицу времени (мм/сут); время наступления спороношения; споропродуктивность (Методы..., 1982).

Определение споропродуктивности штаммов проводили с помощью создания маточных суспензий колониеобразующих единиц (КОЕ) в единице объема, массы и т. п., в которых число КОЕ подсчитывали прямым способом в камере Горяева или путем последовательных десятичных разведений маточной суспензии. Наиболее оптимальное для количественного и качественного учета споропродуктивности серийное разведение маточной суспензии КОЕ исследуемого штамма высевали на агаризованные среды (Лилли, Барнетт, 1953; Методы..., 1982). Для оценки целевой активности штаммов *T. asperellum* при колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы использовали метод модифицированной влажной камеры в чашках Петри. Кусок фильтровальной бумаги обрезали по размеру камеры и помещали в ее основание. Чашки Петри с фильтровальной бумагой стерилизовали автоклавированием при 132 ± 2 °С в течение 1 ч. Далее образцы (по 10 г сухих пожнивных растительных остатков пшеницы и кукурузы) помещали поверх фильтровальной бумаги так, чтобы отрезки стеблей закрыли основание, но

Таблица 1. Штаммы микромицетов, использованные в работе

Вид микроорганизма	Характеристика	Происхождение
<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. et Nirenberg (29 штаммов)	Депонирован, паспортизован, в ГКМ ФГБНУ ВИЗР	Ленинградская область (ЛО), естественные условия (ЕУ)
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. (2 штамма – 173, 11Д)	Депонирован, паспортизован, в ГКМ ФГБНУ ВИЗР (грибы <i>Fusarium</i>)	ЛО, ЕУ (корневая гниль пшеницы и ячменя)
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	»	»
<i>F. graminearum</i> Schwabe	»	ЛО, ЕУ (в комплексе фузариоза колоса)
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb., продуцент микотоксинов	»	»
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl., продуцент микотоксинов	Депонирован, паспортизован, в ГКМ ФГБНУ ВИЗР	ЛО, ЕУ (в комплексе листовых пятнистостей злаков)
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kuhn.	»	ЛО, ЕУ (корневая гниль пшеницы и ячменя)
<i>Cochliobolus sativus</i> (S. Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur	»	ЛО, ЕУ (в комплексе листовых пятнистостей и корневых гнилей злаков)

Таблица 2. Состав интактных (для инокуляции съедобными базидиомицетами) и мультikonверсионных субстратов

Вид съедобного макромицета	Субстрат*	
	для инокуляции	отработанный (конверсионный)
<i>L. edodes</i>	Опилки лиственных пород деревьев, отруби пшеничные (10 % от веса субстрата), CaCO ₃ (мел) 0.1 %, CaSO ₄ × 7H ₂ O (гипс) 1 %	Опилки лиственных пород деревьев, отруби пшеничные (10 % от веса субстрата), CaCO ₃ (мел) 0.1 %, CaSO ₄ × 7H ₂ O (гипс) 1 %, мицелий шии-таке в толще субстрата
<i>L. edodes</i> + <i>P. ostreatus</i> НК-35	Опилки лиственных пород деревьев, отруби пшеничные (10 % от веса субстрата), CaCO ₃ (мел) 0.1 %, CaSO ₄ × 7H ₂ O (гипс) 1 %, мицелий шии-таке в толще субстрата	Опилки лиственных пород деревьев, отруби пшеничные (10 % от веса субстрата), CaCO ₃ (мел) 0.1 %, CaSO ₄ × 7H ₂ O (гипс) 1 %, мицелий шии-таке и вешенки в толще субстрата

* Процентное содержание компонентов от массы субстрата 70 %-й влажности.

не накладывались друг на друга. Добавляли достаточное количество стерильной дистиллированной воды, чтобы образец был погружен в воду. Затем чашки закрывали и инкубировали 1 сут при комнатной температуре для выпитывания образцами максимального количества воды. На следующий день остатки воды сливали, образцы инокулировали 2 мл суспензии исследуемого штамма с титром × 10⁸ КОЕ/мл. Образцы инкубировали в течение 14 сут в термостатированных условиях как при 24–28 °С, так и при 4–8 °С в темноте. В последующие сутки воды не добавляли. Влажные камеры ежедневно просматривали в течение периода инкубации, на ранних сроках развития с использованием лупы с увеличением ×16–54 или бинокулярной лупы (Методы..., 1982).

Для оценки антагонистической активности отобранных штаммов *T. asperellum* на тест-объектах в лабораторных опытах *in vitro* использовали метод встречных культур на агаризованных питательных средах (Рудаков, 1981, 1986; Методы..., 1982; Егоров, 2004; Алимова, 2005; Богданов, Титова, 2014). Исследовали взаимодействие четырех отобранных психрофильных штаммов *T. asperellum* Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034 с восемью видами фитопатогенных микромицетов – возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур: *F. oxysporum* 173, 11Д, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *A. alternata*, *R. solani*, *C. sativus* (см. табл. 1). Для встречных культур использовали агар Чапека. Культивирование проводили в термо-

статах при 24–28 и 4–8 °С в темноте. Вносили взаимодействующие культуры немногочисленным инокуломом практически однородной плотности (уколом) в центр половины чашки Петри. Повторность опытов пятикратная. Регистрацию производили ежедневно в течение 30 сут до и после образования зоны контакта культур.

Количественной характеристикой антагонистической активности штаммов *T. asperellum* служили изменения скоростей роста мицелия участников взаимодействия. Качественную характеристику типов взаимоотношений изучаемых микромицетов определяли в соответствии с классификацией взаимодействий мицелиев, разработанной на основе качественных параметров взаимодействий мицелиев: наличие границы между колониями; переплетение гиф с образованием мицелиального валика различной структуры, текстуры, размера и плотности и без него; пигментация зоны контакта; наличие зоны отталкивания или барража; ускорение, замедление или остановка роста колонии (Богданов, Титова, 2014). Показатели гиперпаразитической активности штаммов по отношению к тест-культурам рассчитывали, исходя из зависимости соотношения площадей, занимаемых культурами штаммов исследуемых объектов взаимодействия, от роста культур: исследуемый штамм *T. asperellum* обладает гиперпаразитической активностью, если соотношение площадей, занимаемых культурами, будет не менее 1.9 (ТУ 9291-005-59147141-2006).

Полевые испытания проводили на участке со взаимно ортогональной организацией опыта со сплошным размещением организованных повторений стандартного размещения вариантов общей площадью 133.0 м² (66.5 × 2 м): три повторности на вариант опыта (19 вариантов), учетная делянка – 2.0 м² (1 × 2 м); защитная полоса – 1.0 м² (0.5 × 2 м), с убранной основной культурой (кукуруза) и максимально измельченными, запаханнами в почву пожнивными остатками. Повторность опыта трехкратная (Доспехов, 1979).

Для полевых испытаний эффективности были разработаны ЛО гранулированных мультиконверсионных и торфяных биопрепаратов на основе *T. asperellum* Г-034 с титрами: торфяной – ЛО Г-034, П (2.1 × 10⁸ КОЕ/г); мультиконверсионные – ЛО Г-034, ШГ (шиитачный) (0.9 × 10⁸ КОЕ/г) и ЛО Г-034, ШВГ (шиитачно-вешеночный) (1.1 × 10⁸ КОЕ/г). В полевых мелкоделяночных опытах для оценки эффективности использовали следующие нормы применения ЛО: 2.5, 5 и 10 г/м² при норме расхода рабочего раствора 1.5 л/м². Для проведения опыта готовили водные суспензии образцов биопрепарата и вносили их в почву путем полива. В контроле почву поливали водой.

Качество ЛО оценивали по титрам и степени контаминации: по культуральным признакам и с помощью последовательных серийных разведений. Учет результатов полевых испытаний проводили на 10-е, 20-е, 30-е, 180-е и 360-е сутки, дважды через 6 мес после применения биопрепаратов (6 и 12 мес). Анализировали смешанные усредненные почвенные пробы с пожнивными остатками по показателям числа КОЕ/г штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034 в почве учетных делянок, его жизнеспособности и целевой активности, колонизации пожнивных остатков кукурузы и их габитусу, потерям биомассы растительными остатками и изменению содержания мажорных компонентов (целлюлозы и лигнина). В процессе лабораторного контроля полевого опыта 20 смешанных усредненных почвенных проб из вариантов полевого опыта (примерно по 300 г каждая) помещали в керамические вазоны объемом 1 л и выдерживали в условиях 22–25 °С и перманентного увлажнения в течение 6 мес для обеспечения разложения остатков кукурузы комплексом почвенных микроорганизмов на естественном фоне, а также с внесением психрофильного штамма *T. asperellum* Г-034 в разных нормах применения ЛО. Выявление штамма-продуцента и его жизнеспособности в образцах почвы проводили ежемесячно.

Для оценки степени разложения пожнивных остатков применяли визуальные и органолептические характеристики состояния (габитуса) ткани стеблей и корневой шейки кукурузы. Перед проведением химических анализов образцы пожнивных остатков кукурузы высушивали до воздушно-сухого состояния, измельчали на электрической мельнице и просеивали через сито с диаметром пор 1 мм. Содержание целлюлозы определяли по ГОСТ 31675-2012, лигнина – по ГОСТ 26177-84, влажность остатков – по ГОСТ 13525.19-91. Также определяли процентное содержание целлюлозы и/или лигнина от веса исходной пробы растительных остатков по формуле $C = 100 \times m_i / m_0 - m_0 \times \rho$, где ρ – влажность образца растительных остатков; m_i – масса искомого биополимера

(целлюлоза, лигнин); m_0 – общая масса образца растительных остатков (Оболенская и др., 1955; Schwanninger, Hinterstoisser, 2002). Статистическую оценку результатов и визуализацию материала производили с помощью программных пакетов Excel 2010 и STATISTICA 6.

Результаты

Селекцию активного психрофильного штамма рода *Trichoderma* для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы осуществили в процессе четырехступенчатого скрининга 65 штаммов *T. asperellum* из ГКМ ФГБНУ ВИЗР с высокими целлюлозолитической и антагонистической активностями. На первом этапе было отобрано 29 психрофильных штаммов *T. asperellum*, недостоверно различающихся по скорости роста при 4–8 и 26–28 °С (табл. 3).

Таблица 3. Динамика скорости роста штаммов *T. asperellum* при 4–8 °С

Коллекционный номер штамма	Средняя скорость роста при 4–8 °С, мм/сут		
	5-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
Г-001	6.4	11.8	8.5
Г-002	4.1	4.3	6.8
Г-003	4.3	6.2	7.5
Г-004	7.0	12.0	8.5
Г-005	4.1	3.2	5.6
Г-006	3.0	2.1	3.4
Г-007	6.5	11.5	8.5
Г-011	4.2	5.9	7.3
Г-012	3.5	3.6	3.5
Г-016	4.4	8.8	8.5
Г-018	3.6	10.7	8.5
Г-020	2.2	4.4	3.5
Г-021	3.7	6.5	7.7
Г-022	2.8	5.7	7.3
Г-024	5.6	9.9	8.5
Г-025	6.4	10.7	8.5
Г-026	2.6	5.6	7.6
Г-027	2.0	3.6	3.5
Г-029	4.5	5.7	7.0
Г-030	2.7	5.0	8.0
Г-033	1.0	4.9	7.8
Г-034	6.8	11.9	8.5
Г-035	3.4	5.5	7.7
Г-039	3.4	9.4	8.5
Г-040	4.6	9.1	8.5
Г-045	5.3	10.2	8.5
Г-047	0.6	4.3	7.4
Г-049	5.2	6.2	8.5
Г-051	3.4	6.0	7.9
НСП _{0.5}	0.2	1.2	0.8

На втором этапе из этих 29 штаммов были отобраны 5 психрофильных штаммов (Г-001, Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034), отличающихся высокими скоростями роста и спорпродуктивностью при низких температурах (4–8 °С). При исследовании антагонистической активности отселектированных штаммов на второй ступени скрининга были отобраны 4 штамма (Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034), показавшие высокие начальные скорости линейного роста при взаимодействии с тест-культурами фитопатогенных грибов. Максимальную начальную скорость роста при взаимодействии с тест-культурами выявили у штамма Г-034 *T. asperellum*:

Штамм	Средняя скорость роста, мм/сут
Г-004	1.52
Г-007	1.94
Г-025	1.51
Г-034	2.11
НСР _{0,5}	0.2

Анализ антагонистической активности отобранных штаммов Г-004, Г-007, Г-025 и Г-034 выявил как неполный, так и полный паразитизм *T. asperellum* на большинстве тест-культур и при высоких, и при низких температурах встречного культивирования (Богданов, Титова, 2014). В табл. 4 приведены коэффициенты гиперпаразитической активности отобранных штаммов, соответствующие неполному и полному паразитизму в отношении *F. oxysporum* 173, *F. oxysporum* 11Д, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *A. alternata*, *R. solani*, *C. sativus*.

По совокупности психрофильных показателей – высокой скорости линейного роста и высоким коэффициентам гиперпаразитической активности при 4–8 °С – для оценки эффективности колонизации пожнивных остатков был отобран штамм *T. asperellum* Г-034. Было показано, что в лабораторных условиях колонизация пожнивных остатков пшеницы и кукурузы при 26–28 °С произошла в течение 2 сут с формированием обильного спороношения штамма *T. asperellum* Г-034 на растительных остатках. Таким образом, отобранный психрофильный штамм *T. asperellum* Г-034 обладает высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромикробов – возбу-

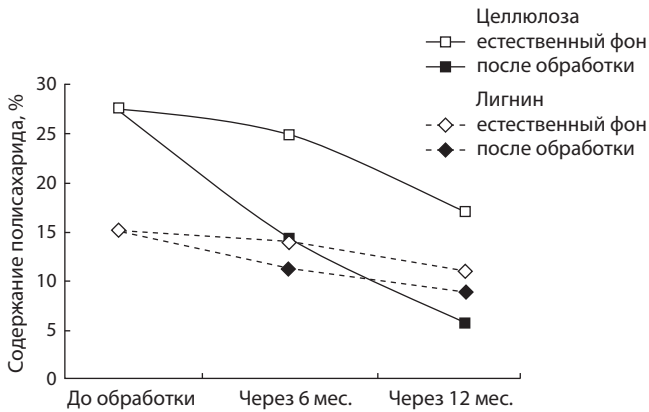
дителей фузариозов и пятнистостей зерновых культур, и способностью эффективно колонизировать растительные остатки в модельных лабораторных опытах.

На следующем этапе исследований необходимо было поработать ЛО препаративных форм и оценить способность штамма-продуцента утилизировать полимеры растительных остатков в условиях полевых испытаний. ЛО на основе штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034 получены путем иммобилизации нестерильного торфа, а также дву- и трехступенчатой биоконверсии отходов сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности, первично конвертированных *L. edodes*, далее *P. ostreatus* НК-35 с титрами 2.1×10^8 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 КОЕ/г соответственно. В контроле полевого опыта аборигенных штаммов *Trichoderma* не было выявлено.

После двукратного применения с 6-месячным перерывом ЛО гранулированных биопрепаратов штамм-продуцент *T. asperellum* Г-034 при всех испытанных нормах применения находился в активном и жизнеспособном состоянии в количестве $\times 10^4$ КОЕ/г. Потери биомассы растительных остатков кукурузы перманентно за 10, 20, 30, 180 и 360 сут в два раза превышали этот показатель в контроле с увлажненными пожнивными остатками без обработки *T. asperellum* Г-034. Максимальное снижение биомассы по отношению к воздушно-сухим пожнивным остаткам растений без обработки за 10, 20, 30 и 180 сут составило 5.4, 10.5, 13.8 и 74.7 % соответственно, а по отношению к увлажненным пожнивным остаткам без обработки биопрепаратами – 1.8, 6.1, 11.4 и 72.7 % соответственно. Наблюдали сходное во всех вариантах опыта общее состояние растительных остатков (габитус): изменение цвета до темно-бурого и серого; легкость скручивания и разрыва тканей как мелких, так и крупных фрагментов; оголение лигнинового скелета во фрагментах остатков стеблей; мацерацию кутикулярного слоя и лигнинового остова мелких фрагментов стеблей; полную мацерацию фрагментов листовых пластинок. Габитус разлагаемых остатков кукурузы после двукратного применения штамма (12 мес. с перезимовкой в поле) соответствовал практически полному оголению и значительной мацерации лигнинового скелета стеблей кукурузы. Наряду с исследованием габитусов растительных остатков кукурузы, про-

Таблица 4. Коэффициенты гиперпаразитической активности отобранных штаммов *T. asperellum* при взаимодействии с тест-объектами

Тест-культура	Г-004		Г-007		Г-025		Г-034	
	Температура, °С							
	26–28	4–8	26–28	4–8	26–28	4–8	26–28	4–8
<i>F. oxysporum</i> 173	1.79	2.55	1.92	3.21	1.92	2.37	2.21	2.06
<i>F. oxysporum</i> 11Д	1.21	1.14	1.57	1.57	1.57	1.29	1.57	1.68
<i>F. sambucinum</i>	2.75	1.68	1.92	3.47	2.21	1.57	2.21	2.37
<i>F. graminearum</i>	1.79	1.92	1.79	1.79	1.79	2.21	1.11	1.92
<i>F. sporotrichioides</i>	2.21	1.47	2.37	2.37	2.55	2.55	2.21	1.79
<i>A. alternata</i>	1.38	2.55	1.29	2.96	1.57	2.96	1.07	2.96
<i>R. solani</i>	1.57	1.47	1.68	1.47	1.68	1.29	1.68	1.11
<i>C. sativus</i>	1.57	6.02	2.21	6.02	2.21	6.02	1.68	6.02



Динамика содержания целлюлозы и лигнина в пожнивных остатках кукурузы после обработок ЛО гранулированных биопрепаратов на основе штамма *T. asperellum* Г-034 (шиитачно-вешеночный мультиконверсионный субстрат) при норме применения 10 г/м².

вели реиоляцию штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034, осуществляющего их разложение в комплексе почвенных микроорганизмов естественного фона, присутствующего во всех вариантах опыта. Содержание целлюлозы в растительных остатках после обработки ЛО биопрепаратов на основе *T. asperellum* Г-034 при нормах применения 5 и 10 г/м² уменьшилось в 2 раза за 6 мес. и в 5 раз за 12 мес., а содержание лигнина – в 1.5 раза за 6 мес. и в 2 раза за 12 мес. В контроле содержание целлюлозы и лигнина в растительных остатках на естественном фоне за 6 и 12 мес. снизилось незначительно (см. рисунок).

Обсуждение

Таким образом, по показателям линейной скорости роста, антагонистической и гиперпаразитической активности при 4–8 °С, высокой скорости колонизации пожнивных остатков пшеницы и кукурузы отобран перспективный психрофильный штамм *T. asperellum* Г-034 для наработки на его основе лабораторных образцов биопрепаратов и проведения полевых опытов. Мелкоделяночные полевые испытания показали высокую эффективность штамма *T. asperellum* Г-034 для ускоренного разложения растительных остатков кукурузы и оздоровления почвы. При проведении исследований по лабораторному контролю полевого опыта выявили активное разложение пожнивных остатков кукурузы под воздействием почвенных микроорганизмов-антагонистов, а главное, под воздействием высокоактивного психрофильного штамма-продуцента *T. asperellum* Г-034, приводящее к полной потере за 12 мес. интактного состояния растительными остатками за счет биодеструкции более 80 % содержащейся в них целлюлозы и более 20 % лигнина, обеспечивающего механическую прочность. Максимальные потери биомассы пожнивными остатками кукурузы за 12 мес составили более 70 %. Штамм-продуцент *T. asperellum* Г-034 после перезимовки в полевых условиях находился в активном состоянии в количестве $\times 10^4$ КОЕ/г, приводящем к нарастанию титра с сезонными возрастанием температуры, увеличением и расширением биодоступности трофической базы.

Микромицеты *Trichoderma* spp. занимают особое положение как продуценты полифункциональных биофун-

гицидов, синтезирующих богатые комплексы гидролаз. Для реализации антагонистической активности у этой группы микромицетов синтез гидролитических ферментов, таких как хитиназы, глюканы, протеазы и липазы, лизирующих клеточные стенки фитопатогенных грибов и разрушающих ряд эффективных молекул фитопатогенов, имеет определяющее значение (Benítez et al., 2004; Аринбасарова и др., 2017). В ряде работ приведены данные о способности штаммов *Trichoderma* существенно обогащать почву подвижными и доступными для растения формами питательных веществ, участвуя в разложении органических соединений (Kubicek et al., 2001; Алимова и др., 2006). Очевидно, именно этим обусловлено повышение эффективности усвоения азота вследствие активизации развития популяций азотфиксаторов и, в целом, биологической активности почв.

Заключение

Микромицеты рода *Trichoderma*, обладая высокой гиперпаразитарной и антагонистической активностью в отношении почвообитающих возбудителей болезней, синтезируют широкий спектр биологически активных веществ, повышают болезнеустойчивость и продуктивность растений (Коломбет и др., 2001; Алимова и др., 2006; Садыкова и др., 2009). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, а также позволяют существенно расширить возможности применения штаммов *Trichoderma* для разложения растительных остатков и биоконтроля почвообитающих фитопатогенных видов при низких температурах, характерных для северных регионов России.

Список литературы / References

- Алимова Ф.К. *Trichoderma*/Нупоцреа (Fungi, Ascomycetes, Нупоцреалес): таксономия и распространение. Казань, 2005.
[Alimova F.K. *Trichoderma*/Нупоцреа (Fungi, Ascomycetes, Нупоцреалес): Taxonomy and Distribution. Kazan, 2005. (in Russian)]
- Алимова Ф.К., Тухбатова Р.И., Тазетдинова Д.И., Кабрера Ф.Х.А., Каримова Л.Ю. Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории Республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями. Грибы и водоросли в биоценозах: Материалы междунар. конф., посвящ. 75-летию биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва, 31 янв.–3 февр. 2006 г. М., 2006; 12–13.
[Alimova F.K., Toukhatova R.I., Tazetdinova D.I., Cabrera F.J.A., Karimova L.Yu. Interactions of *Trichoderma*, widespread throughout the Republic of Tatarstan, with microorganisms and plants. In: Fungi and Algae in Biocenoses: Proc. Int. Conf., dedicated to the 75th anniversary of the Department of Biology, Lomonosov Moscow State University. Moscow, January 31–February 3, 2006. Moscow, 2006; 12–13. (in Russian)]
- Аринбасарова А.Ю., Баскунов Б.П., Меденцев А.Г. Низкомолекулярный антимикробный пептид из *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai VKMF-4268D. *Микробиология*. 2017; 86(2): 258–260.
[Arinbasarova A.Yu., Baskunov B.P., Medentsev A.G. A low-molecular-mass antimicrobial peptide from *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai VKMF-4268D. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2017; 86(2): 258–260. (in Russian)]
- Бисько Н.А., Дудка И.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка. Киев, 1987.
[Bisko N.A., Dudka I.A. Biology and Cultivation of Edible Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. Kiev, 1987. (in Russian)]

- Бисько Н.А., Фомина В.И., Володина Е.П., Билай В.Т. Изменение химического состава субстрата при культивировании *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Микология и фитопатология. 1986; 20(5):392-395.
[Bisko N.A., Fomina V.I., Volodina E.P., Bilay V.T. Change in the chemical composition of the substrate during *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. cultivation. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1986;20(5):392-395. (in Russian)]
- Богданов А.И., Титова Ю.А. Антагонистическая активность штаммов *Trichoderma asperellum* – продуцентов мультиконверсионных биопрепаратов. Вестн. защиты растений. 2014;1:48-52.
[Bogdanov A.I., Titova J.A. Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* strains, multirecycling bioformulation producers. Vestnik Zashchity Rastenii = Plant Protection News. 2014;1:48-52. (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1979.
[Dospikhov B.A. Methodology of Field Experience. Moscow, 1979. (in Russian)]
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., 2004.
[Egorov N.S. Fundamentals of the Antibiotics Doctrine. Moscow, 2004. (in Russian)]
- Зиганшин Д.Д., Лукьянцев М.А., Егоршина А.А., Сироткин А.С. Оценка способности консорциума микроорганизмов к утилизации стерни. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2016;19(16):103-107.
[Ziganshin D.D., Lukiyansev M.A., Egorshina A.A., Sirotkin A.S. Assessment of the ability of a microbial consortium to utilize stubbles. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universiteta = Bull. Kazan Technol. Univ. 2016;19(16):103-107. (in Russian)]
- Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2017;20(10):155-158.
[Ziganshin D.D., Sirotkin A.S. Features of *Trichoderma* fungi deep and surface cultivation for obtaining bioformulations based on fungal cells. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universiteta = Bull. Kazan Technol. Univ. 2017;20(10):155-158. (in Russian)]
- Коломбет Л.В., Жиглецова С.К., Дербышев В.В., Ежов Д.В., Косарева Н.И., Быстрова Е.В. Микофунгицид – препарат на основе *Trichoderma viride* для борьбы с болезнями растений. Прикл. биохимия и микробиология. 2001;37(1):110-114.
[Kolombet L.V., Zhigletsova S.K., Derbyshev V.V., Ezhov D.V., Kosareva N.I., Bystrova E.V. Mycofungicide is a biologic based on *Trichoderma viride* to control plant diseases. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology. 2001;37(1):110-114. (in Russian)]
- Лабынцев А.В., Целуйко О.А. Способ разложения растительных остатков. Пат. РФ RU 2485752 С1. 2013.
[Labyntsev A.V., Tseluyko O.A. A method of plant residues destruction. Patent RU 2485752 C1. 2013. (in Russian)]
- Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов. М., 1953.
[Lilly V., Barnett G. Physiology of the Fungi. New York: McGraw-Hill Publ., 1951. (Russ. ed.: Lilly V., Barnett G. Physiology of the Fungi. Moscow, 1953. (in Russian))]
- Методы экспериментальной микологии: Справочник. Киев, 1982.
[Experimental Mycology Methods: Handbook. Kiev, 1982. (in Russian)]
- Новикова И.И. Полифункциональные биопрепараты на основе микробов-антагонистов – основа экологически безопасной системы защиты растений от болезней. Информ. бюл. ВПРС МОББ. 2007;38:173-175.
[Novikova I.I. Polyfunctional bioformulations based on antagonist microbes are the basis of an environmentally safe system of plant protection against diseases. Informatsionnyy Byulleten VPRS MOBB = IOBC EPRS Informational Bull. 2007;38:173-175. (in Russian)]
- Новикова И.И. Биологическое разнообразие микроорганизмов – основа для создания новых полифункциональных биопрепаратов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем. Вестн. защиты растений. 2016;83(3):120-122.
[Novikova I.I. The biological diversity of microorganisms is the basis for new multifunctional bioformulation development for phytosanitary optimization of agroecosystems. Vestnik Zashchity Rastenii = Plant Protection News. 2016;83(3):120-122. (in Russian)]
- Оболенская А.В., Щеголев В.П., Аким Г.А. Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1955.
[Obolenskaya A.V., Shchegolev V.P., Akim G.A. Practical Work on the Chemistry of Wood and Cellulose. Moscow, 1955. (in Russian)]
- Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. М., 1981.
[Rudakov O.L. Mycophilic Fungi: Biology and Practical Importance. Moscow, 1981. (in Russian)]
- Рудаков О.Л. Проблемы и перспективы использования гиперпаразитов и антагонистов в защите растений от инфекционных заболеваний: Микробиологические средства защиты растений. Новосибирск, 1986;139-143.
[Rudakov O.L. Problems and Prospects of Using Hyperparasites and Antagonists in Plant Protection against Infectious Diseases: Microbiological Means for Plant Protection. Novosibirsk, 1986;139-143. (in Russian)]
- Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Лунева Т.А. Воздействие гриба рода *Trichoderma* на лигнин коры хвойных пород. Катализ в промышленности. 2014;6:64-70.
[Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Luneva T.A. Effect of *Trichoderma* fungi on softwood bark lignin. Kataliz v Promyshlennosti = Catalysis in Industry. 2014;6:64-70. (in Russian)]
- Садыкова В.С., Лихачев А.Н., Бондарь П.Н. Ограничение развития комплекса возбудителей корневых гнилей ячменя антагонистами рода *Trichoderma*. Микология и фитопатология. 2010;44(6):556-562.
[Sadykova V.S., Likhachev A.N., Bondar P.N. Restriction of barley root rot development by antagonistic fungi of the genus *Trichoderma*. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2010;44(6):556-562. (in Russian)]
- Садыкова В.С., Третьякова И.Н., Носкова Н.Е., Бондарь П.Н. Антагонистическая и ростостимулирующая активность штаммов рода *Trichoderma* и перспективы их использования в биоконтроле. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009;2:71-72.
[Sadykova V.S., Tretyakova I.N., Noskova N.E., Bondar P.N. Antagonistic and growth-stimulating activity of the genus *Trichoderma* strains and prospects of their use in biocontrol. Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology. 2009;2:71-72. (in Russian)]
- Титова Ю.А. Методология получения мультиконверсионных биопрепаратов для защиты растений. Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем: Сб. науч. трудов III Всерос. съезда по защите растений. СПб., 2013;2:396-400.
[Titova J.A. Methodology for obtaining multirecycled bioformulations for plant protection. In: Phytosanitary Optimization of Agroecosystems: Proc. III All-Russian Plant Protection Congr. St. Petersburg, 2013;2:396-400. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Бойкова И.В., Бочкова В.Б. Биологическая активность мультиконверсионных биопестицидов на основе актиномицетов. Современная микология в России: IV съезд микологов России. М., 2017а;7:284-286.
[Titova J.A., Boykova I.V., Bochkova V.B. Biological activity of multirecycled biopesticides based on actinomycetes. In: Modern Mycology in Russia: Proc. IV Congr. Russian Mycologists. Moscow, 2017a;7:284-286. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Долгих В.В., Богданов А.И. Особенности биоконверсии компонентов растительных субстратов штаммами-продуцентами биопрепаратов. Вестн. защиты растений. 2014;3:46-49.
[Titova J.A., Dolguikh V.V., Bogdanov A.I. Biorecycling features of plant substrate components by bioformulation producer strains.

- Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News. 2014;3:46-49. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Сокогнова С.В., Полякова О.Ю. Особенности роста энтомопатогенных видов *Beauveria* при мультибиоконверсии отходов производства съедобных грибов. Современная микология в России: IV съезд микологов России. М., 2017б;6:405-406.
- [Titova J.A., Sokornova S.V., Polyakova O.Yu. Growth features of *Beauveria* entomopathogenic species in the multibiorecycling of edible fungi production wastes. In: Modern Mycology in Russia: Proc. IV Congr. Russian Mycologists. Moscow, 2017b;6:405-406. (in Russian)]
- Титова Ю.А., Хлопунова Л.Б., Федорова Р.А., Зыков И.О. Производство вешенки путем мультибиоконверсии отходов производства шиитаке. Современная микология в России: IV съезд микологов России. М., 2017в;7:389-391.
- [Titova J.A., Khlopunova L.B., Fedorova R.A., Zikov I.O. Oyster mushroom production by shiitake waste multibiorecycling. In: Modern Mycology in Russia: Proc. IV Congr. Russian Mycologists. Moscow, 2017c;7:389-391. (in Russian)]
- ТУ 9291-005-59147141-2006. Технические условия. Триходермина нова. 2006.
- [TS 9291-005-59147141-2006. Technical specifications. *Trichodermin nova*. 2006. (in Russian)]
- Alamri S., Hashem M., Mostafa Y.S. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their mode of action. *Biocontrol Sci.* 2012;17(4):155-167.
- Benítez T., Rincon F.M., Limon M.C., Codon A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 2004;7(4):249-260.
- Bheemaraya P.M.B., Ramesh N.M.K., Kalyanrao. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma* species. *J. Mycol. Plant Pathol.* 2011;41(4):618-621.
- Bouregghda H., Renane R. *In vitro* study of antagonistic activity of some isolates of *Trichoderma* spp. against *Fusarium* spp. isolates the causal agent of wheat head scab. *Arab. J. Plant Protection.* 2011;29:51-59.
- Devi P., Prabhakaran N., Kamil D., Pandey P., Borah J.L. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their biocontrol efficiency against plant pathogens. *Afr. J. Biotech.* 2012;11(85):15150-15160. DOI 10.5897/AJB12.2007.
- Haran S., Schickler H., Chet I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology.* 1996;142:2321-2331.
- Heidi I.G., Abo-Elnaga. Biological control of damping off and root rot of wheat and sugar beet with *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathol. J.* 2012;11(1):25-31. DOI 10.3923/ppj2012.25.31.
- Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., Lorito M. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 2001;83:11-23.
- Parra T.J., Maniscalco P.D. Effect of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and some physiological attributes on *Zea mays* L. under greenhouse conditions. *Fitopatol. Venez.* 2012;25:10-15.
- Schwanninger M., Hinterstoisser B. Klason lignin: Modification to improve the precision of the standardized determination. *Holzforchung.* 2002;56:161-166.
- Whipps J.M., Lumsden R.D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Wallingford, UK: CABI Publ., 2001;9-22.

ORCID ID


I.I. Novikova orcid.org/0000-0003-2816-2151
J.A. Titova orcid.org/0000-0002-8188-1852

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Испытательной лаборатории ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт» за неоценимую помощь в проведении исследований.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.08.2018. После доработки 11.02.2019. Принята к публикации 17.02.2019.

Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии

Б.Н. Зайцев , О.С. Таранов, Н.Б. Рудометова, Н.С. Щербакова, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко

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


 e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru

Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей. При исследовании образцов, содержащих вирусы, неизбежно встает вопрос количественного определения вирусных частиц в пробе. Одна из наиболее простых и эффективных методик количественного определения вирусных частиц в препарате – использование электронной микроскопии, однако основным ограничением метода является относительно высокий предел обнаружения (10^7 частиц/мл). Часто такая чувствительность недостаточна и может приводить к ошибочной диагностике. Цель данной работы заключалась в разработке методики, позволяющей более точно оценивать количество вирусных частиц и работать с образцами, в которых концентрация ниже, чем 10^7 частиц/мл. Метод заключается в концентрировании вирусных частиц на мембране из полиэфиросульфата, применяемой в центрифужных концентраторах, с последующим подсчетом с помощью электронной микроскопии. В качестве модельного объекта были выбраны env-псевдовирусы, созданные с использованием лентивирусной системы, которая позволяет получать стандартизованные образцы вирусоподобных частиц. Суспензию вирусных частиц (объемом 20 мл) помещали в центрифужный концентратор и центрифугировали. Затем извлекали мембрану из концентратора и оценивали количество осажденных на мембране частиц с помощью электронного микроскопа, используя метод ультратонких срезов. Количество вирусных частиц на всей поверхности фильтра (площадь 4 cm^2) составляло 4×10^7 вирионов, исходная концентрация псевдовирусов в образце – 2×10^6 на 1 мл (4×10^7 частиц/20 мл). Таким образом, предложенная методика позволяет преодолеть основной недостаток количественного определения вирусов с помощью электронной микроскопии, связанный с относительно высоким пределом обнаружения (10^7 частиц/мл). Кроме того, центрифужный концентратор дает возможность последовательно прогнать через один и тот же фильтр значительные объемы суспензии, содержащей вирусы, что также может привести к повышению чувствительности метода. Предложенный подход позволяет повысить чувствительность, точность и воспроизводимость количественного анализа различных образцов, содержащих вирусы животных, растений и человека, с использованием электронной микроскопии.


Ключевые слова: электронная микроскопия; псевдовирусы; концентрирование; количество вирусных частиц.

Для цитирования: Зайцев Б.Н., Таранов О.С., Рудометова Н.Б., Щербакова Н.С., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):337-342. DOI 10.18699/VJ19.498

An optimized method for counting viral particles using electron microscopy

B.N. Zaitsev , O.S. Taranov, N.B. Rudometova, N.S. Shcherbakova, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

 e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru

Viruses can infect all types of life forms, from animals and plants to microorganisms, including bacteria and archaea. When studying samples containing viruses, one confronts an unavoidable question of the quantitative determination of viral particles in the sample. One of the simplest and efficient approaches to quantitative determination of viral particles in preparation includes the use of electron microscopy; however, a high detection threshold is a significant limitation of this method (10^7 particles per ml). Usually, such sensitivity is insufficient and can result in error diagnosis. This study aims to develop a method making it possible to detect the number of viral particles more precisely and work with samples in which the concentration of particles is lower than 10^7 /ml. The method includes a concentration of viral particles on the polyethersulfone membrane applied in centrifugal concentrators and subsequent calculation using an electron microscope. We selected env-pseudoviruses using a lentiviral system making it possible to obtain standardized samples of virus-like particles that are safer than a live virus. Suspension of viral particles (a volume of 20 ml) was placed into the centrifugal concentrator and centrifuged. After that, we took a membrane out of the centrifugal concentrator and evaluated the number of particles on the ultrathin section using an electron microscope. The number of viral particles on the whole surface of the filter (a square of 4 cm^2) was 4×10^7 virions, the initial concentration of pseudoviruses in the sample was 2×10^6 per 1 ml (4×10^7 particles per 20 ml). As a result, the developed method enables one to evade the major disadvantage of quantitative determination of viruses using

electron microscopy regarding a high detection threshold (concentration of particles $10^7/\text{ml}$). Furthermore, the centrifugal concentrator makes it possible to sequentially drift a considerable volume of the suspension through the filter resulting in enhancement of test sensitivity. The developed approach results in increased sensitivity, accuracy, and reproducibility of quantitative analysis of various samples containing animal, plant or human viruses using electron microscopy.

Key words: electron microscopy; pseudoviruses; concentrating; number of viral particles.

For citation: Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):337-342. DOI 10.18699/VJ19.498 (in Russian)

Введение

В наши дни интерес к вирусам неизмеримо возрос. Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей. Согласно последнему релизу Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses), в настоящее время известно почти 5 тыс. видов вирусов, и каждый год открываются новые.

Важным звеном в системе защиты от инфекционных заболеваний является своевременная диагностика, которая определяет применение адекватных профилактических мер и эффективность лечебных мероприятий в дальнейшем. Однозначно положительным результатом диагностики считается визуальное обнаружение возбудителя инфекции микроскопическими методами и его идентификация. Для исследования вирусов широко используют методы электронной микроскопии (Goldsmith, Miller, 2009). Помимо диагностических целей, электронную микроскопию применяют также для структурных исследований наночастиц, таких как искусственные вирусоподобные частицы, созданные в целях конструирования вакцин и для геномных исследований. Электронная микроскопия не только позволяет идентифицировать отдельные наноразмерные объекты, но и дает важную информацию об их морфологических характеристиках, степени сохранности при воздействии на них различных физических и химических (в том числе фармакологических) факторов, позволяет определить их содержание в биологических жидкостях. Последнее в ряде случаев достигается только с помощью методов электронной микроскопии.

Основное препятствие для применения электронной микроскопии в исследовании вирусных объектов – недостаточная для их обнаружения концентрация частиц в жидкостях. При использовании наиболее простого и популярного метода негативного контрастирования концентрация вирионов (или других нанообъектов) должна быть не менее 10^7 частиц/мл (Reid et al., 2002; Malenovska, 2013). Но часто такая чувствительность недостаточна и может приводить к ошибочной диагностике. В настоящее время для повышения чувствительности метода широко используется концентрирование наноразмерных частиц с помощью ультрацентрифугирования. Метод позволяет увеличить концентрацию исследуемых частиц в единице объема примерно в тысячу раз. Однако при этом для исследования требуется дорогостоящее оборудование и продолжительное время подготовки образцов.

В нашей работе представлена оригинальная методика, позволяющая более точно оценивать количество вирусных частиц на примере env-псевдовирюсов.

Материалы и методы

Получение псевдовирюсов и их характеризацию проводили согласно ранее описанной методике (Рыжиков и др., 2012), с небольшими модификациями. Клетки HEK293T/17 высевали в концентрации 5×10^5 клеток/лунку в 6-луночный культуральный планшет и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^\circ\text{C}$ в среде DMEM, содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку, 600 мг/мл L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. Для получения псевдовирюсов проводили трансфекцию клеток HEK293T одновременно двумя плазмидами: pcDNA3.1env (SF162.LS) (НИИ) и backbone pSG3Δenv (дефектной по гену env) с использованием реагента MATra (PromoKine) по протоколу, рекомендованному фирмой-изготовителем. Планшеты помещали в CO_2 -инкубатор и инкубировали при $+37^\circ\text{C}$. Через 4–6 ч производили смену среды в планшетах. Через 48 ч инкубации собирали культуральную среду. От клеток псевдовирюсы отделяли путем низкоскоростного центрифугирования с последующей фильтрацией через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Полученные препараты псевдовирюсов хранили при -80°C в среде DMEM, содержащей 20 % фетальной бычьей сыворотки.

Определение функциональной активности. У полученных псевдовирюсов определяли функциональную активность при помощи клеток TZM-bl. В лунки 96-луночного культурального планшета вносили по 5×10^4 клеток TZM-bl, далее добавляли по 50 мкл суспензии исследуемых env-псевдовирюсов, по четыре лунки для каждого псевдовирюса. Планшеты инкубировали при 37°C и 5 % CO_2 . Через 48 ч инкубации в клетках определяли люциферазную активность при помощи набора LAR (Promega) согласно рекомендации производителя. В качестве контроля использовали клетки TZM-bl без псевдовирюса. Сигнал люминесценции определяли на люцинометре STATFAX® 4400 (Lumate) и выражали в относительных единицах люминесценции (relative light units – RLU). Интенсивность люминесценции коррелирует с количеством псевдовирюса, попавшего в клетку (Рыжиков и др., 2012). Env-псевдовирюс использовали в дальнейшей работе, если значение RLU превышало двукратное значение спонтанной люминесценции клеток TZM-bl в 50 раз и более.

Электронная микроскопия. Очищенный от клеток супернатант, содержащий псевдовирюсные частицы, фиксировали добавлением равного объема 8 % раствора параформальдегида. Время фиксации – 48 ч при $+4^\circ\text{C}$.

Для контрольного подсчета, изучения размеров и формы вирусоподобных частиц использовали общепринятый метод негативного контрастирования (Harris, Horne,

1994). Супернатант наносили на медные сеточки для электронной микроскопии, покрытые пленкой-подложкой из формвара, стабилизированной углеродом. Препараты окрашивали 2 % водным раствором уранилацетата.

Культуру клеток отделяли от поверхности с помощью резинового шпателя, фиксировали в 4 % растворе параформальдегида при +4 °С в течение 24 ч. Промывали в буферном растворе, дополнительно фиксировали 1 % раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по общепринятой методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне, заливали в смесь эпон-аралдит. Процедура описана ранее (Sergeev et al., 2016). Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (50–60 нм) срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия). Полутонкие срезы окрашивали раствором азура-П и исследовали с помощью светового микроскопа AxioImagerZ1 (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали на электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микросъемка, анализ и обработка изображения осуществлялись с помощью цифровой камеры Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Концентрирование псевдовirusа. 20 мл очищенного от клеток супернатанта последовательно прогоняли через центрифужный концентратор Vivaspin 6 (300 000 MWCO) (Sartorius, Великобритания) порциями по 5 мл (5 мин на порцию при скорости 3000 об/мин). В таком концентрате используется мембранный фильтр с порогом отсеивания по молекулярной массе 300 000 кДа, задерживающий объекты с молекулярной массой больше 300 000 кДа и пропускающий через себя макромолекулы меньшей молекулярной массы. После этого извлекали фильтр и вырезали из различных областей кусочки размером приблизительно 1 × 1 мм. Дальнейшую подготовку образцов проводили по той же методике, что описана выше для культуры клеток. При заливке в смолу кусочки мембраны ориентировали таким образом, чтобы получить срез через всю толщину фильтра.

Для определения физического титра псевдовirusных частиц в суспензии подсчитывали среднее число таких частиц на единицу длины верхней (со стороны фильтруемой жидкости) кромки фильтра на срезе. Исходя из предположения об однородности потока жидкости при фильтровании по площади фильтра и изотропности самого фильтра, считали, что плотность частиц на фильтре однородна во всех направлениях и, следовательно, является квадратом линейной плотности. Это значение подсчитывалось для полной площади фильтра – 4 см².

Результаты

Для подсчета количества вирусных частиц используется ряд методов, в том числе метод бляшек (подсчет негативных колоний вирусов, представляющих собой очаги разрушенной под действием вируса культуры клеток под агаровым покрытием); количественная РТ-ПЦР; иммунофлуоресцентная микроскопия, аналитическая проточная цитометрия, электронная микроскопия и др. (Ferris et al., 2002; Reid et al., 2003; Malenovska, 2013; Heider, Metzner, 2014; Rossi et al., 2015).

Среди перечисленных методов электронная микроскопия обладает рядом преимуществ, поскольку позволяет получить информацию не только о количестве всех вирусных частиц (независимо от того, являются ли они инфекционными), но и о морфологии исследуемого объекта (Malenovska, 2013). Кратко метод заключается в следующем. В исследуемую пробу, содержащую вирусный материал, добавляется определенное количество суспензии с известной концентрацией латексных шариков. Смесь наносится на медные сеточки, покрытые опорной пленкой, которая укреплена напылением углерода, или адсорбцией в течение определенного времени, или распылением смеси над сетками с помощью ультразвукового зонда. Затем электронно-микроскопические сетки изучают в электронном микроскопе. В нескольких ячейках сетки одновременно подсчитывается количество частиц латекса и количество вирусных частиц. Зная концентрацию латекса и сопоставляя ее с количеством обнаруженных вирусных частиц, можно рассчитать концентрацию вируса в исходной пробе. Естественно, этот метод не совсем точный, но удобный, и его широко используют для количественной оценки тех или иных вирусов.

При таком подсчете ошибки обусловлены неоднородностью свойств поверхности опорной пленки, агрегацией как латекса, так и вирусного материала, отклонениями от точной схемы опыта, такими как недостаточное смешивание или загрязнение во время распыления. Однако основным ограничением метода негативного контрастирования при подсчете количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии является недостаточная чувствительность: для получения надежных результатов необходима концентрация не менее 10⁷ частиц/мл (Reid et al., 2003).

В настоящей работе (на примере env-псевдовirusов) представлена оригинальная методика, позволяющая оценивать количество вирусоподобных частиц в образцах, в которых их концентрация ниже, чем 10⁷ частиц/мл.

В качестве модельного объекта были выбраны вирусоподобные частицы ВИЧ-1 (env-псевдовirusы). Env-псевдовirusы могут проникать в клетку аналогично живому вирусу иммунодефицита человека, но из-за дефектного генома не способны формировать полноценное вирусное потомство, поэтому в работе они безопасны. При получении env-псевдовirusов используют два типа плазмид: оболочечную и упаковочную. Упаковочная, или коровая, плазида (pSG3Δenv) кодирует все белки ВИЧ-1, кроме оболочечных. Вторая плазида (pEnv), наоборот, кодирует только белки оболочки ВИЧ-1. Для проверки инфекционности env-псевдовirusов используют генно-инженерные клетки TZM-bl, которые несут в составе своего генома ген люциферазы, активирующийся при попадании в клетку ВИЧ-1 или псевдовirusа (Montefiori, 2009).

Котрансфекция клеток 293Т двумя плазмидами приводит к формированию псевдовirusного потомства, способного только к однократному заражению клеток и не способного к дальнейшей репликации. Сборку и выход псевдовirusных частиц подтверждали методом электронной микроскопии ультратонких срезов (рис. 1).

Характеризацию псевдовirusа проводили также по определению функциональной активности при одном

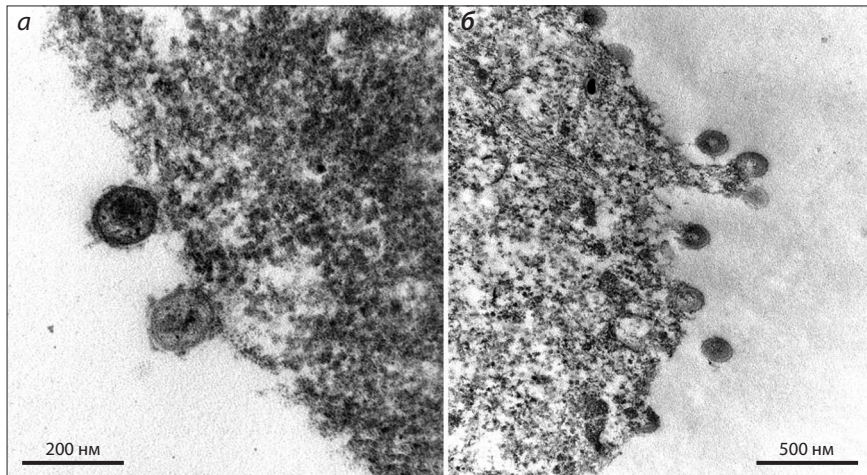


Рис. 1. Почкующийся псевдовирус SF162 на клетках 293Т (а) и несколько частиц псевдовируса разной степени созревания (б).

Просвечивающая электронная микроскопия, ультратонкий срез.

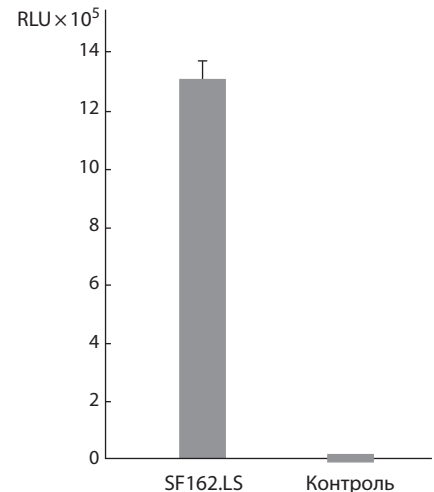


Рис. 2. Функциональная активность псевдовирусов SF162.LS.

цикле инфекции в культуре клеток-мишеней TZM-bl. Результаты представлены на рис. 2. Интенсивность сигнала выражали в условных единицах люминесценции (RLU/мл). Полученные данные говорят о функциональной активности вируса.

Однако в надосадочной жидкости с положительной функциональной активностью методом негативного контрастирования вирусоподобные частицы не обнаруживались. Наиболее вероятной причиной этого была низкая концентрация частиц в исходной жидкости. Для решения задачи мы предложили метод, который заключается в концентрировании вирусных частиц на мембране из полиэфирсульфона, применяемой в центрифужных концентраторах. Вирусные частицы осаждаются из суспензии на мембране концентратора с помощью низкоскоростного центрифугирования. В последующем участок мембраны

заливается в эпон-аралдит, и из него изготавливают ультратонкие срезы для исследования в электронном микроскопе. Мы использовали мембраны с порогом отсечения 300 000 кДа, которые должны были задерживать псевдовирусные частицы диаметром около 100 нм.

На рис. 3 показаны вирусоподобные частицы, захваченные нанофильтром при центрифугировании. Частицы хорошо различимы в теле и

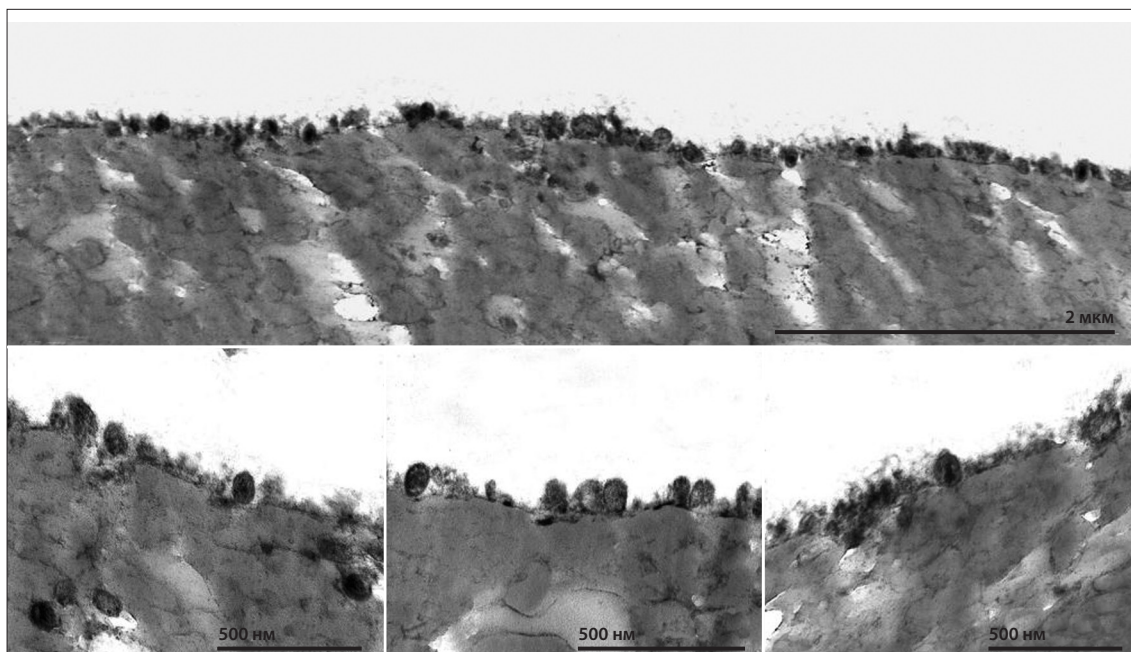


Рис. 3. Частицы псевдовируса, захваченные фильтром Vivaspin 6 (300 000 MWCO), с разным увеличением.

Фрагмент фильтра Vivaspin 6 (300 000 MWCO). Просвечивающая электронная микроскопия, метод ультратонких срезов.

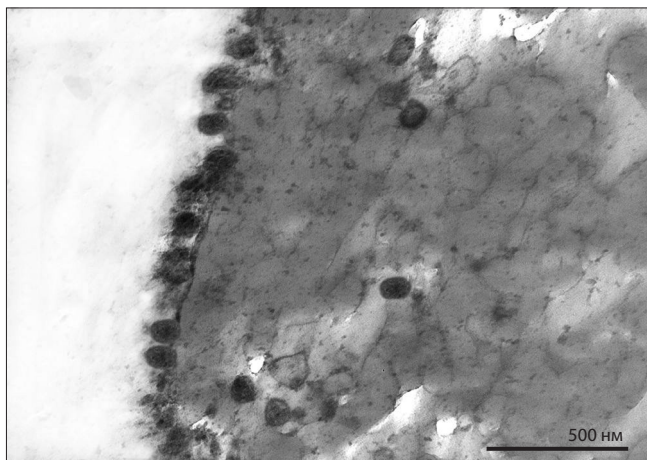


Рис. 4. Частицы псевдовируса, захваченные фильтром Vivaspin 6 (300000 MWCO), располагаются как на поверхности, так и в глубине фильтра.

Просвечивающая электронная микроскопия, метод ультратонких срезов.

на поверхности нанопористого фильтра, что позволяет их распознать морфологически и подсчитать среднее число на единицу длины сечения фильтра.

Исходя из предположения об однородности потока жидкости при фильтровании по площади фильтра и изотропности самого фильтра, считали, что плотность частиц на поверхности фильтра однородна во всех направлениях и, следовательно, является квадратом линейной плотности. Число частиц подсчитывалось для полной площади фильтра – 4 см². В среднем на срезе наблюдается по 3 вириона на отрезке 10 мкм. Если считать, что плотность в перпендикулярном направлении та же, получаем 3 × 3 = 9 вирионов на 100 мкм². Таким образом, на всей поверхности фильтра (площадь 4 см²) находится около 4 × 10⁷ вирионов. Исходя из того, что объем супернатанта, содержащего псевдовирусы, был 20 мл, можно определить исходную концентрацию псевдовирусов в образце: 4 × 10⁷ частиц/20 мл = 2 × 10⁶ частиц на 1 мл. Эта величина на порядок меньше той, что может быть зарегистрирована методом негативного контрастирования, что и подтвердило наше предположение (методом негативного контрастирования частицы псевдовируса обнаружены не были).

Заключение

Таким образом, предложенная методика позволяет преодолеть основной недостаток количественного определения вирусов с помощью электронной микроскопии, связанный с относительно высоким пределом обнаружения (концентрация частиц больше 10⁷/мл). Как видно из рис. 4, плотность псевдовирусов на срезе достаточно велика. Это позволяет надеяться, что при уменьшении концентрации вирионов в суспензии еще на два порядка также будет возможно распознать захваченные вирионы. Кроме того, центрифужный концентратор позволяет последовательно прогнать через один и тот же фильтр значительные объемы суспензии, что тоже способствует повышению чувствительности метода.

Сравнивая предлагаемый метод с широко используемым методом бляшек, отметим преимущества, связанные со скоростью выполнения работы и возможностью определения общего титра вирусных частиц, включая «неинфекционные». С помощью метода бляшек можно обнаружить только частицы, обладающие в данных условиях инфекционными свойствами. Однако в ряде случаев, например при характеристике препаратов вакцин, необходимо знать количество всех частиц, включая и неинфекционные, которые также оказывают влияние на иммунный ответ хозяина (Blancett et al., 2017).

Разработанный метод может быть использован для количественного анализа различных образцов, содержащих вирусы животных, растений и человека, а также неинфекционные наночастицы и вирусоподобные частицы. Особенно полезна данная технология для анализа препаратов с низким содержанием вирусных частиц. Предложенный подход позволяет повысить чувствительность, точность и воспроизводимость количественного анализа вирусных частиц с применением электронной микроскопии.

Список литературы / References

- Рыжиков А.Б., Саркисян К.А., Карпенко Л.И., Пьянкова О.Г., Шаламова Л.А., Борисевич И.В., Воробьева М.С., Богрянцева М.П., Ильичев А.А., Монтефиори Д.С., Нечаева Е.А. Апробация в доклинических испытаниях метода определения вируснейтрализующей активности вакцины-кандидата против ВИЧ-инфекции КомбиВИЧвак с использованием технологии псевдовирусов ВИЧ-1. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012;2(63):70-75.
- [Ryzhikov A.B., Sarkisyan K.A., Karpenko L.I., Pyankova O.G., Shalamova L.A., Borisevich I.V., Vorobyeva M.S., Bogryantseva M.P., Ilyichev A.A., Montefiori D.S., Nechaeva E.A. Testing in preclinical trials method for determining the neutralizing activity of vaccine-candidate against HIV infection CombiHIVvac using HIV-1 pseudoviruses technology. *Epidemiologiya i Vaktsynoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinoprophylactic*. 2012;2(63):70-75. (in Russian)]
- Blancett C.D., Fetterer D.P., Koistinen K.A., Morazzani E.M., Moninger M.K., Piper A.E., Kuehl K.A., Kearney B.J., Norris S.L., Rossi C.A., Glass P.J., Sun M.G. Accurate virus quantitation using a Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) detector in a scanning electron microscope. *J. Virol. Methods*. 2017;248:136-144. DOI 10.1016/j.jviromet.2017.06.014.
- Ferris M.M., Stoffel C.L., Maurer T.T., Rowlen K.L. Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Anal. Biochem*. 2002;304(2):249-256. DOI 10.1006/abio.2002.5616.
- Goldsmith C.S., Miller S.E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev*. 2009;22(4):552-563. DOI 10.1128/CMR.00027-09.
- Harris R.J., Horne R.W. Negative staining: a brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities. *Micron*. 1994;25(1):5-13. DOI 10.1016/0968-4328(94)90051-5.
- Heider S., Metzner C. Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*. 2014;462-463(1):199-206. DOI 10.1016/j.virol.2014.06.005.
- Malenovska H. Virus quantitation by transmission electron microscopy, TCID₅₀, and the role of timing virus harvesting: a case study of three animal viruses. *J. Virol. Methods*. 2013;191(2):136-140. DOI 10.1016/j.jviromet.2013.04.008.
- Montefiori D.C. Measuring HIV Neutralization in a Luciferase Reporter Gene Assay. In: Prasad V.R., Kalpana G.V. (Eds.). *HIV Protocols*.

2nd edn. (Ser.: Methods in Molecular Biology). 2009;485:395-405.
DOI 10.1007/978-1-59745-170-3_26.

Reid G.G., Milne E.W., Coggins L.W., Wilson N.J., Smith K.T.,
Shepherd A.J. Comparison of electron microscopic techniques for
enumeration of endogenous retrovirus in mouse and Chinese ham-
ster cell lines used for production of biologics. *J. Virol. Methods*.
2003;108(1):91-96. DOI 10.1016/S0166-0934(02)00263-X.

Rossi C.A., Kearney B.J., Olschner S.P., Williams P.L., Robinson C.G.,
Heinrich M.L., Zovanyi A.M., Ingram M.F., Norwood D.A.,

Schoepp R.J. Evaluation of ViroCyt® Virus Counter for rapid filovi-
rus quantitation. *Viruses*. 2015;7(3):857-872. DOI 10.3390/v7030857.
Sergeev A.I.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Pyan-
kov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Tito-
va K.A., Glotov A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Shishkina L.N.,
Agafonov A.P., Sergeev A.N. The Possibility of Using the ICR
Mouse as an Animal Model to Assess Antimonkeypox Drug Effi-
cacy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016;63:e419-e430. DOI 10.1111/
tbed.12323.

ORCID ID

B.N. Zaitsev orcid.org/0000-0001-6359-465X

O.S. Taranov orcid.org/0000-0002-6746-8092

N.B. Rudometova orcid.org/0000-0002-1684-9071

N.S. Shcherbakova orcid.org/0000-0002-0953-6333

A.A. Ilyichev orcid.org/0000-0001-5356-084


L.I. Karpenko orcid.org/0000-0003-4365-8809


Благодарности. Работа выполнена в рамках ГЗ-7/18 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-34-00314.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.09.2018. После доработки 30.11.2018. Принята к публикации 05.12.2018.

Молекулярно-генетические основы формирования окраски оперения у кур

А.В. Макарова, О.В. Митрофанова, А.Б. Вахрамеев, Н.В. Дементьева 


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

Окраска оперения – важный признак у птиц, нередко определяющий принадлежность к тому или иному виду или породе. Окраска является результатом действия веществ, которые поглощают определенную длину волны и формируют так называемые пигментные цвета, и оптическим эффектом, обусловленным интерференцией света, отраженного биологическими микроструктурами пера. Основой для формирования окраски служит синтез меланина. Эумеланин ответственен за черные и коричневые оттенки, а феомеланин отвечает за красновато-коричневые оттенки. Молекулярно-генетический механизм появления того или иного типа окраски еще до конца не изучен, поскольку на один и тот же признак могут влиять несколько генов. Первичная пигментация оперения определяется взаимодействием полиморфных вариантов гена *MC1R* и генов, участвующих в регуляции меланогенеза. Гены-модификаторы вызывают изменение окраски любого генотипа по локусу *E* и могут как уменьшать или увеличивать экспрессию эумеланина, так и разрушать меланоциты. Вторичная пигментация оперения определяется белыми пятнами или специфическим распределением эумеланина на отдельных перьях. Современные методы анализа ДНК, такие как секвенирование, полногеномный анализ с использованием чипов различной плотности, анализ экспрессии генов, позволяют получать новые данные о генах, определяющих окраску оперения. Ключевые слова: *Gallus domesticus*; куры; окраска оперения; гены; локус; экспрессия; маркеры.

Для цитирования: Макарова А.В., Митрофанова О.В., Вахрамеев А.Б., Дементьева Н.В. Молекулярно-генетические основы формирования окраски оперения у кур. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):343-354. DOI 10.18699/VJ19.499

Molecular-genetic bases of plumage coloring in chicken

A.V. Makarova, O.V. Mitrofanova, A.B. Vakhrameev, N.V. Dementeva 

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

The color of plumage in birds is an important feature, often determining descent to a particular species or breed. It serves as a key factor in the interaction of birds with each other due to their well-developed visual perception of the surrounding world. In poultry including chickens, the color of the plumage can be treated as a genetic marker, useful for identifying breeds, populations and breeding groups with their specific traits. The origin of diverse color plumage is the result of two interrelated physical processes, chemical and optical, due to which pigment and structural colors in the color are formed. The pigment melanin, which is presented in two forms, eumelanin and pheomelanin, is widely spread in birds. The basis for the formation of melanin is the aromatic amino acid tyrosine. The process of melano-genesis involves many loci, part of the complex expression of plumage color genes. In birds, the solid black color locus encodes the melanocortin 1 receptor (*MC1R*), mutations in which lead to a change in receptor activation and form different variants of the *E* locus. Using the GWAS analysis, possible genes affecting the formation of color in chickens were detected. The biosynthesis and types of melanin are affected by the activity of the enzyme tyrosinase, and mutations in the tyrosinase gene (*TYR*) cause albinism in different species. The formation mechanism of brown, silver, gold, lavender and a number of other shades is determined by the influence on the work of the *MC1R* genes and *TYR* specific modifier genes. Thus, locus *I* currently associated with the *PMEL17* gene inhibits the expression of eumelanin, and the *MLPH* gene affects tyrosinase function. Research on the mechanisms of formation of the secondary coloring of plumage in chickens is being actively conducted nowadays. The formation of a marble feather pattern is associated with the mutation of the endothelin B2 receptor (*EDNRB2*), in the coding part of the gene of which a polymorphism is found associated with the *mo* locus. The molecular base that causes the feather banding (locus *B* and autosomal recessive banding) is identified. Today, only some genes that determine the color of the plumage of chickens are studied and described. Different genes can produce similar plumage patterns, and different phenotypes can be determined by the polymorphism of a single gene. Using molecular methods, you can more accurately identify these differences. This overview shows the nature of melanin coloration in birds using

the example of chickens of various breeds and also attempts to systematize knowledge about the molecular-genetic mechanisms of the appearance of various types of coloration.

Key words: chickens; coloring plumage; genes; locus; expression; markers.

For citation: Makarova A.V., Mitrofanova O.V., Vakhrameev A.B., Dementeva N.V. Molecular-genetic bases of plumage coloring in chicken. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):343-354. DOI 10.18699/VJ19.499 (in Russian)

Введение

Важный признак у птиц, нередко определяющий принадлежность к тому или иному виду или породе, – это окраска оперения. Именно окраска оперения легла в основу разработки таких парадигм в биологии, как теория видообразования. Цвет оперения во многом определяет то, как животные общаются друг с другом, играет важную роль в адаптации к условиям окружающей среды (Cott, 1940). Среди птиц широко распространены узоры пера, возникшие под давлением естественного отбора (Roulin, 2004; Roulin, Ducrest, 2013).

Окраска оперения является результатом двух разных, но взаимосвязанных физических процессов: 1) химический механизм создает окраску как результат действия веществ, которые поглощают определенную длину волны и формируют так называемые пигментные цвета; 2) оптический механизм, обусловленный интерференцией света, отраженного биологическими микроструктурами пера, создает структурные цвета. Благодаря оптическому механизму возникают цвета, которые не могут генерироваться одними только пигментами, однако специализированные микроструктуры часто требуют присутствия пигментов, которые поглощают определенные длины волн для получения структурных цветов (D'Alba et al., 2012). Следовательно, пигментные и структурные цвета являются не результатом двух независимых процессов, а скорее, основой, ответственной за все разнообразие окраски.

Птицы характеризуются большим разнообразием цвета оперения. Это связано с тем, что у них, в отличие от млекопитающих и человека, визуальное восприятие сородичей, взаимодействие с ними играет ведущую роль (Negro et al., 2016). Пигменты, ответственные за это разнообразие, откладываются не только в перьях, но и в неоперенных частях тела, таких как клюв и ноги. У птиц описаны три группы пигментов, дающих вариации окраски оперения: меланин, каротиноиды и необычные цвета (например, порфирин). Большинство из этих пигментов присутствуют только в определенных группах птиц (Lopes et al., 2016; Vreelsford et al., 2017; Cooke et al., 2017). Наиболее широко распространены меланины и каротиноиды. Обычно меланины встречаются чаще, а у некоторых видов (например, ласточки) уровень меланина на порядок выше, чем уровень каротиноидов (McGraw et al., 2004).

У сельскохозяйственных птиц, в том числе у кур, окраска оперения может служить генетическим маркером, полезным для идентификации пород, популяций и селекционных групп со свойственными им признаками (Моисеева и др., 2012; Mitrofanova et al., 2017). Молекулярно-генетический механизм появления того или иного типа окраски еще до конца не изучен, поскольку на один и тот же признак могут влиять несколько генов. Одни гены обуславливают первичные эффекты окраски, другие

играют роль модификаторов и регуляторов, влияющих на зональное и региональное распределение пигмента, распределение его внутри отдельных перьев (полосатость, пятнистость, окаймленность и другие узоры пера) (Юрченко и др., 2015). Это разделение условно, и проявление пигмента может различаться в окраске пуха, ювенального и взрослого оперения кур (Серебровский, 1926; Crawford, 1991; Yang et al., 2017).

В настоящем обзоре мы рассматриваем природу меланиновой окраски у птиц на примере кур различных пород, а также молекулярно-генетические механизмы появления разных типов этой окраски. В качестве примера различной окраски приведены генофондные породы из биоресурсной коллекции «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (<http://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kollekciya-redkix-i-ischezayushhix-porod-kur/>).

Биохимия синтеза меланина

Самым распространенным пигментом у птиц является меланин, у которого описаны два типа – эумеланин и феомеланин. Эумеланин – более крупная форма, ответственная за черные и коричневые оттенки, феомеланин отвечает за красновато-коричневые оттенки. Эти пигменты продуцируются эндогенно в периферических тканях, таких как кожа, в специализированных клетках меланоцитах.

Меланоциты наиболее распространены в коже, волосах, фолликулах перьев и в глазах (Dupin, Le Douarin, 2003). Обнаружены они и во внутреннем ухе, пищевode, щитовидной железе, костях, сердце и даже в мозге, например, нейромеланин (Zucca et al., 2014).

У млекопитающих и птиц меланин производится в небольших органеллах, называемых меланосомами, которые содержат все ферменты, необходимые для процесса пигментации. В зависимости от структуры и расположения меланосом, цвет окраски оперения птиц может претерпевать изменения (Maia et al., 2013; Nordén et al., 2018). На рис. 1 представлено строение фолликула пера во время фазы покоя и роста. Покоящиеся клетки-предшественники меланоцитов присутствуют в основании пера. Если перо сорвано или потеряно в результате линьки, клетки-предшественники меланоцитов активируются и мигрируют вверх по растущему стволу пера, делятся и дифференцируются в меланоциты, продуцирующие пигмент.

Птичьи меланины образуются из ароматической аминокислоты тирозин (Lerner, Fitzpatrick, 1950). Фермент тирозиназа катализирует начальную стадию окисления тирозина до допахинона, который является промежуточным продуктом синтеза обоих типов меланина. В случае, если в работу включаются дополнительные ферменты TRP1 и TRP2/DCT, произойдет синтез черного эумеланина. Кроме генетического контроля, на меланогенез могут влиять экологические или физиологические воздействия,

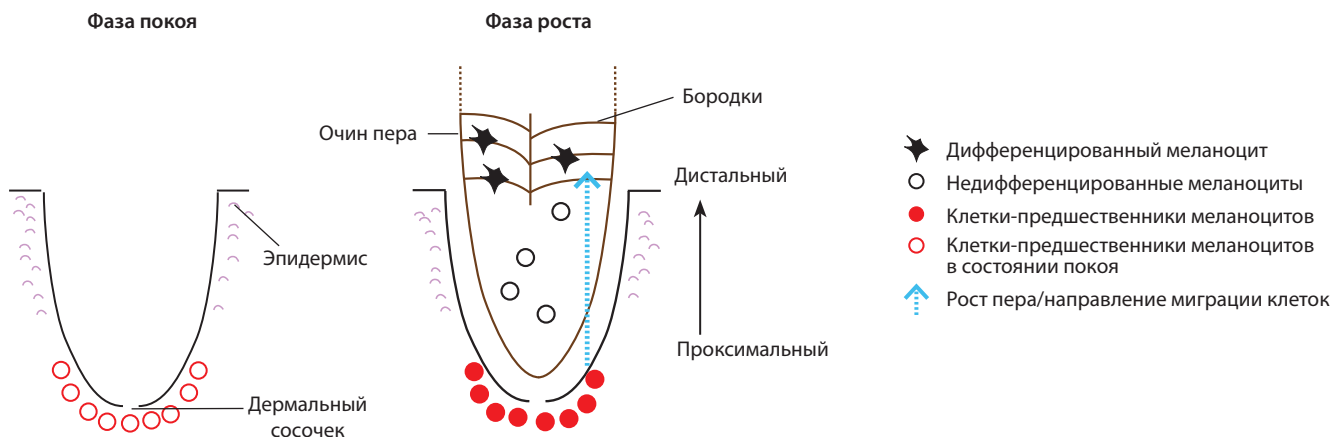


Рис. 1. Строение фолликула пера во время покоя и роста, по (Schwochow-Thalmann, 2018).

а окраска будет зависеть от сезона, пола и формы покрова. На меланин влияют четыре класса гормонов: андрогены, эстрогены, гормоны гипофиза (лютеинизирующий гормон) и гормоны щитовидной железы. Меланин может взаимодействовать с другими пигментами, давая сложную окраску перьев. Дополнительно еще накладывается окраска, обусловленная структурой пера (Rzepka et al., 2016).

Желтый пигмент требует дополнительной аминокислоты – цистеина. Например, при высоком уровне цистеина в окружающей среде может быть повышен синтез феомеланина (Smit et al., 1997; Land, Riley, 2000). Подобная ситуация наблюдается и под влиянием других факторов (Ancans et al., 2001), когда концентрация или активность *TYR* низка (Ozeki et al., 1997; Ito et al., 2000) либо активируются пути, которые подавляют производство эумеланина, например сигнальный путь агути (Takeuchi et al., 2000; Wolff, 2003). Более высокая экспрессия *TRP1* и *TRP2/DCT* коррелирует с темной пигментацией у ряда птиц, таких как куры, утки, китайские расписные перепела, голуби и гуси (Galvan, Solano, 2016; Galvan et al., 2017). Кроме того, некоторые гормоны, такие как α -меланотарный стимулирующий гормон (α MSH), а также стероидные гормоны (тестостерон) влияют на меланогенез, как правило, путем увеличения продуцирования эумеланина (Strasser, Schwabl, 2004; Eising et al., 2006) (рис. 2).

Учитывая разнообразие пигментов птиц и их функций, понимание моле-



Рис. 2. Влияние уровня тестостерона на половой диморфизм окраски фавероль лососевой (а, б) и итальянской куропатчатой (в, г).

Здесь и далее на photographs представлены генофондные породы из биоресурсной коллекции «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур». Авторы всех фотографий А. Санганаева, А.Б. Вахрамеев.



Рис. 3. Снижение активности *MC1R* от эумеланинового полностью черного цвета, аллель *E* (панциревская порода) (а), через березовую окраску, аллель E^R (узбекская бойцовая) (б) к усилению феомеланиновой окраски у e^{Wh} (ню-гемпшир) (в) до палевой у e^Y (леггорн) (г).

кулярной основы этих процессов остается недостаточно изученным. Больше всего к настоящему времени накоплено знаний о синтезе меланина.

Процесс меланогенеза включает фазы со множеством локусов, участвующих в сложной экспрессии генов окраски оперения (Doucet et al., 2004; Baiao et al., 2007; Uy et al., 2009; Johnson et al., 2012). Молекулярные исследования у млекопитающих и птиц показали, что локус сплошной черной окраски кодирует рецептор меланокортина 1 (*MC1R*) (Takeuchi et al., 1996; Mundy, 2005). Этот рецептор встроен в мембрану меланоцитов и кодируется небольшим геном (менее 1000 п. н.). При связывании его с антагонистом α MSH происходит изменение конформации рецептора, активация аденилилциклазы, вызывающая переход АТФ в циклическую форму АМФ. Увеличение уровня циклического АМФ ведет к активации транскрипционных факторов *CREB* (cAMP response element-binding protein) и *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) (Schiaffino, 2010). Более высокая активность *MC1R* обычно приводит к более темной пигментации, тогда как низкая активность способствует производству феомеланина (García-Borron et al., 2005).

Первичная пигментация оперения

Базовое или зональное распределение черного эумеланина по всему телу кур определяется мутациями гена *MC1R*, приводящими к изменению активизации рецептора, что объясняет варианты окраски локуса *E* у кур (Smyth, 1990; Sazanov et al., 1998; Kerje et al., 2003; Ling et al., 2003; Hoque et al., 2013). Локус *E* включает аллели: *E* – полностью черная окраска (минорка, черный

австралорп, панциревская); E^R – березовая окраска (юрловская голосистая порода); e^{Wh} – доминантная пшеничная (ню-гемпшир); e^+ – дикий тип окраски (итальянская куропатчатая, см. рис. 2, в, г); e^b – коричневая (загорская лососевая, фавероль, см. рис. 2, а, б); e^{bc} – баттеркап (сицилийский баттеркап); e^y – рецессивная пшеничная окраска (род-айланд) (рис. 3). Эти аллели влияют на распределение меланиновых пигментов (эумеланин и феомеланин) в перьях (Серебровский, 1926; Somes et al., 1988; Davila et al., 2014).

Исследования S. Davila с коллегами (2014) показали, что гаплотипы гена *MC1R* объясняют изменения окраски кур по локусу *E* у различных пород. Обнаружено 11 гаплотипов по семи значимым SNP. Найдена ассоциация распределения этих гаплотипов по аллелям локуса *E*. Наибольшее число гаплотипов известно для пород с черной, березовой и голубой окраской оперения, тогда как куропатчатые и красные породы были мономорфными. По мнению авторов, мутация Glu92Lys может быть ответственной за активацию рецептора для продуцирования эумеланина, являясь необходимым, но не всегда достаточным условием для максимальной экспрессии черного фенотипа (Davila et al., 2014). Другая мутация Arg213Cys может быть причиной потери или снижения функции рецептора для продуцирования эумеланина, а мутация Ala137Thr – кандидатом для ослабления эффекта Glu92Lys. Наблюдаемая совместная сегрегация аллелей и полиморфизмов *E* в *MC1R* подтверждает, что локус *E* эквивалентен *MC1R*.

В последнее время были предприняты попытки проведения полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) черной окраски оперения с отдельными SNP на чипах различной плотности. Общее исследование (Park et al., 2013) с помощью чипа Illumina 60K выявило 12 значимых SNP, ассоциированных с окраской. В интронной области *AKT3* найден SNP (rs14339964), расположенный на хромосоме 3, который, как известно, является одним из ключевых генов в образовании клеток меланомы (Tsao et al., 2012). Таким образом, авторы делают заключение, что мутации *AKT3*

могут быть связаны с пигментацией оперения. Другие два SNP (GGaluGA344987 и rs14641648 на хромосомах 3 и 8 соответственно) расположены в межгенной области около генов *KRT7* и *PAP2*, которые связаны с пигментацией. *PAP2* (*LPPR5*) увеличивает пигментацию (Shan et al., 2009), а *KRT7* входит в семейство генов кератина и связан с меланокитарными опухолями (Blum et al., 2010). Обнаруженный полиморфизм в интроне гена *DDX6*, возможно, тоже связан с окраской, так как является подтвержденным геном заболевания кожи витилиго (Tang et al., 2012).

В работе (Yang et al., 2017) с помощью чипа Affymetrix 600K HD выявлены 13 значимых SNP в десяти генах. Найдены наиболее вероятные, влияющие на синтез эумеланина кандидатные гены *SHN* и *NUAK*. Основываясь на предыдущих исследованиях модельных видов, авторы предположили, что гены киназы *NUAK 1* и сигнальный ген *SHN* могут играть роль в развитии клеток меланобластов во время эмбрионального периода, что также влияет на пигментацию пера (Yang et al., 2017).

На биосинтез и типы меланина оказывает влияние активность тирозиназы (Chang et al., 2006). Отсутствие ее функции приводит к полной потере меланина в коже, пере, сетчатке и вызывает альбинизм у разных видов. Тирозиназа – важный фермент в биогенезе меланина в пигментных клетках (Niwa et al., 2002). В исследованиях W. Liu с соавторами (2010) гены тирозиназы (*TYR*) и меланокортина 1 (*MC1R*) были приняты в качестве основных генов, участвующих в пигментации оперения цыплят. Профили изменения цвета оперения и уровни экспрессии генов *TYR* и *MC1R* наблюдались от рождения до возраста 112 дней. Уровень экспрессии *TYR* был максимальным в суточном возрасте, а потом резко снижался в течение изученных возрастов; уровень экспрессии *MC1R* был наивысшим на 28-й день. Экспрессия *TYR* у цыплят, несущих аллели E/E и E/e в локусе *MC1R*, была выше от рождения до 28 дней, чем у тех, которые несут аллели e/e. Эти исследования показали, что механизмы, влияющие на окраску пуха в суточном возрасте, и механизмы, регулирующие окраску оперения в более позднем возрасте, различны. Кроме того, хотя ген *TYR* во взаимодействии с геном *MC1R* являются определяющими факторами окраски оперения, разные фенотипы не соответствовали разным генотипическим классам как для генов *TYR*, так и для *MC1R*, а рецессивная белая вариация гена *TYR* не могла полностью блокировать синтез меланина до 28 дней. Поэтому суточные цыплята были окрашены в соответствии с аллелем локуса E (Liu et al., 2010).

В исследовании (Chang et al., 2006) была показана вставка полноразмерного ретровируса внутри интрона 4 гена *TYR* у рецессивных белых цыплят (Chang et al., 2006; Kuliawat, Santambrogio, 2009), приводящая к нарушению экспрессии тирозиназы. Такой рецессивный эпистаз характерен для некоторых белоокрашенных пород, например шелковой (рис. 4). Делеция в гене *TYR6* нуклеотидов (-GACTGG) привела к аутосомальному альбинизму (Tobita-Teramoto et al., 2000).

Гены *MC1R* и *TYR* служат молекулярно-генетической основой для формирования окраски оперения у кур. Другие гены являются модификаторами их экспрессии.



Рис. 4. Шелковая порода кур. Рецессивный эпистаз гена *TYR*.

Гены-модификаторы

Изменение окраски любого генотипа по локусу E может быть индуцировано доминантным аллелем I, который ингибирует экспрессию эумеланина, разрушая меланоциты. Локус I ассоциирован с геном *PMEL17*, расположенным на хромосоме 33 у кур, которая кодирует специфический для меланоцитов белок и имеет важное значение для нормального развития эумеланосом (Keeling et al., 2004; Kerje et al., 2004; Natt et al., 2007). Локус I имеет четыре аллеля: доминантный белый (I); Smoky (I^S), частично восстанавливает пигментацию и дает сероватый фенотип, является рецессивным для доминантного белого, но частично доминирующим для аллеля дикого типа (i); Dun (I^D) ингибирует только экспрессию эумеланина и дает коричневую окраску (Galeotti et al., 2003; Karlsson et al., 2010; Gaudet et al., 2011). Доминантный белый был обнаружен у белого леггорна и связан со вставкой 9 п. н. в экзоне 10 *PMEL17*, что привело к введению трех аминокислот в трансмембранную область. Аналогично появилась делеция пяти аминокислот в трансмембранной области в белке, кодируемом Dun. Аллель Smoky появился уже у белого леггорна и включает в себя как инсерцию в экзоне 10, так и делецию 12 нуклеотидов в экзоне 6, исключая четыре аминокислоты из белка.

Темно-коричневая (Db) мутация у цыплят уменьшает экспрессию черного эумеланина и усиливает экспрессию красного феомеланина, но только в определенных частях оперения. Авторы работы (Gunnarsson et al., 2011) предположили ассоциацию фенотипа Db с делецией 8.3 кб, расположенной на хромосоме 1 на 14 кб выше гена *SOX10*, который является важным фактором транскрипции в меланоцитах и других типах клеток. Механизм действия этой мутации приводит к уменьшению экспрессии гена *SOX10*, что снижает синтез ключевых ферментов, таких как тирозиназа. Далее тирозиназа приводит к сдвигу в сторону более феомеланистического (красноватого) цвета оперения, являющегося характерной особенностью генотипа Db. Темно-коричневый аллель особенно интересен, поскольку он влияет на характер пигментации, а не на ее наличие или отсутствие. Простой диагностический тест для определения генотипа Db облегчит изучение других локусов, связанных с окраской пера.

Еще одним геном, влияющим на экспрессию тирозиназы, является ген *MLPH* (Vaez et al., 2008; Bed'hom et



Рис. 5. Серебристая окраска оперения (а, б) – аллель S (первомайская порода), и золотистая окраска (в, г) – аллель s (полтавская глинистая порода).

al., 2012; Xu et al., 2016). Изучая голубую (LAV) окраску оперения кур на основании ортологии с геном, встречающимся у мышей, M. Vaez с коллегами (2008) обнаружили однонуклеотидный полиморфизм, ослабляющий окраску гена E. Позднее у перепелов были найдены мутации в гене *MLPH*, приводящие к формированию лавандовой окраски оперения (Bed'hom et al., 2012). Связь окраски LAV с мутациями в этом гене была подтверждена на примере кур породы Ани (Xu et al., 2016).

На хромосоме Z у *Gallus gallus* расположен ген, определяющий золотистость и серебристость оперения (Gunnarsson et al., 2007). Он образует серию аллелей: S*S (серебристый), S*N (дикий тип/золотистый) и S*AL (связанный с полом несовершенный альбинизм) (рис. 5).

В ортологичном локусе AL у японского перепела (*Coturnix japonica*) также был найден альбинизм (AL*A), связанный с полом. Определяет окраску белок SLC45A2, который играет важную роль в сортировке везикул в меланоцитах. Мутация 106delT в аллеле S*AL кур приводит к сдвигу рамки считывания, образованию стоп-кодона и деградации соответствующей мРНК.

Мутация у японского перепела AL*A вызывает проскальзывание рамки считывания в экзоне 4. Две независимые миссенс-мутации Tyr277Cys и Leu347Met ассоциированы с серебристым аллелем у кур. Особенностью вариантов SLC45A2 является специфическое ингибирование красного феомеланина у серебристых цыплят (Gunnarsson et al., 2007). Остается неизвест-

ным, почему мутации в этом локусе вызывают почти полное отсутствие как эумеланина, так и феомеланина, тогда как некоторые доминирующие миссенс-мутации вызывают специфическое ингибирование производства феомеланина.

E. Oribe с соавторами (2012) изучали сигнальный белок агутти (ASIP), паракринный фактор, который стимулирует синтез феомеланина и ингибирует синтез эумеланина в фолликулярных меланоцитах. У млекопитающих дистальный промотор гена *ASIP* действует исключительно на вентральной стороне тела, создавая защитную пятнистую окраску пигментации и стимулируя синтез феомеланина на брюшной стороне. *ASIP* продуцирует пятнистость у цыплят и взрослых самок, аналогичную млекопитающим. Кроме того, промотор класса 1 этого гена играет важную роль в создании половых различий, контролируемых эстрогеном.

Вторичная окраска оперения

Вторичная пигментация оперения определяется белыми пятнами или специфическим распределением эумеланина на отдельных перьях (Smyth, 1990). Молекулярно-генетические исследования значительно расширили область знаний генетических механизмов формирования такой окраски. У некоторых пород кур по всему миру встречается пестрая окраска оперения, где кончик опахала окрашен в белый цвет. Формирование такого мраморного рисунка пера связывают с мутацией эндотелинового рецептора B2 (*EDNRB2*), расположенного на хромосоме 4 (Kinoshita et al., 2014). Благодаря этим исследованиям был обнаружен полиморфизм в кодирующей области гена *EDNRB2*, приводящий к замещению Arg332His, который ранее описан как локус mo.

Другая мутация G1008T вызывает замещение аминокислоты Cys244Phe в экзоне 5 и провоцирует дефектное связывание белка с эндотелинами. В результате такой замены нарушаются дифференцировка, пролиферация и миграция меланоцитов. Оперение кур mo^w/mo^w осветляется до почти белой окраски с несколькими частично пигментированными перьями. Доказано, что такой фенотип не связан

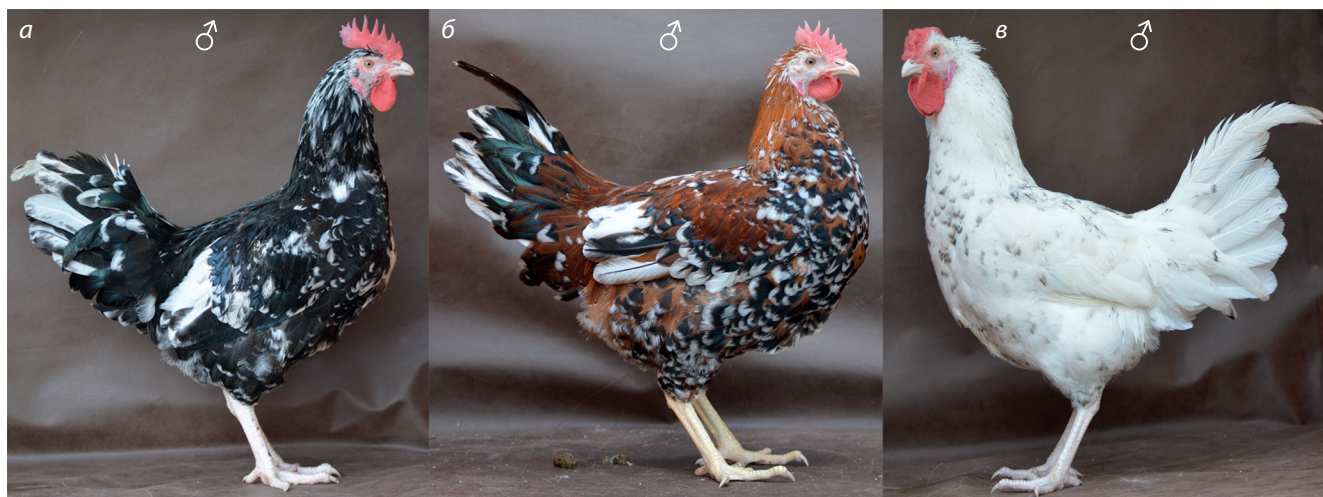


Рис. 6. Три различных фенотипа в разных сочетаниях гена *mo* с другими генами окраски: а – черно-пестрая окраска оперения (австралорп черно-пестрый); б – ситцевая окраска оперения (ленинградская ситцевая); в – белая слабо-пестрая окраска оперения (пушкинская порода).

с геном тирозиназы и имеет аутосомно-рецессивный тип наследования по сравнению с пигментированным фенотипом. В отличие от альбиносов, мутантные цыплята mo^w/mo^w имели окрашенную радужную оболочку глаз и несколько пигментированных пятен на беловато-желтом пухе. Эта мутация присутствовала также у особей четырех японских пород с белым оперением. Результаты свидетельствуют о том, что сигнализация *EDN3* (эндотелин 3) – *EDNRB2* необходима для нормальной пигментации у птиц (Kinoshita et al., 2014).

R. Somes (1980) говорит о шести фенотипах, получаемых в различных сочетаниях гена *mo* с другими генами окраски. В биоресурсной «Генетической коллекции редких и исчезающих пород кур» сохраняются несколько пород, содержащих аллель *mo* в своем генотипе и имеющих три различных фенотипа (рис. 6): ситцевые породы кур, черно-пестрый австралорп и пушкинская порода.

В современных породах кур нередко встречается полосатая окраска оперения, сцепленная с полом, которая характеризуется полностью белой полосой на основном фоне оперения и вызвана так называемым barring-эффектом. Ослабление окраски наблюдается как у оперения взрослой птицы, так и у пуха суточных цыплят (Campo, 1991; Алексеевич и др., 2000; Dorshorst, Ashwell, 2009).

Сцепленная с полом полосатость определяется В-локусом, связанным



Рис. 7. Плимутрок. Более светлая окраска оперения петуха (B1/B1) по сравнению с курицей (B1/-).

с геном *CDKN2A* (Hellström et al., 2010, 2011). Лocus В осветляет дермальный пигмент в плюснах, клюве и ограничивает распространение черного пигмента, создавая полосатый узор пера (Jerome, 1939). Так как ген В расположен в хромосоме Z, гомозиготным он может быть только у петухов, а курицы гемизиготны. Степень ослабления пигментации зависит от гомо- или гетерозиготного состояния аллеля (Коган, 1979) (рис. 7).

В исследованиях (Schwochow Thalmann et al., 2017) установлено, что сцепленный с полом полосатый рисунок оперения у кур связан с двумя некодирующими и двумя кодирующими мутациями, влияющими на транскрипцию APФ в локусе супрессора опухоли *CDKN2A*. Эти мутации образуют четыре функционально разных аллеля – BN, B1, B2 и B0. Последний аллельный вариант характеризуется экстремальным разбавлением меланина (Schwochow Thalmann et al., 2017). Эти аллельные варианты формировались из четырех SNP, расположенных в области 12 кб, включая экзон 1 *CDKN2A*. Два SNP находились в некодирующих областях: SNP1 – в промоторе, SNP2 – в инт-

Локусы, формирующие основные типы окраски оперения у кур

Локус	Хромо-сома	Генотип	Окраска	Порода	Тип мутации	Лит. источник
<i>MC1R</i>	11	E	Черный	Минорка, черный австралорп	Гаплотип H1 (G274A)	Dávila et al., 2014
		E ^R	Березовая	Юрловская голосистая	Гаплотипы H1, H4, H5, H6	
		e ^{Wh}	Доминантный пшеничный	Нью-гемпшир	Гаплотип H7 (A427G)	
		e ⁺	Дикий тип	Итальянская куропатчатая	Гаплотип H0 (референсная последовательность)	
		e ^b	Коричневый	Загорская, фавероль	Гаплотип H9 (4SNP)	
		e ^{bc}	Светло-палевая (баттеркап)	Сицилийский баттеркап	Гаплотипы H10, H7, H1	
		e ^y	Рецессивная пшеничная	Некоторые линии род-айланд	Гаплотип H11 (C637T)	
<i>EDN3</i>	20	FM	Черная кожа и внутренние ткани	Китайские шелковые	Дупликация и инверсия в гене <i>EDN3</i>	Dorshorst et al., 2011
<i>SOX10</i>	1	Db	Темно-коричневая	Фризские куры	Делеция 8.3 кб перед сайтом транскрипции <i>SOX10</i>	Gunnarsson et al., 2011
<i>CDKN2A</i>	Z	B0	Белый	Гибриды леггорна и красной джунглевой курицы	Сочетание трех SNP: двух в промоторе гена, SNP в интроне, сочетание двух SNP	Schwochow Thalmann et al., 2017
		B1	Черные и белые полосы	Плимутрок	Сочетание трех SNP в промоторе гена, SNP в интроне, сочетание двух SNP	
		B2	Светлый петух, полосатая курица	Гибриды леггорна и красной джунглевой курицы	Сочетание трех SNP: в промоторе гена, SNP в интроне, сочетание двух SNP	
<i>PMEL17</i>	33	I (доминантный белый)	Белый (W), серовато-коричневый	Белый леггорн	9 п. н. инсерция в экзоне 10	Kerje et al., 2004
		D	Более светлый, чем дикий тип	Дан	Делеция 15 п. н.	
		S	Дымчатый (темно-серый)	Белый леггорн	12 п. н. делеция в экзоне 6	
<i>SLC45A2</i>	Z	Al	Белый	Гибриды леггорна и красной джунглевой курицы	Делеция T нуклеотида в позиции 106 гена	Gunnarsson et al., 2007
		S	Серебристый	Юрловская голосистая	Две независимые миссенс-мутации Tyr277Cys и Leu347Met	
<i>MLPH</i>	7	LAV*L	Лавандовый	Орпингтон	Замена C103T	Vaez et al., 2008
<i>TYR</i>	1	C*C	Белый	Китайская шелковая	7.7 кб вставка в интроне 4	Chang et al., 2006
		c ^a	Белый	Линия белых леггорнов	Делеция 6 п. н. (-GACTGG)	
<i>EDNRB2</i>	4	mo ^w	Рецессивный белый	Минохики	Замена G1008T в экзоне 5	Kinoshita et al., 2014
		mo	Пятнистый	Карликовый кохинхин, черно-пестрый австралорп	Полиморфизм TC300T, A320G и G1272A	

роне 1. Другие два SNP являются миссенс-мутациями. SNP3 вызывает замещение валина аспарагиновой кислотой (V9D), в то время как SNP4 вызывает замещение аргинина цистеином (R10C). Гаплотип B1 формируют SNP1, SNP2, SNP3. Гаплотип B2 включает SNP1, SNP2, SNP4, а B0 – SNP1, SNP2.

Кроме сцепленной с полом полосатой окраски оперения, у кур существует аутосомный полосатый рисунок оперения. Черные полосы на белом или красном фоне в

этом случае индуцированы, возможно, не блокировкой, а усилением меланогенеза на фоне рецессивных вариантов E. Молекулярная основа такой экспрессии еще недостаточно изучена.

Изменение цветового типа в значительной степени зависит от изменения количества эумелановых и феомелановых пигментов пера (Guernsey et al., 2013), что создает множество различных вариаций в основной окраске оперения. Например, коричневая окраска в разных по-

родах кур меняется от темно-коричневой (род-айланд) до золотистой или палевой (брама палевая, опытная царскосельская популяция).

Гены, регулирующие изменчивость окраски, могут иметь плейотропный эффект и влиять на другие продуктивные признаки кур. Появляется возможность использования их в качестве маркера интенсивности роста и идентификации некоторых заболеваний птицы. Так, ген эндотелинового рецептора *EDNRB2* связан со способностью тибетских куриц к гипоксической адаптации в горных условиях (Zhang et al., 2017). Полиморфизм в промоторе гена тирозиназы *TYR* определяет черную окраску кожи и костей у цыплят, что важно при отборе птицы по этим признакам (Yu et al., 2017). Взаимодействия между генами пигментации и окружающей средой могут способствовать образованию меланомы и опухолей (Gudbjartsson et al., 2008; Ibarrola-Villava et al., 2012). У перепелов несколько мутаций в гене *MLPH*, сцепленных с лавандовой окраской оперения, приводят к снижению живой массы (Bed'hom et al., 2012).

Характеристика локусов, картированных на хромосомах кур и определяющих базовые варианты окраски оперения, а также основные гены, участвующие в процессах пигментации оперения у кур, приведены в таблице.

Эволюция гена *MC1R*

Рецептор меланокортина 1, играющий важную роль в формировании окраски оперения у кур, является представителем целого семейства G-белок-связывающих рецепторов, которые участвуют в ряде важных функций организма, включая регулирование энергетического баланса.

Эндогенными лигандами-агонистами в меланокортикальной системе являются α -меланоцит-стимулирующий гормон (α -MSH) и адренорекотропный гормон (АКТГ). В настоящее время известно, что пять подтипов MCR опосредуют действие этих лигандов (Schiöth, 2001). По-видимому, все они встречаются у большинства млекопитающих, а также у кур (Takeuchi, Takahashi, 1998).

Рецептор меланокортина 1 (*MC1R*) экспрессируется главным образом в коже и определяет ее пигментацию, а также цвет волос или меха у большинства млекопитающих, что было показано на примере нескольких мутаций в этом гене (Rees et al., 1999). У цыплят мутации в гене *MC1R* коррелируют с пигментацией пера (Takeuchi et al., 1996). Этот рецептор также опосредует противовоспалительное действие пептидов MSH.

Довольно мало известно об эволюционном происхождении семейства генов рецептора меланокортина. MCR курицы обнаруживаются в гораздо более широком диапазоне тканей по сравнению с млекопитающими, но их физиологическое воздействие до сих пор неясно.

В работе (Schiöth et al., 2003) авторы использовали доступную сравнительную картографическую информацию для определения вероятной хромосомы, ассоциированной с геном *MC1R*. У *Gallus domesticus MC1R* расположен на GGA11, что подтверждено в двухцветных экспериментах FISH, которые однозначно показали последовательную гибридизацию меченного биотином *MC1R* на той же хромосоме, что и меченных дигоксигенином ADL02232 и MCW0097. Последние, как известно, присутствуют на

GGA11 (Schiöth et al., 2003). В этой работе проведен также филогенетический анализ семейства MCR на основе метода максимальной экономии (MEGA2) с использованием полноразмерных аминокислотных последовательностей каждого из рецепторов. Было показано, что гены, отвечающие за MCR1-рецепторы, формируют отдельный кластер генов, возникший, вероятно, в ходе дупликации.

Заключение

Окраска оперения у птиц служит ключевым фактором при взаимодействии птиц между собой благодаря их хорошо развитому зрительному восприятию окружающего мира. У сельскохозяйственных птиц, в том числе у кур, окраска оперения определяет декоративные качества и является маркером для идентификации пород, популяций и селекционных групп. Многообразие окраски оперения складывается в результате двух взаимосвязанных физических процессов – химического и оптического, благодаря которым формируются пигментные и структурные цвета. Самым распространенным пигментом у птиц является меланин, для которого описаны два типа – эумеланин и феомеланин. Пигментация оперения вызвана распределением черного эумеланина по всему телу кур и определяется мутациями гена *MC1R*, в котором описано несколько гаплотипов, объясняющих изменения окраски кур по локусу E у различных пород.

На меланогенез могут оказывать влияние гормоны и ферменты. Гены *EDN3*, *SOX10*, *PMEL17*, *SLC45A2*, *MLPH* и *TYR* являются молекулярно-генетическими модификаторами при формировании окраски оперения у кур. Мутации в этих генах изменяют уровень экспрессии, что определяет биосинтез и типы меланина. Некоторые ингибируют или уменьшают образование черного эумеланина, другие увеличивают количество красного феомеланина. Описаны варианты специфического распределения пигментов на отдельных перьях, формирующие мраморный и полосатый рисунок, что связывают с мутацией эндотелинового рецептора B2 (*EDNRB2*) и мутациями в гене *CDKN2A*. В нашем обзоре рассматривается природа меланиновой окраски у птиц на примере кур различных пород, а также сделана попытка систематизировать знания о молекулярно-генетических механизмах появления различных типов окраски.

Несмотря на то что геном кур хорошо изучен, описаны еще не все гены, влияющие на окраску. Дополнительные сложности связаны с тем, что разными генами иногда продуцируется одинаковый рисунок оперения, а полиморфизмом одного гена могут определяться различные фенотипы. Применение новых современных методов анализа ДНК, таких как секвенирование, полногеномный анализ с использованием чипов различной плотности, экспрессионный анализ на птице из биоресурсных популяций, позволит получить новые данные о генах, определяющих окраску оперения.

Список литературы / References

- Алексеевич Л.А., Барабанова Л.В., Суллер И.Л. Генетика одомашненных животных. СПб.; Ломоносов, 2000.
[Alekseevich L.A., Barabanova L.V., Suller I.L. Genetics of Domesticated Animals. St. Petersburg–Lomonosov, 2000. (in Russian)]

- Коган З.М. Признаки экстерьера и интерьеря у кур. Новосибирск, 1979.
[Kogan S.M. Features of the Exterior and Interior of Chickens. Novosibirsk, 1979. (in Russian)]
- Моисеева И.Г., Романов М.Н., Никифоров А.А., Авруцкая Т.Б. Исследования по генетике кур к 120-летию со дня рождения выдающегося советского генетика А.С. Серебровского (1892–1948). Генетика. 2012;48(9):1021-1038.
[Moiseyeva I.G., Romanov M.N., Nikiforov A.A., Avrutskaya T.B. Studies in chicken genetics. Commemorating the 120th anniversary of the outstanding soviet geneticist A.S. Serebrovsky (1892–1948). Russ. J. Genet. 2012;48(9):869-885. DOI 10.1134/S1022795412090074.]
- Серебровский А.С. Генетика домашней курицы. М., 1926.
[Serebrovsky A.S. Genetics of Domestic Chicken. Moscow, 1926. (in Russian)]
- Юрченко О.П., Вахрамеев А.Б., Макарова А.В. Аддитивные взаимодействия генов в формировании окрасок оперения у кур. Генетика и разведение животных. 2015;4:41-45.
[Yurchenko O.P., Vakhrameev A.B., Makarova A.V. Additive interactions of genes in the formation of plumage colors in chickens. Genetika i Razvedenie Zhivotnykh = Genetics and Animal Breeding. 2015;4:41-45. (in Russian)]
- Ancans J., Tobin D.J., Hoogduijn M.J., Smit N.P., Wakamatsu K., Thody A.J. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. Exp. Cell Res. 2001;268:26-35. DOI 10.1006/excr.2001.5251.
- Baiao P.C., Schreiber E., Parker P.G. The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed boobies (*Sula sula*): a *melanocortin-1 receptor* (*MCLR*) analysis. J. Hered. 2007;98(4):287-292. DOI 10.1093/jhered/esm030.
- Bed'hom B., Vaez M., Coville J.L., Gourichon D., Chastel O., Follett S., Burke T., Minvielle F. The lavender plumage colour in Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of *MLPH* that is related to differences in growth, feed consumption and body temperature. BMC Genomics. 2012;13:442. DOI 10.1186/1471-2164-13-442.
- Blum A., Hartmann K., Rutten A. Braunliche Verfärbung der linken Brustwarze bei einer 60-jährigen Patientin. Der Hautarzt. 2010;61:64-68. DOI 10.1007/s00105-009-1885-z.
- Brelsford A., Toews D.P.L., Irwin D.E. Admixture mapping in a hybrid zone reveals loci associated with avian feather coloration. Proc. Biol. Sci. 2017;284:1866. DOI 10.1098/rspb.2017.1106.
- Campo J.L. Use of the sex-linked barring (*B*) gene for chick sexing on an eumelanotic Columbian background. Poult. Sci. 1991;70(7):1469-1473. DOI 10.3382/ps.0701469.
- Chang C.M., Coville J.L., Coquerelle G., Gourichon D., Oulmouden A., Tixier-Boichard M. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens. BMC Genomics. 2006;5:7-19. DOI 10.1186/1471-2164-7-19.
- Cooke T.F., Fischer C.R., Wu P., Jiang T.X., Xie K.T., Kuo J., Doctorov E., Zehnder A., Khosla C., Chuong C.M., Bustamante C.D. Genetic mapping and biochemical basis of yellow feather pigmentation in budgerigars. Cell. 2017;171(2):427-439.e21. DOI 10.1016/j.cell.2017.08.016.
- Cott H.B. Adaptive Coloration in Animals. London, UK: Methuen & Co., Ltd, Oxford Univ. Press, 1940.
- Crawford R.D. Poultry Breeding and Genetics. Ser.: Developments in Animal and Veterinary Sciences; 22, Elsevier, 1991.
- D'Alba L., Kieffer L., Shawkey M.D. Relative contributions of pigments and biophotonic nanostructures to natural color production: a case study in budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) feathers. J. Exp. Biol. 2012;215:1272-1277. DOI 10.1242/jeb.064907.
- Davila S.G., Gil M.G., Resino-Talavan P., Campo J.L. Association between polymorphism in the melanocortin 1 receptor gene and E locus plumage color phenotype. Poult. Sci. 2014;93(5):1089-1096. DOI 10.3382/ps.2013-03611.
- Dorshorst B.J., Ashwell C.M. Genetic mapping of the sex-linked barring gene in the chicken. Poult. Sci. 2009;88(9):1811-1817. DOI 10.3382/ps.2009-00134.
- Dorshorst B., Molin A.M., Rubin C.J., Johansson A.M., Strömstedt L., Pham M.H., Chen C.F., Hallböök F., Ashwell C., Andersson L. A complex genomic rearrangement involving the endothelin 3 locus causes dermal hyperpigmentation in the chicken. PLoS Genet. 2011;7(12):e1002412. DOI 10.1371/journal.pgen.1002412.
- Doucet S.M., Shawkey M.D., Rathburn M.K., Mays H.L., Montgomerie R. Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci. 2004;271(1549):1663-1670. DOI 10.1098/rspb.2004.2779.
- Dupin E., Le Douarin N.M. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. Oncogene. 2003;22(20):3016-3023.
- Eising C.M., Muller W., Groothuis T.G.G. Avian mothers create different phenotypes by hormone deposition in their eggs. Biol. Lett. 2006;2:20-22. DOI 10.1098/rsbl.2005.0391.
- Galeotti P., Rubolini D., Dunn P.O., Fasola M. Colour polymorphism in birds: causes and functions. J. Evol. Biol. 2003;16(4):635-646. DOI 10.1046/j.1420-9101.2003.00569.x.
- Galvan I., Garcia-Campa J., Negro J.J. Complex plumage patterns can be produced only with the contribution of melanins. Physiol. Biochem. Zool. 2017;90(5):600-604. DOI 10.1086/693962.
- Galvan I., Solano F. Bird integumentary melanins: biosynthesis, forms, function and evolution. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(4):520. DOI 10.3390/ijms17040520.
- Garcia-Borrón J.C., Sanchez-Laorden B.L., Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. Pigment Cell Res. 2005;18(6):393-410.
- Gaudet P., Livstone M.S., Lewis S.E., Thomas P.D. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. Rief. Bioinform. 2011;12(5):449-462. DOI 10.1093/bib/bbr042.
- Gudbjartsson D.F., Sulem P., Stacey S.N., Goldstein A.M., Rafnar T., Sigurgeirsson B., Benediksdóttir K.R., Thorisdóttir K., Ragnarsson R., Sveinsdóttir S.G., Magnússon V., Lindblom A., Kostulas K., Botella-Estrada R., Soriano V., Juberias P., Grasa M., Saez B., Andres R., Scherer D., Rudnai P., Gurdau E., Koppova K., Kiemeny L.A., Jakobsdóttir M., Steinberg S., Helgason A., Gretarsdóttir S., Tucker M.A., Mayordomo J.I., Nagore E., Kumar R., Hansson J., Olafsson J.H., Gulcher J., Kong A., Thorsteinsdóttir U., Stefansson K. *ASIP* and *TYR* pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. Nat. Genet. 2008;40:886-891. DOI 10.1038/ng.161.
- Guernsey M.W., Ritscher L., Miller M.A., Smith D.A., Schoneberg T., Shapiro M.D. A Val85Met mutation in melanocortin-1 receptor is associated with reductions in eumelanin pigmentation and cell surface expression in domestic rock pigeons (*Columba livia*). PLoS One. 2013;8(8):e74475. DOI 10.1371/journal.pone.0074475.
- Gunnarsson U., Hellstrom A.R., Tixier-Boichard M., Minvielle F., Bed'hom B., Ito S., Jensen P., Rattink A., Vereijken A., Andersson L. Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. Genetics. 2007;175(2):867-877. DOI 10.1534/genetics.106.063107.
- Gunnarsson U., Kerje S., Bed'hom B., Sahlqvist A.S., Ekwall O., Tixier-Boichard M., Kampe O., Andersson L. The Dark brown plumage color in chickens is caused by an 8.3-kb deletion upstream of *SOX10*. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(2):268-274. DOI 10.1111/j.1755-148X.2011.00825.x.
- Hellström A.R., Sundström E., Gunnarsson U., Bed'Hom B., Tixier-Boichard M., Honaker C.F., Sahlqvist A.S., Jensen P., Kampe O., Siegel P.B., Kerje S., Andersson L. Sex-linked barring in chickens is controlled by the *CDKN2A/B* tumour suppressor locus. Pigment Cell Melanoma Res. 2010;23(4):521-530. DOI 10.1111/j.1755-148X.2010.00700.x.
- Hellström A.R., Watt B., Fard S.S., Tenza D., Mannström P., Narfström K., Ekesten B., Ito S., Wakamatsu K., Larsson J., Ulfen-

- dahl M., Kullander K., Raposo G., Kerje S., Hallböök F., Marks M.S., Andersson L. Inactivation of *Pmel* alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. *PLoS Genet.* 2011;7(9):e1002285. DOI 10.1371/journal.pgen.1002285.
- Hoque M.R., Jin S., Heo K.N., Kang B.S., Jo C., Lee J.H. Investigation of MC1R SNPs and their relationships with plumage colors in Korean native chicken. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2013;26(5):625-629. DOI 10.5713/ajas.2012.12581.
- Ibarrola-Villava M., Hu H.-H., Guedj M., Fernandez L.P., Descamps V., Basset-Seguín N., Bagot M., Bensussan A., Saiag P., Fargnoli M.C., Peris K., Aviles J.A., Lluch A., Ribas G., Soufir N. *MC1R*, *SLC45A2* and *TYR* genetic variants involved in melanoma susceptibility in Southern European populations: results from a meta-analysis. *Eur. J. Cancer.* 2012;48:2183-2191. DOI 10.1016/j.ejca.2012.03.006.
- Ito S., Wakamatsu K., Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 2000;13(8):103-109.
- Jerome F.N. Autosex linkage in Barred Plymouth Rock. *Poult. Sci.* 1939;18(18):437-440.
- Johnson J.A., Ambers A.D., Burnham K.K. Genetics of plumage color in the Gyrfalcon (*Falco rusticolus*): analysis of the melanocortin 1 receptor gene. *J. Hered.* 2012;103:315-321. DOI 10.1093/jhered/ess023.
- Karlsson A.C., Kerje S., Andersson L., Jensen P. Genotype at the *PMEL17* locus affects social and explorative behaviour in chickens. *Br. Poult. Sci.* 2010;51(2):170-177. DOI 10.1080/00071661003745802.
- Keeling L., Andersson L., Schutz K.E., Kerje S., Fredriksson R., Carlborg O., Cornwallis C.K., Pizzari T., Jensen P. Chicken genomics: feather-pecking and victim pigmentation. *Nature.* 2004;431(7009):645-646. DOI 10.1038/431645a.
- Kerje S., Lind J., Schutz K., Jensen P., Andersson L. Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Anim. Genet.* 2003;34(4):241-248. DOI 10.1046/j.1365-2052.2003.00991.x.
- Kerje S., Sharma P., Gunnarsson U., Kim H., Bagchi S., Fredriksson R., Schutz K., Jensen P., von Heijne G., Okimoto R., Andersson L. The *Dominant white*, *Dun* and *Smoky* color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the *PMEL17* gene. *Genetics.* 2004;168(3):1507-1518. DOI 10.1534/genetics.104.027995.
- Kinoshita K., Akiyama T., Mizutani M., Shinomiya A., Ishikawa A., Younis H.H., Tsudzuki M., Namikawa T., Matsuda Y. *Endothelin receptor B2 (EDNRB2)* is responsible for the tyrosinase-independent recessive white (*mo^w*) and mottled (*mo*) plumage phenotypes in the chicken. *PLoS One.* 2014;9(1):e86361. DOI 10.1371/journal.pone.0086361.
- Kuliawat R., Santambrogio L. A mutation within the transmembrane domain of melanosomal protein Silver (Pmel17) changes luminal fragment interactions. *Eur. J. Cell Biol.* 2009;88(11):653-667. DOI 10.1016/j.ejcb.2009.07.001.
- Land E.J., Riley P.A. Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways. *Pigment Cell Res.* 2000;13:273-277.
- Lerner A.B., Fitzpatrick T.B. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 1950;30(1):91-126.
- Ling M.K., Lagerstrom M.C., Fredriksson R., Okimoto R., Mundy N.I., Takeuchi S., Schiöth H.B. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *Eur. J. Biochem.* 2003;270(7):1441-1449. DOI 10.1046/j.1432-1033.2003.03506.x.
- Liu W.B., Chen S.R., Zheng J.X., Qu L.J., Xu G.Y., Yang N. Developmental phenotypic-genotypic associations of tyrosinase and melanocortin 1 receptor genes with changing profiles in chicken plumage pigmentation. *Poult. Sci.* 2010;89(6):1110-1114. DOI 10.3382/ps.2010-00628.
- Lopes R.J., Johnson J.D., Toomey M.B., Ferreira M.S., Araujo P.M., Melo-Ferreira J., Andersson L., Hill G.E., Corbo J.C., Carneiro M. Genetic basis for red coloration in birds. *Curr. Biol.* 2016;26(11):1427-1434. DOI 10.1016/j.cub.2016.03.076.
- Maia R., Rubenstein D.R., Shawkey M.D. Key ornamental innovations and diversification in an avian radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(26):10687-10692. DOI 10.1073/pnas.1220784110.
- McGraw K.J., Safra R.J., Evans M.R., Wakamatsu K. European barn swallows use melanin pigments to color their feathers brown. *Behav. Ecol.* 2004;15:889-891.
- Mitrofanova O.V., Dementeva N.V., Krutikova A.A., Yurchenko O.P., Vakhrameev A.B., Terletskiy V.P. Association of polymorphic variants in *MSTN*, *PRL*, and *DRD2* genes with intensity of young animal growth in pushkin breed chickens. *Cytol. Genet.* 2017;51(3):179-184. DOI 10.3103/S0095452717030082.
- Mundy N.I. A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage colouration in birds. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 2005;272:1633-1640. DOI 10.1098/rspb.2005.3107.
- Natt D., Kerje S., Andersson L., Jensen P. Plumage color and feather pecking – behavioral differences associated with *PMEL17* genotypes in chicken (*Gallus gallus*). *Behav. Genet.* 2007;37(2):399-407. DOI 10.1007/s10519-006-9125-0.
- Negro J.J., Blasco R., Rosell J., Finlayson C. Potential exploitation of avian resources by fossil hominins: an overview from ethnographic and historical data. *Quat. Int.* 2016;421:6-11. DOI 10.1016/j.quaint.2015.09.034.
- Niwa T., Mochii M., Nakamura A., Shiojiri N. Plumage pigmentation and expression of its regulatory genes during quail development – histochemical analysis using *Bh* (black at hatch) mutants. *Mech. Dev.* 2002;118(1-2):139-146. DOI 10.1016/S0925-4773(02)00256-3.
- Nordén K.K., Faber J., Babarović F., Stubbs T.L., Selly T., Schiffbauer J.D., Štefanić P.P., Mayr G., Smithwick F., Vinther J. Melanosome diversity and convergence in the evolution of iridescent avian feathers – implications for paleocolor reconstruction. *Evolution.* 2018;73-1:15-27. DOI 10.1111/evo.13641.
- Oribe E., Fukao A., Yoshihara C., Mendori M., Rosal K.G., Takahashi S., Takeuchi S. Conserved distal promoter of the agouti signaling protein (*ASIP*) gene controls sexual dichromatism in chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012;177(2):231-237. DOI 10.1016/j.ygcen.2012.04.016.
- Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Ishiguro I. Chemical characterization of pheomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997;1336(3):539-548.
- Park M.N., Choi J.A., Lee K.T., Lee H.J., Choi B.H., Kim H., Kim T.H., Cho S., Lee T. Genome-wide association study of chicken plumage pigmentation. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2013;26(11):1523-1528. DOI 10.5713/ajas.2013.13413.
- Rees J.L., Birch-Machin M., Flanagan N., Healy E., Phillips S., Todd C. Genetic studies of the human melanocortin-1 receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999;885:134-142.
- Roulin A. The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biol. Rev.* 2004;79:815-848. DOI 10.1017/S1464793104006487.
- Roulin A., Ducrest A.L. Genetics of colouration in birds. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2013;24(6-7):594-608. DOI 10.1016/j.semdb.2013.05.005.
- Rzepka Z., Buszman E., Beberok A., Wrześniak D. From tyrosine to melanin: signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016;70:695-708. DOI 10.5604/17322693.1208033.
- Sazanov A., Masabanda J., Ewald D., Takeuchi S., Tixier-Boichard M., Buitkamp J., Fries R. Evolutionarily conserved telomeric location of *BBC1* and *MC1R* on a microchromosome questions the identity of *MC1R* and a pigmentation locus on chromosome 1 in chicken. *Chromosome Res.* 1998;6(8):651-654. DOI 10.1023/A:1009269830117.
- Schiaffino M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010;42(7):1094-1104. DOI 10.1016/j.biocel.2010.03.023.
- Schiöth H.B. The physiological role of melanocortin receptors. *Vitam. Horm.* 2001;63:195-232. DOI 10.1016/S0083-6729(01)63007-3.
- Schiöth H.B., Raudsepp T., Ringholm A., Fredriksson R., Takeuchi S., Larhammar D., Chowdhary B.P. Remarkable synteny conservation

- of melanocortin receptors in chicken, human, and other vertebrates. *Genomics*. 2003;81(5):504-509.
- Schwochow-Thalman D. Molecular Identification of Colour Pattern Genes in Birds. Uppsala: Swed. Univ. Agric. Sci., 2018;9:1652-6880.
- Schwochow Thalman D., Ring H., Sundstrom E., Cao X., Larsson M., Kerje S., Höglund A., Fogelholm J., Wright D., Jemth P., Hallböök F., Bed'Hom B., Dorshorst B., Tixier-Boichard M., Andersson L. The evolution of *Sex-linked barring* alleles in chickens involves both regulatory and coding changes in *CDKN2A*. *PLoS Genet*. 2017;13(4):1006665. DOI 10.1371/journal.pgen.1006665.
- Shan X., Zhang Y., Peng W., Wang Z., Xie D. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2009;60:3849-3860.
- Smit N.P., Van der Meulen H., Koerten H.K., Kolb R.M., Mommaas A.M., Lentjes E.G., Pavel S. Melanogenesis in cultured melanocytes can be substantially influenced by L-tyrosine and L-cysteine. *J. Invest Dermatol.* 1997;109:796-800.
- Smyth J.R. Genetics of Plumage, Skin and Eye Pigmentation in Chickens. In: Crawford R.D. (Ed.). *Poultry Breeding and Genetics. Ser.: Developments in Animal and Veterinary Sciences*; 22. Elsevier, 1990;109-168.
- Somes R.G. The mottling gene, the basis of six plumage color patterns in the domestic fowl. *Poult. Sci.* 1980;59(7):1370-1374. DOI 10.3382/ps.0591370.
- Somes R.G., Jr. International Registry of Poultry Genetic Stocks. Storrs Agric. Exp. Station. 29. 1988. <https://opencommons.uconn.edu/saes/29>
- Strasser R., Schwabl H. Yolk testosterone organizes behavior and male plumage coloration in house sparrows (*Passer domesticus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2004;56:491-497. DOI 10.1007/s00265-004-0810-9.
- Takeuchi S., Suzuki H., Yabuuchi M. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996;14(1308(2)):164-168. DOI 10.1016/0167-4781(96)00100-5.
- Takeuchi S., Takahashi S. Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1998;112(2):220-231.
- Takeuchi S., Teshigawara K., Takahashi S. Widespread expression of Agouti-related protein (AGRP) in the chicken: a possible involvement of AGRP in regulating peripheral melanocortin systems in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1496:261-269.
- Tang X.-F., Zhang Z., Hu D.-Y., Xu A.-E., Zhou H.-S., Sun L.-D., Gao M., Gao T.-W., Gao X.-H., Chen H.-D. Association analyses identify three susceptibility loci for vitiligo in the Chinese Han population. *J. Invest. Dermatol.* 2012;133:403-410.
- Tobita-Teramoto T., Jang G.Y., Kino K., Salter D.W., Brumbaugh J., Akiyama T. Autosomal albino chicken mutation (c^a/c^a) deletes hexanucleotide ($-\Delta GACTGG817$) at a copper-binding site of the tyrosinase gene. *Poult. Sci.* 2000;79(1):46-50.
- Tsao H., Chin L., Garraway L.A., Fisher D.E. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012;26:1131-1155.
- Uy J.A., Moyle R.G., Filardi C.E., Cheviron Z.A. Difference in plumage color used in species recognition between incipient species is linked to a single amino acid substitution in the melanocortin 1 receptor. *Am. Nat.* 2009;174:244-254. DOI 10.1086/600084.
- Vaez M., Follett S.A., Bed'hom B., Gourichon D., Tixier-Boichard M., Burke T. A single point-mutation within the melanophilin gene causes the *lavender* plumage colour dilution phenotype in the chicken. *BMC Genet.* 2008;9:7. DOI 10.1186/1471-2156-9-7.
- Wolff G.L. Regulation of yellow pigment formation in mice: a historical perspective. *Pigment Cell Res.* 2003;16:2-15.
- Xu J.G., Xie M.G., Zou S.Y., Liu X.F., Li X.H., Xie J.F., Zhang X.Q. Interactions of allele *E* of the *MC1R* gene with *FM* and mutations in the *MLPH* gene cause the five-gray phenotype in the Anyi tile-like gray chicken. *Genet. Mol. Res.* 2016;15(2). DOI 10.4238/gmr.15027633.
- Yang L., Du X., Wei S., Gu L., Li N., Gong Y., Li S. Genome-wide association analysis identifies potential regulatory genes for eumelanin pigmentation in chicken plumage. *Anim. Genet.* 2017;48(5):611-614.
- Yu S., Liao J., Tang M., Wang Y., Wei X., Mao L., Zeng C. A functional single nucleotide polymorphism in the tyrosinase gene promoter affects skin color and transcription activity in the black-boned chicken. *Poult. Sci.* 2017;96(11):4061-4067. DOI 10.3382/ps/pex217.
- Zhang Y., Gou W., Ma J., Zhang H., Zhang Y., Zhang H. Genome methylation and regulatory functions for hypoxic adaptation in Tibetan chicken embryos. *Peer J.* 2017;5:e3891. DOI 10.7717/peerj.3891.
- Zucca F.A., Basso E., Cupaioli F.A., Ferrari E., Sulzer D., Casella L., Zecca L. Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox Res.* 2014;25(1):13-23. DOI 10.1007/s12640-013-9435-y.

ORCID ID


A.V. Makarova orcid.org/0000-0002-3281-4581
O.V. Mitrofanova orcid.org/0000-0003-4702-2736
A.B. Vakhrameev orcid.org/0000-0001-5166-979X
N.V. Dementeva orcid.org/0000-0003-0210-9344

Благодарности. Исследование поддержано программой государственного задания АААА-А18-118021590129-9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.11.2018. После доработки 16.02.2019. Принята к публикации 18.02.2019.

Синапсис, рекомбинация и эпигенетическая модификация хромосом у баранов, гетерозиготных по метацентрической хромосоме 3 домашней овцы *Ovis aries* и акроцентрическим гомологам архара *Ovis ammon*

Т.И. Бикчурина^{1, 2, 3}, Е.К. Томгорова³, А.А. Торгашева^{1, 2, 3}, В.А. Багиров³, Н.А. Волкова³, П.М. Бородин^{1, 2, 3} 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральное научное учреждение животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Дубровицы, Россия


 e-mail: borodin@bionet.nsc.ru

Гибридизация пород домашних животных с их дикими сородичами может служить перспективным методом повышения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных. Ресурсные популяции, полученные на основе гибридизации различных пород домашних овец с муфлоном и архаром, являются важным источником селекционного материала. Кариотипы архара и домашней овцы различаются по Робертсоновской транслокации, возникшей у общего предка муфлона и овец (*Ovis aries*) за счет центрального слияния хромосом 5 и 11 архара (*O. ammon*) с образованием хромосомы 3 овцы. Известно, что гетерозиготность по транслокациям может приводить к нарушениям синапсиса, рекомбинации и сегрегации хромосом в мейозе. Особенности протекания мейоза у баранов, гетерозиготных по транслокации, различающей кариотипы овец и архаров, до сих пор не исследованы. Мы изучали синапсис, рекомбинацию и эпигенетическую модификацию хромосом, вовлеченных в данную перестройку у гетерозигот, с использованием иммунолокализации ключевых белков мейоза. В большинстве клеток наблюдался полный синапсис между метацентрической хромосомой овцы и двумя акроцентрическими хромосомами архара с образованием тривалента. В небольшой доле клеток на стадии ранней пахитены наблюдалась задержка синапсиса в перичентромерных районах тривалента. Неспаренные участки подвергались эпигенетической модификации: фосфорилированию гистона H2A.X. Однако к концу пахитены эти нарушения полностью устранялись. Асинапсис замечался негомологичным синапсисом между перичентромерными районами акроцентрических хромосом. К концу пахитены сигнал γH2A.X сохранялся только на половом биваленте и отсутствовал на триваленте. По числу и распределению рекомбинационных сайтов, степени центромерной и кроссоверной интерференции транслокационный тривалент не отличался от нормальных бивалентов метацентрических хромосом. Таким образом, установлено, что гетерозиготность по хромосоме 3 домашней овцы и хромосомам 5 и 11 архара не вызывает существенных изменений в ключевых процессах профазы I мейоза и, следовательно, не должна приводить к снижению плодовитости у потомков от межвидовой гибридизации овец.

Ключевые слова: *Ovis aries*; иммуноокрашивание; мейоз; синаптонемные комплексы; рекомбинация; Робертсоновские транслокации.

Для цитирования: Бикчурина Т.И., Томгорова Е.К., Торгашева А.А., Багиров В.А., Волкова Н.А., Бородин П.М. Синапсис, рекомбинация и эпигенетическая модификация хромосом у баранов, гетерозиготных по метацентрической хромосоме 3 домашней овцы *Ovis aries* и акроцентрическим гомологам архара *Ovis ammon*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):355-361. DOI 10.18699/VJ19.502


Chromosome synapsis, recombination and epigenetic modification in rams heterozygous for metacentric chromosome 3 of the domestic sheep *Ovis aries* and acrocentric homologs of the argali *Ovis ammon*

T.I. Bikchurina^{1, 2, 3}, E.K. Tomgorova³, A.A. Torgasheva^{1, 2, 3}, V.A. Bagirov³, N.A. Volkova³, P.M. Borodin^{1, 2, 3} 

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Federal Scientific Center for Animal Husbandry – VIZH named after academician L.K. Ernst, Dubrovitsy, Russia

 e-mail: borodin@bionet.nsc.ru

Hybridization of domestic animal breeds with their wild relatives is a promising method for increasing the genetic diversity of farm animals. Resource populations derived from the hybridization of various breeds of domestic sheep with mouflon and argali are an important source of breeding material. The karyotypes of argali and domestic sheep differ for a Robertsonian translocation, which occurred in the common ancestor of mouflon and domestic sheep (*Ovis aries*) due to the centric fusion of chromosomes 5 and 11 of the argali (*O. ammon*) into chromosome 3 of sheep. It is known that heterozygosity for translocation can lead to synapsis, recombination and chromosome segregation abnormalities in meiosis. Meiosis in

the heterozygotes for translocation that distinguishes the karyotypes of sheep and argali has not yet been studied. We examined synapsis, recombination, and epigenetic modification of chromosomes involved in this rearrangement in heterozygous rams using immunolocalization of key proteins of meiosis. In the majority of cells, we observed complete synapsis between the sheep metacentric chromosome and two argali acrocentric chromosomes with the formation of a trivalent. In a small proportion of cells at the early pachytene stage, we observed delayed synapsis in pericentromeric regions of the trivalent. Unpaired sites were subjected to epigenetic modification, namely histone H2A.X phosphorylation. However, by the end of the pachytene, these abnormalities had been completely eliminated. Asynapsis was replaced by a nonhomologous synapsis between the centromeric regions of the acrocentric chromosomes. By the end of the pachytene, the γ H2A.X signal had been preserved only at the XY bivalent and was absent from the trivalent. The translocation trivalent did not differ from the normal bivalents of metacentric chromosomes for the number and distribution of recombination sites as well as for the degree of centromeric and crossover interference. Thus, we found that heterozygosity for the domestic sheep chromosome 3 and argali chromosomes 5 and 11 does not cause significant alterations in key processes of prophase I meiosis and, therefore, should not lead to a decrease in fertility of the offspring from interspecific sheep hybridization.

Key words: *Ovis aries*; immunostaining; meiosis; synaptonemal complex; recombination; Robertsonian translocation.

For citation: Bikchurina T.I., Tomgorova E.K., Torgasheva A.A., Bagirov V.A., Volkova N.A., Borodin P.M. Chromosome synapsis, recombination and epigenetic modification in rams heterozygous for metacentric chromosome 3 of the domestic sheep *Ovis aries* and acrocentric homologs of the argali *Ovis ammon*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):355-361. DOI 10.18699/VJ19.502 (in Russian)

Введение

Гибридизация пород домашних животных с их дикими сородичами может служить перспективным методом повышения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных, внесения в их геном факторов устойчивости к заболеваниям и неблагоприятным условиям внешней среды (Серебровский, 1935). Этот подход используется в селекции овец. Ресурсные популяции, полученные от гибридов различных пород домашних овец (*Ovis aries*: OAR) с муфлоном (*O. orientalis*) и архаром (*O. ammon*: OAM), являются источником ценных аллелей и аллельных комбинаций для последующей селекции (Deniskova et al., 2016).

При этом следует учитывать, что кариотип архара содержит две пары метацентрических хромосом ($2n = 56$), а кариотипы муфлона и домашней овцы – три пары метacentриков ($2n = 54$). Различия в диплоидном числе хромосом обусловлены робертсоновской транслокацией, возникшей у общего предка муфлона и овец за счет слияния между центромерами хромосом 5 и 11 архара (OAM5 и OAM11) с образованием хромосомы 3 овцы (OAR3): $rob(OAM5;11)$ (Bunch et al., 1998). Здесь и далее для хромосом архара мы используем стандартную номенклатуру хромосом Bovidae (Popescu et al., 1996). Теоретически гетерозиготность по робертсоновским транслокациям должна приводить к значительным нарушениям мейоза и снижению плодовитости. Нарушения мейоза могут возникать за счет пространственной сложности пресинаптического выравнивания и последующего синapsиса между метацентрическим и акроцентрическими гомологами (Vorodin et al., 1998). Задержка синapsиса может вести к транскрипционной инактивации неспаренного хроматина, апоптозу и гибели генеративных клеток (Burgoyne, Mahadevaiah, 1993; Burgoyne et al., 2009). Даже в случае успешного синapsиса и нормальной рекомбинации нерасхождение хромосом, вовлеченных в тривалент, должно вести к образованию несбалансированных гамет и снижению плодовитости гетерозигот (Garagna et al., 2014).

Несмотря на это, робертсоновские транслокации являются самым распространенным вариантом эволюционных хромосомных перестроек среди млекопитающих; по ним часто наблюдаются различия между близкими видами

(Ferguson-Smith, Trifonov, 2007). Полиморфизм по робертсоновским транслокациям довольно широко распространен в популяциях многих видов (Dobigny et al., 2017), в том числе внутри пород домашних овец (Broad et al., 1997). Это объясняется относительной нейтральностью такого типа перестроек. Они, как правило, не вызывают фенотипических эффектов. У простых гетерозигот, несущих метацентрическую хромосому и две гомологичные акроцентрические хромосомы, в большинстве случаев плодовитость не снижается. Более того, она остается нормальной даже в случае простой гетерозиготности по нескольким робертсоновским транслокациям (Vuèrè, Ellis, 1979; Dobigny et al., 2017). Снижение фертильности чаще всего обнаруживается у сложных гетерозигот по нескольким робертсоновским транслокациям, вовлекающим одни и те же плечи хромосом: гибридов с монобрахиальной гомологией (Medarde et al., 2015).

У домашних овец существует внутривидовой полиморфизм по пяти робертсоновским транслокациям: $rob(6;24)$, $rob(9;10)$, $rob(7;25)$, $rob(5;8)$ и $rob(8;22)$ (Broad et al., 1997). Электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов (СК) у самцов, гетерозиготных по транслокациям $rob(6;24)$, $rob(9;10)$ и $rob(7;25)$, выявил относительно высокую частоту клеток с задержанным синapsисом в тривалентах, образованных метацентрической хромосомой и двумя акроцентрическими гомологами. Обнаружены также ассоциации между неспаренными перичентромерными районами акроцентрических элементов тривалентов и половым бивалентом (Dai et al., 1994a, b). При этом было показано, что простые гетерозиготы по одной или нескольким этим транслокациям хотя и имеют несколько повышенный уровень нерасхождения хромосом, тем не менее сохраняют нормальную плодовитость (Vuèrè, Ellis, 1979).

Особенности протекания мейоза у баранов, гетерозиготных по транслокации $rob(OAM5;11)$, до сих пор не исследованы. Анализ мейоза представляется важным в свете проводимых в настоящее время экспериментов по созданию ресурсных популяций на основе гибридов различных пород домашних овец с муфлоном и архаром (Deniskova et al., 2016).

В данной работе мы исследовали синapsис, рекомбинацию и эпигенетическую модификацию хромосом,

вовлеченных в транслокацию, с использованием иммунолокализации ключевых белков мейоза. Боковые элементы синаптомемного комплекса визуализировали с использованием антител к белку SYCP3. Эпигенетические модификации районов, содержащих не репарированные двунитевые разрывы ДНК, детектировали антителами к фосфорилированной форме гистона H2A.X (γ H2A.X) (Rogakou et al., 1998). Оценивались число и распределение по хромосомам рекомбинационных узелков, меченных антителами к MLH1, белку мисматч-репарации (Anderson et al., 1999). Известно, что глобальное распределение рекомбинационных событий по хромосомам зависит в основном от размера хромосомы и центромерно-теломерного градиента (Kleckner et al., 2003). Локальные особенности генетического состава хромосом определяют позиции горячих точек рекомбинации в пределах 1–2 тыс. пар оснований и не вносят значительного вклада в хромосомный паттерн рекомбинации (Lichten, Goldman, 1995). У большинства исследованных видов позвоночных выявлены районы вблизи теломер с большим числом обменов, так называемые дистальные пики рекомбинации (Ruiz-Herrera et al., 2017). Кроме того, на распределение сайтов кроссинговера влияет центромерная интерференция (подавление рекомбинации вблизи центромеры) и кроссоверная интерференция (снижение вероятности возникновения нового кроссинговера в определенной окрестности уже возникшего) (Zickler, Kleckner, 2015). Чем больше расстояние между соседними точками рекомбинации, тем сильнее интерференция. В литературе имеются ограниченные данные по числу и распределению сайтов MLH1 у домашних и диких видов овец (Muñoz-Fuentes et al., 2015; Ruiz-Herrera et al., 2017). Представляет особый интерес изучение этих характеристик у гетерозигот по транслокации *rob(OAM5;11)*.

Материалы и методы

Препараты мейотических хромосом готовили из семенников половозрелых баранов в возрасте 6–9 месяцев, разводимых в экспериментальном хозяйстве ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Два барана, гетерозиготных по *rob(OAM5;11)*, были получены в результате скрещиваний, показанных на рис. 1. В качестве представителей стандартного кариотипа использовали трех баранов романовской породы.

Семенники были выделены в ходе плановой кастрации. Содержание, анестезия и кастрация проводились в соответствии с международными и национальными правилами гуманного обращения с животными по протоколу, одобренному Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 35 от 16.10.2016).

Препараты синаптомемных комплексов готовили по методике (Peters et al., 1997), с изменениями. Выделенные семенники освобождали от оболочки, и небольшой фрагмент семенника размером около 0.5 см³ помещали в гипотонический экстракционный буфер (30 мМ Трис, 50 мМ сахарозы, 17 мМ цитрата натрия, 5 мМ ЭДТА, pH 8.2) на 90–110 мин. Затем семенные каналы мацерировали в 40 мкл раствора 0.1 М сахарозы при pH 8.2. Остатки канальцев удаляли. Суспензию тестикулярных клеток ресуспендировали несколько раз и порциями по

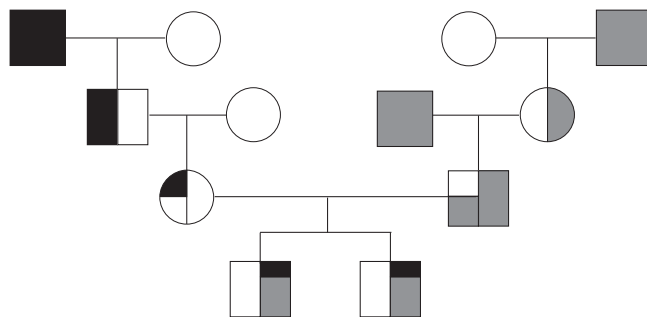


Рис. 1. Родословная гетерозигот по *rob(OAM5;11)*.

Квадратами обозначены самцы, кругами – самки, черным цветом – геномы архара, серым – муфлона, белым – романовской овцы.

20 мкл наносили на предметные стекла, смоченные в 1 % растворе параформальдегида, распределяя по поверхности наклоном стекла. Затем препарат оставляли сушиться во влажной камере в течение 2 ч. Препараты промывали в 0.4 % Kodak PhotoFlo, высушивали и хранили до окрашивания в герметичных контейнерах при –20 °С.

Иммуноокрашивание препаратов распластанных мейотических хромосом проводили по методу (Anderson et al., 1999), с модификациями. На препараты наносили 400 мкл 10 % PBT (PBS – фосфатно-солевой буфер, 0.05 % Tween 20, 3 % BSA (Sigma-Aldrich, США)) для блокирования неспецифического связывания антител и выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин. Затем инкубировали препараты 12 ч при 37 °С с первичными антителами. В зависимости от задачи были использованы: поликлональные антитела кролика к белку SYCP3 человека (Abcam, Великобритания) при разведении 1 : 500; моноклональные антитела мыши к белку MLH1 человека (Pharmingen, США) при разведении 1 : 30; поликлональные антитела кролика к белку γ H2A.X человека (Abcam) при разведении 1 : 150; антитела человека к белкам центромеры человека (Sigma-Aldrich) при разведении 1 : 70 в PBT. Препараты отмывали три раза по 15 мин в PBS с 0.1 % Tween 20 и инкубировали 60 мин при 37 °С со следующими вторичными антителами, которые использовали в различных комбинациях: антителами осла к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 500; антителами козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories) в разведении 1 : 30; антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories) в разведении 1 : 150, и антителами козы к иммуноглобулинам человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой AMCA (Vector Laboratories) в разведении 1 : 50. Препараты отмывали в PBS, высушивали, наносили 15 мкл раствора антифэйда (Vectashield; Vector Laboratories) для предотвращения гашения флуоресценции и накрывали покровным стеклом.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе Axioplan 2 (ZEISS, Германия), снабженном

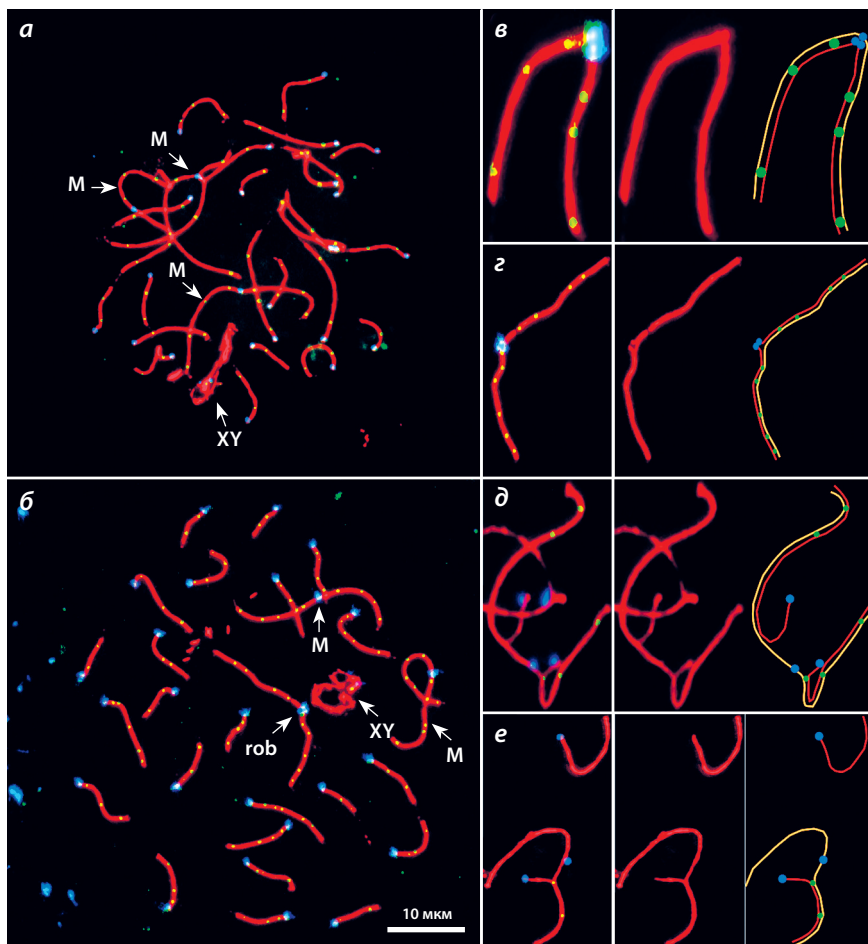


Рис. 2. Сперматозоиды баранов романовской породы (а), гетерозигот по *rob*(OAM5;11) (б) и увеличенные изображения различных синаптических конфигураций робертсоновского тривалента (в–е).

в – тривалент полностью синаптирован; г – перичентромерные районы акроцентриков синаптированы с образованием бокового плеча; д – перичентромерный район тривалента частично асинаптирован; е – один из акроцентриков в триваленте полностью асинаптирован. В первой колонке совмещены три цветных канала, во второй представлен только красный канал, в третьей – схематичное изображение тривалента. Красный сигнал – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромера. М – метацентрический бивалент, *rob* – робертсоновский тривалент, XY – половой бивалент.

CCD-видеокамерой (CV M300, JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия). Яркость и контраст изображений редактировали с помощью пакета Corel PaintShop Photo Pro X3.

Проанализировано 93 сперматозоида у представителей нормального кариотипа и 101 сперматозоид у гетерозигот по транслокации. Для этого были отобраны клетки на стадии пахитены, в которых все аутосомные биваленты стандартного кариотипа *O. aries* полностью синаптированы. Измерение длин хромосом и относительного положения сайтов MLH1 производили при помощи программы MicroMeasure 3.3 (Reeves, 2001).

Для анализа распределения сайтов MLH1 вдоль хромосом рассчитывали абсолютное положение каждого сигнала MLH1, умножая относительное положение каждого сигнала на абсолютную длину соответствующего хромосомного плеча, усредненного для всех метацентриков. При построении рекомбинационной карты хромосомные плечи были разделены на равные интервалы, соответствующие 1 мкм, и для каждого интервала подсчитана доля расположенных на нем сигналов MLH1 от общего числа сигналов на данной хромосоме во всех клетках.

Тестирование влияния гетерозиготности по хромосомной перестройке на рекомбинационные характеристики хромосом проводили с использовани-

ем ANOVA, статистические тесты – с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft). Средние значения длин СК и числа сайтов MLH1 приведены со стандартными отклонениями (\pm SD).

Результаты

Кариотип пахитенных клеток баранов романовской породы содержал три крупных метацентрических бивалента, неотличимых друг от друга, 23 акроцентрических бивалента, образующих непрерывный ряд по убыванию длины, и половой бивалент (рис. 2, а). Пахитенные сперматозоиды гетерозигот по робертсоновской транслокации содержали два метацентрических бивалента и тривалент, образованный хромосомой 3 овцы и акроцентрическими гомологами архара (см. рис. 2, б). По средней длине СК триваленты не отличались от бивалентов двух других метацентрических хромосом у гетерозигот ($t = 0.87$, $p = 0.38$), но были достоверно короче бивалентов всех трех метацентрических хромосом в нормальном кариотипе ($t = 5.36$, $p < 0.001$) (см. таблицу). Поэтому в дальнейшем анализе мы сравнивали рекомбинационные характеристики транслокационного тривалента с объединенными данными по бивалентам двух метацентрических хромосом у гетерозигот.

На рис. 2, в–е представлены разные варианты синаптических конфигураций, обнаруженных у гетерозигот. Наиболее частым был вариант с практически полным спариванием между метацентрической хромосомой 3 и ее акроцентрическими гомологами (см. рис. 2, в). Иногда центромеры акроцентриков накладывались друг на друга, образуя маленькое боковое плечо (г). Асинапсис перичентромерных районов одного или обоих акроцентриков встречался в 5.0 ± 2.2 % клеток (д). Средний размер неспаренного участка составлял 24.2 ± 14.3 %. В одном случае мы наблюдали полный асинапсис более длинного акроцентрика (е).

Иммунолокализация фосфорилированной формы гистона H2A.X (γ H2A.X) позволила нам визуализировать районы, содержащие нерепарированные двунитевые разрывы ДНК (рис. 3). На стадии лептотены такие районы были многочисленны

Рекомбинационные характеристики хромосом 1–3 у баранов стандартного кариотипа (+/+) и хромосом 1–2 и 3 у гетерозигот по rob(OAM5;11) (+/rob)

Хромосомы	Число исследованных хромосом	Длина синаптомемного комплекса, мкм	Число сайтов MLH1	Отн. расстояние между соседними сайтами MLH1 (доля длины хромосомы)	Доля сайтов MLH1 в перичентромерных районах*, %
1–3 (+/+)	279	35.8 ± 8.4	5.7 ± 1.2	0.18 ± 0.01	6.9 ± 0.6
1–2 (+/rob)	202	31.6 ± 8.3	6.0 ± 1.4	0.17 ± 0.01	5.8 ± 0.7
3 (+/rob)	101	30.7 ± 7.8	6.2 ± 1.4	0.16 ± 0.01	4.8 ± 0.9

* На расстоянии ± 2 мкм от центромеры.

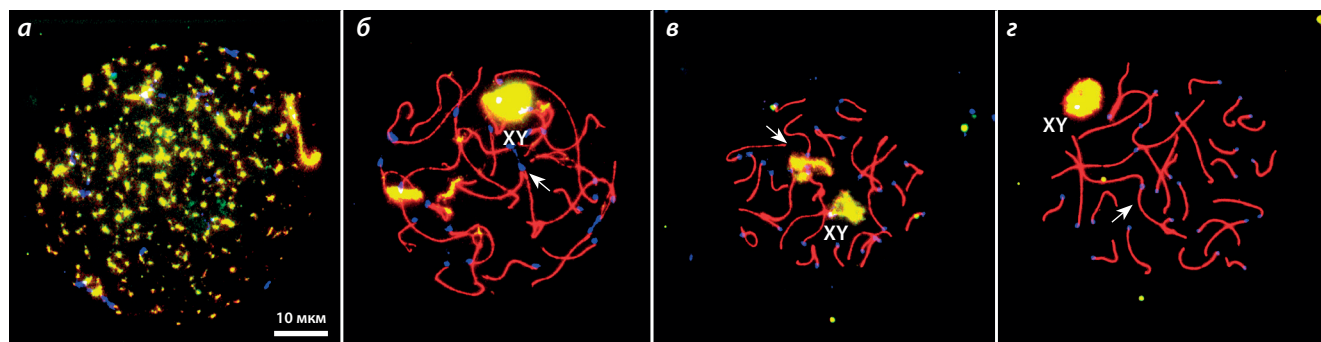


Рис. 3. Сперматоциты баранов, гетерозиготных по rob(OAM5;11) на разных стадиях профазы I.

а – лептотена: сигналы γ H2A.X наблюдаются вдоль фрагментов боковых элементов СК; *б* – ранняя пахитена: сигнал γ H2A.X локализован на асинептированных участках аутосом и половом биваленте и отсутствует на полностью синаптированном триваленте; *в* – средняя пахитена: облака сигнала γ H2A.X расположены на асинептированных участках тривалента и половом биваленте; *з* – поздняя пахитена: сигнал γ H2A.X локализован только на половом биваленте. Стрелки указывают на тривалент с транслокацией. XY – половой бивалент. Красный сигнал – SYCP3, желтый – γ H2A.X, синий – центромера.

и присутствовали на всех хромосомах (см. рис. 3, *а*). В ранней пахитене мы наблюдали сигналы γ H2A.X на несинапсированных участках аутосом, в том числе и на асинептированных участках акроцентрических элементов транслокационного тривалента, если их синапсис не успевал завершиться к тому времени (см. рис. 3, *б*). В редких случаях эпигенетической модификации подвергалось все плечо тривалента, включая его синапсированную часть (см. рис. 3, *в*). К концу пахитены сигнал γ H2A.X сохранялся только на половом биваленте и отсутствовал на триваленте (см. рис. 3, *з*).

Визуализация рекомбинационных узелков с использованием антител к белку MLH1 (см. рис. 2) позволила оценить число кроссинговеров на интересующих нас хромосомах. Мы не обнаружили различий по среднему числу локусов MLH1 между робертсоновским тривалентом и бивалентами двух других метацентрических хромосом у гетерозигот по rob(OAM5;11) ($t = 1.33, p = 0.18$), тогда как биваленты трех метацентрических хромосом, включая хромосому 3, у нормальных гомозигот имели в среднем меньшее число локусов MLH1 ($t = 3.59, p < 0.001$).

Распределение сайтов MLH1 по хромосоме 3 в составе транслокационного тривалента было относительно равномерным и сходным с распределением, наблюдаемым на бивалентах метацентрических хромосом 1–2 у гетерозигот по хромосоме 3 и на бивалентах хромосом 1–3 у нормальных бивалентов (рис. 4). В отличие от хромосом многих других млекопитающих (Ruiz-Herrera et al., 2017), метацентрические хромосомы баранов не имели выраженных пиков в дистальных районах хромосом. Частота

сайтов MLH1 в перичентромерных районах тривалента и нормальных бивалентах была снижена лишь в коротком (1–2 мкм) интервале. При этом мы не наблюдали достоверных отличий по доле сайтов MLH1 в перичентромерных районах ($p > 0.05$) между робертсоновским тривалентом и двумя метацентрическими бивалентами (см. таблицу). Не обнаружено также различий между тривалентом и бивалентами в степени выраженности кроссоверной интерференции: среднее расстояние между соседними сайтами MLH1 было практически одинаковым (см. таблицу).

Обсуждение

Мы установили, что гетерозиготы по rob(OAM5;11) характеризуются задержанным синапсисом робертсоновского тривалента в небольшой доле пахитенных сперматоцитов. Сходное явление было обнаружено при электронно-микроскопических исследованиях сперматоцитов баранов, гетерозиготных по rob(6;24), rob(9;10) и rob(7;25) (Dai et al., 1994a, b). В цитированных работах процентное содержание аномальных сперматоцитов было выше, чем в нашем эксперименте. У носителей данных транслокаций отмечалась высокая доля ассоциаций между асинептированными районами тривалента и половым бивалентом. Мы не наблюдали таких ассоциаций. Эти различия в синапсисе тривалентов у гетерозигот по транслокациям, полиморфным внутри вида, и транслокациям, различающим разные виды, обусловлены методическими различиями и/или особенностями хромосом, вовлеченных в эти транслокации.

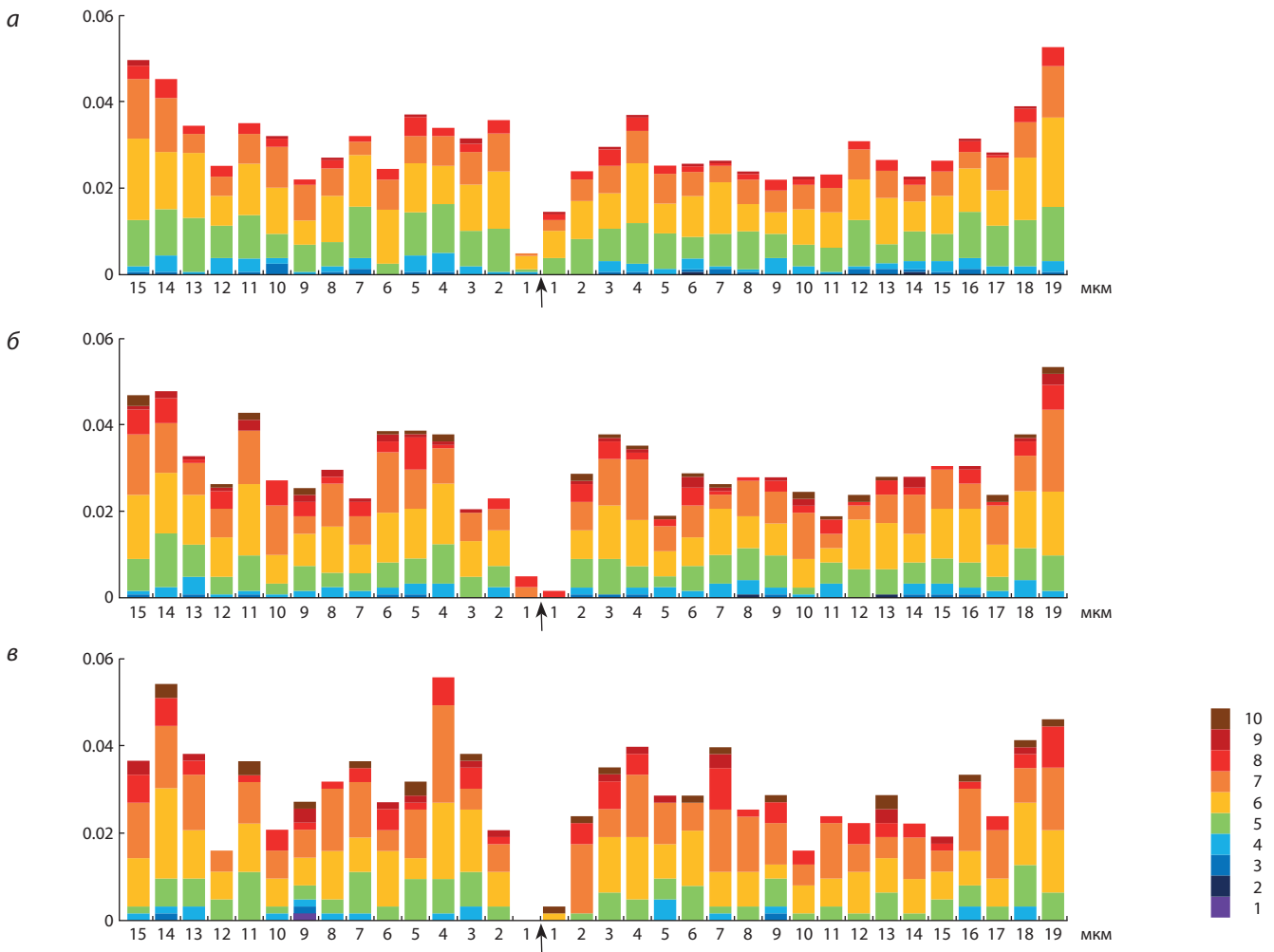


Рис. 4. Распределение сайтов MLH1 на бивалентах хромосом 1–3 у нормальных гомозигот (а), на бивалентах хромосом 1–2 (б) и на триваленте хромосомы 3 (в) у гетерозигот по транслокации.

На оси X показана позиция сайтов MLH1 на хромосоме по отношению к центромере (обозначена стрелкой), на оси Y – доля сайтов MLH1 в каждом интервале. Цветовая шкала (от 1 до 10) отражает частоту тривалентов и бивалентов с разным числом сайтов MLH1 в пределах каждого интервала.

Задержка синapsиса в перицентромерном районе транслокационного бивалента приводила к задержке в репарации двуниевых разрывов ДНК, которая, в свою очередь, вызывала эпигенетическую модификацию этого района: фосфорилирование гистона H2A.X по серину 139. Обычно такая модификация неспаренного хроматина приводит к транскрипционной инактивации генов, локализованных в модифицированных районах (Burgoyne et al., 2009; Turner, 2015). Если подобные события и происходили в пахитенных сперматоцитах баранов, гетерозиготных по транслокации, то они затрагивали лишь небольшую долю клеток. При этом следует учесть, что перицентромерные районы хромосомы, как правило, обогащены повторными последовательностями и содержат ограниченное число генов. Поэтому маловероятно, что инактивация таких районов приведет к гибели клеток. Кроме того, в сперматоцитах на стадии поздней пахитены мы не наблюдали ни асинapsитических участков, ни сигналов эпигенетической модификации. Скорее всего, асинapsис в таких клетках замещался негомологичным синapsисом, а модификация хроматина оказывалась обратимой. Не исключена вероят-

ность, что клетки с задержанным синapsисом элиминировались раньше и не достигали пахитены. Однако даже если такая элиминация и происходила, она затрагивала лишь небольшую долю клеток и не должна была сказаться на плодовитости гетерозигот.

Число и распределение кроссинговеров на бивалентах нормальных метацентрических хромосом и на хромосоме 3 в транслокационном триваленте были сходны. Довольно распространенным эффектом гетерозиготности по робертсоновским транслокациям является дистализация распределения кроссинговеров вдоль плеч вовлеченных хромосом (Dumas, Britton-Davidian, 2002; Borodin et al., 2008; Dumas et al., 2015). Мы не обнаружили этого явления у баранов, гетерозиготных по *rob(OAM5;11)*. Центромерная интерференция у них была не более выражена, чем у гомозигот по остальным метацентрическим хромосомам. В ряде случаев обмены возникли в непосредственной близости от центромеры (см. рис. 2, в, д и рис. 4). По уровню кроссоверной интерференции триваленты по транслокации также не отличались от нормальных бивалентов. Нормальная рекомбинация в робертсоновском

триваленте гарантирует нормальную сегрегацию хромосом и делает маловероятным образование несбалансированных гамет.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что гетерозиготность по хромосоме 3 домашней овцы и хромосомам 5 и 11 арха не вызывает существенных изменений в ключевых этапах мейоза и, следовательно, не должна приводить к снижению плодовитости у потомков от межвидовой гибридизации овец.

Список литературы / References

Серебровский А.С. Гибридизация животных. М.; Л.: Биомедгиз, 1935.
[Serebrovsky A.S. Hybridization of Animals. Moscow; Leningrad: Biomedgiz Publ., 1935. (in Russian)]
Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics*. 1999;151:1569-1579.
Borodin P.M., Karamysheva T.V., Belonogova N.M., Torgasheva A.A., Rubtsov N.B., Searle J.B. Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia). *Genetics*. 2008;178:621-632. DOI 10.1534/genetics.107.079665.
Borodin P.M., Rogatcheva M.B., Zhelezova A.I., Oda S. Chromosome pairing in inter-racial hybrids of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). *Genome*. 1998;41:79-90.
Broad T., Hayes H., Long S. Cytogenetics: Physical Chromosome Maps. In: Piper L., Ruvinsky A. (Eds.). *The Genetics of Sheep*. Wallingford, UK: CAB International, 1997.
Bruère A., Ellis P. Cytogenetics and reproduction of sheep with multiple centric fusions (Robertsonian translocations). *J. Reprod. Fert.* 1979;57(2):363-375.
Bunch T.D., Vorontsov N.N., Lyapunova E.A., Hoffmann R.S. Chromosome number of Severtzov's sheep (*Ovis ammon severtzovi*): G-banded karyotype comparisons within ovis. *J. Hered.* 1998;89:266-269.
Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K. Unpaired sex chromosomes and gametogenic failure. *Chromosomes Today*. 1993;11:243-263. DOI 10.1159/000133268.
Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:207-216. DOI 10.1038/nrg2505.
Dai K., Gillies C.B., Dollin A.E. Synaptonemal complex analysis of domestic sheep (*Ovis aries*) with Robertsonian translocations. II. Trivalent and pairing abnormalities in Massey I and Massey II heterozygotes. *Genome*. 1994a;37:679-689.
Dai K., Gillies C.B., Dollin A.E. Synaptonemal complex analysis of domestic sheep (*Ovis aries*) with Robertsonian translocations. III. Deficient pairing and NOR role in Massey III heterozygotes. *Genome*. 1994b;37:802-808.
Deniskova T.E., Sermiyagin A.A., Bagirov V.A., Okhlopov I.M., Gladyshev E.A., Ivanov R.V., Brem G., Zinovieva N.A. Comparative analysis of the effectiveness of STR and SNP markers for intraspecific and interspecific differentiation of the genus *Ovis*. *Russ. J. Genet.* 2016; 52:79-84. DOI 10.1134/S1022795416010026.

Dobigny G., Britton-Davidian J., Robinson T.J. Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. *Biol. Rev.* 2017;92(1):1-21. DOI 10.1111/brv.12213.
Dumas D., Britton-Davidian J. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and robertsonian populations of the house mouse. *Genetics*. 2002;162:1355-1366.
Dumas D., Catalan J., Britton-Davidian J. Reduced recombination patterns in Robertsonian hybrids between chromosomal races of the house mouse: chiasma analyses. *Heredity (Edinb.)*. 2015;114:56-64. DOI 10.1038/hdy.2014.69.
Ferguson-Smith M.A., Trifonov V. Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8:950-962. DOI 10.1038/nrg2199.
Garagna S., Page J., Fernandez-Donoso R., Zuccotti M., Searle J.B. The Robertsonian phenomenon in the house mouse: meiosis and speciation. *Chromosoma*. 2014;123:529-544. DOI 10.1007/s00412-014-0477-6.
Kleckner N., Storlazzi A., Zickler D. Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends Genet.* 2003;19:623-628. DOI 10.1016/j.tig.2003.09.004.
Lichten M., Goldman A.S. Meiotic recombination hotspots. *Annu. Rev. Genet.* 1995;29:423. DOI 10.1146/annurev.ge.29.120195.002231.
Medarde N., Merico V., López-Fuster M.J., Zuccotti M., Garagna S., Ventura J. Impact of the number of Robertsonian chromosomes on germ cell death in wild male house mice. *Chromosome Res.* 2015;23:159-169. DOI 10.1007/s10577-014-9442-8.
Muñoz-Fuentes V., Marcet-Ortega M., Alkorta-Aranburu G., Linde Forsberg C., Morrell J.M., Manzano-Piedras E., Söderberg A., Daniel K., Villalba A., Toth A., Di Rienzo A., Roig I., Vilà C. Strong artificial selection in domestic mammals did not result in an increased recombination rate. *Mol. Biol. Evol.* 2015;32:510-523. DOI 10.1093/molbev/msu322.
Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J., de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 1997;5:66-68.
Popescu C.P., Long S., Riggs P., Womack J., Schmutz S., Fries R., Gallagher D.S. Standardization of cattle karyotype nomenclature: Report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. *Cytogenet. Genome Res.* 1996;74: 259-261. DOI 10.1159/000134429.
Reeves A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*. 2001;44:439-443.
Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 1998;273:5858-5868.
Ruiz-Herrera A., Vozdova M., Fernández J., Sebestova H., Capilla L., Frohlich J., Vara C., Hernández-Marsal A., Sipek J., Robinson T.J., Rubes J. Recombination correlates with synaptonemal complex length and chromatin loop size in bovids – insights into mammalian meiotic chromosomal organization. *Chromosoma*. 2017;126(5):615-631. DOI 10.1007/s00412-016-0624-3.
Turner J.M.A. Meiotic silencing in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 2015; 49:395-412. DOI 10.1146/annurev-genet-112414-055145.
Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(6): a016626. DOI 10.1101/cshperspect.a016626.

ORCID ID

T.I. Bikchurina orcid.org/0000-0003-0921-7970
E.K. Tomgorova orcid.org/0000-0001-5398-8815
A.A. Torgasheva orcid.org/0000-0002-8933-8336
V.A. Bagirov orcid.org/0000-0001-5398-8815
N.A. Volkova orcid.org/0000-0001-7191-3550
P.M. Borodin orcid.org/0000-0002-6717-844X

Благодарности. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-16-00079. Мы благодарим Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставление микроскопической техники.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.11.2018. После доработки 24.12.2018. Принята к публикации 05.01.2019.

Филогеографическая структура евразийской связи (*Mareca penelope*) в Голарктике

И.В. Куликова¹✉, Ю.Н. Журавлев¹, И.Г. Коробицын², Г.А. Немкова¹, К.Г. МакКрекен^{3, 4, 5}, Дж.Л. Петерс⁶

¹ Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

² Биологический институт Томского государственного университета, Томск, Россия

³ Отделение биологии, Университет Майами, Корал Кэйблз, Флорида, США

⁴ Отделение морской биологии и экологии, Институт морской и атмосферной науки им. Розенштейна, Университет Майами, Майми, Флорида, США

⁵ Институт геномики человека им. Хассмана, Медицинский институт им. Миллера Университета Майами, Майми, Флорида, США

⁶ Отделение биологических наук, Государственный университет Райта, Дэйтон, Огайо, США

✉ e-mail: Kulikova@biosoil.ru

Евразийская связь (*Mareca penelope*) – один из самых многочисленных перелетных видов уток в Палеарктике. Ежегодно значительная часть всего вида совершает сезонные перелеты на расстояния от десятков до тысяч и более километров. По данным кольцевания выделено пять географических популяций, однако четких границ между популяциями не обнаружено. В то же время филогеографическая структура евразийской связи на всем протяжении ее ареала до сих пор не изучена. Помимо фундаментального значения подобного исследования, знание генетической структуры популяций необходимо для разработки мер по сохранению и увеличению численности этого ценного охотничье-промыслового вида. В связи с этим целью нашей работы был филогеографический анализ связи на обширной территории ее ареала в Палеарктике с привлечением образцов тканей птиц, зимующих в Северной Америке. С помощью секвенирования 5'-фрагмента контрольного региона митохондриальной ДНК была изучена генетическая дифференциация популяций связи, выделенных по данным кольцевания, реконструированы филогенетические отношения гаплотипов мтДНК и демографическая история популяций и вида в целом. Всего было проанализировано 195 последовательностей длиной 661 п. н. Генетическое разнообразие было высоким во всех изученных популяциях. Филогенетические реконструкции показали отсутствие кластеризации по географическому признаку. Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) выявил две группы популяций: европейско-сибирскую и восточноазиатскую. В первую группу, помимо европейской и сибирской, также вошла выборка из Атлантического побережья Северной Америки, вторая включила особей из Дальнего Востока, Камчатки, Чукотки, Алеутских островов, Аляски и Тихоокеанского побережья Северной Америки. Ключевые слова: филогеография; популяционно-генетическая структура; связь; *Mareca penelope*; контрольный регион; мтДНК.

Для цитирования: Куликова И.В., Журавлев Ю.Н., Коробицын И.Г., Немкова Г.А., МакКрекен К.Г., Петерс Дж.Л. Филогеографическая структура евразийской связи (*Mareca penelope*) в Голарктике. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):362-369. DOI 10.18699/VJ19.503

Holarctic phylogeographic structure of Eurasian wigeon (*Mareca penelope*)

I.V. Kulikova¹✉, Y.N. Zhuravlev¹, I.G. Korobitsyn², G.A. Nemkova¹, K.G. McCracken^{3, 4, 5}, J.L. Peters⁶

¹ Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok, Russia

² Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Department of Biology, University of Miami, Coral Gables, Florida, USA

⁴ Department of Marine Biology and Ecology, Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences, University of Miami, Miami, Florida, USA

⁵ Human Genetics and Genomics, Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA

⁶ Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, Ohio, USA

✉ e-mail: Kulikova@biosoil.ru

The Eurasian wigeon (*Mareca penelope*) is one of the most numerous migrant species of waterfowl in the Palearctic. Annually, significant part of the world's wigeon population makes seasonal flights over distances from tens to thousands or more kilometers. According to different estimates based on banding data, five geographic populations of the species were described in the Palearctic. However, distinct borders between the populations have not been identified. At the same time, no phylogeographic studies have been carried out for the complete native range of wigeon so far. In addition to the fundamental importance of such a study, knowledge of the genetic structure of populations is necessary for the development of measures to increase the number of and preserve this valuable game species. The aim of our work was a phylogeographic analysis of the wigeon across its vast native range in the Palearctic including ducks wintering in North America. We examined genetic diversity and differentiation of wigeon

populations identified with banding data, phylogenetic relationships of mtDNA haplotypes and demographic history of populations and species as a whole by sequencing a 661 base-pair 5'-fragment of the mitochondrial control region from 195 individual ducks collected throughout the Palearctic and Nearctic. Genetic diversity was high in all studied populations. A reconstruction of haplotypes phylogeny revealed the absence of geographic structure in the data. Nonetheless, analysis of molecular variance (AMOVA) identified two groups of populations: European-Siberian and East Asian. The former included wigeons from Europe, Siberia and the Atlantic coast of North America, and the latter comprised ducks from Russian Far East, Kamchatka Peninsula, Chukotka Autonomous District, the Aleutian Islands, Alaska, and the Pacific coast of North America.

Key words: phylogeography; population genetic structure; wigeon; *Mareca penelope*; control region; mtDNA.

For citation: Kulikova I.V., Zhuravlev Y.N., Korobitsyn I.G., Nemkova G.A., McCracken K.G., Peters J.L. Holarctic phylogeographic structure of Eurasian wigeon (*Mareca penelope*). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):362-369. DOI 10.18699/VJ19.503 (in Russian)

Введение

Евразийская связь (*Mareca penelope*) – широко распространенный и многочисленный вид промысловых утиных птиц Палеарктики. Гнездится в северной части Палеарктики, от Британских островов и Исландии на западе до бассейна р. Анадырь и полуострова Камчатка на востоке, от высоких северных широт Евразии до приблизительно 50-й параллели северной широты (Дементьев, Гладков, 1952). Встречается евразийская связь также и в Неварктике, а именно на Алеутских островах, Аляске и вне гнездового периода на Атлантическом и Тихоокеанском побережьях Северной Америки. По данным кольцевания в Палеарктике выделено пять географических популяций вида: исландская, европейская, западносибирская, восточносибирская и дальневосточная (Павлов и др., 1997). Предполагается, что между популяциями нет четких границ. Так, данные кольцевания выявили высокий уровень обмена мигрантами между популяциями (от 5 до 30 %). Однако миграции происходят преимущественно на периферии популяций, в местах наложения популяционных ареалов и во время зимовки (Павлов и др., 1997).

В последние годы было проведено много филогеографических исследований утиных птиц. Распространенным результатом таких исследований стало обнаружение парафилии или полифилии митохондриальной и ядерной ДНК, особенно в случае анализа геномов близкородственных видов. В качестве наиболее вероятного объяснения были предложены незавершенная сортировка линий ядерной ДНК/гаплогипов мтДНК или межвидовая гибридизация (McCracken et al., 2001; Kulikova et al., 2004, 2005; Peters et al., 2005, 2007; Peters, Omland, 2007). Это неудивительно, учитывая относительно молодой с точки зрения эволюции возраст таксонов (Peters et al., 2007; Lavretsky et al., 2014) и широко известную способность уток к гибридизации в неволе и в дикой природе (Johnsgard, 1960; Greig, 1980). Было показано, что между географическими популяциями многих видов утиных существуют лишь незначительные генетические различия, что, по мнению ряда авторов, обусловлено гennым потоком и расселением (Cronin et al., 1996; McCracken et al., 2001; Kulikova et al., 2005; Peters, Omland, 2007; Kraus et al., 2011).

В настоящей работе была впервые изучена филогеографическая структура широкоареального вида *Mareca penelope* в Голарктике. В качестве молекулярного маркера мы выбрали 5'-фрагмент контрольного региона мтДНК. Анализ вариабельности мтДНК является рутинным методом филогеографических исследований, что объясняется

гаплоидностью, отсутствием рекомбинации, матриархальным наследованием и быстрой по сравнению с ядерной ДНК скоростью эволюции митохондриального генома. Контрольный регион, или D-петля – это протяженный некодирующий участок мтДНК, скорость эволюции которого в три-пять раз превышает таковую остальной мтДНК (Taanman, 1999). В области D-петли расположены промоторы транскрипции легкой и тяжелой цепей и точка репликации тяжелой цепи мтДНК. В составе контрольного региона выделяют три домена, которые отличаются по степени вариабельности: консервативный центральный домен II и фланкирующие домены I и III, характеризующиеся высокой скоростью нуклеотидных замен. Длина контрольного региона птиц варьирует от 1028 до 1581 п. н., составляя в среднем 1127 п. н. (Ruokonen, Kvist, 2002). У пекинской породы уток, например, длина контрольного региона составляет 1048 п. н., а длины доменов I, II и III равны 348, 478 и 222 п. н. соответственно (Ramirez et al., 1993). Благодаря высокой скорости эволюции контрольный регион весьма успешно применяется в изучении внутривидовой изменчивости утиных птиц (Cronin et al., 1996; McCracken et al., 2001; Kulikova et al., 2005; Peters, Omland, 2007; Kraus et al., 2011). С помощью анализа полиморфизма 5'-фрагмента контрольного региона мтДНК мы пытались выяснить, окажутся ли популяции связи, выделенные по данным кольцевания, генетически дифференцированными и существуют ли генетические различия между особями, зимующими в Северной Америке, и евразийскими популяциями.

Материалы и методы

В Евразии и Северной Америке были собраны 115 образцов тканей евразийских связей; использованы также 80 опубликованных ранее последовательностей (Peters et al., 2005, 2014; Куликова, Журавлев, 2010). Информация об образцах и местах их сбора представлена в табл. 1. Региональные выборки были выделены в соответствии с данными кольцевания (Павлов и др., 1997) и в настоящем исследовании приравнены к популяциям. (1) Европейская популяция состояла из образцов, собранных в Европе ($n = 8$). (2) Сибирская популяция ($n = 22$) включила главным образом образцы из западной и центральной частей Сибири, за исключением восьми связей из Томской области, собранных во время миграции, которые могли иметь как западносибирское, так и восточносибирское происхождение. В эту региональную выборку попали также девять особей из Турции, Египта и Бангладеш, поскольку

Таблица 1. Материал для исследований

Континент	Регион	Код	<i>n</i>	Место сбора образцов	<i>n</i>	Литературный источник
Евразия <i>n</i> = 164	Европа	EUR	8	Германия	5	Peters et al., 2005
				Шотландия	2	»
				Испания	1	»
	Сибирь	SIB	22	Турция	2	Неопубл.
				Египет	6	»
				Ямало-Ненецкий автономный округ	1	Peters et al., 2005
				Бангладеш	1	Неопубл.
				Казахстан	2	Peters et al., 2005
				Томская область	10	Неопубл.
				Дальний Восток	FE	106
Магаданская область	1	Peters et al., 2005				
<i>n</i> = 8	Западная Берингия	WB	30	Чукотский автономный округ	8	Куликова, Журавлев, 2010
				Камчатская область	22	Неопубл.
				Алеутские острова и Аляска	8	Алеутские острова, США
Северная Америка <i>n</i> = 21	Тихоокеанское побережье Северной Америки	PAC	17	Аляска, США	2	Peters et al., 2005
				Калифорния, США	5	Peters et al., 2005; неопубл.
				Орегон, США	5	»
	Атлантическое побережье Северной Америки	ATL	4	Вашингтон, США	7	»
				Делавэр, США	1	Неопубл.
				Массачусетс, США	1	Peters et al., 2005
				Мэриленд, США	1	Неопубл.
Новая Шотландия, Канада	1	»				

в этих странах зимуют особи из западносибирской популяции, и две образца из Казахстана, собранные во время весенней миграции в районе одного из миграционных путей, характерных для западносибирской популяции (Павлов и др., 1997). (3) Дальневосточная популяция (*n* = 106) состояла из особей, собранных во время миграции в Приморском крае, и одного образца из Магадана. Птицы этой популяции зимуют главным образом в Корею, Китае и на севере Вьетнама, а гнездится на севере и северо-востоке Якутии (Павлов и др., 1997). (4) Популяция западной Берингии (*n* = 30) включила гнездящихся на Камчатке и в бассейне Анадыря птиц, которые зимуют на Курильских островах и в Японии. (5) В одну популяцию были объединены утки Алеутских островов и Аляски (*n* = 8). (6) Тихоокеанская (*n* = 17) и (7) атлантическая (*n* = 4) североамериканские популяции состояли из образцов, собранных на побережье Тихого и Атлантического океанов Северной Америки соответственно.

Тотальную ДНК выделяли из печени и мышц птиц с помощью ДНК DNeasy Tissue Kit (Qiagen, США). 5'-участок контрольного региона митохондриальной ДНК (78–774 п. н. митохондриального генома курицы) амплифицировали с помощью праймеров L78 и H774 (Sorenson, Fleischer, 1996). Амплификацию проводили на приборе UNOII Thermoblock (Biometra, Германия) в 25 мкл реак-

ционной смеси, содержащей геномную ДНК, 1.25 мкл каждого праймера (10 мМ), 2.5 мкл каждого dNTP (10 мМ), 2.5 мкл MgCl₂ (25 мМ), 2.5 мкл десятикратного буфера для PCR и 0.2 мкл Taq-ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих температурных условиях: начальная денатурация – 7 мин при 94 °С; 45 циклов в режиме: денатурация – 20 с при 94 °С, отжиг – 20 с при 52 °С, элонгация – 1 мин при 72 °С; и завершающая элонгация – 7 мин при 72 °С. Качество продуктов амплификации определяли с помощью электрофореза. Обе цепи секвенировали с помощью BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits в четырехкратном разведении. Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, Калифорния). ABI-хроматограммы совмещали и редактировали с помощью пакета программ Staden 1.53 (Staden et al., 2000). Все последовательности сданы в GenBank (идентификационные номера MN460239–MN460385).

Филогению реконструировали по методу присоединения соседей Neighbour-Joining (NJ) (Saitou, Nei, 1987) в программе MEGA 5.3 (Tamura et al., 2011). В качестве внешней группы использовали серую утку *Anas strepera* (DQ449148.1). Генетические дистанции вычисляли на основании двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980), выбранной с помощью программы Modeltest v. 3.06

(Posada, Crandall, 1998). Медианную сеть гаплотипов реконструировали с помощью программы Network 4.6.1 (Bandelt et al., 1999). Вставки/делеции учитывались как дополнительное пятое состояние признака. Нуклеотидное (π) и гаплотипическое (H) разнообразие, значения теста на селективную нейтральность (Fu's Fs) вычисляли для каждой популяции с помощью программы ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). Значения параметров генетической подразделенности Φ_{ST} и анализ молекулярной изменчивости AMOVA также выполнили с помощью ARLEQUIN 3.5. Для оценки экспансии были построены гистограммы распределения попарных нуклеотидных различий в ARLEQUIN 3.5 (Harpending, 1994). Для вычисления максимально правдоподобных оценок параметра роста численности популяции (g) и его стандартного отклонения применяли программу Fluctuate 1.4 (Kuhner et al., 1995).

Результаты

В настоящей работе использованы 195 последовательностей 5'-конца контрольного региона мтДНК длиной 661 п. н., включая 80 уже опубликованных последовательностей (Peters et al., 2005, 2014; Куликова, Журавлев, 2010) (см. табл. 1). Из 661 гомологичной позиции 36 (5.4 %) были переменными и 19 (2.9 %) информативными с точки зрения максимальной экономии. Всего было идентифицировано 34 гаплотипа, 23 гаплотипа были уникальными, 7 встречались у 2–10 особей, гаплотип E-3 обнаружен у

13 особей, E-4 – у 16, E-6 – у 28 и самый распространенный гаплотип, E-2, – у 79 особей. Гаплотип E-6 обнаружен во всех выборках, E-2 и E-4 – в шести и пяти из семи выборок соответственно. Среднее число нуклеотидных различий (K) между гаплотипами было 1.87, гаплотипическое разнообразие (H) составило 0.802 ± 0.025 . Один гаплотип связи из западной Берингии значительно отличался от остальных (K = 21.76) и был идентичен таковым американской связи *Mareca americana* из базы данных GenBank/NCBI (AY881737, KJ824074).

Показатели нуклеотидного и гаплотипического разнообразия варьировали от 0.00101 до 0.00531 и от 0.6667 до 1.000 соответственно (табл. 2). Самое высокое значение π отмечено в европейской популяции и западной Берингии, самое низкое – в атлантической североамериканской выборке. Однако после удаления гаплотипа американской связи из выборки западной Берингии значение параметра нуклеотидного разнообразия снизилось почти в два раза (см. табл. 2). Впоследствии этот гаплотип был изъят из популяционно-генетического и демографического анализов, поскольку он попал в популяцию европейской связи в результате интрогрессии от американской связи (Куликова, Журавлев, 2010) и из-за большого числа нуклеотидных отличий искажал результаты анализа. Гаплотипическое разнообразие также оказалось самым высоким в европейской и самым низким в атлантической популяциях (см. табл. 2). Примерно половина значений Φ_{ST} были статистически достоверными (табл. 3).

Таблица 2. Генетическое разнообразие

Популяция	n	Nh	S	K	H	π
EUR	8	8	9	3.50	1.0000 ± 0.0625	0.005311 ± 0.003442
SIB	22	10	15	2.07	0.8658 ± 0.0519	0.003142 ± 0.002038
FE	106	19	16	1.38	0.7513 ± 0.0403	0.002095 ± 0.001440
WB	30	9	29	2.91	0.7655 ± 0.0728	0.004413 ± 0.002650
WB*	29	8	10	1.55	0.7488 ± 0.0728	0.002351 ± 0.001610
ALA	8	5	5	1.67	0.8571 ± 0.1083	0.002385 ± 0.001801
PAC	17	8	7	1.53	0.7794 ± 0.0985	0.002321 ± 0.001637
ATL	4	2	1	0.67	0.6667 ± 0.2041	0.001012 ± 0.001135

Примечание. n – размер выборки; Nh – число гаплотипов; S – число полиморфных сайтов; K – среднее число нуклеотидных различий; H – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие. * Анализ был проведен без гаплотипа *M. americana*. Коды популяций приведены в табл. 1.

Таблица 3. Значения коэффициента генетической дифференциации Φ_{ST}

Популяция	EUR	SIB	FE	WB	ALA	PAC
EUR						
SIB	0.04863					
FE	0.22160	0.10870				
WB	0.19491	0.15413	0.00986			
ALA	0.09841	0.01606	-0.02456	0.02149		
PAC	0.17928	0.16701	0.02193	-0.01825	0.03381	
ATL	-0.01073	-0.06208	0.23085	0.29133	0.19691	0.32412

Примечание. Коды популяций приведены в табл. 1. Статистически достоверные значения выделены жирным шрифтом ($p < 0.05$).

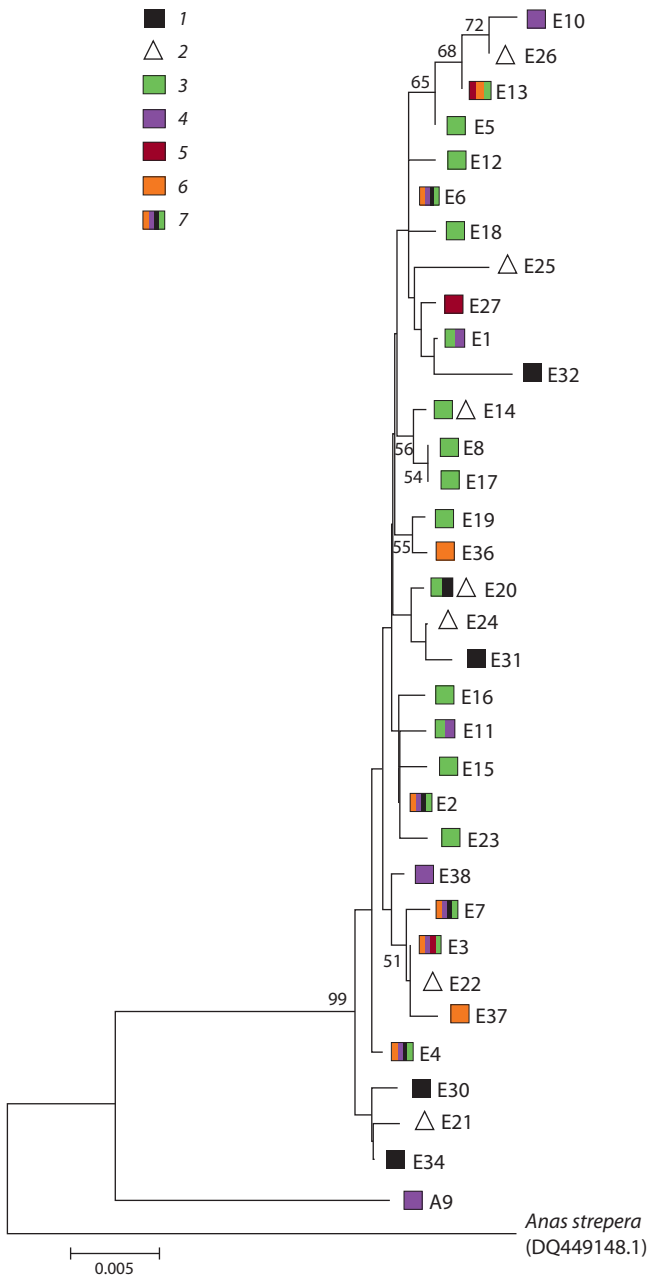


Рис. 1. NJ-дерево гаплотипов мтДНК *M. penelope*.
Значения индекса бутстрепа приведены, если они превышают 50 %.
1 – Европа; 2 – Сибирь; 3 – Дальний Восток; 4 – западная Берингия; 5 – Аляска/Алеутские острова; 6 – Тихоокеанское побережье Северной Америки; 7 – гаплотипы, обнаруженные в пяти и более выборках.

Самые высокие значения индекса генетической дифференциации были получены при сравнении выборки из Атлантического побережья Северной Америки с выборками из Тихоокеанского побережья Северной Америки (0.324), западной Берингии (0.291), Дальнего Востока (0.231). Значительные различия были также обнаружены между популяциями европейской и дальневосточной (0.322), европейской и западной Берингии (0.195), европейской и тихоокеанской Северной Америки (0.179), а также сибирской и тихоокеанской Северной Америки (0.167), сибирской и западной Берингии (0.154). Умеренно диффе-

ренцированными были дальневосточная и сибирская популяции (0.109).

Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) показал, что 91.85 % генетического разнообразия обусловлено внутривидовой изменчивостью, тогда как на изменчивость между популяциями приходится 8.15 %. Максимально снизить внутривидовую изменчивость и получить самое высокое значение межгрупповой изменчивости удалось с помощью группировки популяций по географической близости. При объединении популяций дальневосточной, тихоокеанской, западной Берингии и алеутской в одну группу, европейской, сибирской и атлантической – в другую доля межгрупповой изменчивости составила 13.89 %, внутривидовой – 84.73 %, а на межвидовую изменчивость внутри групп пришлось 1.38 %.

Консенсусное NJ-дерево объединило все гаплотипы *M. penelope* в один кластер с 99 % бутстрепподдержкой, исключив гаплотип А-9, обнаруженный у одной особи из Анадыря (рис. 1). Воспроизводимость ветвления внутри кластера была низкой, и лишь несколько узлов ветвления имели значения бутстрепа выше 50 %. Медианная сеть гаплотипов имела структуру, близкую к звездообразной (рис. 2). Центральные гаплотипы встречались с самой высокой частотой и были обнаружены во всех или почти во всех исследованных популяциях *M. penelope*. Гаплотипы отстояли друг от друга в большинстве случаев на одну и единично на две или три нуклеотидные замены, за исключением гаплотипа А-9 из Анадыря, отделенного от основной клады 19 заменами. Гаплотипы не формировали кластеров в соответствии с их географической принадлежностью.

Результаты теста Fu's Fs на селективную нейтральность свидетельствовали в поддержку гипотезы роста численности популяций в прошлом (табл. 4). Так, значения Fu's Fs были отрицательными, за исключением выборки из североамериканской Атлантики и достоверно отличались от нуля для дальневосточной, сибирской, европейской и тихоокеанской выборок. Отрицательные значения теста Fu's Fs могут трактоваться и как свидетельство действия направленного отбора. Однако распределение попарных нуклеотидных различий между парами гаплотипов во всех выборках было унимодальным и соответствовало ожидаемому, согласно модели увеличения численности популяции в прошлом (данные не приведены). Низкие и статистически недостоверные значения суммы квадратов отклонений SSD между наблюдаемым и ожидаемым распределениями подтвердили достоверность соответствия. По данным коалесцентного анализа, максимально правдоподобные значения параметра роста численности (g) исследуемых популяций имели положительные значения, варьируя от 725.8 до 6528.6 (см. табл. 4). Ввиду большого значения стандартного отклонения параметра g для атлантической североамериканской выборки положительная оценка роста численности оказалась недостоверной (99.9 % CI: -581.8 – 2715).

Обсуждение

Генетическое разнообразие оказалось высоким во всех исследованных выборках: средние значения нуклеотидного

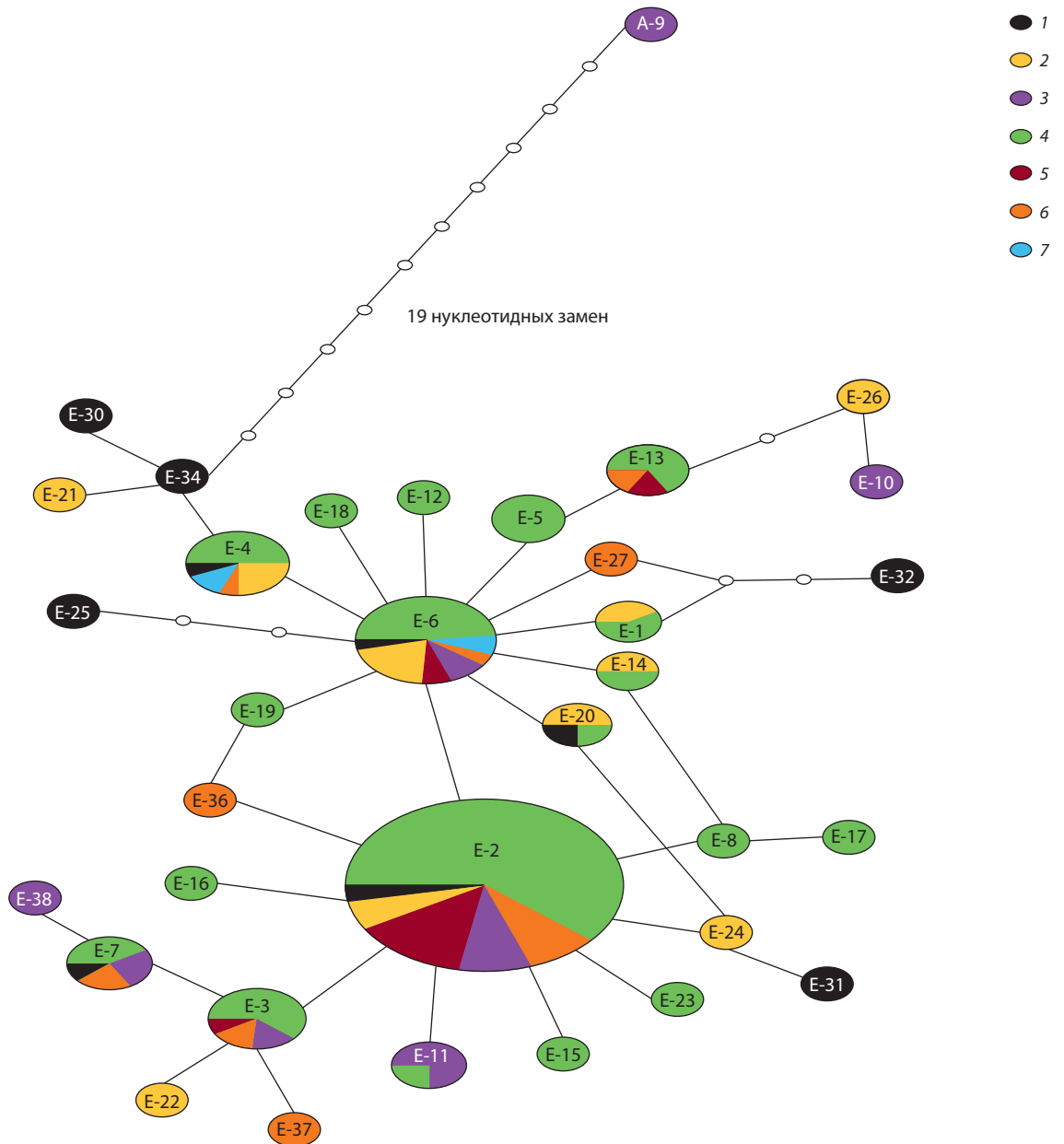


Рис. 2. Филогенетическая сеть гаплотипов мтДНК *M. penelope*.

Размер круга пропорционален числу особей, имеющих данный гаплотип. Маленькие окружности представляют промежуточные гаплотипы, не обнаруженные в выборках.

1 – Европа; 2 – Сибирь; 3 – западная Берингия; 4 – Дальний Восток; 5 – Аляска/Алеутские острова; 6 – Тихоокеанское побережье Северной Америки; 7 – Атлантическое побережье Северной Америки.

Таблица 4. Демографические параметры

Популяция	SSD	<i>p</i> -value	Fu's Fs	<i>p</i> -value	G	SD (G)
EUR	0.0242	0.57	-5.063	0.004	2180.42	173.352
SIB	0.0109	0.22	-4.0281	0.01	2369.77	321.473
FE	0.0076	0.21	-13.14	0	1863.11	83.2869
WB	0.0033	0.56	-2.26	0.078	725.802	241.624
ALA	0.0101	0.67	-1.69	0.071	6528.63	518.407
PAC	0.005	0.64	-3.6915	0.003	3576.6	467.931
ATL	0.0898	0.41	0.34	0.473	1066.66	1648.45

Примечание. Коды популяций приведены в табл. 1.

и гаплотипического разнообразия составили 0.00295 ± 0.00200 и 0.8123 ± 0.0912 соответственно, что укладывается в пределы изменчивости других видов утиных птиц ($\pi = 0.0020-0.0130$; $H = 0.68-0.987$; (McCracken et al., 2001; Kulikova et al., 2004, 2005; Kraus et al., 2011). Доля внутривидовой генетической изменчивости составила 91.85 %, тогда как межпопуляционная компонента изменчивости оказалась равной 8.15 %. Филогенетические реконструкции продемонстрировали отсутствие кластеризации по географическому признаку (см. рис. 1 и 2). Аналогичные результаты были получены в исследованиях других видов утиных (Cronin et al., 1996; McCracken et al., 2001; Kulikova et al., 2005; Peters, Omland, 2007; Flint et al., 2009; Kraus et al., 2011; Peters et al., 2014). Значительная натальная дисперсия, симпатрия на зимовке или в местах гнездования, смена мест гнездования и сезонные миграции способствуют перераспределению особей в пределах ареала (Павлов и др., 1997; Flint et al., 2009), что и объясняет высокое внутривидовое генетическое разнообразие и низкую межпопуляционную дифференциацию.

Тем не менее анализ молекулярной изменчивости AMOVA позволил выявить некоторую генетическую структурированность наших данных. Самые высокие показатели генетической подразделенности были получены после объединения популяций в две группы, европейско-сибирскую и восточноазиатскую. В первую вошли выборки из Европы, Сибири и североамериканской Атлантики, во вторую – выборки из Дальнего Востока, западной Берингии, Аляски, Алеутских островов и Тихоокеанского побережья Северной Америки. Учитывая, что на изменчивость между группами приходится 13.9 % генетического разнообразия, можно предположить, что популяции внутри одной группы чаще обмениваются мигрантами, чем с популяциями из другой группы. Известно, что формирование пар у утиных птиц часто происходит во время зимовки (Rohwer, Anderson, 1988). Ареалы зимовок сибирской и европейской популяций связи накладываются друг на друга на значительной территории, которая, начинаясь от севера Испании, простирается в северо-восточном направлении через Францию, Германию и дальше на восток до Урала (Monval, Pirot, 1989). Общими местами зимовок для связей из западной Берингии и Дальнего Востока являются юг Корейского полуострова и Япония (Sonobe, Usui, 1993; Павлов и др., 1997).

С середины XX в. евразийская связь стала часто встречаться во время зимовки на восточном и западном побережьях Северной Америки (Edgell, 1984; Johnsgard, 2010; Bogiatto et al., 2015). В последние годы отмечены находки связей и в летнее время, причем это были не одиночные самцы, а птицы парами. Предполагают, что связь даже гнездится в небольших количествах на Аляске и в северо-западной части Канады (Fournier, Hines, 1996; Johnsgard, 2010). В то же время появились сведения о находках представителей этого вида и в Южной Америке (Williams, Beadle, 2003; Johnson, 2018). Согласно полученным в нашей работе результатам, выборка связи западного побережья Северной Америки генетически не дифференцирована от популяции западной Берингии и слабо дифференцирована от дальневосточной популяции (см. табл. 3). Птицы из

выборки восточного побережья США и Канады относятся к выделенной по данным AMOVA европейско-сибирской группе. Таким образом, на восточном побережье Северной Америки зимуют птицы из Европы и Сибири, а на западном – из Северо-Восточной Азии.

Факт обнаружения гаплотипа американской связи в выборке из Анадыря (Чукотка) у особи, фенотипически не отличимой от евразийской связи, уже описан в нашей предыдущей работе (Куликова, Журавлев, 2010). Это удивительно, учитывая встречи фенотипических гибридов *americana* × *penelope* на Чукотке (Кречмар, Кондратьев, 2006). Известно, что американские связи гнездятся в бассейне р. Анадырь и что оба вида контактируют в Евразии и Северной Америке во время зимовки (Peterson et al., 1983; Edgell, 1984). Зимовка и гнездование на одной территории, тесное родство американской и евразийской связей (Peters et al., 2005, 2014) могут способствовать межвидовой гибридизации.

Заключение

Таким образом, филогеографическая структура евразийской связи *M. penelope* оказалась невыраженной. Однако на основании данных полиморфизма контрольного региона мтДНК нам удалось выделить две группы популяций, восточноазиатскую и европейско-сибирскую, что подтверждают и сведения о кольцевании. Но наши результаты базируются на изменчивости мтДНК, которая отражает только матриархальную сторону изменчивости. Для получения полной картины филогеографической структуры вида необходимо продолжить исследования с применением аутосомных и сцепленных с Z-хромосомой маркеров.

Список литературы / References

- Дементьев Г.П., Гладков Н.А. (Ред.) Птицы Советского Союза. М.: Сов. наука, 1952; Т. 4.
[Dement'ev G.P., Gladkov N.A. (Eds.) Birds of the USSR. Moscow: Sovetskaya Nauka Publ., 1952; V. 4. (in Russian)]
- Кречмар А.В., Кондратьев А.В. Пластинчатоклювые птицы Северо-Востока Азии. Магадан, 2006.
[Krechmar A.V., Kondratyev A.V. Waterfowl Birds of northeastern Asia. Magadan, 2006. (in Russian)]
- Куликова И.В., Журавлев Ю.Н. Генетическая структура дальневосточной популяции связи *Anas penelope* по данным секвенирования контрольного региона мтДНК. Генетика. 2010;46(8): 1095-1101.
[Kulikova I.V., Zhuravlev Y.N. Genetic structure of the Far Eastern population of Eurasian wigeon *Anas penelope* inferred from sequencing of mitochondrial DNA control region. Rus. J. Genetics. 2010;46(8):976-981. DOI 10.1134/S1022795410080090.]
- Павлов Д.С., Бианки В.В., Добрынина И.Н. Миграции птиц Восточной Европы и Северной Азии: Пластинчатоклювые. Речные утки. М.: Наука, 1997.
[Pavlov D.C., Bianki V.V., Dobrynina I.N. Migrations of Birds of Eastern Europe and Northern Asia: Anseriformes. Dabbling Ducks. Moscow: Nauka Publ., 1997. (in Russian)]
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median joining net works for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 1999;16:37-48. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.
- Bogiatto R.J., Ashe J.B., Cockrell L.E., Foster S.R., Mattson M.L., Ruckle J.T. Temporal pattern of wetland use by Eurasian and American wigeon in the Northern Sacramento Valley, California. North-

- western Naturalist. 2015;96(3):234-239. DOI 10.1898/1051-1733-96.3.234.
- Cronin M.A., Grand J.B., Esler D., Derksen D.V., Scribner K.T. Breeding populations of northern pintails have similar mitochondrial DNA. *Can. J. Zool.* 1996;74:992-999. DOI 10.1139/z96-112.
- Edgell M.C.R. Trans-hemispheric movements of Holarctic Anatidae: the Eurasian wigeon (*Anas penelope* L.) in North America. *J. Biogeogr.* 1984;11:27-39. DOI 10.2307/2844773.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* 2010;10:564-567. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Flint P.L., Ozaki K., Pearce J.M., Guzzetti B., Higuchi H., Fleskes J.P., Shimada T., Derksen D.V. Breeding-season sympatry facilitates genetic exchange among allopatric wintering populations of northern pintails in Japan and California. *Condor.* 2009;111:591-598. DOI 10.1525/cond.2009.090100.
- Fournier M.A., Hines J.E. Second record and possible breeding of the Eurasian Wigeon, *Anas penelope* in the District of Mackenzie, Northwest Territories. *Can. Field-Natur.* 1996;110(2):336-337.
- Greig J.C. Duck hybridization: a threat to species integrity. *Bokmakierie.* 1980;32:88-89.
- Harpending H.C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 1994;66:591-600.
- Johnsgard P.A. Hybridization in the Anatidae and its taxonomic implications. *Condor.* 1960;62:25-33. DOI 10.2307/1365656.
- Johnsgard P.A. Waterfowl of North America. Revised Edition (2010). Available at <http://digitalcommons.unl.edu/biosciwaterfowlna/1/>
- Johnson T.A. Eurasian Wigeon *Mareca penelope* in Trinidad and Tobago: first documented record for South America. *Cotinga.* 2018;40:79-80.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980;16:111-120. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Kraus R.H.S., Zeddeman A., van Hooff P., Sartakov D., Soloviev S.A., Ydenberg R.C., Prins H.H.T. Evolution and connectivity in the world-wide migration system of the mallard: Inferences from mitochondrial DNA. *BMC Genetics.* 2011;12:99. DOI 10.1186/1471-2156-12-99.
- Kuhner M.K., Yamato J., Felsenstein J. Estimating effective population size and neutral mutation rate from sequence data using Metropolis-Hastings sampling. *Genetics.* 1995;140:1421-1430.
- Kulikova I.V., Drovetski S.V., Gibson D.D., Harrigan R.J., Rohwer S., Sorenson M.D., Winker K., Zhuravlev Y.N., McCracken K.G. Phylogeography of the Mallard (*Anas platyrhynchos*): hybridization, dispersal and lineage sorting contribute to complex geographic structure. *Auk.* 2005;122(3):949-965. DOI 10.1642/0004-8038(2005)122[1309:POTMAP]2.0.CO;2.
- Kulikova I.V., Zhuravlev Yu.N., McCracken K.G. Asymmetric hybridization and sex-biased gene flow between Eastern Spot-billed Ducks (*Anas zonorhyncha*) and Mallards (*A. platyrhynchos*) in the Russian Far East. *Auk.* 2004;121(3):930-949. DOI 10.1642/0004-8038(2004)121[0930:AHASGF]2.0.CO;2.
- Lavretsky P., Hernández-Baños B.E., Peters J.L. Rapid radiation and hybridization contribute to weak differentiation and hinder phylogenetic inferences in the New World Mallard complex (*Anas* spp.). *Auk.* 2014;131(4):524-538. DOI 10.1642/AUK-13-164.1.
- McCracken K.G., Johnson W.P., Sheldon F.H. Molecular population genetics, phylogeography, and conservation biology of the mottled duck (*Anas fulvigula*). *Conserv. Genet.* 2001;2:87-102. DOI 10.1023/A:1011858312115.
- Monval J.-Y., Piro J.-Y. Results of the IWRB International Waterfowl Census 1967-1989. Slimbridge, IWRB, 1989.
- Peters J.L., McCracken K.G., Zhuravlev Y.N., Lu Y., Wilson R.E., Johnson K.P., Omland K.E. Phylogenetics of wigeons and allies (Anatidae: *Anas*): The importance of sampling multiple loci and multiple individuals. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005;35:209-224. DOI 10.1016/j.ympev.2004.12.017.
- Peters J.L., Omland K.E. Population structure and mitochondrial phylogeny in North American Gadwalls (*Anas strepera*). *Auk.* 2007;124(2):444-462. DOI 10.1642/0004-8038(2007)124[444:PSAMPI]2.0.CO;2.
- Peters J.L., Winker K., Millam K.C., Lavretsky P., Kulikova I., Wilson R.E., Zhuravlev Y.N., McCracken K.G. Mito-nuclear discord in six congeneric lineages of Holarctic ducks (genus *Anas*). *Mol. Ecol.* 2014;23:2961-2974. DOI 10.1111/mec.12799.
- Peters J.L., Zhuravlev Y., Fefelov I., Logie A., Omland K.E. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwalls and falcated duck (*Anas* spp.). *Evolution.* 2007;61(8):1992-2006. DOI 10.1111/j.1558-5646.2007.00149.x.
- Peterson R.T., Mountfort G.A., Hollom P.A.D. A Field Guide to the Birds of Britain and Europe. Glasgow: Wm Collins Sons, 1983.
- Posada D., Crandall K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817-818. DOI 10.1093/bioinformatics/14.9.817.
- Ramirez V., Savoie P., Morais R. Molecular characterization and evolution of a duck mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 1993;37:296-310. DOI 10.1007/BF00175506.
- Rohwer F.C., Anderson M.G. Female-biased philopatry, monogamy, and the timing of pair formation in migratory waterfowl. *Curr. Ornithol.* 1988;5:187-221. DOI 10.1007/978-1-4615-6787-5_4.
- Ruokonen M., Kvist L. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2002;23:422-432. DOI 10.1016/S1055-7903(02)00021-0.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4:406-425. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sonobe K., Usui S. (Eds.) A Field Guide to the Waterbirds of Asia. Tokyo: Wild Bird Society of Japan, 1993.
- Sorenson M.D., Fleischer R.C. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:15239-15243. DOI 10.1073/pnas.93.26.15239.
- Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K. The Staden Package, 1998. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:115-130.
- Taanman J.W. The mitochondrial genome: structure, ranscription, translation and replication. *Biochem. Biophys. Acta.* 1999;1410:103-123. DOI 10.1016/S0005-2728(98)00161-3.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011;28:2731-2739. DOI 10.1093/molbev/msr121.
- Williams R.S.R., Beadle D.D. Eurasian Wigeon *Anas penelope* in Venezuela: a new bird for South America. *Cotinga.* 2003;19:71.

ORCID ID

I.V. Kulikova orcid.org/0000-0003-4847-2560

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Американского фонда гражданских исследований и развития (U.S. Civilian Research & Development Foundation (грант RUB1-7094-VL-13)), ДВО РАН (грант CRDF-14-004) и ТГУ (грант 8.1.19.2018).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.12.2018. После доработки 04.02.2019. Принята к публикации 04.02.2019.


Митотип *Drosophila melanogaster* может иметь адаптивное значение

Д.В. Петровский^{1, 2} , Л.П. Захаренко^{1, 3} 

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

² Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: dm_petr@ngs.ru; zakharlp@bionet.nsc.ru

В природных популяциях *Drosophila melanogaster* обнаруживают несколько митохондриальных клад, отличающихся друг от друга по первичной последовательности. Чаще всего это однонуклеотидные замены, часть из них консервативна. Одни клады встречаются редко, другие доминируют. В семи исследованных на сегодняшний день популяциях *D. melanogaster* клада III преобладает по сравнению с кладами V и VI. Мы сравнивали линии *D. melanogaster* с разными митотипами, но с выровненными в течение нескольких поколений беккроссами ядерными геномами, по двигательной активности (с использованием TriKinetics *Drosophila* Activity Monitor), энергообмену (методом непрямой калориметрии, на основе измерения потребления кислорода) и по длительности жизни (в экстремальных условиях содержания при 29 °C). По нашим данным, у особей с митотипом, относящимся к кладе III, выше уровень локомоторной активности и больше продолжительность жизни. По энергопотреблению исследованные линии не различаются. Однако один и тот же уровень энергообмена может быть по-разному распределен между состоянием активности и состоянием покоя. Если энергообмен в состоянии покоя у мух с разной локомоторной активностью одинаков, то особь при одинаковых тратах суммарной энергии может перемещаться на большее расстояние или дольше проявлять активность. Это можно интерпретировать как преимущество линии с митотипом, относящимся к кладе III, по сравнению с двумя другими исследованными митотипами, относящимися к кладам V и VI. Если особи имеют разный энергообмен в покое, то линии с наименьшим энергообменом в покое потратят меньше энергии при вынужденном бездействии. И в этом случае митотип, относящийся к кладе III, будет иметь преимущества. Какие нуклеотидные замены в этом митотипе могут обеспечивать адаптивное преимущество, пока остается непонятным. Мы предполагаем, что особи из широко распространенной клады III могут иметь адаптивные преимущества по сравнению с другими митотипами благодаря большей локомоторной активности даже при одинаковом энергообмене. Требуются дальнейшие исследования, поскольку митотипы полиморфны по набору однонуклеотидных замен не только между кладами, но и внутри клады.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; митотип; продолжительность жизни; локомоторная активность; энергообмен.

Для цитирования: Петровский Д.В., Захаренко Л.П. Митотип *Drosophila melanogaster* может иметь адаптивное значение. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):370-374. DOI 10.18699/VJ19.504


A *Drosophila melanogaster* mitotype may have an adaptive meaning

D.V. Petrovskii^{1, 2} , L.P. Zakharenko^{1, 3} 

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: dm_petr@ngs.ru; zakharlp@bionet.nsc.ru

Several different mitochondrial clades have been found in natural populations of *Drosophila melanogaster*. Most often, the difference is in single nucleotide substitutions, some of which are conservative. Some clades are rare, and others dominate. It has been reported that clade III dominates over clades V and VI in seven populations of *D. melanogaster*. We compared *D. melanogaster* strains with different mitotypes by locomotor activity (using TriKinetics *Drosophila* Activity Monitor), energy expenditure (by indirect calorimetry, based on measuring oxygen consumption) and life span (under extreme conditions at 29 °C). The nuclear genomes of these strains were aligned for several generations by backcrosses. According to our data, individuals with the mitotype from clade III had a higher level of locomotor activity and longer life span. In terms of energy expenditure, the strains studied did not differ. However, the same level of energy expenditure may be differently distributed between the state of activity and the state of rest or sleep. If the energy expenditure during the sleep in flies with different locomotor activity is the same, then an individual with the same overall energy expenditure can move a greater distance or be active longer. This can be interpreted as an advantage of the strain with the mitotype from clade III compared to the other two mitotypes studied. If individuals have

different energy expenditure values at rest, the strains with lower energy expenditure at rest spend less energy during forced inactivity. In this case, the mitotype from clade III should also be advantageous. What nucleotide substitutions in the mitotype from clade III can provide an adaptive advantage is not clear yet. We assume that individuals with widespread clade M(III) may have adaptive advantages compared to other mitotypes due to their greater locomotor activity even with the same energy expenditure. Further studies are required, for mitotypes are polymorphic for single nucleotide polymorphism not only between but also within the clades.

Key words: *Drosophila melanogaster*; mitotype; life span; locomotor activity; energy expenditure.

For citation: Petrovskii D.V., Zakharenko L.P. A *Drosophila melanogaster* mitotype may have an adaptive meaning. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):370-374. DOI 10.18699/VJ19.504 (in Russian)

Введение

Митохондриальный геном отвечает за обеспеченность клетки энергией, в частности кодирует ряд белков, задействованных в цикле Кребса, β -окислении жирных кислот, окислительном фосфорилировании. В ряде работ отмечают связь между структурой мтДНК и длительностью жизни (Lehmann et al., 2008; Muradian et al., 2010). Например, считается, что у плацентарных млекопитающих повышенная частота мутирования митохондриальной ДНК позволяет увеличить длительность жизни за счет селективного преимущества мутаций, уменьшающих наработку активных форм кислорода (Rottenberg, 2007). У *Drosophila simulans* с разными митогаплотипами выявляют разницу по АТФазной активности, содержанию митохондриального цитохрома С, перекиси водорода и другим биоэнергетическим показателям (Katewa, Ballard, 2007). Хотя в цитируемой работе использовали *D. simulans* из симпатрических популяций, влияния митоядерных взаимодействий на наблюдаемые различия исключить нельзя (Stuart, Brown, 2006). Среди множества теорий старения особое место занимает свободнорадикальная теория старения, согласно которой активные формы кислорода, синтезируемые главным образом в митохондриях, нарушают работу клеток (Harman, 1956; Halliwell, 2012).

В силу большой вариабельности митохондриальной ДНК разница между митохондриями разных линий может достигать более 100 SNP (Zhu et al., 2014). Исследователи полиморфизма мтДНК *D. melanogaster* выделяют несколько митохондриальных клад. По одной классификации выделяют клады М и S, различающиеся по однонуклеотидной консервативной замене 37С/Т (позиция 2187 в последовательности GenBank accession number NC001709) (Richardson et al., 2012; Илинский и др., 2013; Pinsky, 2013). По другой классификации выделяют восемь клад, которые группируются следующим образом: М(I–V, VIII) и S(VI–VII) и отличаются друг от друга набором однонуклеотидных замен, часть из которых консервативна (Richardson et al., 2012; Early, Clark, 2013; Pinsky, 2013). М(III) клады в природных популяциях Raleigh, North Carolina (США) (Richardson et al., 2012), Beijing (Китай), Ithaca (NY, США), Netherlands, Tasmania, and Zimbabwe (Early, Clark, 2013) преобладает по сравнению с кладами М(V) и S(VI) и высоко полиморфна по набору SNP. Внутривидовая вариабельность цитоплазматических генов может влиять на продолжительность жизни и другие физиологические параметры (Maklakov et al., 2006).

Мы сравнивали линии с разными митотипами (М(III) – митогаплотип из клады III, М(V) – митогаплотип из клады V и S(VI) – митогаплотип из клады VI) по двигательной

активности, энергопотреблению и длительности жизни, чтобы понять, существуют ли физиологические преимущества у какого-либо из исследованных митотипов.

Материалы и методы

Линии дрозофил. Митохондрии считают важным фактором, влияющим на продолжительность жизни и другие физиологические параметры. Однако на вариабельность митохондриального генома может накладываться генетический фон, обусловленный ядерным геномом (Clancy, 2008). Митохондриальный геном наследуется по материнской линии, тогда как ядерный геном достается потомкам от обоих родителей. Используя эту особенность наследования, при помощи беккроссов можно получить линии с разными митотипами, но с одной и той же ядерной ДНК. Насыщающие возвратные скрещивания в течение не менее 10 поколений с самцами линии Vi90 позволили получить линии дрозофил со сходным ядерным геномом, но с тремя разными митохондриальными геномами: М(III), М(V) и S(VI). Линии дрозофил, используемые в работе, были любезно предоставлены Н.Е. Грунтенко. Поскольку инфицированность линии вольбахиями может давать вклад в жизненно важные физиологические показатели (Gruntenko et al., 2017), мух выращивали на корме с тетрациклином (0.25 мг/мл) в течение двух поколений. Такая обработка антибиотиком не влияет на длительность жизни дрозофил (Min, Benzer, 1997). Часть линий была задублирована, чтобы исключить возможное влияние неполного замещения генома (Gruntenko et al., 2017). Мы исследовали линии на основе ядерного генома линии Vi90: М(III) – митотип из клады III (исходный геном линии W304 – две отводки), М(V) – митотип из клады V (исходный геном линии B90 – две отводки) и S(VI) – митотип из клады VI (исходные геномы линий W1118 (две отводки) и W153 и W181 (по одной отводке каждая)).

Измерение энергообмена проводили методом непрямой калориметрии, на основе измерения потребления кислорода в герметичной камере со щелочью. Животные при дыхании потребляют кислород и выделяют углекислый газ и воду. Углекислый газ, в свою очередь, реагирует со щелочью (в нашем случае гидроокись калия), образуя твердое вещество (K_2CO_3). Таким образом, давление в камере падает пропорционально изъятому кислороду. Установка для измерения энергообмена была сконструирована по аналогии с ранее описанной (Diarga et al., 1999) с небольшими модификациями. Она состояла из 10 термостатированных камер (8 измерительных камер и 2 камеры сравнения) объемом 3 мл каждая и одного датчика давления. В каждую камеру помещали по 10 самцов

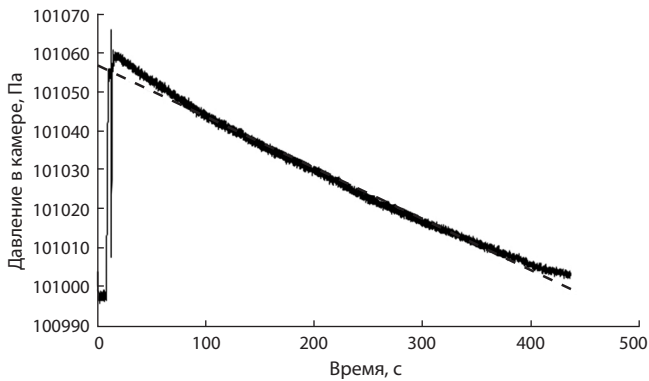


Рис. 1. Пример измерения потребления кислорода. Сплошная линия – давление в камере, штриховая – аппроксимирующая прямая.

в возрасте 3–7 дней. Эксперимент проводили при 29 °С с 11:00 до 16:00 через 1 ч после посадки мух. Падение давления в каждой камере измеряли в течение 6 мин в двух повторах.

Для оценки уровня энергообмена измеряли угол наклона аппроксимирующей прямой на графике, отражающем изменение давления в камере (рис. 1). Для статистической обработки брали среднее значение по двум повторам. Сразу после эксперимента мух взвешивали. Всего было проведено четыре эксперимента.

Двигательную активность самцов тестируемых линий измеряли с использованием TriKinetics *Drosophila* Activity Monitor (Trikinetics, Waltham, MA, США). Каждого самца помещали в стеклянную трубку со стандартным кормом. Активность определяли по числу пересечений самцом инфракрасного луча за одну минуту в течение пяти дней. В качестве показателя среднесуточной локомоторной активности для каждой мухи рассчитывали среднечасовую активность с 11:00 по 16:00 со второго по четвертый день эксперимента. В анализ брали данные по мухам, которые дожили до конца эксперимента. В каждой линии было проанализировано от 12 до 16 особей в возрасте 3–7 дней. Эксперимент проводили при 29 °С.

Длительность жизни определяли при 29 °С. В каждую пробирку сажали по 20 самцов. Корм меняли два раза в неделю. В анализ брали по пять пробирок на каждую линию.

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили в программе Statistica 6.0. Для сравнения средних использовали LSD (least significant difference). Длительность жизни оценивали с помощью теста logrank (Bland, Altman, 2004) с применением критерия χ^2 .

Результаты

В дневные часы максимальная локомоторная активность была у дрозофил с митотипом M(III) (рис. 2). Среднесуточная активность у мух с митотипом M(III) составила 51.2 ± 5.9 пересечений за 1 ч, что достоверно выше ($p < 0.02$), чем активность мух с митотипом S(VI) (39.9 ± 2.9) и достоверно выше ($p < 0.05$) активности мух с митотипом M(V) (35.0 ± 4.0). Среднесуточная активность мух митотипов M(V) и S(VI) не различалась ($p > 0.4$).

Потребление кислорода в пересчете на одну муху в среднем составило 2.76 мкл/ч. У исследованных мух

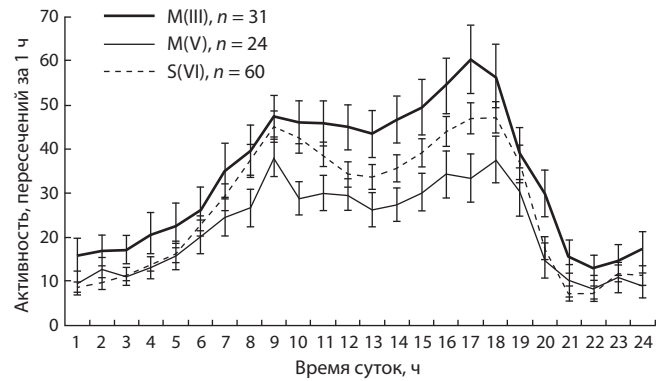


Рис. 2. Суточная динамика двигательной активности дрозофил с разными митотипами (mean \pm SE).

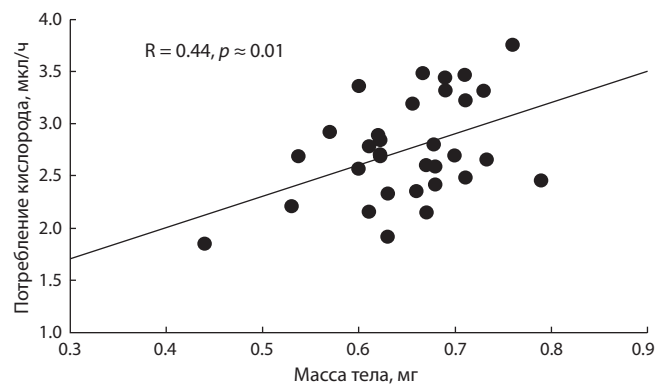


Рис. 3. Корреляция усредненных значений потребления кислорода со средней массой тела мух.

Энергообмен у дрозофил с разными митотипами

Митотип	n	Масса тела, мг	Среднее потребление O ₂	
			на одну муху, мкл/ч	на массу тела, мл/г/ч
M(III)	8	0.662 \pm 0.014	2.83 \pm 0.19	4.27 \pm 0.25
M(V)	8	0.653 \pm 0.019	2.79 \pm 0.19	4.31 \pm 0.35
S(VI)	12	0.644 \pm 0.023	2.70 \pm 0.11	4.21 \pm 0.12

Примечание. n – число особей. Данные представлены как mean \pm SE.

этот показатель достоверно коррелировал с массой тела ($R = 0.44$, $p \approx 0.01$) (рис. 3). Усредненные по линиям значения потребления кислорода на уровне тенденции коррелировали со среднесуточной активностью ($R = 0.61$, $p \approx 0.1$). Потребление кислорода в пересчете на массу тела мух не коррелировало с массой тела ($p > 0.2$) и среднесуточной активностью даже на уровне тенденции ($p > 0.8$). Достоверных различий между митотипами ни по массе, ни по потреблению кислорода не выявлено (таблица).

Длительность жизни мух митотипа M(III) была достоверно больше, чем длительность жизни мух митотипа S(VI) ($\chi^2 = 9.24$, $p < 0.01$) и митотипа M(V) ($\chi^2 = 4.83$, $p < 0.05$), достоверных различий между митотипами S(VI) и M(V) по продолжительности жизни не обнаружено (рис. 4).

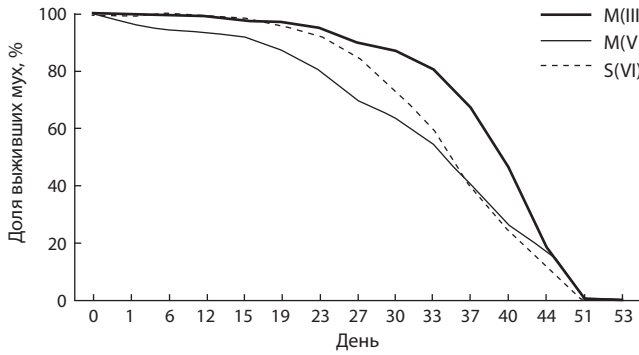


Рис. 4. Длительность жизни самцов с разными митотипами.

Обсуждение

Муши с митотипом М(III), по нашим данным, отличаются более высоким уровнем двигательной активности, однако имеют такой же энергообмен, как и муши с митотипами М(V) и S(VI), что можно рассматривать как адаптивное преимущество мух с митотипом М(III). Зависимость потребления кислорода от активности можно аппроксимировать линейно (Шмидт-Ниельсен, 1982), тогда угол наклона прямой можно назвать ценой активности или коэффициентом полезного действия, а пересечение этой прямой с осью ординат будет отражать метаболизм покоя или метаболизм при нулевой активности. У мух с разным генотипом один и тот же уровень энергообмена может быть по-разному распределен между состоянием активности и состоянием покоя. Поскольку в нашем случае для каждого митотипа мы имеем единственную точку на плоскости активность/энергообмен, а через одну точку можно провести бесконечное количество прямых, то однозначно оценить распределение энергии между состоянием покоя и состоянием активности нельзя. Тем не менее рассмотрим два крайних случая.

Если энергообмен в состоянии покоя у мух с разным митотипом будет одинаковым, то у аппроксимирующих прямых для этих митотипов будут разный наклон и, соответственно, разная цена активности (рис. 5, а). Наименее крутая прямая (для линии с М(III) митотипом) будет означать, что особь при одинаковых тратах энергии может перемещаться на большее расстояние или дольше проявлять активность. Это можно интерпретировать как преимущество линии с М(III) митотипом по сравнению с двумя другими исследованными митотипами.

Если же особи имеют разный энергообмен в покое (см. рис. 5, б) и одинаковую цену активности (одинаковый угол наклона аппроксимирующих кривых), то и в этом случае линии с М(III) митотипом получают преимущество над линиями с другими исследованными митотипами, поскольку наименьший энергообмен в покое позволит потратить меньше энергии при вынужденном бездействии при неблагоприятных условиях.

Скорее всего, истинная картина будет отличаться от этих двух крайних случаев. Для выяснения истинной зависимости энергообмена от активности лучше изучать эти параметры одновременно. Тогда для каждой линии можно получить несколько значений энергообмена и активности и увидеть реальную картину влияния митотипа.

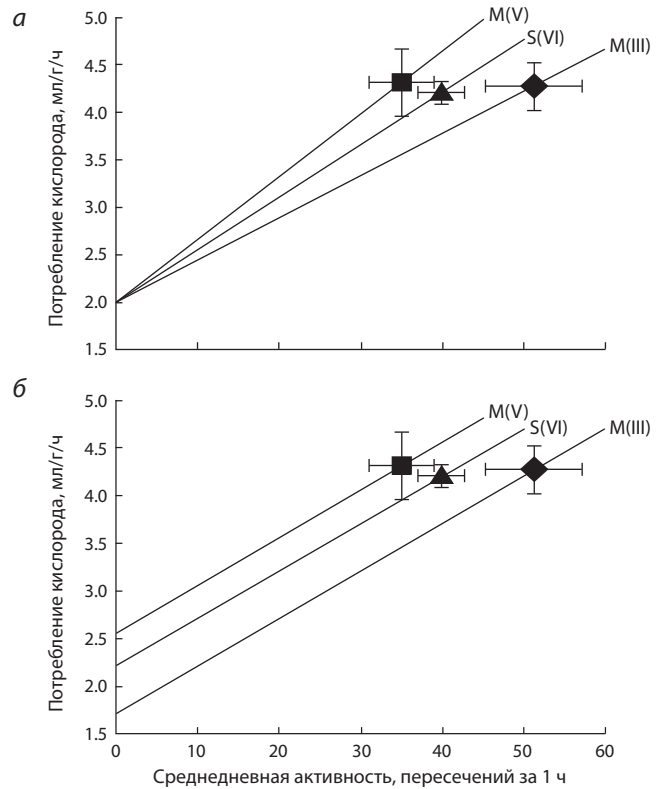


Рис. 5. Гипотетические варианты зависимости энергообмена от локомоторной активности для мух с разными митотипами.

У мух с разными митотипами: а – одинаковый уровень потребления кислорода при нулевой активности, но различаются углы наклона аппроксимирующих прямых; б – одинаковые углы наклона аппроксимирующих прямых, но различаются уровни потребления кислорода при нулевой активности.

Продолжительность жизни не коррелирует с уровнем выделения углекислого газа у *Drosophila simulans* (Melvin et al., 2007), что подтверждается и в наших экспериментах для *Drosophila melanogaster*. Однако продолжительность жизни самцов с митотипом М(III) при содержании в экстремальных условиях (29 °С) оказалась несколько выше, чем с митотипом М(V) и S(VI), не различающихся между собой.

Заключение

Мы предполагаем, что особи из линии с митотипом М(III), относящиеся к самой распространенной кладе, могут иметь адаптивные преимущества по сравнению с другими митотипами благодаря большей локомоторной активности. Какие нуклеотидные замены в М(III) митотипе могут обеспечивать адаптивное преимущество, пока остается непонятным. Требуются дальнейшие исследования на большем числе линий, относящихся как к одной и той же кладе, так и к разным митотическим кладам.

Список литературы / References

Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Захаров И.К. Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций института цитологии и генетики СО РАН: генотипы эндосимбионта *Wolbachia* и митотипы вида-хозяина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17:407-415.

- [Ilinsky Yu.Yu., Bykov R.A., Zakharov I.K. Cytotypes of mutant *Drosophila melanogaster* stocks from the collection of the genetics of population laboratory of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS: genotypes of the *Wolbachia* endosymbiont and host mitotypes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17:407-415. (in Russian)]
- Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. М.: Мир, 1982; Кн. 1.
[Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. London–New York, Cambridge University Press, 1975. (Russ. ed. Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Book 1. Moscow: Mir Publ., 1982). (in Russian)]
- Bland J.M., Altman D.G. The logrank test. *The BMJ*. 2004;328:1073-1074.
- Clancy D.J. Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background. *Aging Cell*. 2008;7(6):795-804. DOI 10.1111/j.1474-9726.2008.00428.x.
- Diarra G.M., Roberts T.W., Christensen B.M. Automated measurement of oxygen consumption by the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;60:859-864.
- Early A.M., Clark A.G. Monophyly of *Wolbachia pipientis* genomes within *Drosophila melanogaster*: geographic structuring, titre variation and host effects across five populations. *Mol. Ecol.* 2013;23:5765-5778. DOI 10.1111/mec.12530.
- Gruntenko N.E., Ilinsky Y.Y., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Rauschenbach I.Y. Various *Wolbachia* genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions. *BMC Evol. Biol.* 2017;17(Suppl. 2):252. DOI 10.1186/s12862-017-1104-y.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.* 2012;70:257-265. DOI 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956;11:298-300. DOI 10.1093/geronj/11.3.298.
- Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes. *PLoS One*. 2013;8(1):e54373. DOI 10.1371/journal.pone.0054373.
- Katewa S.D., Ballard J.W. Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show difference in mitochondrial respiration and electron transport. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007;37(3):213-222.
- Lehmann G., Segal E., Muradian K.K., Fraifeld V.E. Do mitochondrial DNA and metabolic rate complement each other in determination of the mammalian maximum longevity? *Rejuvenation Res.* 2008;11:409-417.
- Maklakov A.A., Friberg U., Dowling D.K., Arnqvist G. Within-population variation in cytoplasmic genes affects female life span and aging in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 2006;60:2081-2086.
- Melvin R.G., Van Voorhies W.A., Ballard J.W. Working harder to stay alive: metabolic rate increases with age in *Drosophila simulans* but does not correlate with life span. *J. Insect Physiol.* 2007;53:1300-1306.
- Min K.T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94:10792-10796.
- Muradian K.K., Lehmann G., Fraifeld V.E. NUMT (“new mighty”) hypothesis of longevity. *Rejuvenation Res.* 2010;13:152-155. DOI 10.1089/rej.2009.0974.
- Richardson M.F., Weinert L.A., Welch J.J., Linheiro R.S., Magwire M.M., Jiggins F.M., Bergman C.M. Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2012;8(12):e1003129. DOI 10.1371/journal.pgen.1003129.
- Rottenberg H. Coevolution of exceptional longevity, exceptionally high metabolic rates, and mitochondrial DNA-coded proteins in mammals. *Exp. Gerontol.* 2007;42(4):364-373.
- Stuart J.A., Brown M.F. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1757(2):79-89.
- Zhu C.T., Ingelmo P., Rand D.M. G×G×E for lifespan in *Drosophila*: mitochondrial, nuclear, and dietary interactions that modify longevity. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004354. DOI 10.1371/journal.pgen.1004354.

ORCID ID

D.V. Petrovskii orcid.org/0000-0002-0623-0363

L.P. Zakharenko orcid.org/0000-0002-6341-8522

Благодарности. Работа поддержана 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).

Авторы благодарят Н.Е. Грунтенко за предоставленные линии, Ю.Ю. Илинского – за консультации по характеристике митотипов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.10.2018. После доработки 18.01.2019. Принята к публикации 01.02.2019.