


NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя

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

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

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

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

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

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


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

NGS sequencing in barley breeding and genetic studies

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

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

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

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

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

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

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

Введение

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

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

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

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

Секвенирование генома ячменя и его структурная организация

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

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

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

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

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

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

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

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

Структурная организация генома ячменя

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

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

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

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

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

Пространственная организация генома ячменя

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Высокопроизводительное генотипирование ячменя впервые апробировано в 2005 г. (Rostoks et al., 2005) на основе технологии Illumina GoldenGate (Fan et al., 2003). Первые коммерчески доступные чипы для генотипирования ячменя появились в 2009 г. (Close et al., 2009). Для его создания было выбрано и протестировано 4596 SNP на 576 ДНК-образцах для двух пилотных чипов OPA, POPA1 и POPA2, и на 480 ДНК-образцах для третьего пилотного чипа – POPA3. Далее было выбрано 3072 SNP, которые прошли качественный контроль и были генетически информативны. Они составили две производные OPA – BOPA1 и BOPA2, которые планировалось использовать для дальнейших исследований генофонда ячменя. Из 3072 SNP, выбранных для изучения, 2279 были получены из библиотек EST, а 793 – путем секвенирования ПЦР-ампликонов. В результате в платформу для генотипирования, содержащую 3072 маркера, вошли два чипа, BOPA1 и BOPA2, каждый из которых содержал по 1536 маркеров SNP, и они имели различные дизайны генотипирования (Close et al., 2009). Следующий чип был разработан Illumina Infinium iSelect 9K Custom Genotyping BeadChip (Comadran et al., 2012) и включал в себя 2832 маркера, разработанных для предыдущей технологии GoldenGate, и 5010 дополнительных маркеров, основанных на обнаружении маркеров SNP в данных Illumina RNA-seq из 10 элитных сортов Великобритании (Bayer et al., 2017).

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

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

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

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

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

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

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

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

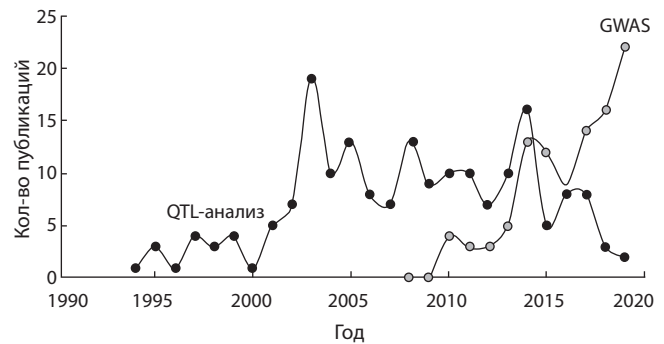


Рис. 1. Количество публикаций, описывающих проведение QTL и GWAS на ячмене, полученное на основе поиска статей по сочетаниям слов: “barley + genome-wide-association” и “barley + QTL-analysis” в базе данных Scopus (Website: <http://scopus.com>; доступ <28.08.2019>).

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

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

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

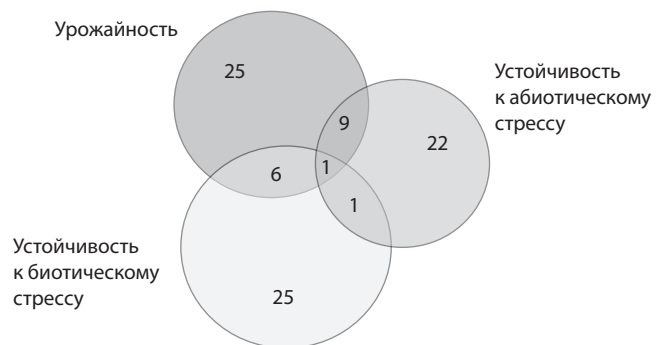


Рис. 2. Количество работ на ячмене, выполненных с помощью полногеномного анализа ассоциаций (GWAS).

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

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

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

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

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

Геномное редактирование

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

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

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

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

Заключение

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

Список литературы / References

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

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

- Hayes P., Szucs P. Disequilibrium and association in barley: thinking outside the glass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(49): 18385-18386. DOI 10.1007/s00438-006.
- Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant Cell Rep.* 2017;36(4): 611-620. DOI 10.1007/s00299-017-2107-2.
- Hyne V., Kearsey M.J. QTL analysis: further uses of 'marker regression' regression. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91(3):471-476. DOI 10.1007/BF00222975.
- International Barley Genome Sequencing Consortium; Mayer K.F.X., Waugh R., Brown J.W.S., Schulman A., Langridge P., Platzer M., Fincher G.B., Muehlbauer G.J., Sato K., Close T.J., Wise R.P., Stein N. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. 2012;491(7426):711-716. DOI 10.1038/nature11543.
- Jensen J. Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci. *Theor. Appl. Genet.* 1989;78(5):613-618. DOI 10.1007/BF00262554.
- Kearsey M.J., Farquhar A.G.L. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity*. 1998;80(2):137-142. DOI 10.1038/sj.hdy.6885001.
- Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 1993;4(2):403-410.
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):29-37. DOI 10.18699/vj19.458.
- Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(11):1892-1903. DOI 10.1111/pbi.12924.
- Kumpatla S.P., Buyyarapu R., Abdurakhmonov I.Y., Mammadov J.A. Genomics-assisted plant breeding in the 21st century: technological advances and progress. In: Abdurakhmonov I. (Ed). *Plant Breeding*. 2012;131-183.
- Künzel G., Korzun L., Meister A. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics*. 2000;154(1):397-412.
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* 2015;16(1):1-13. DOI 10.1186/s13059-015-0826-7.
- Leng Y., Wang R., Ali S., Zhao M., Zhong S. Sources and genetics of spot blotch resistance to a new pathotype of *Cochliobolus sativus* in the USDA National small grains collection. *Plant Dis.* 2016; 100(10):1988-1093. DOI 10.1094/PDIS-02-16-0152-RE.
- Lorenz A.J., Hamblin M.T., Jannink J.L. Performance of single nucleotide polymorphisms versus haplotypes for genome-wide association analysis in barley. *PLoS One*. 2010;5(11):e14079. DOI 10.1371/journal.pone.0014079.
- Luo M.C., Thomas C., You F.M., Hsiao J., Ouyang S., Buell C.R., Malandro M., McGuire P.E., Anderson O.D., Dvorak J. High-throughput fingerprinting of bacterial artificial chromosomes using the SNaPshot labeling kit and sizing of restriction fragments by capillary electrophoresis. *Genomics*. 2003;82(3):378-389. DOI 10.1016/S0888-7543(03)00128-9.
- Madishetty K., Condamine P., Svensson J.T., Rodriguez E., Close T.J. An improved method to identify BAC clones using pooled overgos. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(1):1-5. DOI 10.1093/nar/gkl920.
- Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok S.O., Wicker T., Radchuk V., ..., Hansson M., Zhang G., Braumann I., Spannagl M., Li C., Waugh R., Stein N. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*. 2017; 544(7651):427-433. DOI 10.1038/nature22043.
- Mascher M., Muehlbauer G.J., Rokhsar D.S., Chapman J., Schmutz J., Barry K., Muñoz Amatriáin M., Close T.J., Wise R.P., Schulman A.H., Himmelbach A., Mayer K.F.X., Scholz U., Poland J.A., Stein N., Waugh R. Anchoring and ordering NGS contig assemblies by population sequencing (POPSEQ). *Plant J.* 2013;76(4): 718-727. DOI 10.1111/tbj.12319.
- Olson M., Hood L., Cantor C., Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*. 1989;245(4925): 1434-1435. DOI 10.1126/science.2781285.
- Pauli D., Muehlbauer G.J., Smith K.P., Cooper B., Hole D., Obert D.E., Ullrich S.E., Blake T.K. Association mapping of agronomic QTLs in US spring barley breeding germplasm. *Plant Genome*. 2014;7(3): 1-15. DOI 10.3835/plantgenome2013.11.0037.
- Prieto P., Santos A.P., Moore G., Shaw P. Chromosomes associate premeiotically and in xylem vessel cells via their telomeres and centromeres in diploid rice (*Oryza sativa*). *Chromosoma*. 2004;112(6): 300-307. DOI 10.1007/s00412-004-0274-8.
- Rasheed A., Hao Y., Xia X., Khan A., Xu Y., Varshney R.K., He Z. Crop breeding chips and genotyping platforms: progress, challenges, and perspectives. *Mol. Plant*. 2017;10(8):1047-1064. DOI 10.1016/j.molp.2017.06.008.
- Rostoks N., Mudie S., Cardle L., Russell J., Ramsay L., Booth A., Svensson J.T., Wanamaker S.L., Walia H., Rodriguez E.M., Hedley P.E., Liu H., Morris J., Close T.J., Marshall D.F., Waugh R. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*. 2005;274(5):515-527. DOI 10.1007/s00438-005-0046-z.
- Schulte D., Close T.J., Graner A., Langridge P., Matsumoto T., Muehlbauer G., Sato K., Schulman A.H., Waugh R., Wise R.P., Stein N. Update on the international barley sequencing consortium – at the threshold of efficient access to the barley genome. *Plant Physiol.* 2009;149(1):142-147. DOI 10.1104/pp.108.128967.
- Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed.* 2014;33(1):1-14.
- Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(2):205-213. DOI 10.18699/VJ15.026.
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(10):4127-4138. DOI 10.1093/nar/12.10.4127.
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M.S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T.J., Lipshutz R., Chee M., Lander E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 1998;280(5366):1077-1082. DOI 10.1126/science.280.5366.1077.

ORCID ID

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

Благодарности. Статья подготовлена в рамках проекта РФФИ (№ 16-14-00086).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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