

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ20.637

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

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

Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ20.637

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"
The Vavilov Society of Geneticists and Breeders
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial council

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agric.), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States
V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia
T.G. Amstislavskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Netherlands
N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
D. Larkin, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany
I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E. Pestsova, Dr. Sci. (Biology), Germany
L.Yu. Novikova, Cand. Sci. (Engineering), Russia
N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
E. Turuspekov, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

Генетика растений

- 451 **ОБЗОР**
Молекулярно-генетические основы устойчивости семян к окислительному стрессу при хранении. *Н.А. Швачко, Е.К. Хлесткина*
- 459 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Консенсусная микросателлитная карта ржи с интегрированными EST-SSR маркерами пшеницы. *Д.О. Видакович, Д. Перович, Т.В. Семилет, А. Бернер, Е.К. Хлесткина* (на англ. языке)
- 465 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Геномные районы *Solanum tuberosum* L., ассоциированные с глубиной залегания глазков клубней. *И.В. Тоцкий, И.В. Розанова, А.Д. Сафонова, А.С. Батов, Ю.А. Гуреева, А.В. Кочетов, Е.К. Хлесткина*
- 474 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Анализ генетических взаимосвязей генотипов рода *Rosa* L. из коллекции Никитского ботанического сада с использованием ISSR- и IRAP-ДНК-маркеров. *И.И. Супрун, С.А. Плугатарь, И.В. Степанов, Т.С. Науменко*
- 481 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Идентификация видов рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) на основе нуклеотидной изменчивости ядерной рибосомной ДНК. *Т.А. Полякова, Е.В. Банаев, М.А. Томошевич*

Селекция растений

- 489 **ОБЗОР**
Приоритетные направления и перспективы селекции ежевики в условиях средней полосы России. *Л.А. Грюнер, Б.Б. Корнилов*
- 501 **ОБЗОР**
Содержание желтых пигментов в зерне твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): биосинтез, генетический контроль, маркерная селекция. *П.Н. Мальчиков, М.Г. Мясникова*

Молекулярная и клеточная биология

- 512 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изучение влияния детерминант митохондриального импорта в структуре нРНК на активность комплекса нРНК/SpCas9 *in vitro*. *Э.Г. Закирова, Ю.В. Вяткин, Н.А. Верещагина, В.В. Музыка, И.О. Мазунин, К.Е. Орищенко*
- 519 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания. *К.С. Задесенец, Н.Б. Рубцов*

Генетика животных

- 525 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Миграцию клеток зародышевой линии в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* негативно регулируют окружающие соматические клетки. *Н.В. Дорогова, А.С. Хрущева, Ю.А. Галимова, Д.Ю. Ощепков, Д.Е. Маслов, Е.Д. Шведкина, К.А. Ахметова, С.А. Фёдорова*
- 533 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние диеты с повышенным содержанием жира на липидный профиль ооцитов мышей. *Е.Ю. Брусенцев, Э.А. Чуйко, К.А. Окотруб, Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова, Д.С. Рагаева, С.В. Раннева, В.А. Напримеров, С.Я. Амтиславский*

Генетика человека

- 539 **ОБЗОР**
Генетические маркеры о распространении древних морских охотников в Приохотье. *Б.А. Малярчук*

Plant genetics

- 451 **REVIEW**
Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *N.A. Shvachko, E.K. Khlestkina*
- 459 **ORIGINAL ARTICLE**
The consensus rye microsatellite map with EST-SSRs transferred from wheat. *D.O. Vidakovic, D. Perovic, T.V. Semilet, A. Börner, E.K. Khlestkina*
- 465 **ORIGINAL ARTICLE**
Genomic regions of *Solanum tuberosum* L. associated with the tuber eye depth. *I.V. Totsky, I.V. Rozanova, A.D. Safonova, A.S. Batov, Yu.A. Gureeva, A.V. Kochetov, E.K. Khlestkina*
- 474 **ORIGINAL ARTICLE**
Analysis of genetic relationships of genotypes of the genus *Rosa* L. from the collection of Nikita Botanical Gardens using ISSR and IRAP DNA markers. *I.I. Suprun, S.A. Plugatar, I.V. Stepanov, T.S. Naumenko*
- 481 **ORIGINAL ARTICLE**
Identification of species in the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on nucleotide variability of nuclear ribosomal DNA. *T.A. Poliakova, E.V. Banaev, M.A. Tomoshevich*

Plant breeding

- 489 **REVIEW**
Priority trends and prospects of blackberry breeding in conditions of Central Russia. *L.A. Gruner, B.B. Kornilov*
- 501 **REVIEW**
The content of yellow pigments in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grains: biosynthesis, genetic control, marker selection. *P.N. Malchikov, M.G. Myashnikova*

Molecular and cell biology

- 512 **ORIGINAL ARTICLE**
Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex *in vitro*. *E.G. Zakirova, Y.V. Vyatkin, N.A. Verechshagina, V.V. Muzyka, I.O. Mazunin, K.E. Orishchenko*
- 519 **ORIGINAL ARTICLE**
Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes when chromosome identification by routine staining is impossible. *K.S. Zadesenets, N.B. Rubtsov*

Animal genetics

- 525 **ORIGINAL ARTICLE**
Migration of primordial germline cells is negatively regulated by surrounding somatic cells during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *N.V. Dorogova, A.S. Khruscheva, Iu.A. Galimova, D.Yu. Oshchepkov, D.E. Maslov, E.D. Shvedkina, K.A. Akhmetova, S.A. Fedorova*
- 533 **ORIGINAL ARTICLE**
Effects of a high-fat diet on the lipid profile of oocytes in mice. *E.Yu. Brusentsev, E.A. Chuyko, K.A. Okotrub, T.N. Igonina, I.N. Rozhkova, D.S. Ragaeva, S.V. Ranneva, V.A. Naprimerov, S.Ya. Amstislavsky*

Human genetics

- 539 **REVIEW**
Genetic markers on the distribution of ancient marine hunters in Priokhotye. *B.A. Malyarchuk*

Молекулярно-генетические основы устойчивости семян к окислительному стрессу при хранении

Н.А. Швачко , Е.К. Хлесткина

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

 e-mail: n.shvachko@vir.nw.ru

Аннотация. Сохранение генетического разнообразия растений, в том числе хозяйственно значимых культур, является основой продовольственной безопасности. В мире около 90 % генетического разнообразия культурных растений сохраняется в виде семян в генных банках. В процессе хранения в семенах накапливаются свободные радикалы, в первую очередь активные формы кислорода (АФК). Повышение уровня АФК вызывает окислительный стресс, который негативно влияет на качество семян и может привести к полной потере их жизнеспособности. В обзоре обобщены сведения о биохимических процессах, влияющих на продолжительность жизни семян. Проанализированы данные о деструктивном действии свободных радикалов по отношению к макромолекулам клетки растения и пути устранения избыточного количества АФК в растениях, наиболее важным из которых является аскорбат-глутатионовый путь. Рассматривается вопрос взаимосвязи периода покоя и длительности сохранения семян. В исследованиях на семенах разных видов растений была выявлена отрицательная корреляция между периодом покоя и долголетием семян, тогда как в работах с семенами *Arabidopsis* различные авторы выявили как положительную корреляцию между периодом покоя и длительностью сохранения семян, так и отрицательную. Отрицательная корреляция между периодом покоя и жизнеспособностью, вероятно, свидетельствует о способности семян адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Нами проанализирована информация по генам *Arabidopsis*, связанным с жизнеспособностью семян. В настоящее время выделено значительное количество локусов и генов, влияющих на долголетие семян. Статья знакомит с современными исследованиями жизнеспособности семян ячменя. Локусы количественных признаков (QTL), связанные с долголетием семян ячменя, были определены на хромосомах 2Н, 5Н и 7Н. В изученных областях QTL выявлены гены *Zeo1*, *Ale*, *nud*, *nadp-me* и *HvGR*. Однако вопрос о том, какие гены являются маркерами жизнеспособности семян растений определенного вида, остается открытым. Ключевые слова: семена; ячмень; QTL; гены долголетия семян; генетические маркеры; биохимические маркеры.

Для цитирования: Швачко Н.А., Хлесткина Е.К. Молекулярно-генетические основы устойчивости семян к окислительному стрессу при хранении. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):451-458. DOI 10.18699/VJ20.47-0

Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage

N.A. Shvachko , E.K. Khlestkina

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

 e-mail: n.shvachko@vir.nw.ru

Abstract. Conservation of plant genetic diversity, including economically important crops, is the foundation for food safety. About 90 % of the world's crop genetic diversity is stored as seeds in genebanks. During storage seeds suffer physiological stress consequences, one of which is the accumulation of free radicals, primarily reactive oxygen species (ROS). An increase in ROS leads to oxidative stress, which negatively affects the quality of seeds and can lead to a complete loss of their viability. The review summarizes data on biochemical processes that affect seed longevity. The data on the destructive effect of free radicals towards plant cell macromolecules are analyzed, and the ways to eliminate excessive ROS in plants, the most important of which is the glutathione-ascorbate pathway, are discussed. The relationship between seed dormancy and seed longevity is examined. Studying seeds of different plant species revealed a negative correlation between seed dormancy and longevity, while various authors who researched *Arabidopsis* seeds reported both positive and negative correlations between dormancy and seed longevity. A negative correlation between seed dormancy and viability probably means that seeds are able to adapt to changing environmental conditions. This review provides a summary of *Arabidopsis* genes associated with seed viability. By now, a significant number of loci and genes affecting seed longevity have been identified. This review contains a synopsis of modern studies on the viability of barley

seeds. QTLs associated with barley seed longevity were identified on chromosomes 2H, 5H and 7H. In the QTL regions studied, the *Zeo1*, *Ale*, *nud*, *nadp-me*, and *HvGR* genes were identified. However, there is still no definite answer as to which genes would serve as markers of seed viability in a certain plant species.

Key words: seeds; barley; QTL; seed longevity genes; genetic markers; biochemical markers.

For citation: Shvachko N.A., Khlestkina E.K. Molecular genetic bases of seed resistance to oxidative stress during storage. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5): 451-458. DOI 10.18699/VJ20.47-0

Введение

Сохранение генетического разнообразия растений, в том числе хозяйственно значимых культур, является задачей первостепенной важности. С конца прошлого века по всему миру начали создавать генные банки растений. В настоящее время около 90 % образцов сельскохозяйственных культур сохраняется в виде семян в генных банках (Li, Pritchard, 2009; <http://www.fao.org>). Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) поддерживается в живом виде более 320 тыс. образцов генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей, из них более 250 тыс. образцов семян сохраняется в Кубанском генбанке, основанном в 1976 г. (Лоскутов, 2009; Силаева, 2012).

Семена представляют собой стадию жизненного цикла, в которой растения испытывают особенно высокий уровень генотоксического стресса, приводящего к нестабильности генома (Waterworth et al., 2011). Старение семян рассматривают как накопление структурных и метаболических повреждений, вызывающих нарушение функций и снижение устойчивости к неблагоприятным внешним условиям, вплоть до потери жизнеспособности (McDonald, 1999; Смоликова, 2014). По поведению при хранении семена классифицируются на ортодоксальные и рекальцитрантные (Walters, 2015). Ортодоксальные семена в конце периода созревания, как правило, теряют воду и высыхают до влажности около 10 %; в таком состоянии они могут храниться многие годы без потери всхожести. Это свойство ортодоксальных семян получило название «устойчивость к высыханию» (desiccation tolerance) (Dekkers et al., 2015). Потеря же воды рекальцитрантными семенами приводит к снижению их всхожести и гибели, поэтому они считаются чувствительными к высыханию (desiccation sensitive). Перед закладкой на хранение в генбанк рекальцитрантные семена в основном не подвергают высушиванию, ортодоксальные же семена высушивают до уровня влажности 5 % и менее или замораживают. Длительность хранения ортодоксальных семян в генбанках, как правило, увеличивается за счет содержания семян при пониженной влажности и температуре (Bewley et al., 2013). Так, семена ячменя сохраняют всхожесть от полугодия до 7–9 лет при температуре воздуха +20 °C и относительной влажности 50 % (Priestley et al., 1985; Nagel, Börner, 2010), тогда как при отрицательной температуре (–18 °C) и влажности 4–8 % сохранение всхожести семян, согласно прогнозируемому расчету, может составить более 80 лет (Walters et al., 2005).

Помимо экологических факторов – влажности, температуры, света, отсутствия патогенных организмов (Schmidt, 2000), скорость старения семян зависит от генетических факторов, определяющих цвет и массу семени, а также

влияющих на активность протекания процессов неферментативного гликирования белков, перекисного окисления липидов, структуру клеточной мембраны, генерацию активных форм кислорода (АФК) и свободных радикалов и их нейтрализацию и другие процессы (Wettlaufer, Leopold, 1991; Ponquett et al., 1992; Khan et al., 1996; Wojtyla et al., 2016; Frolov et al., 2018; Antonova et al., 2019).

Причины снижения всхожести и гибели семян не до конца понятны, поскольку в этом задействовано множество процессов, включая повреждение макромолекул (таких как ДНК, липиды и белки) в результате реакций, вызванных АФК. Данный вопрос изучали многие исследователи. На примерах различных видов растений показано, что скорость, с которой происходит процесс старения семян, зависит от механизмов защиты от стресса и способности семян противостоять изменениям, вызванным АФК. У разных видов растений антиоксиданты по-разному участвуют в устранении избытков АФК. Так, у масличных более высокую роль играют липофильные антиоксиданты (Bailey, 2004; Bahin et al., 2011; Waterworth et al., 2011; Jeevan Kumar et al., 2015; Kong et al., 2015). Исследования, проведенные с использованием материалов генных банков ИРК (Германия) и USDA (США), показали, что продолжительность жизни семян различается не только у разных видов растений, но и у разных генотипов внутри одного и того же вида; при этом межвидовые отличия по длительности хранения семян были выше, чем внутривидовые. Подобные исследования были выполнены для различных видов растений: ячменя, пшеницы, рапса и др. (Walters et al., 2005; Nagel et al., 2009; Nagel, Börner, 2010; Rehman Arif et al., 2017; Rehman Arif, Börner, 2019). Выявленное авторами указанных работ различие в продолжительности жизни семян между генотипами внутри одного и того же вида может служить основой для генетического анализа долголетия семян.

Период покоя и продолжительность жизни семян

Покой семян – это физиологическое состояние, при котором у семян временно отсутствует способность к прорастанию независимо от внешних условий (Николаева, 1982; Николаева, 1999; Baskin J., Baskin C., 2007). Покой является адаптивным признаком, позволяющим семенам пережить длительные периоды неблагоприятных условий (Bewley et al., 2013; Sliwinska, Bewley, 2014). Чтобы оптимизировать прорастание и поддерживать длительные периоды неблагоприятных условий, семена переходят в состояние покоя (Rajjou, Debeaujon, 2008). Регуляция периода покоя семян осуществляется с участием абсцизовой кислоты (АБК) и других биологически активных веществ, таких как фитогормоны гиббереллины, цитокинины и этилен (Nonogaki,

тельно-восстановительного потенциала клетки в случае ортодоксальных семян (Schafer, Buettner, 2001; Noctor et al., 2011). Поскольку ортодоксальные семена содержат незначительное количество аскорбата (Kranner et al., 2006), была выдвинута гипотеза о том, что глутатион – это основной и, вероятно, наиболее древний окислительно-восстановительный буфер, а изменение его окислительно-восстановительного потенциала в GSSG/GSH служит универсальным маркером жизнеспособности семян (Mittler, 2002; Kranner et al., 2006). Помимо водорастворимых, в семенах растений присутствуют жирорастворимые (гидрофобные) антиоксиданты – α -, β -, γ -, σ -токоферолы и каротиноиды (Шарова, 2016), их вклад в антиоксидантную защиту клетки зависит от вида растений. Так, жирорастворимые антиоксиданты более значимы для масличных культур, семена которых богаты жирными кислотами.

На долготелетие семян влияют и некоторые другие соединения, такие как полифенолы, флавоноиды и пероксидредоксины, имеющие антиоксидантную функцию (Landry et al., 1995; Sattler et al., 2004; Шарова, 2016). Необходимо отметить, что антиоксидантные механизмы клетки контролируют содержание АФК, но не устраняют их полностью. Это связано с тем, что в небольшом количестве АФК являются важными сигнальными молекулами, участвующими в росте растений, развитии и реакции на стресс. В семенах АФК играют важную роль, связанную с жизнеспособностью и преодолением периода покоя. Избыток АФК приводит к потере жизнеспособности семян, однако выработка АФК необходима для выхода семян из периода покоя и способствует их прорастанию (Bailly, 2004; Oracz et al., 2009).

Таким образом, АФК выполняют двоякую роль в физиологии семени. С одной стороны, они обладают чрезвычайно высокой реакционной способностью: способны индуцировать цепные реакции и окислять практически любые органические соединения, приводить к необратимым окислительным повреждениям важнейшие биомолекулы, такие как белки, липиды и ДНК. С другой стороны, АФК участвуют в регулировании роста клеток, обеспечении защиты от патогенов и контроле окислительно-восстановительного статуса клеток. АФК действуют также как положительный сигнал в высвобождении покоя семян и их прорастании (Bahin et al., 2011; Jeevan Kumar et al., 2015).

Гены-кандидаты продолжительности жизни семян, выявленные у *Arabidopsis thaliana* (L.)

Роль важных факторов, влияющих на продолжительность жизни семян, анализировали с использованием мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и трансгенных линий. Известно, что созревание семян генетически контролируется четырьмя основными регуляторами: *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*), *LEC1*, *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 1* и *2*) и *FUS3* (*FUSCA3*) (Raz et al., 2001). Мутации в этих ключевых регуляторах приводят к быстрой потере жизнеспособности семян при хранении. Так, мутанты *abi3*, *lec1* и *fus3* демонстрировали снижение продолжительности жизни семян (Ooms et al., 1993; Clerkx et al., 2004). К значительному сокращению продолжительности жизни семян приводят и мутации семенной оболочки. Семенная оболочка выступает в качестве структурного барьера

для защиты от биотических и абиотических стрессов. Например, мутанты *tt* (*transparent testa*), *tig* (*transparent testa glabra*) и *ats* (*aberrant testa shape*) имели более низкую продолжительность жизни семян по сравнению с контрольными растениями (Debeaujon et al., 2000; Clerkx et al., 2004). Снижение продолжительности жизни семян продемонстрировали мутанты *vte1* и *vte2*, вовлеченные в биосинтез витамина Е (липофильный антиоксидант), а также те, у которых полностью отсутствовали токоферолы (Sattler et al., 2004).

Мутанты арабидопсиса с дефицитом биосинтеза флавоноидов после воздействия обнаружили увеличение уровня перекисного окисления липидов на 60 %, что коррелирует с уменьшением жизнеспособности семян (Landry et al., 1995). Содержание некоторых олигосахаридов, таких как галактинол, коррелирует с продолжительностью жизни семян (Obendorf, 1997). Исследования, проведенные на арабидопсисе, капусте и томатах, выявили положительную корреляцию между содержанием галактинола и продолжительностью жизни семян этих культур (de Souza Vidigal et al., 2016). Низкую жизнеспособность семян по сравнению с растениями дикого типа имели мутанты *Arabidopsis*, лишенные функционального фермента малатдегидрогеназы (Yazdanpanah et al., 2019). Авторы этого исследования предполагают, что деятельность NADP-ME1 требуется для защиты семян от окисления при длительном хранении. Окислительный стресс негативно влияет на качество семян, о чем свидетельствует снижение всхожести мутанта *frol1*, который конституционально накапливает АФК (Lee et al., 2002; Clerkx et al., 2004). В то же время в исследованиях Clerkx с коллегами не выявлено достоверного снижения всхожести семян для двух мутантов, задействованных в антиоксидантных механизмах защиты от АФК: мутанта с дефицитом витамина C1-1 (*vtc1-1*) и мутанта, чувствительного к кадмию (*cad2-1*), у которого проявляется дефицит глутатиона.

В настоящее время выделено значительное количество локусов и генов, связанных с долготелетием семян арабидопсиса. По механизмам действия на жизнеспособность семян гены можно объединить в несколько групп. Наиболее значимыми являются группы генов, механизмы действия которых связаны с фитогормонами, такими как абсцизовая и гибберелловая кислоты, а также с окислительно-восстановительными процессами.

Гены-кандидаты продолжительности жизни семян, выявленные у *Hordeum vulgare* (L.)

Исследования продолжительности жизни семян, проведенные для различных видов растений: арабидопсиса (Clerkx et al., 2004; Bentsink et al., 2006), ячменя (Nagel et al., 2009), пшеницы (Landjeva et al., 2010; Rehman Arif, Börner, 2019), риса (Miura et al., 2002), эгилопса (Landjeva et al., 2010), кукурузы (Revilla et al., 2009), салата (Schwember, Bradford, 2010) и др., показали, что долготелетие семян контролируется несколькими генетическими факторами, что позволяет обнаруживать локусы количественных признаков (QTL). QTL для продолжительности жизни семян были определены в ряде работ на разных видах растений с использованием методов естественного и искусственного старения. Методики искусственного

старения семян предназначены для прогнозирования способности образцов семян к длительному хранению (Сафина, Филипенко, 2013; Смоликова, 2014). Суть их состоит в искусственном ускорении процесса старения путем экспозиции семян в течение непродолжительного времени при повышенной температуре и влажности, близкой к критической для данной культуры. Общепринятыми являются два метода искусственного старения семян: AA (accelerated aging) и CD (controlled deterioration). Согласно тесту AA, семена подвергаются в течение короткого периода времени воздействию высоких температуры и относительной влажности (100 %). Тест CD отличается от AA тем, что семена короткое время хранятся при высокой влажности (MC) (18–20 %) и температуре запечатанными в пакеты из алюминиевой фольги (Nagel et al., 2009, 2015). По стандартам ISTA (International Seed Testing Association), предписывается определенное значение MC для теста CD в соответствии со следующей формулой:

$$m_{H_2O} = \left(\frac{100 - smc_1 (\%)}{100 - smc_t (\%)} \right) \times m_1,$$

где m_{H_2O} – количество добавленной воды, г; smc_1 и smc_t – первоначальная и конечная влажность семян, %; m_1 – первоначальная навеска семян, г.

Необходимо отметить, что при искусственном старении семена находятся в условиях высоких влажности и температуры воздуха. В такой ситуации основными негативными процессами, протекающими в семенах, будут перекисное окисление липидов и потеря мембранами фосфолипидов. В случае же длительного хранения сухих семян будут происходить в основном неферментативные реакции, не требующие присутствия большого количества воды (Walters, 1998; Murthy et al., 2003; Веселовский, Веселова, 2012; Frolov et al., 2018; Antonova et al., 2019). Поэтому вопрос о том, насколько процессы, происходящие в семенах при искусственном старении, будут совпадать с процессами долговременного старения при длительном хранении, остается открытым (Agacka-Mołodoch et al., 2016; Bankin et al., 2018). Тем не менее методы искусственного старения широко применяются различными авторами в работах по изучению жизнеспособности семян.

Развитие новых технологий секвенирования, достижения в области широкого спектра аналитических технологий и появление процедур биоинформатики способствовали повышению качества исследований не только на модельных видах, но и на сельскохозяйственных растениях. Несколько существенных особенностей ячменя *H. vulgare* (L.), такие как диплоидный характер генома сортового ячменя с высокой степенью самоопыления, небольшое количество достаточно крупных хромосом ($2n = 14$), легкость скрещивания и простота выращивания в широком диапазоне климатических условий, способствуют широкому использованию этой культуры в генетических исследованиях. С помощью современных ДНК-технологий на различных образцах ячменя были определены возможные гены-кандидаты, ответственные за увеличение срока жизни семян. Так, Nagel и сотрудники (Nagel et al., 2009) при помощи методов искусственного старения AA и CD идентифицировали QTL, коррелирующие с долголетием семян ячменя, с использованием сле-

дующих популяций растений: OWB, S × M ('Steptoe' × 'Morex') и W766. Исследователи обнаружили, что наибольшее количество QTL, коррелирующих с долголетием семян, расположено на хромосомах 2Н, 5Н и 7Н. Один значимый QTL был найден в дистальной области хромосомы 2Н, связанной с локусом гена *Zeol* (*Zeocriton 1*). Ген *Zeol* определяет высоту растения и компактность колоса. Известно, что такие растения отличаются низкой фертильностью. Ген *Ale* (*Aleurain*), кодирующий тиоловую протеазу, был выявлен в QTL, расположенном в проксимальной области длинного плеча хромосомы 5Н. Экспрессия *Ale* регулируется гибберелловой и абсцизовой кислотами, которые играют важную роль в прорастании семян (Nagel et al., 2009). Ген *nud*, определяющий голозерность/пленчатость зерна, был идентифицирован как ген-кандидат для QTL на хромосоме 7Н. В 2016 г. Nagel с коллегами провели дополнительные исследования по изучению долголетия семян. Большинство QTL, связанных с долголетием семян, как и в работе 2009 г., были обнаружены в двух областях: на хромосоме 2Н на участке, расположенном в диапазоне между 110 и 172 сМ – место локализации гена *Zeol*, а также в центромерной области хромосомы 7Н на участке от 73 до 95 сМ, включающем ген *nud*.

Дальнейшая аннотация функций генов в изученных областях QTL выявила нахождение в этой области фермента глутатионредуктазы, что указывает на связь с окислительным стрессом (Meyer, Hell, 2005; Rouhier et al., 2008; Nagel et al., 2016). Bahin с соавторами в работе по изучению жизнеспособности семян подсолнечника и ячменя установили, что в процессе хранения семян ячменя, в отличие от подсолнечника, не происходит накопления АФК (Bahin et al., 2011). Авторы предполагают, что избыток АФК нейтрализует антиоксидант глутатион (GSH), который мог бы быть маркером для исследований долголетия семян ячменя. Wozny с коллегами в работе 2018 г. предлагает использовать в качестве гена-кандидата для дальнейших исследований долголетия семян ячменя фермент NADP-зависимую малатдегидрогеназу (NADP-ME) (Wozny et al., 2018). Местонахождение данного фермента было определено на хромосоме 2Н ячменя в области QTL, коррелирующих с продолжительностью жизни семян для изученных образцов ячменя.

Таким образом, большинство QTL, связанных с долголетием семян ячменя, были определены на хромосомах 2Н, 5Н и 7Н. В изученных областях QTL обнаружены гены *Zeol*, *Ale*, *nud*, *nadp-me*, *HvGR*. Различные авторы предлагают разные гены-кандидаты для дальнейших исследований долголетия семян ячменя. Однако какого-либо надежного универсального маркера потери жизнеспособности семян ячменя в настоящее время не выявлено. Генетические маркеры, связанные с долголетием семян, которые были бы удобны для определения оптимальной частоты репродуцирования образцов, пока до конца не установлены.

Закключение

Механизмы снижения всхожести семян и их гибели в результате длительного хранения у разных видов растений могут различаться. У ячменя они установлены лишь частично. Имеющиеся на сегодняшний день данные по

выявлению генов, связанных с долголетием семян ячменя, получены с использованием методов искусственного старения семян, которые, как известно, не совсем точно моделируют естественное старение. Генетические маркеры, связанные с долголетием семян, которые были бы удобны для определения оптимальной частоты репродукции образцов, пока до конца не установлены. В качестве гена-кандидата для дальнейших исследований долголетия семян ячменя может быть предложена глутатионредуктаза. Этот фермент напрямую участвует в нейтрализации избытков АФК в растениях, в антиоксидантной защите и клеточном сигналинге.

Список литературы / References

- Веселовский В.А., Веселова Т.В. Перекисное окисление липидов, гидролиз углеводов и реакция Амадори–Майларда на ранних этапах старения сухих семян. *Физиология растений*. 2012; 59(6):763-770.
[Veselovsky V.A., Veselova T.V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori–Maillard reaction at early stages of dry seed aging. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(6):811-817.]
- Лоскутов И.Г. История мировой коллекции генетических ресурсов растений в России. СПб., 2009.
[Loskutov I.G. The History of the World Collection of Plant Genetic Resources in Russia. St. Petersburg, 2009. (in Russian)]
- Медведев С.С. Физиология растений. СПб., 2013.
[Medvedev S.S. Plant Physiology. St. Petersburg, 2013. (in Russian)]
- Николаева М.Г. Покой семян. В: Физиология семян. М., 1982.
[Nikolaeva M.G. Dormancy of seeds. In: The Physiology of Seeds. Moscow, 1982. (in Russian)]
- Сафина Г.Ф., Филипенко Г.И. Долговечность семян при хранении и ее прогнозирование методом ускоренного старения. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2013;174:123-130.
[Safina G.F., Filipenko G.I. Longevity of seeds at storage and its prediction by the accelerated ageing method. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2013;174:123-130. (in Russian)]
- Силаева О.И. Хранение коллекции семян мировых растительных ресурсов в условиях низких положительных температур – оценка, состояние, перспективы. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2012;169:230-239.
[Silaeva O.I. Storage of seeds collection of the world's plant resources in conditions low positive temperatures – assessment, status, prospects. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2012;169:230-239. (in Russian)]
- Смоликова Г.Н. Применение метода ускоренного старения для оценки устойчивости семян к стрессовым воздействиям. *Вестн. СПбГУ. Сер. 3: Биология*. 2014;2:82-93. <https://biocomm.spbu.ru/article/view/1138/992>
[Smolikova G.N. Application of the method of accelerated aging to evaluate the stress tolerance of seeds. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya 3: Biologiya = Bulletin of St. Petersburg State University. Ser. 3: Biology*. 2014;2:82-93. Available at: <https://biocomm.spbu.ru/article/view/1138/992> (in Russian)]
- Шарова Е.И. Антиоксиданты растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2016.
[Sharova E.I. Plant Antioxidants. St. Petersburg, 2016. (in Russian)]
- Agacka-Moldoch M., Rehman A.M.A., Lohwasser U., Doroszewska T., Qualset C.O., Börner A. The inheritance of wheat grain longevity: a comparison between induced and natural ageing. *J. Appl. Genet.* 2016;57(4):477-481. DOI 10.1007/s13353-016-0348-3.
- Antonova K., Vikhnina M., Soboleva A., Mehmood T., Heymich M., Leonova T., Bankin M., Lukasheva E., Gensberger-Reigl S., Medvedev S., Smolikova G., Pischetsrieder M., Frolov A. Analysis of chemically labile glycation adducts in seed proteins: case study of methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1 (MG-H1). *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(15):3659. DOI 10.3390/ijms20153659.
- Bahin E., Bailly C., Sotta B., Kranner I., Corbineau F., Leymaruie J. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 2011;34(6):980-993. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x.
- Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 2004;142:93-107. DOI 10.1079/SSR2004159.
- Bailly C., Kranner I. Analyses of reactive oxygen species and antioxidants in relation to seed longevity and germination. In: Kermod A.R. (Ed.). *Seed Dormancy: Methods and Protocols*. Humana Press, 2011;343-367. DOI 10.1007/978-1-61779-231-1_20.
- Bankin M.P., Bilova T.E., Dubovskaya A.G., Gavrilova V.A., Frolov A.A., Smolikova G.N., Medvedev S.S. Biochemical changes induced in *Brassica napus* L. seeds after longstorage and accelerated aging. In: Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen, 18–21 June 2018. Copenhagen, 2018;161.
- Baskin J.M., Baskin C.C. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 2007;14:1-16. DOI 10.1079/SSR2003150.
- Bentsink L., Jowett J., Hanhart C.J., Koornneef M. Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(45):17042-17047. DOI 10.1073/pnas.0607877103.
- Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W.M., Nonogaki H. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd edn. Springer, New York, 2013. DOI 10.1007/978-1-4614-4693-4.
- Clerx E.J.M., Blankestijn-de Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C., Koornneef M. Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 2004;121(3):448-461. DOI 10.1111/j.0031-9317.2004.00339.x.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000;122(2):403-414. DOI 10.1104/pp.122.2.403.
- Dekkers B.J.W., Costa M.C.D., Maia J., Bentsink L., Ligterink W., Hilhorst H.W.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*. 2015;241:563-577. DOI 10.1007/s00425-014-2240-x.
- de Souza Vidigal D., Willems L., van Arkel J., Dekkers B.J.W., Hilhorst H.W.M., Bentsink L. Galactinol as marker for seed longevity. *Plant Sci.* 2016;246:112-118. DOI 10.1016/j.plantsci.2016.02.015.
- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G. Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 1997;100(2):234-240. DOI 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04779.x.
- Foyer C., Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 2005;28:1056-1071. DOI 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.
- Frolov A., Mamontova T., Ihling C., Lukasheva E., Bankin M., Chantseva V., Vikhnina M., Soboleva A., Shumilina J., Mavropolo-Stolyarenko G., Grishina T., Osmolovskaya N., Zhukov V., Hoehenwarter W., Sinz A., Tikhononovich I., Wessjohann L., Bilova T., Smolikova G., Medvedev S. Mining seed proteome: from protein dynamics to modification profiles. *Bio. Comm.* 2018;63:43-58. DOI 10.21638/spbu03.2018.106.
- Jajic I., Sarna T., Strzalka K. Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*. 2015;4:393-411. DOI 10.3390/plants4030393.
- Jeevan Kumar S.P., Rajendra Prasad S., Banerjee R., Thammineni C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Ann. Bot.* 2015;116(4):663-668. DOI 10.1093/aob/mcv098.
- Khan M.M., Hendry G.A.F., Atherton N.M., Vertucci-Walters C.W. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. *Seed Sci. Res.* 1996; 6(03):101-106. DOI 10.1017/S0960258500003123.

- Kong L., Huo H., Mao P. Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Front. Plant Sci.* 2015;6:158. DOI 10.3389/fpls.2015.00158. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00158/full>
- Kranner I., Birtić S., Anderson K.M., Pritchard H.W. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic. Biol. Med.* 2006;40(12):2155-2165. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.013.
- Landjeva S., Lohwasser U., Börner A. Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. *Euphytica*. 2010;171(1):129-143. DOI 10.1007/s10681-009-0016-3.
- Landry L.G., Chapple C., Last R.L. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* 1995;109(4):1159-1166. DOI 10.1104/pp.109.4.1159.
- Lee B., Lee H., Xiong L., Zhu J.-K. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell*. 2002; 14(6):1235-1251. DOI 10.1105/tpc.010433.
- Li D., Pritchard H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends Plant Sci.* 2009;14(11):614-621. DOI 10.1016/j.tplants.2009.09.005.
- McDonald M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 1999;27:177-237.
- Meyer A.J., Hell R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth. Res.* 2005;86(3):435-457. DOI 10.1007/s11120-005-8425-1.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7(9):405-410. DOI 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
- Miura K., Lin S., Yano M., Nagamine T. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2002;104(6):981-986. DOI 10.1007/s00122-002-0872-x.
- Murthy U.M.N., Kumar P.P., Sun W.Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J. Exp. Bot.* 2003;54(384):1057-1067. DOI 10.1093/jxb/erg092.
- Nagel M., Alqudah A.M., Bailly M., Rajjou L., Pistrick S., Matzig G., Börner A., Kranner I. Novel loci and a role for nitric oxide for seed dormancy and preharvest sprouting in barley. *Plant Cell Environ.* 2019;42(4):1318-1327. DOI 10.1111/pce.13483.
- Nagel M., Börner A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci. Res.* 2010;20:1-12. DOI 10.1017/S0960258509990213.
- Nagel M., Kodde J., Pistrick S., Mascher M., Börner A., Groot S.P.C. Barley seed aging: genetics behind the dry elevated pressure of oxygen aging and moist controlled deterioration. *Front. Plant Sci.* 2016; 7:1-11. DOI 10.3389/fpls.2016.00388.
- Nagel M., Kranner I., Neumann K., Rolletschek H., Seal C.E., Colville L., Fernandez-Marin B., Börner A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant Cell Environ.* 2015;38(6):1011-1022. DOI 10.1111/pce.12474.
- Nagel M., Vogel H., Landjeva S., Buck-Sorlin G., Lohwasser U., Scholz U., Börner A. Seed conservation in *ex situ* genebanks – genetic studies on longevity in barley. *Euphytica*. 2009;170(1-2):5-14. DOI 10.1007/s10681-009-9975-7.
- Nguyen T.P., Keizer P., van Eeuwijk F., Smeekens S., Bentsink L. Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2012;160(4):2083-2092. DOI 10.1104/pp.112.206649.
- Nikolaeva M.G. Patterns of seed dormancy and germination as related to plant phylogeny and ecological and geographical conditions of their habitats. *Russ. J. Plant Physiol.* 1999;46:369-373.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C.H. Glutathione. *The Arabidopsis Book*. 2011;9(1):1-32. DOI 10.1199/tab.0142.
- Nonogaki H. Seed biology updates – highlights and new discoveries in seed dormancy and germination research. *Front. Plant Sci.* 2017;8: 1-16. DOI 10.3389/fpls.2017.00524.
- Obendorf R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 1997;7(2):63-74. DOI 10.1017/S096025850000341X.
- Ooms J., Leon-Kloosterziel K.M., Bartels D., Koornneef M., Karsen C.M. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant Physiol.* 1993;102(4):1185-1191. DOI 10.1104/pp.102.4.1185.
- Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Kranner I., Bogatek R., Corbineau F., Bailly C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol.* 2009;150(1):494-505. DOI 10.1104/pp.109.138107.
- Ponquett R.T., Smith M.T., Ross G. Lipid autooxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability. *Seed Sci. Res.* 1992;2(1):51-54. DOI 10.1017/S0960258500001100.
- Priestley D.A., Cullinan V.I., Wolee J. Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell Environ.* 1985;8(8):557-562. DOI 10.1111/j.1365-3040.1985.tb01693.x.
- Rajjou L., Debeaujon I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies.* 2008;331:796-805. DOI 10.1016/j.crv.2008.07.021.
- Raz V., Bergervoet J.H., Koornneef M. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*. 2001;128(2): 243-252.
- Rehman Arif M.A., Börner A. Mapping of QTL associated with seed longevity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *J. Appl. Genet.* 2019;60(1):33-36. DOI 10.1007/s13353-018-0477-y.
- Rehman Arif M.A., Nagel M., Lohwasser U., Börner A. Genetic architecture of seed longevity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Biosci.* 2017;42(1):81-89. DOI 10.1007/s12038-016-9661-6.
- Revilla P., Butron A., Rodriguez V.M., Malvar R.A., Ordas A. Identification of genes related to germination in aged maize seed by screening natural variability. *J. Exp. Bot.* 2009;60(14):4151-4157. DOI 10.1093/jxb/erp249.
- Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008;59(1):143-166. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811.
- Sattler S.E., Gilliland L.U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*. 2004;16(6): 1419-1432. DOI 10.1105/tpc.021360.
- Scandalios J.G., Lingqiang G., Polidoros A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. 1997;343-406. DOI 10.1101/087969502.34.343.
- Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30(11):1191-1212. DOI 10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- Schmidt L.H. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre, 2000.
- Schwember A.R., Bradford K.J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. *J. Exp. Bot.* 2010;61(15):4423-4436. DOI 10.1093/jxb/erq248.
- Sliwinska E., Bewley J.D. Overview of seed development, anatomy and morphology. In: Gallagher R.S. (Ed.). *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. 3rd edn. CAB International, 2014;1-17. DOI 10.1079/9781780641836.000.
- Walters C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 1998;8(2):223-244. DOI 10.1017/S096025850000413X.

- Walters C. Orthodoxy, recalcitrance and inbetween: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*. 2015;242:397-406. DOI 10.1007/s00425-015-2312-6.
- Walters C., Hill L.M., Wheeler L.J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integr. Comp. Biol.* 2005;45(5):751-758. DOI 10.1093/icb/45.5.751.
- Waterworth W.M., Drury G.E., Bray C.M., West C.E. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytol.* 2011;192(4):805-822. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x.
- Wettlaufer S.H., Leopold A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol.* 1991;97(1):165-169. DOI 10.1104/pp.97.1.165.
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., van Camp W. Catalases in plants. *Mol. Breeding*. 1995;1(3):207-228. DOI 10.1007/BF02277422.
- Wojtyła K., Lechowska K., Kubala S., Garnczarska M. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1-16. DOI 10.3389/fpls.2016.00066.
- Wozny D., Kramer K., Finkemeier I., Acosta I.F., Koornneef M. Genes for seed longevity in barley identified by genomic analysis on near isogenic lines. *Plant Cell Environ.* 2018;41(8):1895-1911. DOI 10.1111/pce.13330.
- Yazdanpanah F., Maurino V.G., Mettler-Altmann T., Buijs G., Bailly M., Karimi Jashni M., Willems L., Sergeeva L.I., Rajjou L., Hilhorst H.W.M., Bentsink L. NADP-MALIC ENZYME 1 affects germination after seed storage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(2):318-328. DOI 10.1093/pcp/pcy213.

ORCID ID

N.A. Shvachko orcid.org/0000-0002-1958-5008
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания № 0481-2019-0001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.10.2019. После доработки 08.01.2020. Принята к публикации 17.01.2020. Опубликована онлайн 29.06.2020.

The consensus rye microsatellite map with EST-SSRs transferred from wheat

D.O. Vidakovic^{1,2}, D. Perovic¹, T.V. Semilet³, A. Börner⁴, E.K. Khlestkina^{3,5,6} 

¹ Julius Kühn-Institute (JKI), Quedlinburg, Germany

² University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Novi Sad, Serbia

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

⁴ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

⁵ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁶ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Abstract. Microsatellite (SSR) markers with known precise intrachromosomal locations are widely used for mapping genes in rye and for the investigation of wheat-rye translocation lines and triticale highly demanded for mapping economically important genes and QTL-analysis. One of the sources of novel SSR markers in rye are microsatellites transferable from the wheat genome. Broadening the list of available SSRs in rye mapped to chromosomes is still needed, since some rye chromosome maps still have just a few microsatellite loci mapped. The goal of the current study was to integrate wheat EST-SSRs into the existing rye genetic maps and to construct a consensus rye microsatellite map. Four rye mapping populations (P87/P105, N6/N2, N7/N2 and N7/N6) were tested with CFE (EST-SSRs) primers. A total of 23 *Xcfe* loci were mapped on rye chromosomes: *Xcfe023*, -136 and -266 on chromosome 1R, *Xcfe006*, -067, -175 and -187 on 2R, *Xcfe029* and -282 on 3R, *Xcfe004*, -100, -152, -224 and -260 on 4R, *Xcfe037*, -208 and -270 on 5R, *Xcfe124*, -159 and -277 on 6R, *Xcfe010*, -143 and -228 on 7R. With the exception of *Xcfe159* and *Xcfe224*, all the *Xcfe* loci mapped were found in orthologous positions considering multiple evolutionary translocations in the rye genome relative to those of common wheat. The consensus map was constructed using mapping data from the four bi-parental populations. It contains a total of 123 microsatellites, 12 SNPs, 118 RFLPs and 2 isozyme loci.

Key words: *Secale cereale*; SSR; *Triticum aestivum*; microsatellite markers; genetic mapping.

For citation: Vidakovic D.O., Perovic D., Semilet T.V., Börner A., Khlestkina E.K. The consensus rye microsatellite map with EST-SSRs transferred from wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):459-464. DOI 10.18699/VJ20.48-0

Консенсусная микросателлитная карта ржи с интегрированными EST-SSR маркерами пшеницы

Д.О. Видакович^{1,2}, Д. Перович¹, Т.В. Семилет³, А. Бернер⁴, Е.К. Хлесткина^{3,5,6} 

¹ Институт Юлиуса Кюна, Кведлинбург, Германия


² Нови-Садский университет, факультет биологии и экологии, Нови-Сад, Сербия

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

⁴ Институт генетики растений и растениеводства им. Лейбница, Гатерслебен, Германия

⁵ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁶ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Аннотация. Микросателлитные (SSR) маркеры широко используют для картирования генов ржи и анализа транслокационных линий пшеницы и тритикале. SSR-маркеры с известной внутривхромосомной локализацией очень востребованы для картирования экономически значимых генов и QTL-анализа. Одним из источников новых SSR-маркеров у ржи являются микросателлитные маркеры пшеницы. Несмотря на несколько наборов микросателлитных маркеров, доступных у ржи, по-прежнему необходимо расширение списка SSR, сопоставленных с хромосомами ржи, поскольку на некоторых генетических картах количество SSR-маркеров невелико. Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы интегрировать EST-SSR пшеницы в существующие генетические карты ржи и построить консенсусную микросателлитную карту ржи. Четыре картирующих популяции ржи (P87/P105, N6/N2, N7/N2 и N7/N6) тестировали с использованием праймеров CFE (EST-SSR). В результате в молекулярно-генетические карты ржи было интегрировано 23 микросателлитных локуса *Xcfe*: *Xcfe023*, -136 и -266 на хромосоме 1R, *Xcfe006*, -067, -175 и -187 на 2R, *Xcfe029* и -282 на 3R, *Xcfe004*, -100, -152, -224 и -260 на 4R, *Xcfe037*, -208 и -270 на 5R, *Xcfe124*, -159 и -277 на 6R, *Xcfe010*, -143 и -228 на 7R. За исключением *Xcfe159* и *Xcfe224*, все картированные локусы *Xcfe* были обнару-

жены в ортологичных позициях с учетом множественных транслокаций в ходе эволюции генома ржи по сравнению с пшеницей. Консенсусная карта построена с использованием данных по четырем картирующим популяциям ржи. Она содержит в общей сложности 123 микросателлитных маркера, 12 SNP, 118 RFLP и 2 изоферментных локуса.

Ключевые слова: *Secale cereale*; SSR; *Triticum aestivum*; микросателлитные маркеры; генетические карты.

Introduction

Several linkage maps of rye carrying RFLP, AFLP, SSR, DARt and SNP markers are available to date (Devos et al., 1993; Philipp et al., 1994; Senft, Wricke, 1996; Korzun et al., 2001; Bednarek et al., 2003; Hackauf, Wehling, 2003; Khlestkina et al., 2004; Varshney et al., 2007; Bolibok-Brażowska et al., 2009; Gustafson et al., 2009; Milczarski et al., 2011, 2016; Xu et al., 2012; Bauer et al., 2017).

SSRs (microsatellites) are among the most widely used DNA-markers in rye genetics. For example, SSR markers were used for mapping the *sy1*, *sy9*, *sy18* and *sy19* asynaptic genes (Malyshev et al., 2009; Dolmatovich et al., 2013a, b), the gene *mol* for supernumerary spikelets (Dobrovolskaya et al., 2009), several anthocyanin biosynthesis genes (Khlestkina et al., 2009, 2011, 2013), *Ddw1* (Tenhola-Roininen, Tanhuanpää, 2010) and *Ddw3* (Yang et al., 2018) dwarfing genes, the powdery mildew resistance locus (Wang et al., 2010), the *Elm-R1* gene related with embryo lethality in wheat-rye hybrids as well as the hybrid dwarfness gene *Hdw-R1* (Tikhenko et al., 2011; Tsvetkova et al., 2018), aluminum tolerance loci in rye and triticale (Fontecha et al., 2007; Benito et al., 2010; Niedziela et al., 2014) and several QTL for agronomic traits including grain yield (Hackauf et al., 2017).

SSRs can be suitable for marker-assisted breeding (Lapitan et al., 2007), detection of the genetic variability in rye and triticale (Bolibok et al., 2005; Vyhnanek et al., 2009) as well as for marker-assisted identification of rye genetic material in wheat cultivars and lines (Silkova et al., 2006; Schlegel, Korzun, 2008; Schneider, Molnár-Láng, 2009; Adonina et al., 2011; Silkova et al., 2011; Schlegel, 2015).

In spite of several sets of microsatellite markers available in rye, broadening a list of SSRs mapped to rye chromosomes is still needed, since some rye chromosome maps still have just a few microsatellite loci mapped (Khlestkina et al., 2004). The goal of the current study was to integrate wheat EST-SSRs, expressed sequence tag SSR (from map of L.Y. Zhang et al. (2005)) into the existing rye microsatellite map and construct the consensus microsatellite map of rye genome.

Materials and methods

Four rye F₂ mapping populations (P87/P105; N6/N2, N7/N2 and N7/N6; see details in (Khlestkina et al., 2004)) were used in PCR assays with CFE primers available at GrainGenes database (<http://wheat.pw.usda.gov>). DNA was available from previous studies (Korzun et al., 2001; Khlestkina et al., 2004). PCR and analysis of the amplified fragments length was performed as described in L.Y. Zhang et al. (2005). Chromosome arm location of homologous sequences carrying the CFEs (<http://wheat.pw.usda.gov>) was performed using BLAST analysis (Altschul et al., 1990) of the corresponding wheat ESTs given at <http://wheat.pw.usda.gov> against wheat chromosome survey sequences available at <https://urgi.versailles.inra.fr/blast/blast.php>. Linkage maps were constructed with

MAPMAKER 2.0 (Lander et al., 1987) using Kosambi function (Kosambi, 1944), based on genotyping data obtained in the current study and previously (Korzun et al., 2001; Khlestkina et al., 2004; Varshney et al., 2007). The consensus map was constructed using JoinMap 2.0 program (Stam, 1993).

Results and discussion

Despite the possibility of a high-throughput marker analysis using SNPs (Bauer et al., 2017), microsatellites remain convenient and low-cost markers for mapping genes and marker assisted selection in rye and triticale. For these purposes microsatellite markers with known precise intrachromosomal location are needed. The sources for mapping novel SSR loci in rye were rye EST-SSRs (Hackauf, Wehling, 2003; Khlestkina et al., 2004), or wheat genomic microsatellites (Khlestkina et al., 2004). In the current study, we used wheat EST-SSRs for genotyping rye mapping populations.

The parents of the four rye mapping populations (P87/P105, N6/N2, N7/N2 and N7/N6) were tested with 301 CFE primer pairs. Thirty-two pairs revealed polymorphism between the parents of one or more mapping populations: 10 between P87 and P105, 13 between N6 and N2, 11 between N7 and N2 and 15 between N7 and N6. The portion of polymorphic CFE markers (10.6 %) is comparable with that described for genomic wheat SSRs GWM transferred to the same set of mapping populations parents (9.2 %) (Khlestkina et al., 2004).

Twenty-three of the 32 markers were segregating in the mapping populations, while nine pairs produced monomorphic PCR-products, that can be explained by rye heterogeneity. Twenty-three *Xcfe* loci were genetically mapped on rye chromosomes (see the Table and Supplementary Materials)¹.

A consensus map was constructed using mapping data for the four populations. The consensus map contains 11 microsatellite (*Xcfe*..., *Xrems*... or *Xgwm*...) markers on chromosome 1R, 23 on 2R, 10 on 3R, 15 on 4R, 29 on 5R, 17 on 6R, 18 on 7R (see the Figure). In addition to these 123 SSR markers the consensus map contains 12 SNPs (*Xgbs*...), 118 RFLP markers (other *X*... names), and two isozyme loci. The former rye consensus map constructed in 2009 contained 10 microsatellite markers only (Gustafson et al., 2009).

Most of the microsatellites mapped in the current study consist of 3 bp repeats (15 loci), 5 of the mapped SSRs were dinucleotide, 2 sequences carried tetra- and 1 hexanucleotide repeat (see the Table).

Twenty-one of the 23 *Xcfe* loci mapped in orthologous positions (see the Table) considering multiple evolutionary translocations in the rye genome relative to those of common wheat, as described in detail by K.M. Devos et al. (1993). Two loci *Xcfe159-6R* and *Xcfe224-4R* have no orthology with wheat *Xcfe159* (5A, 5D) and *Xcfe224* (5B). The portion of the *Xcfe* loci showing orthology between wheat and

¹ Supplementary Materials are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/app5.pdf>

Characterization of CFE markers mapped in the current study

CFE No.	Motif	bp in wheat	bp in rye*	Chromosome location		Orthologous between wheat and rye
				in wheat**	in rye*	
004	(GAG) ₆	217	124, 130	3B, 4BS, 4DS	4RS	Yes
006	(CGT) ₇	239	304, 307	2AL, 2BL, 2DL	2RL	Yes
010	(AGG) ₈	324	311, 314	7AS, 7BS, 7DS	7RS	Yes
023	(CGA) ₅	231	198, 207, 213	1AS, 1BS, 1DS	1RS	Yes
029	(GA) ₇	201	194, 196	3AL, 3B, 3DL	3RL	Yes
037	(TACG) ₃	150	159, 171	5AL, 5BL, 5DL	5RL	Yes
67	(AG) ₁₁	175	180, 182, 194	2AS, 2BS, 2D	2RS	Yes
100	(TG) ₆	243	237, 241, 255	7AS, 7BS, 7DS	4R(cent)	Yes
124	(GAACCC) ₃	263	250, 272	6AL, 6BL, 6DL	6RL	Yes
136	(AG) ₇	160	194, 200	1AL, 1BL, 1DL	1RL	Yes
143	(CAGG) ₄	150	168, 172	5BL, 5DL	7RS	Yes
152	(CGA) ₅	150	226, 232, 235, 238	6AS, 6BS, 6DS, 7AS	4RL	Yes
159	(CAG) ₆	163	164, 167, 170, 173, 176	5BL, 5DL	6R(cent)	No
175	(GGC) ₆	216	216, 219, 222	2AL, 2BL, 2DL	2RL	Yes
183	(AG) ₁₄	215	210, 212	2AL, 2BL, 2DL	2RL	Yes
208	(AGG) ₄	249	268, 274	5A, 5BS, 5DS	5RS	Yes
224	(GCC) ₇₊₄	275	212, 215	5BL	4R(cent)	No
228	(CTG) ₁₃	207	324, 333, 348	4AL, 5BL	7RS	Yes
260	(CCT) ₇	149	136, 139	4AL, 4BS, 4DS	4RS	Yes
266	(ACC) ₄	251	239, 244, 247	1AL, 1BL, 1DL	1RL	Yes
270	(GTG) ₇	126	129, 132	4DL, 5DL, 4BL, 5AL	5RL	Yes
277	(ACA) ₄	202	197, 203	6D	6RL	Yes
282	(GAC) ₇	149	129, 138	3AS, 3B, 3DS, 4DL	3RS	Yes

* Data obtained in the current study (different length of the PCR products correspond to different parents of the rye mapping populations used; each microsatellite studied was monolocus and homozygous in all parents of the mapping populations, amplifying one fragment in each parental genotype).

** Chromosome location of homologous sequences carrying the CFEs (<http://wheat.pw.usda.gov>) was performed using BLAST analysis of the corresponding wheat ESTs given at <http://wheat.pw.usda.gov> against wheat chromosome survey sequences available at <https://urgi.versailles.inra.fr/blast/blast.php>. Further information is given according to <http://wheat.pw.usda.gov>.

rye (91 %) is higher than that found previously for genomic SSR loci *Xgwm* (73 %) (Khlestkina et al., 2004). This may reflect conservatism of the coding portion of plant genome, in particular that of the regions complementary to the primers, flanking microsatellites.

Usually the markers mapped to 7RS are found in a comprehensive region of the chromosome 7R corresponding to ancient translocation, while just a few markers are available for the small proximal region not involved in this translocation (Devos et al., 1993; Korzun et al., 2001; Khlestkina et al., 2004). The *Xcfe010-7R* locus mapped in the current study is located in this region (see the Figure) and can be used for tagging the part of chromosome 7RS, which is orthologous to the short arm of chromosome 7 of Triticeae (Devos et al., 1993).

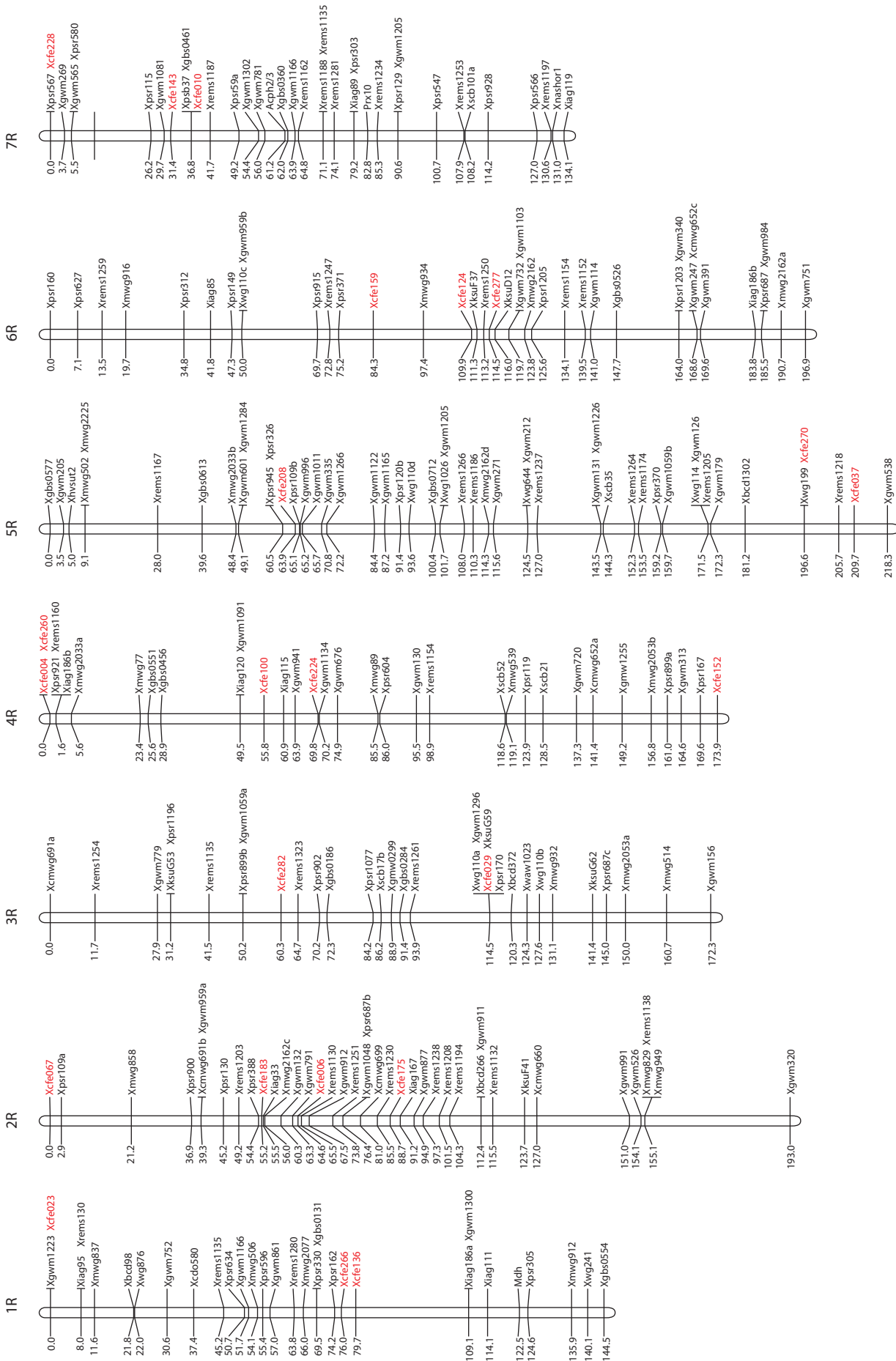
The *Xcfe* loci mapped can be recommended for various applications in rye genetics and breeding. Some of them locate in the regions carrying known rye genes and therefore have a

potential for marker-assisted selection. For example, comparison of the consensus map (see the Figure) with data available from previous gene mapping studies suggests *Xcfe270-5R* to be close to the dwarfing gene *Ddw1* (mapped by (Tenhola-Roininen, Tanhuanpää, 2010)), while the *Xcfe006-2R* locus (see the Figure) is mapped in the region highly comparable with location of the asynaptic genes *sy9* and *sy18* on chromosome 2R (Malyshev et al., 2009; Dolmatovich et al., 2013a).

Overall, the consensus map of rye contains 123 microsatellites. The list of mapped SSRs can be broadened in the future based on 856 SSRs recently found in rye genome shotgun survey sequences (Li et al., 2018).

Conclusion

The consensus map constructed in the current study contains a total of 123 microsatellites (including 23 SSRs transferred in our study from wheat to rye map), 12 SNPs, 118 RFLPs



Rye consensus microsatellite map constructed in the current study based on the map data from our study (for wheat EST-SSRs) and previous studies (for SNPs, Varshney et al., 2007; rye SSRs and wheat gSSRs, Khlestkina et al., 2004; RFLPs, Korzun et al., 2001) using JoinMap 2.0 program (Stam, 1993).

and 2 isozyme loci. Co-linearity between rye and wheat chromosome regions carrying these microsatellite loci was shown using 21 from 23 SSRs. These markers can be useful for both comparative mapping between wheat, rye and triticale as well as for marker-assisted breeding.

References

- Adonina I.G., Orlovskaya O.A., Tereshchenko O.Y., Koren L.V., Khotyleva L.V., Shumny V.K., Salina E.A. Development of commercially valuable traits in hexaploid triticale lines with Aegilops introgressions as dependent on the genome composition. *Russ. J. Genet.* 2011;47:453-461. DOI 10.1134/S1022795411040028.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215:403-410. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Bauer E., Schmutzer T., Barilar I., Mascher M., Gundlach H., Martis M.M., Twardziok S.O., Hackauf B., Gordillo A., Wilde P., Schmidt M., Korzun V., Mayer K.F.X., Schmid K., Schön C.-C., Scholz U. Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *Plant J.* 2017;89:853-869. DOI 10.1111/tpj.13436.
- Bednarek P.T., Masojc P., Lewandowska R., Myskow B. Saturating rye genetic map with amplified fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Appl. Genet.* 2003;44:21-33.
- Benito C., Silva-Navas J., Fontecha G., Hernández-Riquer M.V., Eguren M., Salvador N., Gallego F.J. From the rye *Alt3* and *Alt4* aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals. *Plant Soil.* 2010;327:107-120. DOI 10.1007/s11104-009-0035-9.
- Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M., Hromada A., Pietrzykowski R. Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. *Euphytica.* 2005;146:109-116. DOI 10.1007/s10681-005-0548-0.
- Bolibok-Bragoszewska H., Heller-Uszyńska K., Wenzl P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. DARt markers for the rye genome-genetic diversity and mapping. *BMC Genomics.* 2009;10:578. DOI 10.1186/1471-2164-10-578.
- Devos K.M., Atkinson M.D., Chinoy C.N., Francis H.A., Harcourt R.L., Koebner R.M.D., Liu C.J., Masojc P., Xie D.X., Gale M.D. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1993;85:673-680. DOI 10.1007/BF00225004.
- Dobrovolskaya O., Martinek P., Voylovokov A.V., Korzun V., Röder M.S., Börner A. Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:867-874. DOI 10.1007/s00122-009-1095-1.
- Dolmatovich T.V., Malyshev S.V., Sosnikhina S.P., Tsvetkova N.V., Kartel N.A., Voylovokov A.V. Mapping of meiotic genes in rye (*Secale cereale* L.): Localization of *sy18* mutation with impaired homologous synapsis using microsatellite markers. *Russ. J. Genet.* 2013a;49:411-416. DOI 10.1134/S1022795413040030.
- Dolmatovich T.V., Malyshev S.V., Sosnikhina S.P., Tsvetkova N.V., Kartel N.A., Voylovokov A.V. Mapping of meiotic genes in rye (*Secale cereale* L.): Localization of *sy19* mutation with impaired homologous synapsis using microsatellite markers. *Russ. J. Genet.* 2013b;49:511-516. DOI 10.1134/S1022795413030058.
- Fontecha G., Silva-Navas J., Benito C., Mestres M.A., Espino F.J., Hernández-Riquer M.V., Gallego F.J. Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:249-260. DOI 10.1007/s00122-006-0427-7.
- Gustafson J.P., Ma X.F., Korzun V., Snape J.W. A consensus map of rye integrating mapping data from five mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:793-800. DOI 10.1007/s00122-008-0939-4.
- Hackauf B., Haffke S., Fromme F.J., Roux S.R., Kusterer B., Musmann D., Kilian A., Miedaner T. QTL mapping and comparative genome analysis of agronomic traits including grain yield in winter rye. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130:1801-1817. DOI 10.1007/s00122-017-2926-0.
- Hackauf B., Wehling P. Development of microsatellite markers in rye: map construction. *Plant Breed. Seed Sci.* 2003;48:143-151.
- Khlestkina E.K., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A. Diversification of the duplicated *F3h* genes in Triticeae. *J. Mol. Evol.* 2013;76:261-266. DOI 10.1007/s00239-013-9554-3.
- Khlestkina E.K., Myint Than M.H., Pestsova E.G., Röder M.S., Malyshev S.V., Korzun V., Börner A. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in Rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequencing tags. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:725-732. DOI 10.1007/s00122-004-1659-z.
- Khlestkina E.K., Salina E.A., Matthies I., Leonova I.N., Börner A., Röder M.S. Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley. *Euphytica.* 2011;179:333-341. DOI 10.1007/s10681-010-0337-2.
- Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Yu., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids. *Mol. Genet. Genom.* 2009;282:475-485. DOI 10.1007/s00438-009-0479-x.
- Korzun V., Malyshev S., Voylovokov A.V., Börner A. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci. *Theor. Appl. Genet.* 2001;102:709-717. DOI 10.1007/s001220051701.
- Kosambi D.D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 1944;12(1):172-175. DOI 10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg I. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics.* 1987;1:174-181.
- Lapitan N.L.V., Peng J., Sharma V. A high-density map and PCR markers for Russian wheat aphid resistance gene on chromosome 1RS/1BL. *Crop Sci.* 2007;47:811-818. DOI 10.2135/cropsci2006.08.0529.
- Li J., Zhou R., Endo T.R., Stein N. High-throughput development of SSR marker candidates and their chromosomal assignment in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breed.* 2018;137:561-572. DOI 10.1111/pbr.12619.
- Malyshev S.V., Dolmatovich T.V., Voylovokov A.V., Sosnikhina S.P., Tsvetkova N.V., Lovtus A.V., Kartel N.A. Molecular genetic mapping of the *sy1* and *sy9* asynaptic genes in rye (*Secale cereale* L.) using microsatellite and isozyme markers. *Russ. J. Genet.* 2009;45:1444-1449. DOI 10.1134/S1022795409120060.
- Milczarski P., Bolibok-Bragoszewska H., Myśków B., Stojalowski S., Heller-Uszyńska K., Góralska M., Bragoszewski P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. A high density consensus map of rye (*Secale cereale* L.) based on DARt markers. *PLoS One.* 2011;6:e28495. DOI 10.1371/journal.pone.0028495.
- Milczarski P., Hanek M., Tyrka M., Stojalowski S. The application of GBS markers for extending the dense genetic map of rye (*Secale cereale* L.) and the localization of the *Rfc1* gene restoring male fertility in plants with the C source of sterility-inducing cytoplasm. *J. Appl. Genet.* 2016;57:439-451. DOI 10.1007/s13353-016-0347-4.
- Niedziela A., Bednarek P.T., Labudda M., Mańkowski D.R., Anioł A. Genetic mapping of a 7R AI tolerance QTL in triticale (\times *Triticosecale* Wittmack). *J. Appl. Genet.* 2014;55:1-14. DOI 10.1007/s13353-013-0170-0.
- Philipp U., Wehling P., Wricke G. A linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* 1994;88:243-248. DOI 10.1007/BF00225904.
- Schlegel R. Hybrid breeding boosted molecular genetics in rye. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016;6(5):569-583. DOI 10.1134/S2079059716050105.
- Schlegel R., Korzun V. Notes on the origin of 4BL-5RL rye translocations in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Res. Commun.* 2008;36:373-385. DOI 10.1556/CRC.36.2008.3.2.
- Schneider A., Molnár-Láng M. Detection of the 1RS chromosome arm in Martonvásár wheat genotypes containing 1BL.1RS or 1AL.1RS translocations using SSR and STS markers. *Acta Agron. Hung.* 2009;57:409-416. DOI 10.1556/AAgr.57.2009.4.3.
- Senft P., Wricke G. An extended genetic map of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breed.* 1996;115:508-510. DOI 10.1111/j.1439-0523.tb00966.x.

- Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Silkova O.G., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Röder M.S., Salina E.A., Shchapova A.I., Shummy V.K. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet.* 2006;42:645-653. DOI 10.1134/S1022795406060093.
- Silkova O.G., Leonova I.N., Krasilova N.M., Dubovets N.I. Preferential elimination of chromosome 5R of rye in the progeny of 5R5D dimonosomics. *Russ. J. Genet.* 2011;47:942-950. DOI 10.1134/S1022795411080151.
- Stam P. Construction of integrated linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *Plant J.* 1993;5:739-744. DOI 10.1046/j.1365-3113x.1993.03050739.
- Tenhola-Roininen T., Tanhuanpää P. Tagging the dwarfing gene *Ddw1* in a rye population derived from doubled haploid parents. *Euphytica*. 2010;172:303-312. DOI 10.1007/s10681-009-9982-8.
- Tikhenko N., Tsvetkova N., Priyatkina S., Voylovkov A., Börner A. Gene mutations in rye causing embryo lethality in hybrids with wheat: allelism and chromosomal localization. *Biol. Plant.* 2011;55(3): 448-452. DOI 10.1007/s10535-011-0109-4.
- Tsvetkova N.V., Tikhenko N.D., Hackauf B., Voylovkov A.V. Two rye genes responsible for abnormal development of wheat-rye hybrids are linked in the vicinity of an evolutionary translocation on chromosome 6R. *Plants*. 2018;7:55. DOI 10.3390/plants7030055.
- Varshney R.K., Beier U., Khlestkina E.K., Kota R., Korzun V., Graner A., Börner A. Single nucleotide polymorphisms in rye (*Secale cereale* L.): discovery, frequency, and applications for genome mapping and diversity studies. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1105-1116. DOI 10.1007/s00122-007-0504-6.
- Vyhnánek T., Nevrtalová E., Slezáková K. Detection of the genetic variability of triticale using wheat and Rye SSR markers. *Cereal Res. Commun.* 2009;37:23-29. DOI 10.1556/CRC.37.2009.1.3.
- Wang D., Zhuang L., Sun L., Feng Y., Pei Z., Qi Z. Allocation of a powdery mildew resistance locus to the chromosome arm 6RL of *Secale cereale* L. cv. 'Jingzhouheimai'. *Euphytica*. 2010;176:157-166. DOI 10.1007/s10681-010-0199-7.
- Xu H., Yin D., Li L., Wang Q., Li X., Yang X., Liu W., An D. Development and application of EST-based markers specific for chromosome arms of rye (*Secale cereale* L.). *Cytogenet. Genome Res.* 2012; 136:220-228. DOI 10.1159/000336478.
- Yang S., Zhu H., Yu J., Zhong Y.Y., Zhao L.-B., Jiang Y.-F., Hao M., Zhang L., Ning S., Chen X.J., Liu D., Yuan Z. Using a wheat-rye amphihaploid population to map a rye gene responsible for dwarfness. *Euphytica*. 2018.214:166. DOI 10.1007/s10681-018-2247-7.
- Zhang L.Y., Bernard M., Leroy P., Feuillet C., Sourdille P. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:677-687. DOI 10.1007/s00122-005-2041-5.

ORCID ID

D.O. Vidakovic orcid.org/0000-0003-1529-3347
D. Perovic orcid.org/0000-0002-0292-1693
T.V. Semilet orcid.org/0000-0001-7275-3878
A. Börner orcid.org/0000-0003-3301-9026
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Acknowledgements. Ms Tatiana Semilet was supported by the VIR project No. 0481-2019-0001.

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

Received October 21, 2019. Revised February 17, 2020. Accepted April 7, 2020. Published online July 7, 2020.


Геномные районы *Solanum tuberosum* L., ассоциированные с глубиной залегания глазков клубней

И.В. Тоцкий^{1, 2} , И.В. Розанова^{1, 3}, А.Д. Сафонова², А.С. Батов², Ю.А. Гуреева², А.В. Кочетов¹, Е.К. Хлесткина^{1, 3}

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

² Сибирский научно-исследовательский Институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

 e-mail: totsky@bionet.nsc.ru

Аннотация. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из важнейших в мире продовольственных культур. Геном вида автотетраплоидный, отличается высоким уровнем гетерозиготности, этот вид является также перекрестно-опыляемым. Все это затрудняет генетический анализ и селекционный процесс. Глубина залегания глазков клубня картофеля продовольственного назначения – важный признак, влияющий на пригодность сортов картофеля для переработки. Селекция по этому признаку ведется на основе фенотипической оценки. Идентификация локусов, контролирующих данный признак, позволила бы проводить маркер-контролируемый отбор гибридов, отбраковывая формы с глубоким залеганием глазков на ранних этапах селекции. Целью настоящего исследования было выявление геномных районов, ассоциированных с глубиной залегания глазков, путем анализа сортообразцов картофеля *S. tuberosum* L. из коллекции ГенАгро Института цитологии и генетики СО РАН. При использовании 15214 SNP-маркеров, генотипированных с помощью чипа Illumina 22K SNP potato array, и обобщенной линейной модели (General Linear Model, GLM) с учетом популяционной структуры найдены 24 значимых маркера, ассоциированных с признаком «глубина залегания глазков». Полученные данные показали наличие SNP в четырех геномных районах: в хромосомах 4 (1 маркер в районе 3.92 Мб), 5 (1 маркер в районе 4.67 Мб) и 10 (1 маркер, относящийся к району 4.87 Мб, и 21 маркер в районе 48.1–48.9 Мб). Сопоставление выявленных геномных районов в нашем исследовании с более ранними работами подтвердило, что локус между 48.1–48.9 Мб был известен ранее, остальные три района обнаружены впервые. Участки ДНК, содержащие SNP, сцепленные с глубиной залегания глазков, были изучены в сборке генома картофеля SolTub_3.0 (<https://plants.ensembl.org/>), и на основе полученных данных были разработаны KASP-маркеры, при применении которых можно будет более эффективно вести скрининг селекционного материала и селекцию сортов с мелким залеганием глазков. Ключевые слова: GWAS; SNP; картофель; глубина залегания глазков.

Для цитирования: Тоцкий И.В., Розанова И.В., Сафонова А.Д., Батов А.С., Гуреева Ю.А., Кочетов А.В., Хлесткина Е.К. Геномные районы *Solanum tuberosum* L., ассоциированные с глубиной залегания глазков клубней. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):465-473. DOI 10.18699/VJ20.638


Genomic regions of *Solanum tuberosum* L. associated with the tuber eye depth

I.V. Totsky^{1, 2} , I.V. Rozanova^{1, 3}, A.D. Safonova², A.S. Batov², Yu.A. Gureeva², A.V. Kochetov¹, E.K. Khlestkina^{1, 3}

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

² Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

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

 e-mail: totsky@bionet.nsc.ru

Abstract. Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food crops in the world. The genome of this potato species is autotetraploid and has a high level of heterozygosity, also this potato species is a cross-pollinated plant. These characteristics complicate the genetic analysis and breeding process. The tuber's eye depth is an important trait that affects the suitability of potato varieties for processing. Potato breeding for this trait is based on phenotypic assessment. Identification of the loci that control tuber eye depth would allow diagnostic markers for the marker-assisted selection to be created. The aim of this study is to search for loci associated with the eye depth by analyzing *Solanum tuberosum* varieties from the GenAgro collection of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, genotyped using the Illumina 22K SNP potato array DNA chip. The 24 significant markers associated with the “eye depth” trait were identified using 15,214 SNP markers genotyped with the Illumina 22K SNP potato array chip and the general linear model (GLM) taking into account the population structure. Data obtained showed the presence of SNPs in four genomic regions: on chromosome 4 (1 marker in the 3.92 Mb area), 5 (1 marker in the 4.67 Mb area) and 10 (1 marker in the 4.87 Mb area and 21 markers in the region between 48.1–48.9 Mb). The results

of localization in the region 48.1–48.9 Mb of chromosome 10 correspond to previously published studies, the remaining three regions were detected for the first time. DNA sections containing SNPs linked to the tuber's eye depth were studied in the SolTub_3.0 potato genome assembly (<https://plants.ensembl.org/>). KASP markers were developed based on the data obtained. It will be possible to screen the breeding material and to breed the varieties more effectively using current markers associated with a shallow tuber's eye depth.

Key words: GWAS; SNP; potato; eye depth.

For citation: Totksy I.V., Rozanova I.V., Safonova A.D., Batov A.S., Gureeva Yu.A., Kochetov A.V., Khlestkina E.K. Genomic regions of *Solanum tuberosum* L. associated with the tuber eye depth. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):465-473. DOI 10.18699/VJ20.638

Введение

Картофель *Solanum tuberosum* L. – важнейшая продовольственная культура. Это перекрестноопыляемый вид, его геном является автотетраплоидным и отличается высоким уровнем гетерозиготности, что затрудняет генетический анализ и селекционный процесс (Prashar et al., 2014). Сорты картофеля размножаются вегетативно ввиду низкой фертильности и невозможности созревания плодов в климатических условиях многих стран. Такой характер размножения позволяет сохранять целостность генома сортов картофеля, несмотря на их гетерозиготное состояние.

Картирование генов и локусов количественных признаков (QTL) автотетраплоидного картофеля при использовании двуродительских популяций – сложная задача. При таком методе автотетраплоидное состояние генома предполагает получение многочисленного потомства, что затруднено в связи с низкой фертильностью большинства сортов картофеля, которые обычно размножаются вегетативно. Эти ограничения зачастую обходят путем получения диплоидных форм картофеля, в том числе межвидовых гибридов, уменьшая, таким образом, необходимые объемы потомства при проведении картирования. Для более эффективного применения данной методики нужно отбирать образцы с высокой фертильностью. Все это, в свою очередь, ограничивает использование селекционных сортов картофеля при картировании генов и локусов количественных признаков. Однако возможность применения полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) с развитием методов высокопроизводительного секвенирования и генотипирования (в том числе в виде разработанных SNP-чипов) позволила активизировать работы по выявлению локусов, контролирующих количественные признаки, и избежать трудностей, возникающих при их картировании. По сравнению с другими перекрестноопыляемыми растениями, именно вегетативный способ размножения культивируемых форм картофеля дал возможность легко адаптировать метод GWAS для генетического анализа этой культуры с некоторыми модификациями, учитывающими автотетраплоидную природу и гетерозиготность генома картофеля (Prashar et al., 2014; Khlestkin et al., 2019).

Глубина залегания глазков клубня – важный признак, влияющий на пригодность сортов картофеля для переработки. От глубины залегания глазков зависит объем потерь при очистке, который не должен быть выше 15 % (Земцова, Тимофеева, 2011), и, соответственно, этот признак влияет на стоимость очистки при переработке. Исходя из условий получения минимальных отходов при механизированной, абразивной очистке, глубина залегания глазков у клубней должна быть не более 1.5 мм (Пшеченков, Мальцев, 2011). Оценку глубины залегания глазков проводят с применени-

ем различных шкал. В ряде исследований использованы шкалы, разделенные на три-девять классов (Li et al., 2005; Prashar et al., 2014; Hara-Skrzypiec et al., 2018).

Первые исследования по генетике глубины залегания глазков осуществлены в начале двадцатого века. R.N. Salaman (1910) выявил, что глубокие глазки доминируют над мелкими. Позже W. Black (1930) также предположил, что глубина залегания глазков контролируется генетическими факторами. Однако он выдвинул гипотезу о том, что этот признак имеет промежуточный тип наследования или неполное доминирование, когда крайние фенотипы (очень глубокие и мелкие глазки), вероятно, гомозиготные, а промежуточные (средняя глубина залегания глазков) – гетерозиготные. В. Maris (1966) признал возможным, что глубина залегания глазков контролируется одним основным геном, имеющим кумулятивный эффект. Некоторые авторы сообщали, что мелкие глазки являются доминирующими (Howard, 1974). Н. Kukimura (1972) и Н.В. Howard (1974) указывали, что при скрещивании двух образцов с мелкими глазками в расщеплении могут появиться образцы с глубокими и средними глазками. Исследования с использованием генетического маркирования показали, что существует главный локус, контролирующий признак «глубина залегания глазков» (Li et al., 2005). Эти работы также демонстрировали, что признак глубокого залегания глазков (Eud) доминирует над мелкими глазками (eud). Локус Eud/eud, отвечающий за глубину залегания глазков, расположен на хромосоме 10 (Li et al., 2005).

W. Black (1930) впервые допустил, что глубина залегания глазков в значительной степени зависит от условий окружающей среды. Высокую подверженность этого признака изменениям под воздействием факторов окружающей среды продемонстрировал В. Maris (1966). Однако Н.В. Howard (1974) утверждал, что глубина залегания глазков определяется в основном генотипом. Позже в ряде исследований также были обнаружены высокая наследуемость глубины залегания глазков (Gopal et al., 1992; Love et al., 1997; da Silva et al., 2014; Ney et al., 2016) и незначительное влияние окружающей среды (Love et al., 1997). Другие ученые показывают, что генотип наиболее сильно влияет на признак, однако воздействие факторов окружающей среды также высоко (Hara-Skrzypiec et al., 2018). В ряде работ выявлена способность глубины залегания глазков изменяться при соматической изменчивости (Evans et al., 1986; Thieme, Griess, 2005).

В традиционной селекции глубина залегания глазков оценивается в первом поколении после скрещивания. Однако клубни гибридов, выросшие из ботанических семян, обладают слишком мелким размером, и в таком случае затруднительно адекватно оценить глубину за-

легания глазков. Для решения этой проблемы можно использовать ДНК-маркеры, которые позволят провести отбор на этапе первого поколения и уменьшить объемы последующих исследований.

Целью настоящего исследования был поиск локусов, ассоциированных с глубиной залегания глазков, путем анализа сортообразцов картофеля *S. tuberosum* из коллекции ГенАгро Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, генотипированных с помощью ДНК-чипа Illumina 22K SNP potato array.

Материалы и методы

Растительным материалом для фенотипирования были 88 сортообразцов картофеля из коллекции ГенАгро ИЦиГ СО РАН (табл. 1). Большую часть коллекции картофеля составляли сорта и гибриды отечественной селекции, часть коллекции была представлена сортами, созданными в ближнем и дальнем зарубежье (Украина, Германия, Китай и др.).

Растения выращивали в полевых условиях на двух участках на территории пос. Мичуринский Новосибирской области с мая по август 2017 г.

Испытания проводили по следующей схеме: количество рядков для каждого генотипа – 2; количество растений в рядке – 10 шт.; длина рядка – 3 м; расстояние между рядами – 0.75 м; расстояние между растениями в рядах – 0.30 м; способ посадки – вручную по бороздам, заделка борозд бородами; срок посадки – третья декада мая.

Агрохимическая характеристика почвы: содержание обменного калия 110.00 мг/кг; сумма обменных оснований 24.19 мг-экв/100 г; гидролитическая кислотность 3.23 мг-экв/100 г; обменная кислотность 5.60 мг-экв/100 г; содержание гумуса 2.67 %; содержание подвижного фосфора 5.14 мг/кг; степень насыщенности основаниями (V) 88.20 %.

Метеорологические условия вегетационного периода (по месяцам):

Май. Температура воздуха: среднее многолетнее 10.90 °С; средняя за месяц 12.60 °С; сумма эффективных температур 197.60 °С. Осадки: среднее многолетнее 37.00 мм; сумма за месяц 33.90 мм.

Июнь. Температура воздуха: среднее многолетнее 16.90 °С; средняя за месяц 19.30 °С; сумма эффективных температур 576.00 °С. Осадки: среднее многолетнее 55.00 мм; сумма за месяц 71.90 мм.

Июль. Температура воздуха: среднее многолетнее 19.40 °С; средняя за месяц 18.50 °С; сумма эффективных температур 1004.00 °С. Осадки: среднее многолетнее 61.00 мм; сумма за месяц 99.50 мм.

Август. Температура воздуха: среднее многолетнее 16.20 °С; средняя за месяц 16.80 °С; сумма эффективных температур 1408.00 °С. Осадки: среднее многолетнее 67.00 мм; сумма за месяц 65.60 мм.

Оценка глубины залегания глазков проведена в 2017 г. в результате фенотипирования коллекции картофеля сотрудниками лаборатории селекции, семеноводства и технологии возделывания овощных культур и картофеля Сибирского научно-исследовательского Института растениеводства и селекции в соответствии с методикой Всероссийского института генетических ресурсов растений

им. Н.И. Вавилова (Киру и др., 2010). Глубина залегания глазков определялась по шкале от 1 до 3: 1 – мелкая (менее 1–1.3 мм), 2 – средняя (1.4–1.6 мм), 3 – глубокая (более 1.7 мм). Измеряли пять типичных глазков клубня картофеля. Результаты сравнивали с оценкой глубины глазков, представленной в базе данных Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию (<http://gossortrf.ru/gosreestr.html>), и характеристиками из европейской базы данных культурного картофеля (<https://www.europotato.org/>).

Для генотипирования ДНК выделяли из кожуры клубней картофеля с использованием набора DNeasy Plant Mini (Qiagen, CA, США) согласно протоколу производителя. Концентрация и чистота тестируемых образцов была определена с помощью гель-электрофореза и с использованием аппарата Nanodrop 2000.

Все 88 сортов были генотипированы с использованием ДНК-чипа Illumina 22K SNP potato array (GGP Potato V3) в компании Traitgenetics GmbH (Гатерслебен, Германия).

Набор данных, состоявший из 21 226 SNP, был отфильтрован с применением программного обеспечения Excel. Были удалены данные низкого качества, все мономорфные маркеры и маркеры, содержащие больше чем 95 % одного аллеля. В дальнейший анализ было взято 15214 (71.7 %) SNP. Хромосомная позиция для SNP была определена по (Vos et al., 2015).

Анализ ассоциаций между глубиной залегания глазков и геномом проведен с применением программного пакета Tassel 5.2.59 (Bradbury et al., 2007). Использована обобщенная линейная модель (GLM) с учетом популяционной структуры (Q). Популяционную структуру коллекции анализировали в предыдущих работах (Khlestkin et al., 2019) посредством программы STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), на основе данных всех 15214 маркеров, взятых для дальнейшего анализа.

Так как программный пакет TASSEL был разработан для анализа геномов диплоидных видов, для его применения к тетраплоидному геному данные были перекодированы в цифровой формат с учетом представленности эффекторного аллеля (Khlestkin et al., 2019).

Значимость ассоциаций определяли с помощью двух критериев: поправки Бонферрони – деления статистического уровня значимости (0.05) на общее число испытаний, в нашем случае на количество маркеров (15214), равной $3.28 \cdot 10^{-6}$, и критерия Бенджамини–Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995) (false discovery rate, FDR). Значимыми с учетом поправки метода Бенджамини–Хохберга в данном случае считались только те SNP, значение *p*-value (FDR) которых не превышало порогового значения 0.05.

Разработку KASP-маркеров и генотипирование 86 сортов с их использованием проводили в компании LGC Genomics LLC (Теддингтон, Великобритания). Участки ДНК размером 100 н. п., содержащие SNP, ассоциированные с признаком «глубина залегания глазков», были конвертированы в KASP-маркеры (Приложение 1)¹. Данные о нуклеотидном составе этих участков представлены в сборке генома картофеля SolTub_3.0 (<https://plants.ensembl.org/>). В дальнейшем с помощью разработанных

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx6.pdf>

Таблица 1. Результаты оценки глубины залегания глазков клубня картофеля

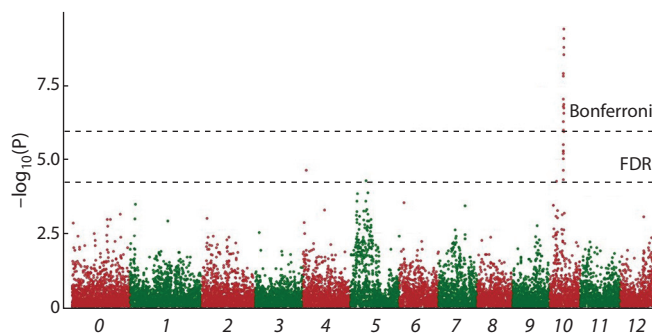
№ п/п	Название сортаобразца	Глубина залегания глазков	№ п/п	Название сортаобразца	Глубина залегания глазков
1	785/8-5	Средняя	45	Любава	Средняя
2	Агата	Мелкая	46	Люкс	Мелкая
3	Алёна	Средняя	47	Марет	Средняя
4	Антонина	»	48	Матушка	Мелкая
5	Арлекин	»	49	Метеор	Средняя
6	Бабушка	Мелкая	50	Милавица	»
7	Божедар	Глубокая	51	Монализа	Мелкая
8	Браво	Средняя	52	Накра	Средняя
9	Василёк	Мелкая	53	Наяда	Мелкая
10	Великан	Средняя	54	Невский	»
11	Вираз	»	55	Никулинский	»
12	Вымпел	»	56	Новосибирский	Глубокая
13	Г 06-08-2015	»	57	Памяти Осиповой	»
14	Г 3-43-2	Мелкая	58	Памяти Рогачёва	Мелкая
15	Г 3-43-6	Средняя	59	Пикассо	»
16	Гала	Мелкая	60	Радонежский	Средняя
17	Голубизна	»	61	Регги	Мелкая
18	Горняк	»	62	Ред Скарлет	»
19	Гранат	Средняя	63	Редстар	»
20	Гранола	Мелкая	64	Руслан	»
21	Гулливер	»	65	Русский сувенир	»
22	Гусар	»	66	С-112-03 (Дочка)	»
23	Дебрянский	Средняя	67	Самба	»
24	Ди Джон 12	Глубокая	68	Сантэ	»
25	Диамант	Мелкая	69	Саровский	Средняя
26	Жаворонок	Средняя	70	Сафо	Мелкая
27	Жигулёвский	Мелкая	71	Свитанок киевский	»
28	Жуковский ранний	»	72	Сельма	»
29	Загадка	Средняя	73	Скала	»
30	Зекура	Мелкая	74	Солнечный	Средняя
31	Зизелла	Средняя	75	Старт	Мелкая
32	Златка	»	76	Стигния	»
33	Ильинский	»	77	Сударыня	Средняя
34	Импала	Мелкая	78	Танай	Мелкая
35	Ирбитский	»	79	Танго	Средняя
36	Кемеровчанин	Средняя	80	Тулеевский	Мелкая
37	Клада	Мелкая	81	Удача	»
38	Колобок	Глубокая	82	Фаворит	»
39	Кортни	»	83	Фиолетовый	Средняя
40	Крепыш	Средняя	84	Фрителла	Мелкая
41	Кузнечанка	»	85	Хозяюшка	»
42	Ладожский	»	86	Чароит	»
43	Лина	»	87	Югана	»
44	Ломоносовский	Мелкая	88	Юна	»

KASP-маркеров можно будет более эффективно вести скрининг селекционного материала и селекцию сортов с мелким залеганием глазков.

Результаты

Фенотипирование, осуществленное на 88 образцах коллекции, показало, что 49 образцов имели малую глубину залегания глазков. Значительную часть коллекции составляли образцы со средней глубиной залегания глазков – 33 генотипа. Образцы с глубокими глазками представляли малую часть выборки – всего шесть сортообразцов (см. табл. 1).

Ассоциативный анализ данных с использованием GLM и учетом популяционной структуры позволил выявить 24 SNP, значимо связанных с глубиной залегания глазков клубня (табл. 2, см. рисунок). После применения множественной тестовой коррекции Бонферрони при 5 %



Манхэттен график, показывающий значимые SNP, сцепленные с глубиной залегания глазков, при использовании анализа GLM с учетом популяционной структуры.

1–12 – обозначения хромосом; 0 – маркеры с неопределенной хромосомной локализацией.

Таблица 2. Связанные с глубиной залегания глазков SNP, найденные с помощью анализа GLM

№	Маркер	Хромосома	Физическое положение на хромосоме (п. н.)	<i>p</i>	FDR	Алтели
1	PotVar0111687*	10	48721966	3.99E-10	6.06917E-06	T/C
2	solcap_snp_c2_25485*	10	48737840	8.22E-10	6.25189E-06	A/G
3	solcap_snp_c1_8019*	10	48863165	1.62E-09	8.21252E-06	A/G
4	solcap_snp_c2_25471*	10	48808404	2.90E-09	1.10302E-05	A/G
5	solcap_snp_c2_25526*	10	48617149	1.27E-08	3.85736E-05	A/G
6	solcap_snp_c2_25522*	10	48617457	1.53E-08	3.87577E-05	T/C
7	solcap_snp_c2_25532*	10	48591792	9.29E-08	0.000201844	C/G
8	solcap_snp_c1_8021*	10	48862950	1.41E-07	0.00026906	A/G
9	solcap_snp_c2_25529*	10	48593621	1.62E-07	0.000273091	T/G
10	solcap_snp_c1_16351*	10	48761642	1.86E-07	0.000282357	T/C
11	solcap_snp_c2_55948*	10	48982352	2.80E-07	0.000387016	A/G
12	solcap_snp_c2_25528*	10	48616808	5.26E-07	0.000667235	T/C
13	solcap_snp_c2_25527*	10	48616993	1.05E-06	0.001228589	A/G
14	solcap_snp_c2_25469*	10	48808653	1.21E-06	0.001315794	A/G
15	solcap_snp_c2_45611*	10	48203431	3.15E-06	0.003191491	A/G
16	solcap_snp_c2_25530	10	48593576	5.13E-06	0.004875707	T/C
17	solcap_snp_c1_13531	10	48149384	5.48E-06	0.004901056	A/G
18	solcap_snp_c2_45606	10	48218826	6.41E-06	0.005414409	A/G
19	solcap_snp_c2_25523	10	48617343	9.66E-06	0.007735919	T/A
20	PotVar0106879	4	3916249	2.40E-05	0.01823474	T/C
21	solcap_snp_c2_49532	10	48443334	2.40E-05	0.017394673	A/C
22	solcap_snp_c2_45612	10	48203384	4.93E-05	0.034120853	T/C
23	solcap_snp_c2_23017	5	4670373	5.39E-05	0.035637141	T/C
24	PotVar0107893	10	4870467	5.45E-05	0.034526271	A/G

Примечание. 1–15* – SNP, значимые при использовании множественной тестовой коррекции Бонферрони при 5 % ($p < 3.28 \cdot 10^{-6}$); 16–24 – SNP, значимые при использовании FDR.

Таблица 3. Соответствие аллельного состояния маркера и фенотипического проявления глубины залегания глазков

№ п/п	Маркер	Аллели	Глазки		
			мелкие	средние	глубокие
1	PotVar0111687	4 C	0	0	1
		C+T	38	29	5
		4 T	10	2	0
2	solcap_snp_c2_25526	4 C	0	0	0
		C+T	37	28	6
		4 T	11	4	0
3	solcap_snp_c1_16351	4 C	0	0	1
		C+T	35	29	4
		4 T	13	3	0
4	solcap_snp_c2_55948	4 C	0	0	1
		C+T	34	28	5
		4 T	14	3	0
5	solcap_snp_c1_8019	4 G	0	0	1
		G+A	36	30	5
		4 A	10	1	0
6	solcap_snp_c2_25471	4 G	0	0	1
		G+A	38	31	5
		4 A	10	1	0
7	solcap_snp_c2_25522	4 A	0	0	1
		G+A	38	29	5
		4 G	10	3	0
8	solcap_snp_c2_25528	4 A	0	0	1
		G+A	34	27	5
		4 G	14	5	0
9	solcap_snp_c2_25469	4 A	0	0	1
		G+A	33	28	4
		4 G	15	4	1
10	solcap_snp_c2_25529	4 A	0	0	1
		C+A	33	27	4
		4 C	15	5	1
11	solcap_snp_c2_25527	4 T	0	0	1
		C+T	33	28	4
		4 C	14	4	1

Примечание. Полужирным шрифтом выделены гаплотипы, предсказывающие мелкое залегание глазков.

($p < 3.28 \cdot 10^{-6}$) только 15 из 24 SNP оставались значимы для глубины залегания глазков клубня, остальные 9 SNP сохраняли значимость только при использовании критерия FDR ($p < 0.05$).

Ассоциированные с глубиной залегания глазков SNP обнаружены в четырех геномных регионах, два из которых находятся на хромосоме 10. Значимые при использовании множественной тестовой коррекции Бонферрони ($p < 3.28 \cdot 10^{-6}$), SNP располагались на одном из двух локусов хромосомы 10. Значимые с использованием FDR ($p < 0.05$) SNP встречаются во всех четырех локусах на

хромосомах 10, 4 и 5. На хромосомах 4 и 5 располагалось только по одному значимому SNP. На хромосоме 10 21 SNP находился на относительно небольшом участке между 48.1 и 48.9 Мб. Еще один SNP был локализован в другом районе хромосомы 10 на позиции 4.87 Мб (этот SNP значим при использовании FDR).

Наиболее значимый SNP PotVar0111687 относится к некодирующей последовательности. Из 18 значимых SNP 6 находятся в некодирующих районах генома, а 11 – в последовательностях, кодирующих белки. Аннотация генов, содержащих значимые SNP, приведена в Приложении 2.

Ввиду отсутствия точной информации по генетическому контролю глубины залегания глазков оказалось затруднительным однозначно связать выявленные гены с формированием глубины залегания глазков.

Результаты анализа KASP-генотипирования

KASP-генотипирование проводили с использованием 11 KASP-маркеров, разработанных на основе значимых при использовании множественной тестовой коррекции Бонферрони SNP, которые были сцеплены с глубиной залегания глазков и располагались на хромосоме 10 между 48.1 и 48.9 Мб (табл. 3). Восемь маркеров коррелировали с глубиной залегания глазков, а точнее, гомозиготное состояние одного из аллелей данных маркеров коррелирует с мелким залеганием глазков.

Гаплотип, на 100 % предсказывающий мелкое залегание глазков: PotVar0111687 (гомозигота по T), solcap_snp_c2_25526 (гомозигота по T), solcap_snp_c1_16351 (гомозигота по T), solcap_snp_c2_55948 (гомозигота по T), solcap_snp_c1_8019 (гомозигота по A), solcap_snp_c2_25471 (гомозигота по A), solcap_snp_c2_25522 (гомозигота по G), solcap_snp_c2_25528 (гомозигота по G). Носители этого гаплотипа – сорта Василек, Гулливер, Люкс, Матушка, Няяда, Дочка, Тулеевский, Фаворит, Чароит.

Обсуждение

В работе (Li et al., 2005) проведено генетическое картирование локуса, отвечающего за глубину залегания глазков. В результате локус *Eud* был картирован на хромосоме 10 проксимальнее маркера CT240 (12 сМ) и дистальнее маркера STM0051 (13 сМ). Это позволяет рассчитать расстояние между маркерами CT240 и STM0051, которое составляет 25 сМ. BLAST-анализ последовательностей этих маркеров показывает позицию CT240 в районе 51 Мб, а STM0051 – в районе 23.4 Мб. Можно предположить, что найденный нами на хромосоме 10 локус, расположенный в пределах между 48.1 и 48.9 Мб, соответствует гену *Eud*. В ряде работ (Śliwka et al., 2008; Prashar et al., 2014; Rosyara et al., 2016; и др.) в этом районе регулярно выявлялся локус, сцепленный с глубиной залегания глазков.

Так, А. Prashar с коллегами (2014) с применением чипа Infinium 8303 Potato Array, имеющего 8303 маркера однонуклеотидного полиморфизма (SNP), составляли генетическую карту диплоидного картофеля. После отбора наиболее ценных SNP карта содержала 1355 различных локусов и 2157 SNP. В их работе показано, что основной локус для глубины залегания глазков клубня расположен на хромосоме 10 (SNP: c1_8020) и сцеплен с локусом формы клубня. Этот SNP локализован на хромосоме 10 в районе 48.8 Мб, так же как выявленный нами локус 4. Исследователи обнаружили два SNP, сцепленных с глубиной залегания глазков на хромосомах 2 (c2_7422) и 3 (c2_37119), которые были не столь значимы и, вероятнее всего, могли иметь вспомогательное действие (Prashar et al., 2014).

U.R. Rosyara с коллегами (2016) также использовали GWAS для поиска SNP, сцепленных с глубиной залегания глазков. В их исследовании ДНК-чип имел 3.5 тыс. маркеров. В этой работе SNP, высоко значимый для глубины залегания глазков (совпадающий с локусом, установлен-

ным А. Prashar с коллегами (2010), и локусом 4, выявленным в нашей работе), находился на позиции 48.9 Мб на хромосоме 10. Менее значимый SNP, который также был сцеплен с глубиной залегания глазков клубня, c2_11685, был на хромосоме 5 в позиции 2.3 Мб. В нашей работе также был обнаружен SNP, ассоциированный с глубиной залегания глазков, расположенный на хромосоме 5, но в другом районе – 4.7 Мб.

В работе Н. Lindqvist-Kreuzе с коллегами (2015) на хромосоме 10 в позиции 49.4 Мб выявлен QTL, отвечающий за глубину залегания глазков клубня картофеля, и еще один локус на хромосоме 12. Исследователи идентифицировали ряд генов-кандидатов, лежащих в основе значимого QTL и сцепленных с глубиной залегания глазков. Один из них – BEL-1-подобный ген гомеобокса, обнаруженный на расстоянии 1.37 Мб от QTL-маркера toPt-437059 на хромосоме 10. Второй – ген α -экспансина, который был идентифицирован в области значимого QTL на хромосоме 10 на расстоянии 1.78 Мб от QTL-маркера toPt-437059. Некоторые гены, связанные с продукцией и модификацией пектинов, выявлены в непосредственной близости от маркера toPt-437059 на хромосоме 10.

А. Nara-Skrzywiec с коллегами (2018) также составляли генетическую карту картофеля для ряда признаков, в том числе и для глубины залегания глазков. Они выявили семь QTL, сцепленных с глубиной залегания глазков: по одному на хромосомах 1, 4 и 11 и по два на хромосомах 3 и 5. Однако, в отличие от других исследований, основной, наиболее значимый QTL находился на хромосоме 4 (в позиции 68.8 Мб) и объяснял 22.6 % дисперсии в среднем наборе данных. Мы обнаружили в нашем исследовании значимый SNP PotVar0106879, расположенный на хромосоме 4 в позиции 3.9 Мб.

Таким образом, ключевой локус, отвечающий за глубину залегания глазков, находится на хромосоме 10, тогда как локусы с минорным эффектом – на хромосомах 1, 2, 3, 4, 5, 11 и 12, а также на других участках хромосомы 10.

Заключение

Несмотря на широкий спектр генетических исследований признака «глубина залегания глазков клубней картофеля» и идентификацию генов и локусов, ассоциированных с изменчивостью по этому признаку, в селекции картофеля на глубину залегания глазков до сих пор не применяются ДНК-маркеры. Между тем использование диагностических ДНК-маркеров позволяет как более эффективно вести пребридинговые исследования – проводить скрининг генетических ресурсов картофеля для идентификации доноров ценных аллельных вариантов, так и осуществлять маркер-контролируемый отбор в селекционных программах (Gebhardt et al., 2006; Клименко и др., 2017, 2019; Chen et al., 2017).

Нам удалось разработать ряд новых ПЦР-маркеров, которые могут быть удобными для скрининга генетических ресурсов картофеля и селекционного материала. После дополнительной проверки этих маркеров на расширенной выборке с их помощью можно будет осуществлять отбор путем анализа на уровне ДНК. Отобранные нами ПЦР-маркеры расположены на хромосоме 10 на позициях между 48.62 и 48.98 Мб. Эти данные совпадают с резуль-

татами других исследователей по локализации предполагаемого гена, отвечающего за глубину залегания глазков, однако за счет большего количества обнаруженных нами маркеров позволяют уточнить локализацию интересующего нас гена и предположить, что он расположен на позиции между 48.0 и 49.0 Мб. Оптимальным, по нашим данным, является отбор по гаплотипу 8 SNP хромосомы 10 (PotVar0111687 (гомозигота по T), solcar_snp_c2_25526 (гомозигота по T), solcar_snp_c1_16351 (гомозигота по T), solcar_snp_c2_55948 (гомозигота по T), solcar_snp_c1_8019 (гомозигота по A), solcar_snp_c2_25471 (гомозигота по A), solcar_snp_c2_25522 (гомозигота по G), solcar_snp_c2_25528 (гомозигота по G)). Носители этого гаплотипа – сорта Василек, Гулливер, Люкс, Матушка, Наяда, Дочка, Тулеевский, Фаворит, Чаронт – характеризуются мелким залеганием глазков. Использование этих сортов в качестве доноров данного признака, являющихся вместе с тем донорами и ряда других ценных свойств, в сочетании с ПЦР-анализом потомства для выбора носителей соответствующего гаплотипа обеспечит более экономичный и ускоренный способ создания картофеля с мелким залеганием глазков клубней.

Список литературы / References

- Земцова М.А., Тимофеева И.И. Технологическая оценка сортов картофеля на пригодность для переработки на хрустящий картофель и картофель «фри». *Защита картофеля*. 2011;1:17-20. [Zemtcova M.A., Timofeeva I.I. Technological assessment of potato varieties for suitability for conversion to crisps and French fries. *Zaschita Kartofelya = Potato Protection*. 2011;1:17-20. (in Russian)]
- Киру С.Д., Костина Л.И., Трускинов Э.В., Зотеева Н.М., Рогозина Е.В., Королева Л.В., Фомина В.Е., Палеха С.В., Косарева О.С., Кирилов Д.А. Методические указания по поддержанию и изучению мировой коллекции картофеля. СПб., 2010. [Kiru S.D., Kostina L.I., Truskinov E.V., Zoteeva N.M., Rogozina E.V., Koroleva L.V., Fomina V.E., Palekha S.V., Kosareva O.S., Kirilov D.A. Guidelines on the Maintenance and Study of the World Potato Collection. St. Petersburg, 2010. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоде (патотип Ro1). *Труды по прикл. ботан., генет. и селекции*. 2017;178(4):66-75. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-4-66-75>. [Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-associated selection of Russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(4):66-75. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-4-66-75>. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Гавриленко Т.А., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Антонова О.Ю. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к PVX в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(1):42-48. DOI 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48. [Klimenko N.S., Gavrilenko T.A., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Antonova O.Y. Search for resistance sources to *Globodera pallida* and potato virus X in the collection of potato varieties using molecular markers. *Biotechnologiya i Seleksiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(1):42-48. DOI 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48. (in Russian)]
- Пшеченков К.А., Мальцев С.В. Оценка сортов картофеля селекции ВНИИКХ на пригодность к промпереработке. *Защита картофеля*. 2011;1:38-40. [Pshechenkov K.A., Mal'tsev S.V. Assessment of potato varieties bred at the All-Russia Institute of Potato Industry for suitability for industrial processing. *Zashhita Kartofelya = Potato Protection*. 2011;1:38-40. (in Russian)]
- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 1995;57(1):289-300.
- Black W. Notes on the progenies of various potato hybrids. *J. Genet.* 1930;22(1):27-43. DOI 10.1007/BF02983366.
- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 2007;23:2633-2635. DOI 10.1093/bioinformatics/btm308.
- Chen S., Borza T., Byun B., Coffin J., Peters R., Wang-Pruski G. DNA markers for selection of late blight resistant potato breeding lines. *Am. J. Plant Sci.* 2017;8(6):1197-1209.
- da Silva G.O., Ney V.G., da Silva Pereira A., Terres L.R. Relationships among potato tuber traits in early generations of selection. *Rev. Ceres*. 2014;61(3):370-376. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000300011>.
- Evans N.E., Foulger D., Farrer L., Bright S.W.J. Somaclonal variation in explant-derived potato clones over three tuber generations. *Euphytica*. 1986;35(2):353-361. DOI 10.1007/BF00021843.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112:1458-1464.
- Gopal J., Gaur P.C., Rana M.S. Early generation selection for agronomic characters in a potato breeding programme. *Theor. Appl. Genet.* 1992;84(5-6):709-713. DOI 10.1007/BF00224173.
- Hara-Skrzypiec A., Śliwka J., Jakuczun H., Zimnoch-Guzowska E. QTL for tuber morphology traits in diploid potato. *J. Appl. Genet.* 2018;59(2):123-132. DOI 10.1007/s13353-018-0433-x.
- Howard H.W. Factors influencing the quality of ware potatoes. 1. The genotype. *Potato Res.* 1974;17(4):490-511. DOI <https://doi.org/10.1007/BF02362167>.
- Khlestkin V.K., Rozanova I.V., Efimov V.M., Khlestkina E.K. Starch phosphorylation associated SNPs found by genome-wide association studies in the potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genet.* 2019;20(1):29. DOI 10.1186/s12863-019-0729-9.
- Kukimura H. Effects of gamma-rays on segregation ratios in potato families. *Potato Res.* 1972;15(2):106-116. DOI 10.1007/BF02355958.
- Li X.Q., De Jong H., De Jong D.M., De Jong W.S. Inheritance and genetic mapping of tuber eye depth in cultivated diploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110(6):1068-1073. DOI 10.1007/s00122-005-1927-6.
- Lindqvist-Kreuzer H., Khan A., Salas E., Meiyalaghan S., Thomson S., Gomez R., Bonierbale M. Tuber shape and eye depth variation in a diploid family of Andean potatoes. *BMC Genet.* 2015;16:57. DOI 10.1186/s12863-015-0213-0.
- Love S.L., Werner B.K., Pavak J.J. Selection for individual traits in the early generations of a potato breeding program dedicated to producing cultivars with tubers having long shape and russet skin. *Am. Potato J.* 1997;74(3):199-213. DOI 10.1007/BF02851598.
- Maris B. The modifiability of characters important in potato breeding. *Euphytica*. 1966;15(1):18-31. <https://doi.org/10.1007/BF00024076>.
- Ney V.G., Terres L.R., da Silva G.O., da Silva Pereira A. Expected response to early-generation selection for yield and tuber appearance traits in potatoes. *Semin. Cienc. Agrar.* 2016;37(5):2849-2857. DOI 10.5433/1679-0359.2016v37n5p2849.
- Prashar A., Hornyik C., Young V., McLean K., Sharma S., Dale M.F., Bryan G.J. Construction of a dense SNP map of a highly heterozygous diploid potato population and QTL analysis of tuber shape

- and eye depth. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(10):2159-2171. DOI 10.1007/s00122-014-2369-9.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959.
- Rosyara U.R., De Jong W.S., Douches D.S., Endelman J.B. Software for genome-wide association studies in autopolyploids and its application to potato. *Plant Genome.* 2016;9(2). DOI 10.3835/plantgenome2015.08.0073.
- Salaman R.N. The inheritance of colour and other characters in the potato. *J. Genetics.* 1910;1(1):7-46. DOI <https://doi.org/10.1007/BF02981567>.
- Śliwka J., Wasilewicz-Flis I., Jakuczun H., Gebhardt C. Tagging quantitative trait loci for dormancy, tuber shape, regularity of tuber shape, eye depth and flesh colour in diploid potato originated from six *Solanum* species. *Plant Breed.* 2008;127(1):49-55. DOI 10.1111/j.1439-0523.2008.01420.x.
- Thieme R., Griess H. Somaclonal variation in tuber traits of potato. *Potato Res.* 2005;48(3-4):153-165. DOI 10.1007/BF02742373.
- Vos P.G., Uitdewilligen J.G.A.M.L., Voorrips R.E., Visser R.G.F., van Eck H.J. Development and analysis of a 20K SNP array for potato (*Solanum tuberosum*): an insight into the breeding history. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(12):2387-2401. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2593-y>.

ORCID ID

I.V. Totsky orcid.org/0000-0001-5565-9097
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Благодарности. Исследование фенотипических характеристик сортов картофеля в полевых условиях и в теплице поддержано бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН (проект № 0259-2019-0011). Анализ генетических ассоциаций проведен в рамках Комплексного плана научных исследований «Развитие картофелеводства и семеноводства». Разработка новых аллель-специфических маркеров выполнена в рамках Российского научного фонда (проект № 16-16-04073).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.12.2019. После доработки 12.05.2020. Принята к публикации 13.05.2020.

Анализ генетических взаимосвязей генотипов рода *Rosa* L. из коллекции Никитского ботанического сада с использованием ISSR- и IRAP- ДНК-маркеров

И.И. Супрун¹, С.А. Плугатарь²✉, И.В. Степанов¹, Т.С. Науменко²

¹ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

² Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр Российской академии наук, пгт Никита, Ялта, Республика Крым, Россия

✉ e-mail: gardenroses@mail.ru

Аннотация. В связи с развитием селекции и появлением новых сортов растений все более важным становится вопрос паспортизации и структуризации генофонда, поэтому использование молекулярно-генетических методов для выявления генетической оригинальности и оценки генетического разнообразия растений представляется актуальным. В рамках настоящей работы осуществлены поиск информативных ISSR- и IRAP- ДНК-маркеров, перспективных для изучения генетического разнообразия рода *Rosa* L., и анализ с их помощью генетических взаимосвязей образцов из генофондовой коллекции роз Никитского ботанического сада. Материалом для генотипирования послужили 26 образцов, 18 из которых являются культурными сортами, а 8 образцов относятся к дикорастущим видам. В выборку видов включены представители двух подродов *Rosa* и *Platyrhodon*. Подрод *Platyrhodon* представлен одним образцом вида *R. roxburghii* Tratt. Среди культурных роз присутствовали сорта садовых групп: чайно-гибридной, флорибунда и грандифлора. В исследовании было задействовано 32 ISSR- и 13 IRAP-маркеров. После апробации были отобраны как наиболее перспективные пять ISSR-маркеров (UBC 824, ASSR29, 3A21, UBC 864, UBC 843) и три IRAP-маркера (TDK 2R, Cass1, Cass2). Они использовались для генотипирования исследуемой выборки генотипов и в целом перспективны для дальнейшего изучения генетического разнообразия рода *Rosa* L. Количество полиморфных фрагментов варьировало в диапазоне от 12 до 31, в среднем 19.25 фрагмента на маркер. По маркерам UBC 864 и UBC 843 выявлены уникальные фингерпринты для каждого изученного образца. Оценка генетических взаимосвязей изученных видов и сортов роз с использованием методов UPGMA, PCoA и байесовского анализа, выполненная на основе данных IRAP- и ISSR-генотипирования, согласуется с таксономическим положением образцов. Генотип вида *R. roxburghii* подрода *Platyrhodon* определен как генетически наиболее отдаленный образец. Представитель вида *R. bengalensis* методами кластеризации не выделился из группы культурных сортов. При оценке уровня генетического сходства среди культурных сортов садовой розы наиболее генетически обособленными сортами оказались 'Flamingo', 'Queen Elizabeth', 'Kordes Sondermeldung'; для остальных сортов были определены группы наибольшего генетического сходства. Данная оценка отражает общие тенденции в филогенетических отношениях как между изученными видами рода, так и между культурными сортами.

Ключевые слова: *Rosa* L.; розы; генофонд; генотипирование; ДНК-маркеры; IRAP; ISSR; генетическое разнообразие.

Для цитирования: Супрун И.И., Плугатарь С.А., Степанов И.В., Науменко Т.С. Анализ генетических взаимосвязей генотипов рода *Rosa* L. из коллекции Никитского ботанического сада с использованием ISSR- и IRAP- ДНК-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(5):474-480. DOI 10.18699/VJ20.639

Analysis of genetic relationships of genotypes of the genus *Rosa* L. from the collection of Nikita Botanical Gardens using ISSR and IRAP DNA markers

I.I. Suprun¹, S.A. Plugatar²✉, I.V. Stepanov¹, T.S. Naumenko²

¹ North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russia

² Order of the Red Banner of Labour Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Yalta, Republic of the Crimea, Russia

✉ e-mail: gardenroses@mail.ru

Abstract. In connection with the development of breeding and the creation of new plant varieties, the problem of their genotyping and identification is becoming increasingly important, therefore the use of molecular methods to identify genetic originality and assess plant genetic diversity appears to be relevant. As part of the work performed, informative ISSR and IRAP DNA markers promising for the study of genetic diversity of the *Rosa* L. genus were sought and applied to analysis of genetic relationships among 26 accessions of the genus *Rosa* L. from the gene pool collec-

tion of Nikita Botanical Gardens. They included 18 cultivated varieties and 8 accessions of wild species. The species sample included representatives of two subgenera, *Rosa* and *Platyrhodon*. The subgenus *Platyrhodon* was represented by one accession of the species *R. roxburghii* Tratt. Cultivated roses were represented by varieties of garden groups hybrid tea, floribunda, and grandiflora. The tested markers included 32 ISSRs and 13 IRAPs. Five ISSR markers (UBC 824, ASSR29, 3A21, UBC 864, and UBC 843) and three IRAPs (TDK 2R, Cass1, and Cass2) were chosen as the most promising. They were used for genotyping the studied sample of genotypes. In general, they appeared to be suitable for further use in studying the genetic diversity of the genus *Rosa* L. The numbers of polymorphic fragments ranged from 12 to 31, averaging 19.25 fragments per marker. For markers UBC 864 and UBC 843, unique fingerprints were identified in each accession studied. The genetic relationships of the studied species and varieties of roses analyzed by the UPGMA, PCoA, and Bayesian methods performed on the basis of IRAP and ISSR genotyping are consistent with their taxonomic positions. The genotype of the species *R. roxburghii* of the subgenus *Platyrhodon* was determined genetically as the most distant. According to clustering methods, the representative of the species *R. bengalensis* did not stand out from the group of cultivated varieties. When assessing the level of genetic similarity among the cultivated varieties of garden roses, the most genetically isolated varieties were 'Flamingo', 'Queen Elizabeth', and 'Kordes Sondermeldung'; for most of the other varieties, groups of the greatest genetic similarity were identified. This assessment reflects general trends in phylogenetic relationships, both among the studied species of the genus and among cultivated varieties. Key words: *Rosa* L.; rose; genetic resources; DNA-markers; ISSR; IRAP; genetic diversity.

For citation: Suprun I.I., Plugatar S.A., Stepanov I.V., Naumenko T.S. Analysis of genetic relationships of genotypes of the genus *Rosa* L. from the collection of Nikita Botanical Gardens using ISSR and IRAP DNA markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):474-480. DOI 10.18699/VJ20.639

Введение

Согласно базе данных The Plant List (www.theplantlist.org), род *Rosa* L. включает 373 признанных вида. В природной флоре Крыма известно 16 видов этого рода (Ена, 2012). Мировой сортимент садовых роз в настоящее время состоит из более чем 30 тыс. сортов. По своим декоративным и биологическим признакам все это сортовое многообразие подразделяется, по международной классификации, на 36 садовых групп (McFarland, 2007). Работы по селекции роз активизировались в последние годы в Японии, Китае, Индии, Канаде и Новой Зеландии (Plugatar et al., 2017). В России селекционная работа с розами с 1824 г. и по сей день успешно проводится в Никитском ботаническом саду (Плугатарь, 2016). Наиболее перспективными и востребованными в озеленении считаются розы из садовых групп флорибунда, грандифлора, миниатюрной и чайно-гибридной, которые имеют период цветения в среднем от 180 до 200 дней в году в зависимости от сорта (Plugatar et al., 2017).

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов всего разнообразия культурных сортов роз и видов, принимавших участие в их создании, являются одним из основных аспектов при создании новых сортов, отвечающих требованиям современного декоративного цветоводства для конкретных регионов выращивания данной культуры (Schanzer, Vagina, 2007; Korkmaz, Dogan, 2018).

Стремительное развитие методов ДНК-маркирования и их внедрение в научную практику способствуют повышению эффективности исследований, направленных на выяснение генетических взаимосвязей образцов на внутри- и межвидовом уровне, изучение генетической структуры коллекций генофондов и создание коллекций, паспортизацию и регистрацию имеющегося генофонда. Помимо этого, методы ДНК-маркирования могут эффективно применяться для поиска доноров генов селекционно-ценных признаков, выявления дублирующих образцов и решения спорных вопросов при включении вновь поступивших образцов. Перспективным может быть использование данных об уровне генетического сходства

в комплексе с фенотипической характеристикой сортов при формировании родительских пар для гибридизации в селекционных программах.

К наиболее ранним филогенетическим исследованиям рода *Rosa* L. с использованием молекулярно-генетических маркеров можно отнести работу Т. Миллана с коллегами (Millan et al., 1996). Для оценки полиморфизма на внутривидовом и межвидовом уровне у представителей различных секций *Rosa* авторы привлекли RAPD-маркеры (random amplified polymorphic DNA). Методом UPGMA были установлены три кластера: в первый сгруппировались образцы секций *Pimpinellifoliae* и *Synstylae*, второй кластер был образован секциями *Chinenses (Indicae)* и *Galicanae*, а третий – видами секций *Cassiorhodon (Cinnamomeae)* и *Caninae*. Однако в более поздней работе на значительно расширенной выборке из 109 образцов, относящихся к 39 видам (Atienza et al., 2005), не удалось получить однозначного распределения образцов по таксонам. Подобные результаты не вполне согласовывались с другим исследованием американских авторов (Jan et al., 1999), также применявших RAPD-маркеры для анализа выборки из 119 образцов 36 видов *Rosa*.

У. Купман с коллегами (Koorman et al., 2008) для филогенетического анализа задействовали AFLP ДНК-маркеры. На основании анализа выборки из 92 образцов, принадлежащих 46 видам, была выполнена реконструкция филогении видов внутри рода *Rosa*. Мультилокусные ДНК-маркеры широко использовались для выяснения генетических взаимосвязей, как для коллекций генофонда, так и при изучении природных популяций различных видов рода *Rosa*. Так, комплексные данные, полученные по результатам ISSR- и RAPD-анализа, позволили группе турецких ученых проанализировать генетические взаимосвязи 27 видов рода *Rosa*, произрастающих на территории Турции (Korkmaz, Dogan, 2018). В работе по изучению генетической связи образцов таифской розы с образцами розы, отобранными в Сирии и Египте, включая розу дамасскую, использовали RAPD-, ISSR- и SSR-маркеры. По результатам генотипирования удалось выявить

наибольшую степень генетического родства таифских роз к дамасским розам сорготипа Gogü, произрастающим в Сирии (El-Assal et al., 2014). В ряде отечественных работ, направленных на изучение генетических взаимосвязей в роде *Rosa* и выяснение вопросов, касающихся филогении, также успешно применялись молекулярно-генетические методы анализа, включая ISSR-маркеры (Шанцер, 2013, 2015).

Целью настоящей работы было изучение генетических взаимосвязей между образцами роз (род *Rosa*) различного происхождения из коллекции Никитского ботанического сада с применением IRAP и ISSR мультилокусных маркеров.

Материалы и методы исследований

В качестве растительного материала для генотипирования было отобрано 26 образцов рода *Rosa* L., 18 из которых являются культурными сортами, а 8 образцов относятся к дикорастущим видам (табл. 1). В выборку видов включены представители двух подродов – *Rosa* и *Platyrhodon*.

Подрод *Platyrhodon* представлен одним образцом вида *R. roxburghii* Tratt. Среди культурных роз присутствовали сорта групп чайно-гибридной, флорибунда и грандифлора. Для приготовления препарата ДНК из молодых листьев использовался СТАВ-метод (Murray, Thompson, 1980).

Для проведения ДНК-генотипирования были отобраны ISSR- и IRAP-маркеры, согласно сведениям из различных литературных источников (Arzate-Fernandez et al., 2005; Jawdat et al., 2010; Krishna Parvathaneni et al., 2011; Yuying et al., 2011; Senkova et al., 2013; Супрун и др., 2014). Всего было задействовано 32 ISSR-маркера и 13 IRAP-маркеров. Чтобы выявить маркеры, перспективные к использованию для генотипирования образцов рода *Rosa*, была проведена их апробация. ПЦР выполнялась по следующей программе: 3 мин предварительной денатурации при температуре 95 °С; затем 35 циклов: денатурация 35 с при 95 °С, отжиг праймеров 1 мин при 50 °С (в случае IRAP-маркеров при 55 °С), элонгация 1.5 мин при 72 °С; и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 мин. Концентрации реагентов в ПЦР смеси: 2.5 мкл 10-кратного

Таблица 1. Образцы рода *Rosa*, отобранные для генотипирования

Номер образца	Наименование вида, сорта	Происхождение
1	'Коралловый Сюрприз'	'Kordes Sondermeldung' × 'Queen Elizabeth'
2	'Мисхор'	'Angelique' × 'Звезда Октября'
3	<i>R. multiflora</i> Thunb.	Дикорастущий вид
4	'Gloria Dei'	Семена: ('George Dickson' × 'Souvenir de Claudius Pernet') × ('Joanna Hill' × 'Charles P. Kilham'); пыльца: 'Margaret McGredy'
5	'Аю-Дар'	'Chrysler Imperial' × 'Kordes Sondermeldung'
6	'Kronenbourg'	Клон сорта 'Peace'
7	<i>R. foetida</i> Herrm.	Дикорастущий вид
8	'Flamingo'	Сеянец × 'Lady Like'
9	<i>R. hugonis</i> Hemsl.	Дикорастущий вид
10	<i>R. indica</i> Linn.	»
11	'Климентина'	'Kordes Sondermeldung' × 'Gloria Dei'
12	'Прекрасная Таврида'	'Gloria Dei' × смесь пыльцы 'Crimson Glory' + 'Poinsettia'
13	<i>R. bracteata</i> J.C. Wendl	Дикорастущий вид
14	'Yves Piaget'	('Pharaoh' × 'Peace') × ('Chrysler Imperial' × 'Charles Mallerin')
15	'Чатыр-Дар'	'Charles Mallerin' × 'Chrysler Imperial'
16	'Chrysler Imperial'	'Charlotte Armstrong' × 'Mirandy'
17	'Prince de Monaco'	'Tamango' × 'Matangi'
18	'Мечта'	'Karl Herbst' × 'Spek's Yellow'
19	<i>R. roxburghii</i> Tratt.	Дикорастущий вид
20	'Queen Elizabeth'	'Charlotte Armstrong' × 'Floradora'
21	'Rouletii' (<i>R. rouletii</i> Correvon, <i>R. chinensis</i> Jacq. f. <i>minima</i>)	Дикорастущий вид
22	'La France'	'Madame Victor Verdier' × 'Madame Bravi'
23	<i>R. bengalensis</i> Pers.	Дикорастущий вид
24	'Traviata'	'Porta Nigra' × 'Paola' × 'William Shakespeare'
25	'Алиса'	'Jubile du Prince de Monaco' × 'Flamingo'
26	'Kordes Sondermeldung'	'Baby Chateau' × 'Crimson Glori'

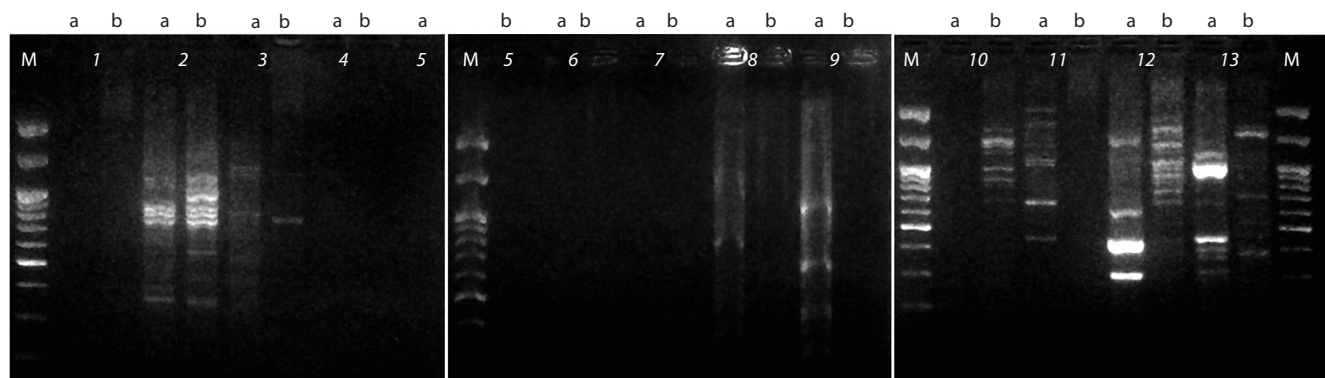


Рис. 1. ДНК-фингерпринты сортов 'La France' (a) и 'Kronenbourg' (b), полученные при апробации IRAP-маркеров:

1 – TDK 1F; 2 – TDK 2R; 3 – TDK 2F; 4 – TDK 12F; 5 – TDK 12R; 6 – TDK 13F; 7 – MET 2F; 8 – MET 2R; 9 – BARE 1; 10 – LTR 3; 11 – LTR 15; 12 – Cass1; 13 – Cass2; M – маркер молекулярной массы ДНК.

буфера для Taq ДНК-полимеразы (ООО «Сибэнзим», Россия), 0.5 или 2.5 мкл dNTP (2.5 мМ), 1 ед. активности Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл праймера (3.75 мМ) и 40–50 нг тотальной ДНК в общем объеме 25 мкл. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили при напряжении 100 В в 2.5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (при апробации маркеров использовали 2 % агарозный гель при напряжении 120 В). Визуализацию ДНК осуществляли в ультрафиолете.

На основе результатов генотипирования была построена бинарная матрица для дальнейшего использования данных в программах статистической обработки. Статистическая обработка результатов ISSR- и IRAP-генотипирования и анализ генетических взаимосвязей изученного генофонда выполнены в программе PAST version 2.17c (UPGMA и PCoA анализ). Генетическая структура выборки оценена с помощью программы Structure 2.3.4 (байесовский анализ). В расчете использовали различные значения гипотетических популяций (K) – от 2 до 7 (burn-in period = 200,000; 500,000 iterations).

Результаты

Основным критерием отбора при апробации ДНК-маркеров служило качество фингерпринтов апробируемых маркеров на генотипах роз (для апробации маркеров была использована ДНК сортов 'La France' и 'Kronenbourg'). Спектры амплифицируемых фрагментов по изученным маркерам отражены на рис. 1.

Для дальнейшей работы были отобраны маркеры, обладающие наиболее качественными фингерпринтами. К критериям качества фингерпринтов отнесены количество ДНК-фрагментов, их четкость и яркость на электрофореграмме; это необходимо для достоверной оценки результатов генотипирования. В качестве перспективных были выявлены пять ISSR-маркеров (UBC 824, ASSR29, 3A21, UBC 864, UBC 843) и три IRAP-маркера (TDK 2R, Cass1, Cass2).

Выборка из 26 генотипов представителей рода *Rosa* была проанализирована с использованием перечисленных ISSR- и IRAP-маркеров (табл. 2). Диапазон количества полиморфных аллелей у разных маркеров варьировал от 12 до 31 фрагмента, в среднем 19.25 фрагмента на мар-

Таблица 2. Характеристики отобранных маркеров по результатам генотипирования

Маркер	Кол-во полиморфных фрагментов	F _{ед} * [*]	Кол-во уникальных генотипов
UBC 824	12	3	21
ASSR29	21	3	25
3A21	17	4	18
UBC 864	31	9	26
UBC 843	18	0	26
TDK 2R	21	0	25
Cass1	17	6	22
Cass2	16	5	22

* F_{ед} – число уникальных фрагментов, выявленных только у одного генотипа.

кер. Максимальным количеством полиморфных фрагментов (31) обладал маркер UBC 864, значительное число фрагментов установлено также у маркеров TDK 2R и ASSR29. Два маркера из выборки (UBC 864 и UBC 843) дают уникальные фингерпринты для каждого образца. Маркер UBC 864 обладал и наибольшим количеством уникальных фрагментов, выявленных в единственном экземпляре у одного из образцов выборки. По результатам генотипирования была построена бинарная матрица для дальнейшего использования данных в программах статистической обработки.

В сумме восемь использованных маркеров позволили получить на выборке из 26 образцов 153 полиморфных фрагмента. При обработке результатов генотипирования методом главных координат (PCoA) культурные сорта розы выделились в обособленную группу (рис. 2). Следует отметить, что вид *R. bengalensis* попал в группу сортовых образцов. Наиболее удаленное положение среди видов розы занимает генотип *R. roxburghii*. На некотором удалении от основной массы генотипов выборки находятся *R. hugonis* и *R. foetida*. Виды *R. bracteata*, *R. multiflora* и *R. indica* разместились ближе всего к культурным сортам. При этом *R. indica* занимает обособленное положение

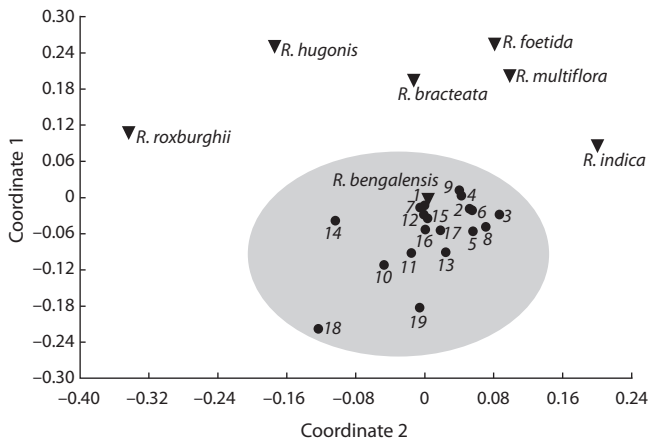


Рис. 2. Результаты PCoA анализа изученной выборки.

Точками обозначены культурные сорта роз: 1 – ‘Коралловый Сюрприз’, 2 – ‘Мисхор’, 3 – ‘Gloria Dei’, 4 – ‘Аю-Дар’, 5 – ‘Kronenbourg’, 6 – ‘Flamingo’, 7 – ‘Климентина’, 8 – ‘Прекрасная Таврида’, 9 – ‘Yves Piaget’, 10 – ‘Чатыр-Дар’, 11 – ‘Chrysler Imperial’, 12 – ‘Prince de Monaco’, 13 – ‘Мечта’, 14 – ‘Queen Elizabeth’, 15 – ‘Rouletii’, 16 – ‘La France’, 17 – ‘Traviata’, 18 – ‘Алиса’, 19 – ‘Kordes Sondermeldung’. Треугольниками отмечены видовые образцы.

относительно двух вышеперечисленных видов, более близкое к культурным формам.

Для определения генетической структуры популяции результаты генотипирования были обработаны с помощью программы Structure 2.3.4; число предполагаемых субкластеров (K) варьировало от 2 до 7. Оптимальное число субкластеров составило 2, при этом в отдельную группу выделились видовые образцы *R. multiflora*, *R. foetida*, *R. hugonis*, *R. indica*, *R. bracteata*, *R. roxburghii*. Вторая группа была сформирована культурными сортами (рис. 3). Образцы *R. bengalensis*, ‘Queen Elizabeth’ и ‘Flamingo’ заняли промежуточное положение между этими группами. При дальнейшем увеличении значения K тенденция к такому распределению сохраняется.

Результаты кластеризации методом UPGMA выявили закономерности в распределении исследованных генотипов, отмеченные и при использовании метода PCoA анализа (рис. 4). В целом клады построенной дендрограммы

показали низкие значения бутстрепа. Наиболее удаленным генотипом является *R. roxburghii*. Отдельный кластер образуют виды *R. hugonis* и *R. foetida*. В следующий кластер вошли *R. bracteata* и *R. multiflora*. Вид *R. indica* занимает обособленное положение относительно других генотипов. Все видовые образцы, за исключением *R. bengalensis*, занимают внешнее положение относительно кластера, включающего культурные формы роз. Среди сортов роз наиболее удалены от общей массы генотипов ‘Queen Elizabeth’ и ‘Flamingo’. Удаленное положение занимает также группа, представленная двумя сортами ‘Kordes Sondermeldung’ и ‘Алиса’. Остальные сорта можно разделить на четыре кластера: первый кластер – ‘Rouletii’, ‘La France’, ‘Traviata’, *R. bengalensis*; второй – ‘Коралловый Сюрприз’, ‘Аю-Дар’, ‘Gloria Dei’, ‘Kronenbourg’, ‘Мисхор’; третий – ‘Chrysler Imperial’, ‘Чатыр-Дар’, ‘Prince de Monaco’, ‘Yves Piaget’, ‘Мечта’; четвертый кластер – ‘Климентина’, ‘Прекрасная Таврида’.

Обсуждение

В настоящей работе проведена оценка генетического родства образцов из генофондовой коллекции роз Никитского ботанического сада. Ниже рассмотрена интерпретация распределения образцов при кластеризации различными методами.

Байесовский анализ позволяет определить генетический вклад предковых форм для каждого изученного генотипа. Поскольку большинство сортов роз имеет гибридное происхождение, то в результате анализа генетического родства образцов установлено, что диплоидные виды четко отделяются от культурных сортов, не привнося существенного вклада в генофонд исследованных сортов. Тем не менее для двух сортов – ‘Flamingo’ и ‘Queen Elizabeth’ – выявлен незначительный вклад диких видов, а генотип *R. bengalensis*, в свою очередь, занимает промежуточное положение между группами диких видов и культурных сортов. Такое распределение свидетельствует о происхождении культурных роз от небольшого количества диких видов, одним из которых является *R. bengalensis*.

Обособленность культурных форм розы при кластеризации отчетливо прослеживается и другими методами,

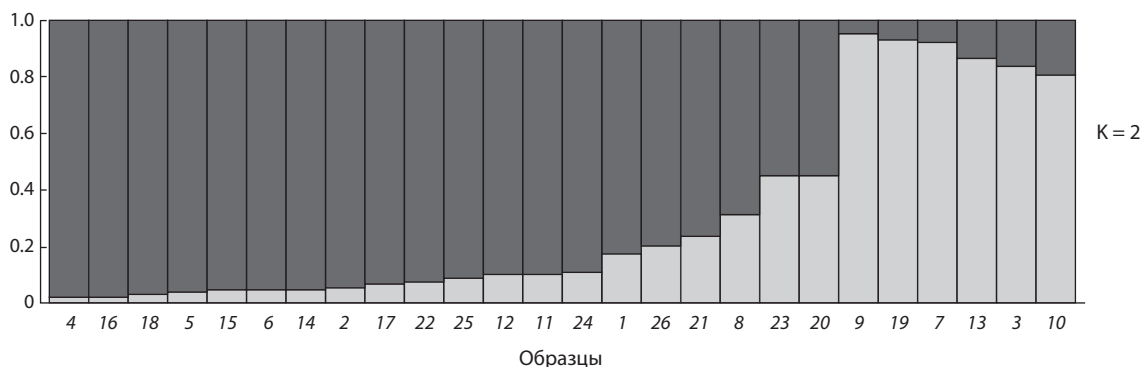


Рис. 3. График байесовского анализа в программе Structure 2.3.4.

Образцы: 1 – ‘Коралловый Сюрприз’, 2 – ‘Мисхор’, 3 – *R. multiflora*, 4 – ‘Gloria Dei’, 5 – ‘Аю-Дар’, 6 – ‘Kronenbourg’, 7 – *R. foetida*, 8 – ‘Flamingo’, 9 – *R. hugonis*, 10 – *R. indica*, 11 – ‘Климентина’, 12 – ‘Прекрасная Таврида’, 13 – *R. bracteata*, 14 – ‘Yves Piaget’, 15 – ‘Чатыр-Дар’, 16 – ‘Chrysler Imperial’, 17 – ‘Prince de Monaco’, 18 – ‘Мечта’, 19 – *R. roxburghii*, 20 – ‘Queen Elizabeth’, 21 – ‘Rouletii’, 22 – ‘La France’, 23 – *R. bengalensis*, 24 – ‘Traviata’, 25 – ‘Алиса’, 26 – ‘Kordes Sondermeldung’.

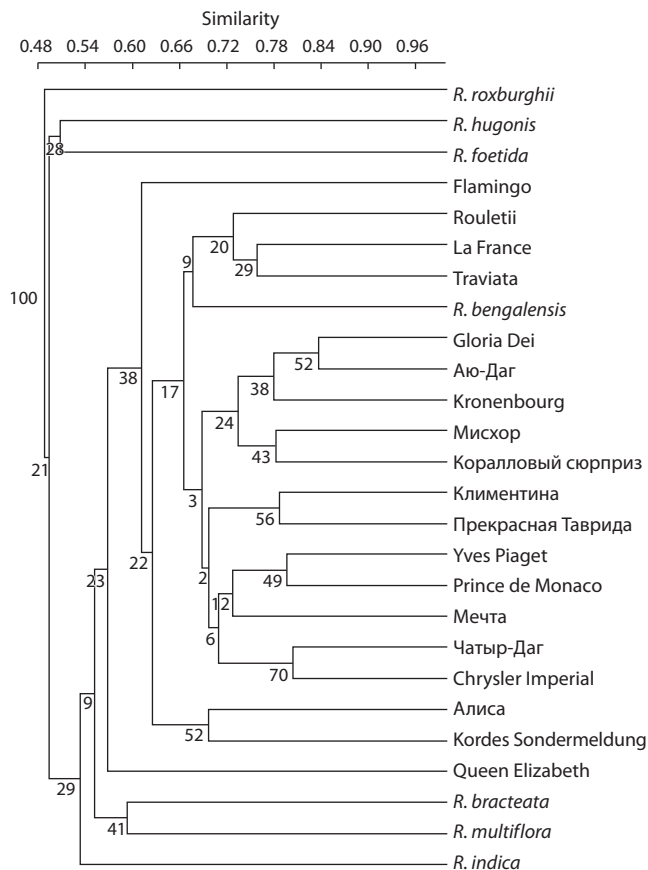


Рис. 4. Кластеризация образцов методом UPGMA.

такими как PCoA и UPGMA. Однако, в отличие от байесовского анализа, эти два метода дают более детальную картину. Метод PCoA дифференцирует дикие виды по степени удаленности от культурных форм. Схожие данные по распределению образцов были получены при выполнении кластеризации методом UPGMA. Низкие значения достоверности клад дендрограммы могут быть обусловлены сложным гибридным происхождением как видовых, так и сортовых образцов (Bruneau et al., 2007). В связи с этим последующая интерпретация результатов UPGMA возможна при сопоставлении со сходными данными, полученными другими методами.

Обобщая сведения по распределению видовых образцов и сортов культурной розы, можно сделать определенные выводы. Филогенетические данные, полученные на основе результатов IRAP- и ISSR-генотипирования, согласуются со сведениями о систематическом положении изученных образцов. Наиболее удаленным от культурных форм видом является *R. roxburghii*, представляющий подрод *Platyrhodon* рода *Rosa*. Остальные видовые и культурные образцы относятся к подроду *Rosa* одноименного рода. Такое распределение соответствует данным систематики. Тем не менее в ряде молекулярно-генетических работ по изучению филогении рода *Rosa* вид *R. roxburghii* не выделяют из группы видов подрода *Rosa* (Wissemann, Ritz, 2005; Koorman et al., 2008; Fougère-Danezan et al., 2015). Внутри подрода *Rosa* обособленное положение занимают два вида секции *Pimpinellifoliae*. Исследования, прове-

денные на хлоропластных ДНК-маркерах, подтверждают близость этих видов (Wissemann, Ritz, 2005). Секция *Pimpinellifoliae* (из представленных в выборке образцов), вероятно, наименее близка к культурным сортам. Виды *R. multiflora*, *R. bracteata* и *R. indica* образуют ближайшие кластеры с сортовыми образцами, не исключен их вклад в формирование культурного генофонда розы. *R. bengalensis* наравне с культурными сортами входит в единую генетическую группу. Вклад этого вида в формирование культурных сортов не вызывает сомнения. Следует также отметить, что генетическое единство культурных сортов свидетельствует об общности их генофонда.

При анализе генетического родства между сортами роз по результатам IRAP- и ISSR-генотипирования за основу были взяты данные PCoA и UPGMA кластеризации. Сопоставляя данные этих двух методов, можно выделить наиболее достоверные группы сортов, стабильно выявляемые обоими методами. В первую группу вошли 'Rouletii' и 'La France'. Оба сорта имеют западноевропейское происхождение, их родство не очевидно. Вторую группу составили 'Prince De Monaco', 'Yves Piaget', 'Чатыр-Даг' и 'Chrysler Imperial'. Два сорта из этой группы имеют в предках 'Chrysler Imperial' – 'Yves Piaget' и 'Чатыр-Даг'. И если родство сортов 'Chrysler Imperial', 'Yves Piaget' и 'Чатыр-Даг' можно объяснить происхождением двух последних от первого, то объединение их в одну группу с сортом 'Prince De Monaco' трудно истолковать. В третью группу попали 'Gloria Dei', 'Kronenbourg', 'Аю-Даг', 'Коралловый Сюрприз'. Это два сорта ('Аю-Даг' и 'Коралловый Сюрприз'), в родителях у которых присутствует 'Kordes Sondermeldung', а также сорт 'Gloria Dei' и его «спорт» (клональный мутант) 'Kronenbourg'.

Такие сорта, как 'Flamingo', 'Queen Elizabeth', 'Kordes Sondermeldung' и 'Алиса', являются наиболее генетически контрастными. Тем не менее ряд сортов в выборке связан происхождением с указанными тремя сортами: 'Аю-Даг', 'Климентина', 'Коралловый Сюрприз' ('Kordes Sondermeldung'), 'Коралловый сюрприз' ('Queen Elizabeth') и 'Алиса' ('Flamingo').

Заклучение

Полученные нами результаты распределения видовых образцов роз по кластерам исходя из их генетического родства согласуются с общепризнанной филогенией. Стоит отметить, что образец вида *R. bengalensis* входит в кластер, образованный культурными сортами. Данный факт может свидетельствовать о вкладе диких роз индийского происхождения в формирование генофонда современных сортов роз. В свою очередь анализ родства культурных сортов садовой розы выявил, что из общей массы исследованных образцов выделяются 'Flamingo', 'Queen Elizabeth', 'Kordes Sondermeldung' и 'Алиса'. Остальные сорта роз были распределены по группам наибольшего генетического сходства. Большая часть результатов кластеризации культурных сортов была объяснена сведениями о их родословной, однако положение некоторых сортов вызвало затруднение в интерпретации. Для определения их родства требуется проведение дальнейших исследований. Таким образом, использованные в работе маркеры показали свою эффективность в изучении рода *Rosa*.

Список литературы / References

- Ена А.В. Природная флора Крымского полуострова. Симферополь, 2012.
[Ena A.V. Natural Flora of the Crimean Peninsula. Simferopol', 2012. (in Russian)]
- Плугатарь Ю.В. Никитский ботанический сад как научное учреждение. *Вестн. РАН*. 2016;86(2):120-126. DOI 10.7868/S0869587316010096.
[Plugatar' Yu.V. Nikitsky Botanical Gardens as a scientific institution. *Vestnik RAN = Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2016;86(2):120-126. DOI 10.7868/S0869587316010096. (in Russian)]
- Супрун И.И., Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С., Слепченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования редких видов растений Западного Кавказа: *Lilium causicum* Misch. ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum*. *Науч. журн. КубГАУ*. 2014;103(09). <http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>
[Suprun I.I., Kolomiec T.M., Malyarovskaya V.I., Sokolov R.N., Samarina L.S., Slepchenko N.A. Testing ISSR DNA markers for genotyping rare plant species of the Western Caucasus: *Lilium causicum* Misch. ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum*. *Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Proceedings of the Kuban State Agrarian University*. 2014;103(09). <http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf> (in Russian)]
- Шанцер И.А. Систематика и филогения шиповников (*Rosa*) в свете молекулярно-генетических данных. В: Современная ботаника в России: Труды XIII съезда Рус. ботан. о-ва и конф. «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна». Тольятти, 2013;1:272-273.
[Shanzer I.A. The taxonomy and phylogeny of wild rose species (*Rosa*) in the light of molecular data. In: Modern Botany in Russia: Proceedings of the 13th Congress of the Russian Botanical Society and the Conference "Scientific Bases for Protection of the Volga Region". Tolyatti, 2013;1:272-273. (in Russian)]
- Шанцер И.А. Сетчатая эволюция в роде *Rosa* L.: палеоботанические находки, морфологическая систематика и молекулярные данные. *Палеобот. вестник. Прил. к журн. "Lethaea Rossica"*. 2015;2:161-164.
[Shanzer I.A. Reticular evolution in the genus *Rosa* L.: paleobotanical findings, morphological systematics, and molecular data. *Paleobotanicheskiy Vremennik. Prilozhenie k Zhurnalu "Lethaea Rossica" = Paleobotanical Chronicle: Supplement to the journal "Lethaea Rossica"*. 2015;2:161-164. (in Russian)]
- Arzate-Fernandez A.M., Miwa M., Shimada T., Yonekura T., Ogawa K. Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*), an endemic and endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biol.* 2005;20:57-65.
- Atienza S.G., Torres A.M., Millan T., Cubero J.I. Genetic diversity in *Rosa* as revealed by RAPDs. *Agric. Conspec. Sci.* 2005;70(3): 75-85.
- Bruneau A., Starr J.R., Joly S. Phylogenetic relationships in the genus *Rosa*: new evidence from chloroplast DNA sequences and an appraisal of current knowledge. *Syst. Bot.* 2007;32(2):366-378.
- El-Assal S.E.-D., El-Awady M.A., El-Tarras A., Shehab G. Assessing the genetic relationship of taif rose with some rose genotypes (*Rosa* sp.) based on random amplified polymorphic DNA, inter simple sequence repeat and simple sequence repeat markers. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2014;10(1):88-98. DOI 10.3844/ajbbsp.2014.88.98.
- Fougère-Danezan M., Joly S., Bruneau A., Gao X.-F., Zhang L.-B. Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Ann. Bot.* 2015;115(2):275-291.
- Jan C.H., Byrne D., Manhart J., Wilson H. Rose germplasm analysis with RAPD markers. *HortSci.* 1999;34(2):341-345.
- Jawdat D., Al-Faoury H., Ayyoubi Z., Al-Safadi B. Molecular and ecological study of *Eryngium* species in Syria. *Biologia.* 2010;65(5): 796-804. DOI 10.2478/s11756-010-0086-7.
- Koopman W.J.M., Wissemann V., De Cock K., Van Huylenbroeck J., De Riek J., Sabatino G.J.H., Visser D., Vosman B., Ritz C.M., Maes B., Werlemark G., Nybom H., Debener T., Linde M., Smulders M.J.M. AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: a case study in *Rosa* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* 2008;95(3): 353-366.
- Korkmaz M., Dogan N.Y. Analysis of genetic relationships between wild roses (*Rosa* L. spp.) growing in Turkey. *Erwerbs-Obstbau.* 2018;60(4):305-310. DOI 10.1007/s10341-018-0375-9.
- Krishna Parvathaneni R., Natesan S., Arunachalam Devaraj A., Muthuraja R., Venkatachalam R., Prathap Subramani A., Laxmanan P. Fingerprinting in cucumber and melon (*Cucumis* spp.) genotypes using morphological and ISSR markers. *J. Crop Sci. Biotech.* 2011; 1:39-43. DOI 10.1007/s12892-010-0080-1.
- McFarland H. Modern Roses 12. Shreveport: The American Rose Society, 2007.
- Millan T., Osuna F., Cobos S., Torres A.M., Cubero J.I. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 1996;92:273-277.
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;10:4321-4325.
- Plugatar S.A., Klymenko Z.K., Plugatar Yu.V., Mitrofanova I.V. Garden roses: results of introduction and selection in Nikita botanical garden. *Acta Hort.* 2017;1167:177-180. DOI 10.17660/Acta Hort.2017.1167.27.
- Schanzer I.A., Vagina A.V. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers reveal natural intersectional hybridization in wild roses [*Rosa* L., sect. *Caninae* (DC.) Ser. and sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser.]. *Wulfenia.* 2007;14:1-14.
- Senkova S., Ziarovska J., Bezo M., Stefunova V., Razna K. Utilization of IRAP technique for plums genotypes differentiation. *Biosci. Res.* 2013;10(1):1-7.
- Wissemann V., Ritz C.M. The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Bot. J. Linn. Soc.* 2005; 147(3):275-290.
- Yuying S., Xiajun D., Fei W., Binhua C., Zhihong G., Zhena Z. Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers. *Sci. Hortic.* 2011;132:50-58. DOI 10.1016/j.scienta.2011.10.005.

ORCID ID

I.I. Suprun orcid.org/0000-0003-0355-8395
S.A. Plugatar orcid.org/0000-0002-7234-6217
I.V. Stepanov orcid.org/0000-0002-6251-300X
T.S. Naumenko orcid.org/0000-0003-1220-4927

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.09.2019. После доработки 06.07.2020. Принята к публикации 06.07.2020.

Идентификация видов рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) на основе нуклеотидной изменчивости ядерной рибосомной ДНК

Т.А. Полякова¹✉, Е.В. Банаев²✉, М.А. Томошевич²

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tat-polyakova@yandex.ru; alnus2005@mail.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ внутригеномного полиморфизма последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 ядерной рибосомной ДНК у 33 образцов, принадлежащих трем видам *Nitraria* – *N. schoberi*, *N. sibirica*, *N. komarovii*. Выявлена нуклеотидная изменчивость региона ITS у изученных видов *Nitraria* в виде однонуклеотидных замен (преимущественно транзиции) и однонуклеотидной делеции. Сведения о нуклеотидной изменчивости фрагментов приводятся впервые нами. Регион ITS1-5.8S-ITS2 у изученных видов *Nitraria* содержит 17 филогенетически информативных однонуклеотидных замен. В межгеномном спейсере ITS1 выявлено 11 однонуклеотидных замен – транзиции (C/T). Спейсер ITS2 содержит 273–274 п. н. и отличается большей консервативностью. Всего в ITS2 у изученных образцов выявлено пять филогенетически информативных однонуклеотидных замен (четыре транзиции: C/T, G/A, одна трансверсия: G/C), одна однонуклеотидная делеция (T/–). Среднее значение содержания G+C составляет 61.5 %. Величина содержания GC-состава ниже у *N. sibirica* (59.2 %), чем у *N. schoberi* и *N. komarovii* (62.7 %). В сравнении с полноразмерным фрагментом ITS, более короткий ITS2 является подходящим молекулярным маркером, дискриминирующим виды, из-за низкой межвидовой изменчивости и одновременно выраженной внутривидовой вариабельности. Филогенетические ML и BI деревья, построенные как отдельно по спейсерам ITS1 и ITS2, так и отдельно по полноразмерному ITS-региону и спейсеру ITS2, оказались конгруэнтны. Полученные результаты по внутривидовой дифференциации *N. sibirica* позволяют выделить среди образцов этого вида два основных риботипа: основной сибирский *sibirica*-риботип и основной казахстанский *sibirica*-риботип. Географические особенности распространения риботипов *N. sibirica*, а также наличие существенных различий между основными сибирским и казахстанским *sibirica*-риботипами (три однонуклеотидные замены) свидетельствуют о существенных межпопуляционных различиях и таксономической неоднородности *N. sibirica*. Вероятнее всего, в настоящее время продолжают процессы гомогенизации рибосомной ДНК образцов *N. sibirica*, происхождение которых связано с гибридизацией и видообразованием. Ключевые слова: *Nitraria*; *N. schoberi*; *N. sibirica*; *N. komarovii*; генетическая изменчивость; таксономия; молекулярная идентификация; ITS; транзиция.

Для цитирования: Полякова Т.А., Банаев Е.В., Томошевич М.А. Идентификация видов рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) на основе нуклеотидной изменчивости ядерной рибосомной ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):481-488. DOI 10.18699/VJ20.640

Identification of species in the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on nucleotide variability of nuclear ribosomal DNA

T.A. Poliakova¹✉, E.V. Banaev²✉, M.A. Tomoshevich²

¹ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tat-polyakova@yandex.ru; alnus2005@mail.ru

Abstract. Intragenomic polymorphism of ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal DNA sequences was analysed in 33 samples belonging to the *Nitraria* species *N. schoberi*, *N. sibirica*, and *N. komarovii*. The nucleotide variability of the ITS region was detected in the *Nitraria* species as single-nucleotide substitutions (mainly transitions) and single-nucleotide deletion. Information about the nucleotide variability of fragments is given for the first time by us. The ITS1-5.8S-ITS2 region contained 17 phylogenetically informative single-nucleotide polymorphisms. Eleven single-nucleotide substitutions (transitions, C/T) were detected in ITS1. The ITS2 spacer contained 273–274 bp and was more conservative. A total of 5 phylogenetically informative single-nucleotide polymorphisms (4 transitions: C/T, G/A, one transversion: G/C), one single-nucleotide deletion (T/–) were detected in ITS2. The average GC content was 61.5 %. The GC content was lower in *N. sibirica* (59.2 %) than in *N. schoberi* and *N. komarovii* (62.7 %). It has been shown that the shorter ITS2 is a suitable molecular marker separating these species, due to the low interspecific variability and simultaneous available intraspecific variability. Phylogenetic ML and BI trees constructed separately for the ITS1 and ITS2 spacers, as well as separately for the full-size ITS region and the ITS2 spacer, were congruent. The results obtained on the intraspecific differentiation of *N. sibirica* revealed two main ribotypes among the samples of this species: the main Siberian *sibirica*-ribotype and the

main Kazakh *sibirica*-ribotype. Geographical features of the distribution of *N. sibirica* ribotypes, as well as the presence of significant differences between the main Siberian and Kazakh *sibirica*-ribotypes (3 single-nucleotide substitutions) indicated significant inter-population differences and taxonomic heterogeneity of *N. sibirica*. Most likely, the processes of homogenization of nuclear ribosomal DNA of *N. sibirica* samples, the origin of which is associated with hybridization and speciation, are currently continuing.

Key words: *Nitraria*; *N. schoberi*; *N. sibirica*; *N. komarovii*; genetic variability; taxonomy; molecular identification; ITS; transition.

For citation: Poliakova T.A., Banaev E.V., Tomoshevich M.A. Identification of species in the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on nucleotide variability of nuclear ribosomal DNA. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):481-488. DOI 10.18699/VJ20.640

Введение

В настоящее время молекулярный подход становится общим аспектом таксономических исследований растений на различных уровнях. Наиболее перспективными последовательностями ДНК для идентификации (в том числе молекулярной) таксонов растений являются некодируемые участки внутренних транскрибируемых спейсеров ITS (internal transcribed spacers; ITS1, ITS2) ядерных рибосомных генов (CBOL, 2009; Шнеер, Родионов, 2018). Ядерные участки ITS1 и ITS2, наряду с другими фрагментами ДНК, признаны стандартными ДНК-штрихкодами (Hollingsworth, 2011; Li et al., 2011; Шнеер, Родионов, 2018). Точная идентификация растительных организмов установлена в 80 % случаев с использованием только ITS-маркера, что существенно выше общепринятых используемых локусов (Bolson et al., 2015). Несмотря на ограничения ITS, которые заключаются в наличии одновременно нескольких тысяч копий последовательностей, в том числе располагающихся на разных хромосомах (Song et al., 2012; Родионов и др., 2016), локус ITS признается наиболее значимым в исследованиях по молекулярной систематике близкородственных таксонов. Показана как высокая результативность целого региона ITS в идентификации видов, например для родов *Spiraea* (Полякова и др., 2015), *Uncaria* (Zhang et al., 2015), *Artemisia* (Wang et al., 2016), так и высокая эффективность отдельного спейсера ITS2 (Gao et al., 2010; Ren et al., 2010; Zhang et al., 2015; Feng et al., 2016). Успех использования спейсеров ITS связан, прежде всего, с эффективной амплификацией, оптимальным размером ампликонов для секвенирования и приемлемым для межвидовых сравнений уровнем дивергенции (Шнеер, 2009; Родионов и др., 2016). Показано, что дивергенция района ITS, как правило, коррелирует с направлением и темпами морфологического видообразования (Шнеер, 2009; Song et al., 2012; Родионов и др., 2016).

Виды рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) являются уникальным объектом для исследования путей и механизмов дивергенции благодаря полиморфизму биологических признаков и древности происхождения. Большинство видов слабо морфологически дифференцированы, поэтому крайние варианты фенотипических различий принимаются систематиками за отдельные виды, внутривидовые формы или экологические расы (Банаев и др., 2015; Kovtonyuk et al., 2019; Tomoshevich et al., 2019). Отдельный интерес представляют самые широко распространенные и полиморфные виды: *N. schoberi* L. и *N. sibirica* Pall. Эти виды не всегда удается различить, особенно затруднены определения гербарных образцов (Пешкова, 1996; Коропачинский, 2016).

Попытки разрешить таксономию сибирских видов рода *Nitraria* были предприняты на основе кариологических (Муратова и др., 2013; Banaev et al., 2018), фитохимических (Банаев и др., 2015) и морфологических (Банаев и др., 2017) признаков, однако молекулярные маркеры имеют ряд преимуществ перед ними, демонстрируя достоверные различия на генетическом уровне без участия факторов окружающей среды. Несмотря на то что секвенирование фрагментов ДНК остается до сих пор дорогостоящим методом анализа, оно дает не только точные, но и высокоинформативные данные об изменчивости геномов организмов.

Целью нашей работы был сравнительный анализ нуклеотидной изменчивости региона ITS и выявление его значимости в таксономии видов рода *Nitraria*.

Материал и методы

Материал для исследования был собран в 2011–2017 гг. в 19 популяциях *N. sibirica*, 12 популяциях *N. schoberi* и 2 популяциях *N. komarovii* Iljin & Lava ex Bobrov на территории России (Алтайский край, Новосибирская область, Республики Крым, Хакасия, Тыва), Казахстана, Таджикистана (табл. 1). Гербарные образцы хранятся в Гербарии лаборатории дендрологии Центрального сибирского ботанического сада СО РАН и NSK Collection (Central Siberian Botanical Garden of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) and Digital Herbarium CSBG SB RAS (<http://herb.csbg.nsc.ru:8081>).

Выделение геномной ДНК, ПЦР-амплификация, секвенирование. ДНК выделяли из высушенных листьев по стандартным методикам для растительных тканей с применением СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990). Концентрацию и количество ДНК оценивали в 0.8 % агарозном геле, а также на спектрофотометре NanoPhotometer P-Class (P-360, Implen).

Для амплификации последовательностей региона ITS, включающего межгенные спейсеры ITS1, ITS2 и ген 5.8S, использовали праймеры ITS6 (5'-tcgtaacaaggttccgtagg tga-3') и ITS9 (5'-ccgcttattgatatgcttaaac-3'), разработанные для восточноазиатских видов трибы Spiraeae (Potter et al., 2007) и синтезированные в ЗАО «Евроген» (Москва). Для ПЦР применяли готовый набор реагентов GenePak® PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Москва). Цикл амплификации включал: первичную элонгацию при 95 °C в течение 5 мин, денатурацию при 94 °C 1 мин, отжиг праймеров при 58 °C в течение 50 с и элонгацию при 72 °C 1 мин с числом циклов 30, финальную элонгацию при 72 °C в течение 5 мин. Качество полученных ПЦР-фрагментов проверяли в 1.5 % агарозном геле и очищали набором реагентов для быстрой элюции ДНК из агарозных

Таблица 1. Однонуклеотидные замены и однонуклеотидная делеция/инсерция в ITS2 у видов *Nitraria*

Вид, образец	Происхождение	Риботип	Позиция с переменным нуклеотидом					
			33	81	140	158	207	217
<i>N. schoberi</i> Krim	Крым	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Kaspil	Казахстан	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Kulunda	Алтайский край	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Malinovie	»	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Bagan	Новосибирская область	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Koktal	Казахстан	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Balhash	»	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Aidarli	»	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Raz'ezd 47	»	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Pyandzh	Таджикистан	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Sariozek	Казахстан	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. schoberi</i> Lepsi*	»	H6	G	C	A	G	C	–
<i>N. komarovii</i> Balhash 1	»	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. komarovii</i> Balhash 2	»	H1	G	C	A	G	C	–
<i>N. sibirica</i> Bele	Хакасия	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Kulunda	Алтайский край	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Rubtsovsk	»	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Noven'koe	»	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Veseloyarsk	»	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Balansor	»	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Kuchuk	»	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Shara-Nur	Тыва	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Koktal	Казахстан	H2	A	C	A	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Karatal	»	H3	A	T	G	C	T	T
<i>N. sibirica</i> Balhash	»	H3	A	T	G	C	T	T
<i>N. sibirica</i> Kurgan	»	H3	A	T	G	C	T	T
<i>N. sibirica</i> Kainar	»	H3	A	T	G	C	T	T
<i>N. sibirica</i> Basshi	»	H3	A	T	G	C	T	T
<i>N. sibirica</i> Dzhira	Алтайский край	H4	A	C	G	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Gornyak	»	H4	A	C	G	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Bahar	Казахстан	H4	A	C	G	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Raz'ezd 47	»	H5	A	T	G	G	T	T
<i>N. sibirica</i> Kurti**	»	H7	A	T	G	C	T	T

Примечание. Образец имеет уникальную замену: * в позиции 71; ** в позиции 201. Прочерк – однонуклеотидная делеция.

гелей Diatom DNA Elution (ООО «Лаборатория Изоген»). Секвенирование фрагментов проводили в обоих направлениях в ЗАО «Евроген».

Анализ данных. Сиквенсы были попарно выравнены в программе BioEdit v.7.1.9 (Hall, 1999), множественное выравнивание выполнено в программе ClustalW2 с последующей проверкой неоднозначных позиций на хроматограммах и редактированием вручную. Анализ выравненных последовательностей, подбор модели нуклеотидных замен, а также эволюционные построения

выполнены в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) на основе байесовского информационного критерия BIC (Guindon, Gascuel, 2003; Darriga et al., 2012). Эволюционные дистанции получены методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) с использованием 3-параметрической модели Тамура (Tamura, 1992), консенсусное ML дерево построено с бутстреп-поддержкой в 1000 репликаций (Felsenstein, 1985). Эволюционные построения выполнены также в программе MrBayes (BI), версия v.3.2.6 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al.,

Таблица 2. Содержание GC-состава (%) в последовательностях ITS-региона у видов *Nitraria*

Вид	ITS1		ITS2		ITS		G+C среднее
	G	C	G	C	G	C	
<i>N. schoberi</i>	24.8	39.3	31.7	31.7	27.8	32.9	62.7
<i>N. komarovii</i>	24.8	39.3	31.7	31.7	27.8	32.9	62.7
<i>N. sibirica</i>	24.8	31.7	31.4	31.4	27.6	30.7	59.2

2012) на основе типа эволюционной модели – GTR с гамма-распределением для аппроксимации скорости замены нуклеотидов. Установленные параметры MCMC цепи: число поколений – 10000000 с частотой сэмплирования каждое тысячное поколение. ВІ деревья визуализированы в программе FigTree версии v. 1.4.3. В качестве внешней группы использован вид *Peganum harmala* L. (GenBank NCBI: KX282320), близкородственный роду *Nitraria*. Границы спейсера ITS2 определены путем сопоставления полученных нами последовательностей ITS с этими же фрагментами, депонированными в GenBank NCBI (*N. schoberi*: KP087771.1; *N. sibirica*: DQ267178.1).

Результаты и обсуждение

Для изучения генетической изменчивости фрагмента ITS проведен анализ 33 нуклеотидных последовательностей ITS *Nitraria*, принадлежащих трем видам – *N. schoberi*, *N. sibirica*, *N. komarovii*. Общая длина амплифицируемого фрагмента ITS после выравнивания составляет 577 п. н., из которых 558 п. н. консервативны, а 19 п. н. представляют собой полиморфные сайты или точечные мутации: 17 – филогенетически информативные, 2 – уникальные замены. Регион ITS видов рода *Nitraria* изучался ранее для решения вопросов филогении (Temirbayeva, Zhang, 2015), однако сведения о нуклеотидной изменчивости этих фрагментов приводятся впервые нами.

Регион ITS1-5.8S-ITS2 у изученных видов *Nitraria* содержит 17 однонуклеотидных замен (ОНЗ). В межгенном спейсере ITS1 выявлено 11 ОНЗ, все замены являются транзициями (С/Т). Ген 5.8S состоит из 157 п. н. и ожидается консервативен. Спейсер ITS2 содержит 273–274 п. н. и отличается большей консервативностью, чем ITS1. Всего в ITS2 у изученных образцов выявлено 5 филогенетически информативных ОНЗ (4 транзиции: С/Т, G/A, 1 трансверсия: G/C), 1 однонуклеотидная делеция/инсерция (Т/–), 2 уникальных замены (см. табл. 1). Среднее значение содержания G+C составляет 61.5 % и варьирует от 59.2 до 62.7 % (табл. 2). В целом величина содержания GC-состава ниже у *N. sibirica* (59.2 %), чем у *N. schoberi* и *N. komarovii* (62.7 %).

Все транзиции в ITS1 четко отделяют *N. sibirica* от видов *N. schoberi* и *N. komarovii*, при этом различий между *N. schoberi* и *N. komarovii* не выявлено; также в этой части генома у изученных образцов не наблюдается внутривидового полиморфизма. В ITS2 выявлены как видоспецифические полиморфизмы, отличающие *N. sibirica* от двух других видов, так и внутривидовая изменчивость образцов *N. sibirica*.

Известно, что спейсер ITS2 предлагается в качестве ДНК-баркода для идентификации растений (Feng et al.,

2016). В сравнении с полноразмерным фрагментом ITS, более короткий ITS2 является подходящим молекулярным маркером, дискриминирующим виды, из-за низкой межвидовой изменчивости и одновременно выраженной внутривидовой вариабельности. Полученные результаты показали, что межгенный спейсер ITS2 отличается у *N. sibirica* и *N. schoberi* и *N. komarovii* на 6 позиций (5 ОНЗ и 1 однонуклеотидная делеция/инсерция). Среднее генетическое расстояние (*p*-distance) между видами *N. schoberi* и *N. sibirica* по последовательностям ITS1 составляет 0.092, что сопоставимо с хорошо различимыми видами. Так, например, для подсекций и видов *Dendrobium* среднее значение *p*-distance, рассчитанное по региону ITS, варьирует от 0.069 до 0.112 (Srikulnath et al., 2015). Для *N. sibirica* и *N. schoberi* были выявлены также межвидовые различия по комплексу фенольных соединений (Банаев и др., 2015) и показана видоспецифичность метрических и качественных морфологических признаков (Банаев и др., 2017).

Филогенетические деревья, построенные как отдельно по спейсерам ITS1 и ITS2, так и отдельно по полноразмерному ITS-региону и спейсеру ITS2, оказались конгруэнтны. Полученные ML и ВІ филогенетические деревья имеют ветви с высокими бутстреп-индексами и в целом согласуются с морфологией и систематикой рода *Nitraria*. В то же время в ходе исследования филогении рода *Nitraria* на основе анализа объединенных данных последовательностей ITS и фрагментов хлоропластной ДНК (6 генов) (Temirbayeva, Zhang, 2015) виды *N. schoberi*, *N. sibirica* и *N. komarovii* сгруппировались в одну кладу вместе с австралийским видом *N. billardieri* DC. При этом более близко расположились *N. komarovii*, *N. billardieri* и *N. sibirica*.

В нашем исследовании сравнение топологий ML и ВІ деревьев (рис. 1 и 2) свидетельствует о сходстве *N. schoberi* и *N. komarovii* и о сложной внутривидовой дифференциации *N. sibirica*.

Виды *N. schoberi* и *N. komarovii*, имеющие одинаковые последовательности ITS, образуют одну отдельную кладу и, соответственно, один риботип – Н1 (см. табл. 1). Исключение составляет образец *N. schoberi* Lepsy из Казахстана, характеризующийся наличием уникальной замены в позиции 71 спейсера ITS2 (см. табл. 1).

Вид *N. sibirica* на ML дереве образует две субклады, а на ВІ дереве – три субклады. От образцов *N. schoberi* и *N. komarovii* один из риботипов (Н3) *N. sibirica* отличается шестью ОНЗ, что очевидно указывает на самостоятельный таксономический ранг этих популяций. Это же подтверждает и среднее межгрупповое генетическое расстояние, которое составляет 0.024 и одинаково как для группы Н1/Н2, так и для Н1/Н4. Риботипы Н2, Н3, Н4,

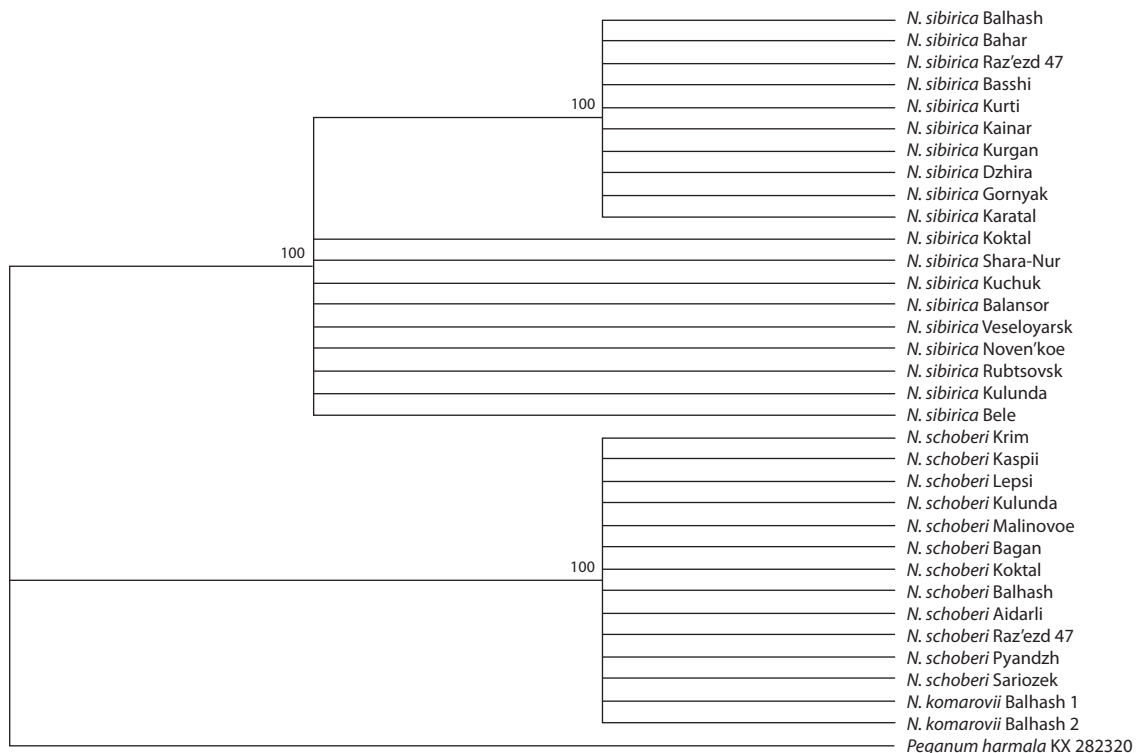


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения последовательностей спейсера ITS2 у образцов *Nitraria* методом максимального правдоподобия.

В ветвях указаны название вида и место сбора исследованного образца.

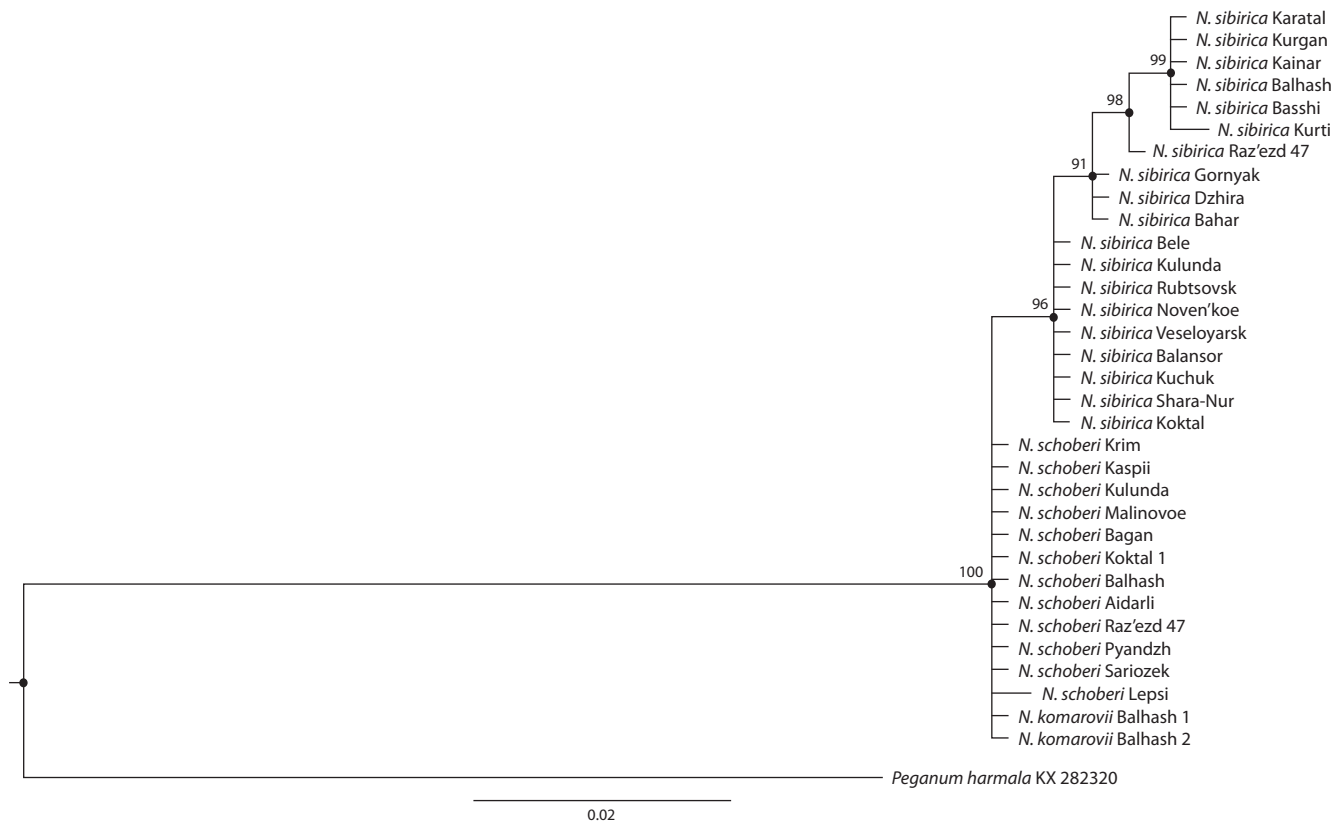


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения последовательностей спейсера ITS2 у образцов *Nitraria* байесовским (BI) методом.

В ветвях указаны название вида и место сбора исследованного образца.

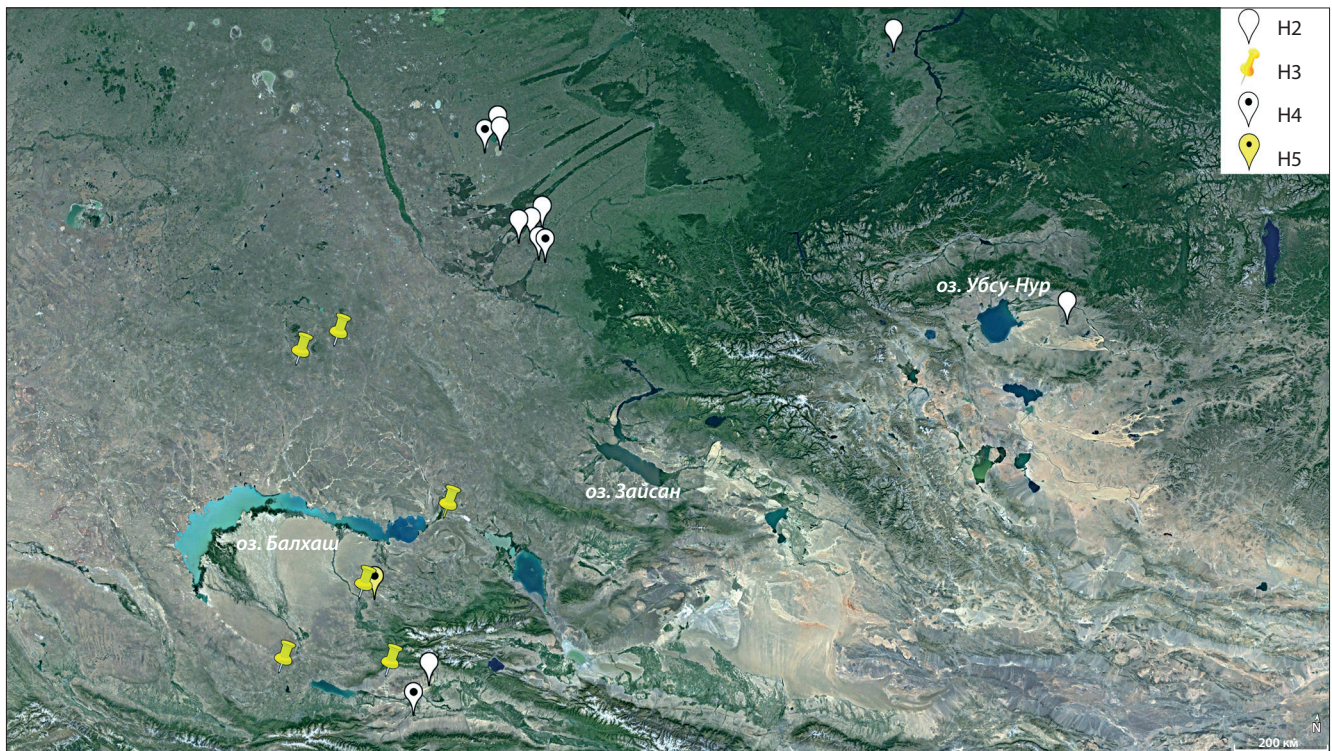


Рис. 3. Распространение риботипов *N. sibirica* (H2, H3, H4, H5).

принадлежащие *N. sibirica*, различаются между собой одной-тремя ОНЗ. Каждый из риботипов H5, H6, H7 имеет одну точечную мутацию.

Полученные результаты по внутривидовой дифференциации *N. sibirica* позволяют разделить образцы этого вида на два основных риботипа: основной сибирский *sibirica*-риботип (H2) и основной казахстанский *sibirica*-риботип (H3) (рис. 3).

Риботип H2 характерен для сибирских популяций *N. sibirica* – Алтайский край (Кулундинская степь), Хакасия и Тыва. Риботип H4, отличающийся одной однонуклеотидной заменой от основного сибирского *sibirica*-риботипа, тоже характерен для популяций, произрастающих преимущественно в Кулунде. Исключение составляют две популяции *N. sibirica* из Юго-Восточного Казахстана на границе с Китаем – Коктал и Бахар, где обнаружены сибирский *sibirica*-риботип (H2) и близкий к нему риботип H4.

Основной казахстанский *sibirica*-риботип (H3) распространен в Или-Балхашском регионе (бассейны рек Или, Каратал, Аягуз) и Казахском мелкосопочнике. Риботип H5, близкий к риботипу H3 (см. рис. 3), и риботип H7 (не приведен на рис. 3) обнаружены также в регионе распространения основного казахстанского *sibirica*-риботипа.

Географические особенности распространения риботипов *N. sibirica* и наличие существенных различий между основными сибирским и казахстанским *sibirica*-риботипами (три ОНЗ) свидетельствуют о существенных межпопуляционных различиях и таксономической неоднородности *N. sibirica*. Вероятнее всего, в настоящее время продолжаются процессы гомогенизации рибосомной ДНК образцов *N. sibirica*, происхождение которых связано с гибридизацией и видообразованием (Rauscher

et al., 2003; Xu et al., 2017; Ефимова и др., 2019). Более ранние исследования также показали, что популяции *N. sibirica* неоднородны и дифференцируются в отдельные группы согласно эколого-географическим особенностям и градиенту высоты над уровнем моря по комплексу фенольных соединений (Банаев и др., 2015).

Заключение

Полученные результаты сравнительного анализа нуклеотидной изменчивости региона ITS демонстрируют надежность спейсера ITS2 как молекулярно-генетического маркера в идентификации видов рода *Nitraria*. В случае сложной морфологической идентификации образцов *Nitraria* может быть достаточно проведения генетического анализа изменчивости короткого спейсера ITS2. Однако следует отметить, что регион ITS не всегда может полностью разрешить все таксономические вопросы. Так, в нашем исследовании виды *N. schoberi* и *N. komarovii* имеют идентичные последовательности ITS. Трудности в интерпретации полученных данных могут быть связаны и с множественными копиями ITS, являющимися паралогами или ортологами. Ответы на дальнейшие вопросы, связанные с таксономией и эволюцией видов рода *Nitraria*, можно получить выявлением этих гомологов путем клонирования фрагментов ITS, а также с привлечением дополнительных генетических маркеров хлоропластного генома. Кроме того, выявленные видоспецифические генетические полиморфизмы в регионе ITS у исследованных видов *Nitraria* позволят в дальнейшем подобрать рестриктазы и таким образом упростить и удешевить способ получения паттернов генетической изменчивости близкородственных таксонов *Nitraria*.

Список литературы / References

- Банаев Е.В., Воронкова М.С., Высочина Г.И., Томошевич М.А. Популяционная структура и дифференциация сибирских представителей рода *Nitraria* L. (Nitrariaceae) по составу и содержанию фенольных соединений в листьях. *Сиб. экол. журн.* 2015;6:890-898. DOI 10.15372/SEJ20150609.
- [Banaev E.V., Voronkova M.S., Vysochina G.I., Tomoshevich M.A. Population structure and differentiation of the Siberian representatives of the genus *Nitraria* L. (Nitrariaceae) based on the composition and content of phenolic compounds in leaves. *Contemp. Probl. Ecol.* 2015;8(6):735-742. DOI 10.1134/S1995425515060025.]
- Банаев Е.В., Томошевич М.А., Ямтыров М.Б. Об изменчивости метрических и качественных признаков видов рода *Nitraria* L. в связи с эколого-климатическими условиями местообитаний Сибири. *Сиб. экол. журн.* 2017;6:746-757. DOI 10.15372/SEJ20170607.
- [Banaev E.V., Tomoshevich M.A., Yamtyrov M.B. Variability of metric and qualitative traits of *Nitraria* species in relation to ecological and climatic conditions of Siberian habitats. *Contemp. Probl. Ecol.* 2017;10(6):664-673. DOI 10.1134/S1995425517060038.]
- Ефимова А.П., Полякова Т.А., Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Политов Д.В. Морфологические и молекулярно-генетические свидетельства межвидового гибрида *Salix* × *zhataica* (Salicaceae) из Центральной Якутии. *Генетика.* 2019;55(5):524-530. DOI 10.1134/S0016675819050059.
- [Efimova A.P., Poliakova T.A., Belokon M.M., Belokon Y.S., Politov D.V. Morphological and molecular genetic verification of interspecific hybrid *Salix* × *zhataica* (Salicaceae) from Central Yakutia. *Russ. J. Genet.* 2019;55(5):551-556. DOI 10.1134/S1022795419050053.]
- Коропачинский И.Ю. Арборифлора Сибири. Новосибирск, 2016. [Koropachinskii I.Y. Tree Flora of Siberia. Novosibirsk, 2016. (in Russian)]
- Муратова Е.Н., Горячкина О.В., Банаев Е.В. Кариологическое изучение сибирских видов *Nitraria* L. (Nitrariaceae). *Turczaninowia.* 2013;16(4):50-54. DOI 10.14258/turczaninowia.16.4.9.
- [Muratova E.N., Goryachkina O.V., Banaev E.V. Karyological studies on Siberian species of *Nitraria* L. (Nitrariaceae). *Turczaninowia.* 2013;16(4):50-54. DOI 10.14258/turczaninowia.16.4.9. (in Russian)]
- Пешкова Г.А. Семейство Nitrariaceae – Селитрянковые. В: Флора Сибири. Новосибирск, 1996;10:34-35.
- [Peshkova G.A. Family Nitrariaceae. In: Flora of Siberia. Novosibirsk, 1996;10:34-35. (in Russian)]
- Полякова Т.А., Шатохина А.В., Ширманов М.В., Бондаренко Г.Н. Оценка таксономических отношений у сибирских представителей секции *Chamaedryon* Ser. рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) на основе анализа нуклеотидного полиморфизма ITS-региона. В: Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. науч. статей по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф., 25–29 мая 2015 года, г. Барнаул. Барнаул, 2015;353-358.
- [Polyakova T.A., Shatokhina A.V., Shirmanov M.V., Bondarenko G.N. Assessment of taxonomy relationships among the Siberian representatives of *Spiraea* L. (section *Chamaedryon* Ser., Rosaceae Juss.) based on the ITS sequence polymorphism. In: Problems of Botany of South Siberia and Mongolia: Proceedings of the 14th Scientific and Practical Conference, May 25–29, 2015, Barnaul. Barnaul, 2015;353-358. (in Russian)]
- Родионов А.В., Гнутиков А.А., Коцинин А.Р., Коцеруба В.В., Носов Н.Н., Пунина Е.О., Райко М.П., Тюпа Н.Б., Ким Е.С. Последовательность ITS1–5.8S рДНК–ITS2 в генах 35S рРНК как маркер при реконструкции филогении злаков (сем. Poaceae). *Успехи соврем. биологии.* 2016;136(5):419-437.
- [Rodionov A.V., Gnutikov A.A., Kotsinyan A.R., Kotscheruba V.V., Nosov N.N., Punina E.O., Raiko M.P., Tyupa N.B., Kim E.S. Sequence ITS1–5.8S rDNA–ITS2 in 35S rRNA genes as a marker in grass (Poaceae) molecular phylogeny. *Uspekhi Sovremennoy Biologii* = *Advances in Current Biology.* 2016;136(5):419-437. (in Russian)]
- Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений. *Генетика.* 2009;45(11):1436-1448.
- [Schneyer V.S. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russ. J. Genet.* 2009;45(11):1267-1278. DOI 10.1134/S1022795409110027.]
- Шнеер В.С., Родионов А.В. ДНК-штрихкоды растений. *Успехи соврем. биологии.* 2018;138(6):531-538. DOI 10.7868/S0042132418060017.
- [Schneyer V.S., Rodionov A.V. Plant DNA barcodes. *Uspekhi Sovremennoy Biologii* = *Advances in Current Biology.* 2018;138(6):531-538. DOI 10.7868/S0042132418060017. (in Russian)]
- Banaev E.V., Tomoshevich M.A., Ak-Lama T.A. Nitrariaceae. In: Marhold K., Breitwieser I. IAPT Chromosome Data 27. *Taxon.* 2018; 67(5):1042. DOI 10.12705/675.24.
- Bolson M., Smidt E.C., Brotto M.L., Silva-Pereira V. ITS and *trnH-psbA* as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143049. DOI 10.1371/journal.pone.0143049.
- CBOI Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106:12794-12797.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772. DOI 10.1038/nmeth.2109.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12:12-15.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783-791.
- Feng Sh., Jiang M., Shi Yu., Jiao K., Shen Ch., Lu J., Ying Q., Wang H. Application of the ribosomal DNA ITS2 region of *Physalis* (Solanaceae): DNA barcoding and phylogenetic study. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1047. DOI 10.3389/fpls.2016.01047.
- Gao T., Yao H., Song J., Zhu Y., Liu C., Chen S. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evol. Biol.* 2010;10:324. DOI 10.1186/1471-2148-10-324.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 1999;41:95-98.
- Hollingsworth P.M. Refining the DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(49):19451-19452. DOI 10.1073/pnas.1116812108.
- Guindon S., Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 2003;52: 696-704.
- Kovtonyuk N.K., Tomoshevich M.A., Banaev E.V. Typification of the name *Nitraria komarovii* (Nitrariaceae). *Bot. Pac.* 2019;8(2):115-118. DOI 10.17581/bp.2019.08210.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096.
- Li D.Z., Gao L.M., Li H.T., Wang H., Ge X.J., Liu J.Q., Chen Z.D., Zhou S.L., Chen S.L., Yang J.B., Fu C.X., Zeng C.X., Yan H.F., Zhu Y.J., Sun Y.S., Chen S.Y., Zhao L., Wang K., Yang T., Duan G.W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(49):19641-19646. DOI 10.1073/pnas.1104551108.
- Potter D., Still S.M., Grebenc T., Ballian D., Božič G., Franjčič J., Kraigher H. Phylogenetic relationships in tribe *Spiraeae* (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data. *Plant Syst. Evol.* 2007;266:105-118. DOI 10.1007/s00606-007-0544-z.
- Rauscher J.T., Doyle J.J., Brown A.H.D. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Gly-*

- cine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex. *Mol. Ecol.* 2003; 11(12):2691-2702. DOI 10.1046/j.1365-294X.2002.01640.x.
- Ren B.Q., Xiang X.G., Chen Z.D. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Mol. Ecol. Resour.* 2010;10(4):594-605. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02815.x.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19(12):1572-1574. DOI 10.1093/bioinformatics/btg180.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 2012;61(3):539-542. DOI 10.1093/sysbio/sys029.
- Song J., Shi L., Li D., Sun Y., Niu Yu., Chen Z., Luo H., Pang X., Sun Z., Liu Ch., Lv A., Deng Y., Larson-Rabin Z., Wilkinson M., Chen Sh. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *PLoS One.* 2012;7(8):e43971. DOI 10.1371/journal.pone.0043971.
- Srikulnath K., Sawasdichai S., Jantapanon T.K., Pongtongkam P., Peyachoknagul S. Phylogenetic relationship of *Dendrobium* species in Thailand inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *Hort. J.* 2015. DOI 10.2503/hortj.MI-028.
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 1992;9:678-687.
- Temirbayeva K., Zhang M.-L. Molecular phylogenetic and biogeographical analysis of *Nitraria* based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Plant Syst. Evol.* 2015;301:1897-1906. DOI 10.1007/s00606-015-1202-5.
- Tomoshevich M.A., Banaev E.V., Ak-Lama T.A. *Nitraria komarovii* Iljin & Lava ex Bobrov (Nitrariaceae), a new record for the flora of Kazakhstan. *Check List.* 2019;15(5):891-897. DOI 10.15560/15.5.891.
- Wang X.-Y., Zheng S.-H., Liu Y., Han J.-P. ITS2, a better DNA barcode than ITS in identification of species in *Artemisia* L. *Chin. Herb. Med.* 2016;8(4):352-358. DOI 10.1016/S1674-6384(16)60062-X.
- Xu B., Zeng X.-M., Gao X.-F., Jin D.-P., Zhang L.-B. ITS non-concerted evolution and rampant hybridization in the legume genus *Lespedeza* (Fabaceae). *Sci. Rep.* 2017;7:e40057. DOI 10.1038/srep40057.
- Zhang Zh.-L., Song M.-F., Guan Y.-H., Li H.-T., Niu Y.-F., Zhang L.-X., Ma X.-J. DNA barcoding in medicinal plants: testing the potential of a proposed barcoding marker for identification of *Uncaria* species from China. *Biochem. Syst. Ecol.* 2015;60:8-14. DOI 10.1016/j.bse.2015.02.017.

ORCID ID

T.A. Poliakova orcid.org/0000-0002-8258-127X
E.V. Banaev orcid.org/0000-0003-1314-8429
M.A. Tomoshevich orcid.org/0000-0002-0307-5919

Благодарности. Исследование выполнено в рамках проекта VI.52.1.2 «Анализ внутривидовой структуры ресурсных растений Азиатской России, отбор и сохранение генофонда» (номер государственной регистрации АААА-А17-117012610054-6) и по теме государственного задания «Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции» (№ 0112-2020-0001).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.04.2020. После доработки 10.06.2020. Принята к публикации 29.06.2020.

Приоритетные направления и перспективы селекции ежевики в условиях средней полосы России

Л.А. Грюнер , Б.Б. Корнилов

Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, д. Жилина, Орловский район, Орловская область, Россия

 e-mail: gruner1@rambler.ru

Аннотация. В обзоре обосновывается возможность и целесообразность селекции ежевики в центральной части России, где она является востребованной, но малораспространенной в садоводстве ягодной культурой. Значительные достижения мировой селекции, давшие современным сортам большой набор хозяйственно важных качеств, растущий интерес к культуре во всем мире, в том числе у российских садоводов, делают актуальной работу с ежевикой и как с объектом селекции, и как с перспективным садовым растением. Однако недостаточные морозо- и зимостойкость основной массы сортов этой культуры создают определенные трудности при выращивании ее в зонах с холодными зимами, к которым относится средняя полоса России. Расширение рынка ягодной продукции тоже предъявляет все более высокие требования к комплексу хозяйственных показателей новых сортов, в первую очередь к качеству плодов ежевики. В связи с этим улучшение имеющегося сортимента культуры, повышение его адаптивных свойств и товарных качеств ягод – настоящие задачи для селекционеров при создании новых сортов. Актуальность селекции диктуется также тем, что в России отечественный сортимент ежевики представлен всего одним сортом – Агатова, полученным в южном регионе и адаптированным прежде всего к нему. Для центральной же зоны страны сорта не создавались (за исключением ограниченных опытов И.В. Мичурина, проведенных около ста лет назад). Поэтому выведение адаптированных сортов ежевики в климатических условиях этого региона может оказаться перспективным. Не исключается также возможность выращивания здесь (при укрытии на зиму) уже созданных за рубежом сортов, которые могут давать при правильной агротехнике хороший промышленный урожай, что подтверждает практика любительского и фермерского садоводства, а также выполненные научные исследования. Цель данной работы – на основании анализа результатов зарубежных и отечественных исследований обозначить ведущие направления селекции ежевики, важнейшие в условиях средней полосы России, показать перспективность создания новых сортов этой ценной культуры в указанной климатической зоне. Анализ мировых тенденций и опыта в селекции и сортоизучении ежевики, а также результаты собственных исследований культуры, проведенных в условиях Орловской области, позволяют считать перспективной и целесообразной работу по совершенствованию сортимента этого растения в средней полосе России. Все приоритетные направления селекции ежевики, обозначенные в зарубежных и отечественных селекционных программах (зимостойкость, высокое качество плодов в свежем и переработанном виде, правильная форма ягод, крупный их размер, необходимые значения биохимического состава, высокая продуктивность растений, бесшипность побегов, высокая устойчивость к болезням и вредителям), актуальны и для данного региона нашей страны; при этом важнейшим направлением является в настоящее время создание сортов с высокой зимостойкостью.


Ключевые слова: ежевика; селекция; направления и приоритеты селекции; средняя полоса России.

Для цитирования: Грюнер Л.А., Корнилов Б.Б. Приоритетные направления и перспективы селекции ежевики в условиях средней полосы России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):489-500. DOI 10.18699/VJ20.641

Priority trends and prospects of blackberry breeding in conditions of Central Russia

L.A. Gruner , B.B. Kornilov

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Zhilina, Orel district, Orel region, Russia

 e-mail: gruner1@rambler.ru

Abstract. This overview substantiates the possibility and expediency of blackberry breeding in Central Russia, where it is in demand, but not widespread in horticulture. Significant achievements of world breeding, which gave modern cultivars a large set of economically important qualities and growing interest in it all over the world, including Russian gardeners, make it relevant to work with blackberries as an object of selection, and as a promising garden plant. However, insufficient frost and winter hardiness of the bulk of the cultivars of this culture cause certain difficulties when growing it in the areas with cold winters to which the Central zone of Russia belongs. The expansion of the market of berry products also imposes increasingly high requirements on the complex of economic

indicators of new cultivars, primarily the quality of blackberry fruit. In this regard, improving the existing range of varieties of the culture, increasing its adaptive properties and commodity qualities of berries are urgent tasks for breeders when creating new cultivars. The relevance of blackberry breeding is also dictated by the fact that in Russia its domestic range of varieties is represented by only one modern cultivar obtained in the southern region and adapted, first of all, to it. For the Central zone of the country, the cultivars of this plant have not been developed (except for the limited experiments of I.V. Michurin conducted almost 100 years ago). Therefore, the breeding of adapted cultivars of the culture in the climatic conditions of this region may be promising. It is also possible to grow here (with shelter for the winter) the cultivars already created abroad that can give with the right agricultural technology a good industrial harvest, which is confirmed by the practice of amateur and farm gardening, as well as scientific research. The purpose of this work is to designate the leading directions of blackberry breeding, the most important in the conditions of Central Russia and to show prospects of the development of new cultivars of this valuable culture in the specified climatic zone. The analysis of world trends and experience in the blackberry breeding and variety study, as well as the results of our own research of the culture conducted in the Orel region, allow us to consider it promising and relevant to work on improving the range of varieties of this plant in Central Russia. All priority areas of blackberry breeding, indicated in foreign and domestic breeding programs (winter hardiness, high quality of fresh and processed fruit, the correct shape of berries, their large size, the necessary values of biochemical composition, high productivity of plants, thornless shoots and high resistance to diseases and pests), are relevant for this region of our country, while high winter hardiness is currently the most important of them.

Key words: blackberries; breeding, trends and priorities of breeding; Central Russia.

For citation: Gruner L.A., Kornilov B.B. Priority trends and prospects of blackberry breeding in conditions of Central Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):489-500. DOI 10.18699/VJ20.641

Введение

В последние годы все большее внимание уделяется мало-распространенным на территории России ягодным культурам, таким как актинидия, голубика, ежевика, жимолость, калина, облепиха и др., которые способны значительно расширить ассортимент ягодной продукции и обогатить рацион питания населения полезными веществами, представляя при этом немалый коммерческий интерес. Плоды их служат богатым источником ценных для организма человека веществ (микро- и макроэлементов, витаминов), в том числе антиоксидантного действия. Содержание этих веществ у них нередко выше, чем у традиционно выращиваемых в большинстве регионов земляники, малины, смородины черной и др., или находится на том же уровне (Помология..., 2014), что подтверждает важность активного вовлечения сортов таких растений в практику садоводства.

Среди культур указанной группы существенный интерес представляет ежевика, которая со временем может занять достойную нишу в российском ягодоводстве, как это произошло в ряде стран мира (Strik et al., 2008; Strik, Finn, 2012), где она находится в числе лидирующих ягодных растений (Clark, Finn, 2011, 2014; Finn, Clark, 2012).

Ежевика плодоносит после большинства других ягодных культур, существенно продлевая конвейер витаминной продукции в регионах выращивания. Плоды ее содержат значительное количество важных биологически активных компонентов антиоксидантного комплекса (Грюнер, Анিকেенко, 1995; Connor et al., 2005; Колбас и др., 2012; Milošević et al., 2012; Lee, 2017), участвующих во многих процессах метаболизма человека (Колбас и др., 2012). Их количество составляет: от 500 до 900 мг/100 г Р-активных веществ-флавоноидов (в том числе от 17 до 30 мг/100 г эллаговой кислоты и 85–390 мг/100 г эллаготанинов), от 10 до 50 мг/100 г аскорбиновой кислоты, около 0.6 мг/100 г каротиноидов. Кроме того, в состав ягод ежевики входит от 5 до 14 % сахаров (преимущественно глюкозы и фруктозы), до 1.3 % органических

кислот, а также существенное количество важных для здоровья людей минеральных макро- и микроэлементов (в пересчете на сухую массу): фосфора (до 254 мг/100 г), кальция (~283 мг/100 г), магния (до 315 мг/100 г), железа (до 11 мг/100 г) и др. Приятный своеобразный вкус и тонкий аромат крупных черных плодов в сочетании с перечисленными компонентами химического состава делают эту культуру привлекательной для садоводов и многочисленных потребителей ягод в различных регионах нашей страны. О востребованности и в то же время дефиците ежевики на рынке садовой продукции России, в том числе средней полосы, косвенно свидетельствуют высокие цены на плоды и посадочный материал сортов.

Улучшенные за годы селекции показатели урожайности (до 20 т/га) (Clark et al., 2019), высокие самоплодность (Грюнер, 2019) и устойчивость многих современных сортов к наиболее опасным болезням и вредителям (Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012), хорошая восстановительная способность после различных повреждений (Грюнер, 2019), относительная простота вегетативного размножения (Подорожный, Романова, 2010; Князев и др., 2012), отзывчивость на формировку кустов (Clark, Finn, 2011; Takeda et al., 2013), бесшипность новых сортов позволяют выращивать ежевику без особых проблем. Определенная уязвимость этой пластичной садовой культуры связана с пониженной зимостойкостью почти всех ее сортов в регионах с холодными и продолжительными зимами, особенно при неустойчивом снеговом покрове, к которым относится средняя полоса России (Якимов, 2010; Евдокименко, Кулагина, 2015; Грюнер, 2019). Поэтому интродукция ежевики в эти климатические условия сопряжена с соответствующими трудностями, которые могут быть преодолены двумя путями: селекционным и технологическим, а также их сочетанием.

Селекция ежевики в мире прошла длительный исторический путь (Darrow, 1937; Шумейкер, 1958; Оурецки, 1981; Витковский, 2003; Clark, Finn, 2011, Finn, Clark, 2012), итогом которого стали многочисленные (несколько

сотен) высокопродуктивные сорта (Оурецки, 1981; Якимов, 2010; Clark et al., 2012; Finn, Clark, 2012). Современный сортимент культуры с комплексом ценных свойств позволяет использовать его как исходный материал для дальнейшей селекции, улучшать отдельные качества или привносить дополнительные без потери остальных. Это делает перспективной селекцию растения, в том числе в условиях центра нашей страны, где не так много, как на юге, разнообразных конкурирующих культур, дающих плоды высокого качества. Обнадеживающими в плане продвижения ежевики на север являются уже полученные положительные результаты по ее селекции на зимостойкость в США и некоторых европейских странах (Danek, Kolodziejczak, 1993; Stanisavljevic, 1999; Danek, Orzeł, 2004; Clark et al., 2012; Clark, 2013; Orzeł et al., 2016).

Орловская область, в которой проводится данная работа, обладает сочетанием климатических факторов вегетационного периода (Агроклиматический справочник..., 1960), в большинстве случаев благоприятных для роста, развития и плодоношения ежевики (Грюнер, 2019). Успех селекции ежевики, как и других плодовых и ягодных культур, в любой климатической зоне определяется, прежде всего, наличием хорошего исходного материала и правильностью выбора приоритетных направлений, которые должны базироваться на уже достигнутых мировых результатах и соответствовать им.

1. Таксономическая принадлежность, важнейшие для селекции виды и некоторые морфобиологические особенности ежевики

Ежевика входит в род *Rubus* L., подрод *Eubatus* Focke (= *Rubus* Watson), насчитывающий в мировой флоре, по свидетельству разных авторов, от 132 (Focke, 1910) до 200 видов и более (Розанова, 1937; Витковский, 2003) и имеющий значительное количество межвидовых форм. О сложности систематики дикорастущей ежевики упоминал известный исследователь этого растения С.В. Юзепчук (1941). В рамках данного подрода широко распространена естественная полиплоидность, представленная полиплоидным рядом форм, имеющих наборы хромосом от $2x$ ($2n = 14$) до $12x$ ($2n = 84$) с основным числом $x = 7$, включая анеуплоиды разного уровня ploidy. При этом такие ряды могут встречаться и в пределах некоторых видов (Розанова, 1937; Оурецки, 1981; Clark, Finn, 2011). Размер хромосом ежевики составляет 1–4 мкм (Clark, Finn, 2011). У культивируемых сортов полиплоидные ряды тоже имеют место, с преобладанием тетраплоидов (Thompson, 1995; Clark, Finn, 2011).

Родоначалниками большинства сортов подрода *Eubatus* стали дикорастущие виды Северной Америки и Европы (Розанова, 1937; Витковский, 2003). Наиболее значимыми при создании сортов ежевики оказались такие североамериканские виды, как: *R. allegheniensis* Porter, *R. argutus* Link. и *R. canadensis* L. (давшие начало первым пряморослым и наиболее зимостойким сортам Agawam, Jumbo, Lawton, Snyder, Erie и др.), *R. ursinus* Cham. & Schlecht., *R. macropetalus* Dougl. и *R. loganobaccus* Bailey (важнейшие виды, от которых получены лучшие стелющиеся сорта ежевики и малино-ежевичные гибриды Logan, Young, Boysen и др.), *R. laciniatus* Willd. (от его бес-

шипной химеры получен известный сорт Thornless Evergreen), *R. trivialis* L. (одна из родительских форм пряморослого засухоустойчивого сорта Brazos, активно использовавшегося при создании современных сортов), *R. ulmi-folius* Schott. (от него получен тетраплоидный источник рецессивного гена бесшипности – сорт Merton Thornless) (Darrow, 1937; Clark, Finn, 2011) и др. Видовую принадлежность современных сортов определить, как правило, невозможно или очень сложно, так как в их геномах часто присутствует геноплазма нескольких видов и их гибридных потомков, а также различных по происхождению сортов, что, в свою очередь, усложняется полиплоидностью и связанной с ней гетерозиготностью культуры (Розанова, 1937; Оурецки, 1981; Clark, Finn, 2011).

Цветки ежевики обычно обоеполые, но встречаются и двудомные виды (например, *R. ursinus* в США). Самоопыляемость хорошая, однако успешно проходит и перекрестное опыление. Окраска венчика варьирует от чисто-белой до ярко-розовой. Тычинки и пестики многочисленные. Плод – сборная костянка, с окраской от темно-вишневого или синего до почти черного цвета, иногда с сизым налетом, при созревании отделяющийся от чашечки вместе со съедобным плодоложем. Количество костянок в нем может варьировать от нескольких штук у дикорастущих видов и форм (например, *R. caesius* L.) до полутора сотен у современных сортов (как у сорта Natchez). Завязываемость костянок высокая, обеспечиваемая нередко факультативным апомиксисом (псевдогамией), свойственным полиплоидным формам подрода *Eubatus* при различных видах опыления (Оурецки, 1981). Цветки и плоды в количестве от нескольких штук до нескольких десятков собраны в кисти.

В России наибольшее количество дикорастущих видов ежевики (около 40) распространено на Кавказе. В условиях средней полосы нашей страны преобладают всего два вида – *R. caesius* L. со стелющимися побегами и *R. nensensis* W. Hall с пряморослыми побегами (Юзепчук, 1941; Гроссгейм, 1952).

Растение представляет собой полукустарник с многолетней подземной частью (разветвленное корневище с отходящими от него придаточными корнями и почками, из которых вырастают побеги) и надземной, состоящей из стеблей двух типов: генеративных двулетних и вегетативных побегов текущего года (однолетних). После созревания урожая стебли второго года жизни отмирают. Существуют также ремонтантные формы, закладывающие генеративные органы и плодоносящие на побегах текущего года.

Выделяют три-четыре основные морфологические группы ежевики, различающиеся характером роста и способом естественного вегетативного размножения (Грюнер, 2014; Finn, Strik, 2014). К группе пряморослой ежевики относятся сорта и формы, обладающие вертикально растущими побегами, сдержанным, рано завершающимся (в средней полосе России до начала августа) ростом. Естественный способ вегетативного размножения у них – корневыми отпрысками (как у красной малины *R. idaeus* L.). Растения группы стелющейся ежевики обладают затяжным ростом, длинными (до 3–8 м) побегами различной толщины, которые к концу вегетации рост замедляют, но не прекращают,

а в зоне верхушки образуют участок ризогенеза с редуцированными листьями, укореняющийся при благоприятных условиях. Представители групп с промежуточным характером роста – полупряморослые и полустелющиеся – завершают или существенно замедляют рост после пряморослых, но раньше стелющихся форм (в средней полосе России это начало сентября). Учитывая, что последние две группы сходны между собой, в зарубежной литературе их обычно объединяют, называя *semirect* – полупряморослые (Finn, Strik, 2014).

2. Состояние селекции ежевики в России

В нашей стране селекция ежевики находится сейчас на начальном этапе своего пути, несмотря на обилие дикорастущих видов и форм, особенно в южных регионах, где они давно могли бы служить исходным материалом для селекции, но вызывали интерес в основном как ботанические ресурсы (Юзепчук, 1941; Гроссгейм, 1952). В начале прошлого столетия на растение как объект селекции всерьез обратил внимание известный селекционер и садовод-опытник И.В. Мичурин (1949), отобравший в результате посева семян от свободного опыления американских сортов несколько перспективных сеянцев, ставших впоследствии сортами и получивших признание в любительском садоводстве. Но в дальнейшем эти сорта сохранялись главным образом в коллекциях научных учреждений, так как растения имели шиповатые побеги, обладали невысокой зимостойкостью и поражались болезнями (сорта Изобильная, Техас).

Крупные отечественные труды, посвященные ежевике и ее сортам, созданным к тому времени в мире, были опубликованы в 1930-х гг. (Бологовская, 1934; Розанова, 1937). Позднее вышли переводные иностранные издания с подробной информацией об этой культуре (Шумейкер, 1958; Оурецки, 1981; и др.). В 1950–1970-х и в последующие годы коллекции дикорастущих видов и некоторых зарубежных сортов были собраны на Майкопской (основная коллекция) и Павловской (единичные образцы) опытных станциях ВИР с целью изучения и выделения наиболее перспективных из них для селекции. О большой потенциальной ценности дикорастущих кавказских видов ежевики, в том числе для введения в культуру в этой зоне, пишет Н.Л. Неронова (1973), участвовавшая в нескольких научных экспедициях по Кавказу и Закавказью с целью пополнения видовой коллекции ежевики МОС ВИР.

Исследованию биологических особенностей и хозяйственной ценности ежевики, выделению генетических источников для селекции посвящено несколько работ, выполненных в южной зоне садоводства в конце прошлого – начале нынешнего столетия (Грюнер, 1992; Семенова, Добренков, 2001; Захарова, 2002) с использованием генофонда культуры Майкопской ОС ВИР. К тому времени была сформирована коллекция ежевики и на Крымской ОСС ВИР, где целенаправленная селекция этой культуры (в период изучения коллекционный генофонд насчитывал 25 интродуцированных сортов) проводилась с 2003 г. (Подорожный, 2016), увенчавшись в 2016 г. включением в Госреестр РФ первого и единственного пока современного отечественного сорта – Агатова (Государственный реестр..., 2019). Приоритетными направлениями селек-

ции ежевики в этом учреждении являются улучшение показателей адаптивности к климатическим факторам южного региона (в том числе засухо- и жаростойкости) и совершенствование других признаков, определенных в качестве ведущих в отечественных и зарубежных селекционных программах, – качества ягод, продуктивности, бесшипности и др. (Кичина и др., 1995; Clark, Finn, 2011; Подорожный, 2016).

Наиболее очевидными причинами длительного отсутствия селекционных исследований по ежевике в России являлись: во-первых, обилие других ценных ягодных культур, распространенных в разных регионах и адаптированных к ним; во-вторых, большое разнообразие дикорастущих видов этого растения в южной климатической зоне, дававших местному населению достаточное количество ягод; в-третьих, сильная шиповатость интенсивно растущих побегов как у дикорастущих видов, так и у старых зарубежных сортов, заставлявшая воспринимать ежевику скорее как сорное и неудобное для культивирования растение; и, в-четвертых, невысокая зимостойкость надземной части растения, не позволявшая рассчитывать на стабильные урожаи ягод.

С интродукцией в 2000-х гг. в нашу страну целой серии современных зарубежных сортов ежевики ситуация в селекции культуры может существенно измениться, так как уровень большинства хозяйственных показателей у них очень высок и дает возможность выбирать для скрещивания лучшие генотипы. Коллекции последних поколений иностранных сортов ежевики уже имеются и изучаются в ряде научно-исследовательских учреждений, в том числе средней полосы России: ВНИИСПК (Орловская область) – 28 сортов, Брянское ГАУ – около 10 сортов (частн. сообщ. д. с.-х. н. С.Н. Евдокименко), ФНЦ им. И.В. Мичурина (Тамбовская область) – примерно 30 сортов (частн. сообщ. н. с. И.В. Гурьевой).

3. Селекция ежевики за рубежом, ее приоритетные направления и достижения

Более 170 лет селекцией ежевики занимаются в США (Darrow, 1937; Шумейкер, 1958; Оурецки, 1981; Витковский, 2003; Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012), где сосредоточено большое разнообразие дикорастущих видов этого растения, давших начало многим сортам. Некоторые из первых сортов возникли спонтанно и были случайно обнаружены в частных садах и дикорастущих популяциях, послужив базой и стимулом для последующего селекционного поиска (Darrow, 1937; Clark, Finn, 2011). Большим прорывом в селекции ежевики стало выведение бесшипного сорта Merton Thornless в Англии (программа John Innes Horticultural Institute), от которого рецессивный ген бесшипности был передан многим современным тетраплоидным ($2n = 28$) сортам (пряморослым и полупряморослым). Два других донора генов доминантной бесшипности с генами S_f и S_{fl} – сорта Austin Thornless ($2n = 56$) и Lincoln Logan ($2n = 42$) – были использованы при создании стелющихся бесшипных сортов (подробнее см. разд. 5.4).

К настоящему времени ученые США считаются признанными мировыми лидерами в создании и совершенствовании сортимента ежевики. Их исследования дали

толчок развитию селекции культуры в других странах. Основной вклад в создание новейших сортов этого растения внесли ученые ведущих селекционных учреждений мира, таких как: USDA-ARS Beltsville St. Maryland (Dr. D. Scott, Dr. D.P. Ink) – США; Arkansas University (Dr. J. Moore, Dr. J. Clark) – США; United States Department of Agriculture ARS St. Oregon (Dr. Ch. Finn, Dr. B. Strick) – США; Scottish Crops Research Institute (Dr. D. Jennings) – Великобритания; Fruit Experiment Station of the Research Institute of Pomology and Floriculture (Dr. J. Danek, Dr. A. Orzel) – Польша; New Zeland Institute for Plant and Food Research (Dr. H. Hall) – Новая Зеландия; Fruit Research Institute, Čačak (Dr. M. Stanisavljevič) – Сербия и др.

Все современные программы селекции нацелены на дальнейшее совершенствование сортимента ежевики по ведущим хозяйственным признакам. Анализ крупных обзоров по селекции ежевики (Оурецки, 1981; Clark, Finn, 2008, 2011; Finn, Clark, 2012) показывает, что приоритетными направлениями в мировых селекционных программах являются: качество и размер плодов, продуктивность растений, адаптивность их к климатическим факторам, бесшипность, оптимальная архитектура побегов, плодородие на побегах текущего года (ремонтантность), устойчивость к болезням и вредителям. То есть круг решаемых проблем остается достаточно широким, поскольку требования к сортам постоянно повышаются; при этом выявленный многолетними исследованиями генетический потенциал культуры (Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012) позволяет рассчитывать на успех.

Отметим, что на первом месте указано качество плодов, связанное с возросшими требованиями рынка. Акцент же в отборе по адаптивности к низким зимним температурам в США, где долгое время велась селекция на этот признак в сочетании с пряморослостью побегов, отчасти сместился в сторону другого ценного направления, тоже в перспективе способного в большой мере решить проблему зимостойкости, – создания ремонтантных сортов ежевики (Clark, Finn, 2011; Clark et al., 2012, Finn, Clark, 2012; Clark, 2013, 2014) (подробнее см. разд. 5.2).

Основными результатами многолетней и кропотливой работы по селекции ежевики стали высокоурожайные сорта с комплексом ценных признаков. Новые селекционные достижения вызвали интерес к культуре во всем мире, уровень производства ее ягод существенно вырос за последние десятилетия и продолжает расти (Strik et al., 2008; Strik, Finn, 2012; Clark, Finn, 2014).

Повысить зимостойкость в сочетании с бесшипностью растения селекционерам удалось лишь до определенного уровня (Stanisavljevic, 1999; Clark, Finn, 2011; Orzel et al., 2016; Телепенько, 2018), который пока недостаточен для регионов с длительными морозными периодами зимой, какие бывают в средней полосе России (Евдокименко, Кулагина, 2015; Грюнер, 2019). Поэтому наряду с появлением промышленных сортов определились лучшие климатические зоны для выращивания ежевики, а также отрабатываются технологии ее возделывания, в том числе предусматривающие зимнее укрытие побегов (Takeda, Handley, 2006; Takeda et al., 2013; Mettler, Hatterman-Valenti, 2018). В результате ведущими производителями ягод ежевики в мире к настоящему времени являются США,

Мексика, Китай, Сербия, Венгрия, Новая Зеландия, а в целом – около 30 стран мира (Strik et al., 2008), где позволяют это климатические условия.

4. Факторы, ограничивающие выращивание ежевики в центральной части России (на примере Орловской области)

Орловская область, где проводятся наши исследования по ежевике, расположена в зоне умеренно континентального климата, в целом благоприятного для садоводства (Агроклиматический справочник..., 1960). Температура наиболее холодного месяца (января) составляет $-9...-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, абсолютный минимум температуры воздуха за многолетний период по области $-39.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2012 г., по данным метеопоста ВНИИСПК). В соответствии со среднемесячными данными, заморозки прекращаются в регионе во второй пятидневке мая (возможные колебания сроков заморозков – с первой декады апреля до первой декады июня). Средние даты осенних заморозков приходятся на конец сентября (самое раннее начало заморозков отмечалось в первой декаде сентября, самое позднее – в третьей декаде октября). Максимальной высоты снежный покров достигает с середины февраля до середины марта. Средняя его высота 20–25 см.

Во время наших исследований, согласно данным метеонаблюдений ВНИИСПК, значительные понижения зимних температур, соответствующие региональным минимумам, были отмечены в конце ноября 2014 г. ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), середине декабря 2016 г. ($-20.6\text{ }^{\circ}\text{C}$), в первой декаде января 2015 г. ($-24.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), во второй декаде января 2016 г. ($-29.3\text{ }^{\circ}\text{C}$), в начале февраля 2017 г. ($-31.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), конце февраля ($-26.0\text{ }^{\circ}\text{C}$) и в конце третьей декады марта 2018 г. ($-21.6\text{ }^{\circ}\text{C}$). При этом в январе, феврале и марте в отдельные годы были продолжительные (до двух недель и более) периоды круглосуточных отрицательных температур с минимумами на уровне $-10...-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Грюнер, 2019).

Пределом морозостойкости основной массы сортов ежевики считаются $-10...-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, и только для отдельных сортов $-25...-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Грюнер, 1986; Takeda, Handley, 2006; Wojcik-Seliga, Wojcik-Gront, 2013; Телепенько, 2018; и др.). Устанавливается он как экспериментально – с применением искусственного промораживания черенков, так и путем полевых наблюдений, которые наиболее приняты при оценке селекционных сеянцев (Кичина и др., 1995; Казаков и др., 1999; Clark, Finn, 2011). В любом случае, указанные границы устойчивости ежевики к морозам недостаточны для региона наших исследований, и это главное препятствие для интродукции культуры в данную климатическую зону. Тем не менее уже есть положительный опыт довольно крупных посадок ежевики (4–7 га) на юге средней полосы России, в Воронежской области: КФХ «Сладуника» (URL: <https://sladunika.ru>) и «Дивный сад» (URL: <https://divnyi-sad.ru>). Однако и там растения, как правило, требуют зимнего укрытия, за исключением отдельных сортов, не подмерзших даже в самые суровые зимы, например польский сорт Orkan и старый американский сорт Agawam (частн. сообщ. руководителя КФХ «Дивный сад» А.Н. Продана).

Помимо недостаточной зимостойкости основного сортимента, к факторам, сдерживающим выращивание еже-

вики в средней полосе страны и других регионах с холодными зимами (-20°C и ниже), можно отнести: связанную с этим необходимость укрытия растений (трудоемкое и затратное мероприятие); разнообразие габитуса сортов, требующее индивидуального подхода к каждому из них при выращивании; обязательное применение шпалеры в связи с высокой продуктивностью и длинными побегами; иногда – недостаточные знания биологии растения, влекущие за собой определенные ошибки в агротехнике.

5. Результаты сортоизучения ежевики в условиях центра России, актуальные направления селекции, генетические источники ценных признаков

Целенаправленная селекционная оценка культивируемой ежевики в климатических условиях средней полосы России не проводилась со времени создания первых ее сортов И.В. Мичуриным (1949). В связи с возросшим интересом населения к сортам этого растения, их биологии и приемам выращивания, появлением новинок селекции на рынке, в 2014–2018 гг. нами изучены сорта ежевики в опытных насаждениях отдела селекции ягодных культур ВНИИСПК (Орловская область). Для оценки коллекционно-селекционного материала использовали общепринятые методы исследований (Доспехов, 1985; Кичина и др., 1995; Казаков и др., 1999).

Выполненный в указанные годы цикл работ по изучению адаптивных и других хозяйственных качеств представителей основных морфологических групп ежевики (пряморослых, стелющихся и промежуточных между ними) показал, что эта ценная ягодная культура при определенных условиях (в первую очередь при зимнем укрытии) может здесь успешно выращиваться и давать высокие урожаи ягод. При этом необходимы шпалера и сорто-специфичная подготовка растений к зиме (Грюнер и др., 2018). Важен подбор сортов по срокам созревания, так как неблагоприятные погодные условия периода вегетации отдельных лет могут привести к невызреванию части урожая наиболее поздних сортов, затяжному росту побегов текущего года и, как следствие, к существенному их подмерзанию зимой (Грюнер, 2019). Как правило, все фазы ежевики проходят в благоприятные для культуры сроки и вписываются в вегетационный период региона (Грюнер, Кулешова, 2014). Выявлено, что среди изученных и привлеченных в коллекцию новых сортообразцов ежевики (для последних информация предварительная) имеются сорта (Agawam, Erie, Thornfree, Brzezina, Ouachita, Loch Tay, Natchez, Chester и др.) и отборные формы (сеянцы сортов Cheyenne, Black Satin, Loch Ness, гибридная форма Thornfree \times *R. caucasicus* I и др.), позволяющие рассчитывать на успешную селекцию по улучшению как показателей адаптивности – зимостойкости и засухоустойчивости (Грюнер, 2019), так и других хозяйственно значимых признаков, в том числе массы, вкусовых и других качеств ягод (Clark, Moore, 2005, 2008; Якимов, 2010).

Практические советы и положительные прогнозы по выращиванию ежевики в условиях более суровой Самарской области, информацию о многочисленных сортах мирового сортимента этой культуры отразил в своей кни-

ге «Ежевика в России» В.В. Якимов (2010), исходя из собственного опыта и обзора зарубежных источников литературы.

Авторы исследования зимостойкости культуры без зимнего укрытия в условиях Брянской области справедливо считают, что выращивать ежевику в этой зоне без укрытия нецелесообразно из-за подмерзания большинства сортов до уровня снега, однако выделяют некоторые из изученных ими сортообразцов (Thornfree, Black Satin, Gazda, Orkan, Marion и Smootstem) в качестве перспективных для приусадебного и производственного использования в регионе (Евдокименко, Кулагина, 2015). Актуальные направления селекции ежевики в России были сформулированы нами ранее (Кичина и др., 1995) и дополнены относительно средней полосы в данной статье. Из них на первом месте находится селекция на зимостойкость и связанные с этим необходимые качества растений ежевики. Далее остановимся на указанном направлении и некоторых других более подробно.

5.1. Селекция на зимостойкость

Создание зимостойких сортов ежевики было важным для США из-за значительного подмерзания большинства представителей подрода *Eubatus* почти во всех регионах этого государства (Finn, Clark, 2012). Ценными в селекции относительно морозо- и зимостойких сортов ежевики были работы североамериканских ученых по созданию пряморослых генотипов, изначально полученных от дикорастущих видов с таким габитусом – *R. allegheniensis*, *R. argutus* и др. Первые сорта с геноплазмой этих видов были шиповатыми, отличались повышенной морозостойкостью и сдержанным ростом: Agawam, Lawton, Snyder, Erie, Darrow и др. (Darrow, 1937; Clark, Finn, 2011). Зимостойкость таких сортов связана с ранним завершением ростовых процессов; им свойственны также глубина и продолжительность органического покоя. В результате длительной селекции в числе наиболее зимостойких сортов выделились шиповатый пряморослый Plini Hardy и бесшипный полустелющийся Chester Thornless (Якимов, 2010; Finn, Clark, 2012). Однако со временем селекционеры США признали, что для эффективного отбора генотипов с более высокой зимостойкостью необходимы климатические условия с регулярными зимними понижениями температур до определенных критических значений (Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012).

Последние поколения пряморослых сортов ежевики (Navaho, Arapaho, Natchez, Ouachita, Caddo и др.), полученные в Арканзасском университете США (Andersen, 2001; Clark, Moore, 2005, 2008; Clark, Finn, 2011; Clark et al., 2019), имеют бесшипные стебли и повышенную зимостойкость, однако завершают рост (по нашим предварительным наблюдениям) позже шиповатых предков, что связано, очевидно, с вовлечением в селекцию при их создании бесшипных, но длительно вегетирующих и потому умеренно зимостойких генотипов (в частности, сорта Thornfree). Следовательно, в средней полосе России зимостойкость указанных сортов будет, скорее всего, недостаточна и ближе к показателю у полустелющихся форм. Морфологическую близость новых пряморослых сортов к упомянутой промежуточной группе подтверждают и сами

их создатели (Finn, Clark, 2012). В то же время скрещивание таких сортов между собой, вероятно, может привести к определенному повышению зимостойкости гибридов вследствие насыщения геноплазмой зимостойких предков их родителей, в частности сорта Dargow, который использовался при создании большинства из них (Clark, Moore, 2005, 2008; Clark et al., 2019). Среди сортообразцов ежевики, проверенных нами в условиях средней полосы России на зимостойкость, без укрытия можно выращивать только старый американский пряморослый тетраплоидный ($2n = 28$) сорт Agawam, однако при его использовании в селекции следует учитывать доминирующую шиповатость побегов и образование большого количества корневых отпрысков, отсутствующих у современных бесшипных сортов с пряморослым габитусом.

Отбор на повышенную зимостойкость представителей подрода *Eubatus* успешно проводится в Польше (Fruit Experiment Station of the Research Institute of Pomology and Floriculture), где получен ряд сортов, не требующих укрытия в климатических условиях этого государства (Danek, Kolodziejczak, 1993; Orzeł et al., 2016) и проявляющих, как уже говорилось, хорошую устойчивость к морозам на юге средней полосы России. Прежде всего это сорт Orkan, подтвердивший, наряду с американским сортом Ouachita, свою зимостойкость и на территории Украины (Телепенько, 2018). Эти сорта могут быть перспективны в ходе дальнейшего селекционного улучшения показателей зимостойкости ежевики, сочетающейся с бесшипностью побегов.

Для укывных сортов в средней полосе России актуальны также повышенная зимостойкость и эластичность (гибкость) побегов, необходимая при значительном снеговом покрове, подвязке к шпалере, укрытии на зиму; стелющийся и полустелющийся габитус куста; раннеспелость. Потенциальными источниками генов этих признаков, по данным наших исследований (Грюнер, 2019) и предварительных наблюдений, могут служить сорт Loch Tay (из имеющихся в коллекции ВНИИСПК) и гибридная форма Thornfree \times *R. caucasicus* I, а также сеянцы LN-4, 13, 14, полученные из семян от свободного опыления сорта Loch Ness. Полезным может быть изучение в условиях региона сортов с типично стелющимся габитусом (хотя бы для целей любительского садоводства), которые уложить на землю для укрытия на зиму легче других; при этом предпочтение следует отдавать бесшипным генотипам (с генами S_f и S_{fl}).

5.2. Селекция на ремонтантность

Одним из актуальных направлений, которые в перспективе могут решить проблему зимостойкости ежевики, является создание новых ремонтантных сортов. Плодоношение на побегах текущего года (ремонтантность) – сравнительно новое направление в селекции ежевики, но очень важное для расширения производства ягод как на юг, так и на север (Clark, Finn, 2011). В южных регионах с теплыми зимами такие сорта полноценно плодоносят (и даже могут давать два урожая за сезон) без воздействия отрицательных температур, которые обычным (неремонтантным) сортам нужны, в частности, для нормальной дифференциации генеративных почек. При продвижении ежевики

на север побеги ремонтантных сортов, в случае раннего (до наступления отрицательных температур) созревания ягод на однолетней древесине, можно после сбора урожая срезать или скашивать, решая таким образом проблему зимостойкости и устойчивости к болезням и вредителям.

Первоначальным источником гена признака ремонтантности была обнаруженная еще в 1949 г. в природной популяции пряморослая диплоидная форма ежевики ($2n = 2x = 14$), названная сортом Hillquist по фамилии человека, нашедшего ее в США (L.G. Hillquist из Ашленда). От этой формы селекционным путем – скрещиванием с тетраплоидным сортом Brazos в Арканзасском университете, были получены тетраплоиды (в том числе форма Ark. 593, использованная в дальнейшей селекции), несущие признак ремонтантности. Предполагается рецессивная природа гена данного признака (Clark, 2008; Clark, Finn, 2011). Сорта Prime-Jan, Prime Jim (2003 и 2004 гг.) стали первыми селекционными достижениями этого типа, Prime-Ark-45 (2009 г.) и последующие сорта обладают плодами улучшенного качества. Важнейшие результаты в этом направлении получены в Арканзасском университете США, где продолжается работа по созданию таких сортов. Селекция на ремонтантность ведется также в Польше (Orzeł et al., 2016).

У созданных к настоящему времени представителей сортов такого типа плодоношения ягоды могут полностью вызреть на побегах текущего года только в южных зонах садоводства. Поэтому цель дальнейшей селекции в этом направлении, в том числе в условиях центра России, – обеспечить более ранние сроки полного созревания урожая на однолетних побегах, добиться большей зимостойкости подземной части растений. Все остальные параметры сортов и направления селекции в средней полосе нашей страны соответствуют мировым приоритетам, обозначенным ведущими селекционерами на основе многолетнего опыта работы с ежевикой (Clark, Finn, 2008, 2011; Finn, Clark, 2012). Приводим их ниже.

5.3. Селекция на улучшенные качества плодов

Большинство современных сортов ежевики обладает комплексом показателей ягод, обеспечивающих их востребованность на рынке и сформированных длительной селекцией. Это относится и к представителям группы пряморослых и полупряморослых сортов, улучшению качества ягод которых было уделено много внимания (Clark, Moore, 2005, 2008; Clark, Finn, 2011).

Сладкий вкус плодов, обеспечиваемый количеством растворимых сухих веществ (РСВ = 10–15 %), считается ключевым для расширения рынка свежей продукции ежевики (Clark, Finn, 2011). В дополнение к этому показателю важны также кислотность, аромат, терпкость. Другие традиционные качественные компоненты – это плотность ягоды, прочность кожицы, мелкосемянность, яркая окраска, легкое отделение при сборе, хорошая послеуборочная сохранность.

При создании новых сортов следует учитывать, что созревание ягод – особый период при выращивании ежевики. С одной стороны, плоды приобретают сорто-

специфичный вкус, набирают максимальное количество сахаров, обретают сочность и аромат, с другой – снижается их транспортабельность, часто теряется красивый глянец. По этой причине ягоды нередко снимают в стадии технической зрелости, и для десертного потребления они малопригодны. Задача селекционеров – объединить в зрелых плодах высокие вкусовые качества (прежде всего сладкий вкус) с блеском черных костянок и прочностью кожицы для успешной транспортировки.

Послеуборочные характеристики ягод ежевики включают: привлекательность внешнего вида (сохранение черного цвета, глянец), прочность плодов (оценивают до и после хранения), хороший вкус, отсутствие развития грибной и бактериальной инфекций. Качество ягод после уборки сильно зависит от погодных условий во время сбора, поэтому практикуется выращивание ежевики, как и других ягодных культур, в высоких тоннелях (Finn, Clark, 2011; http://www.korolevagro.ru/teplichnye-tekhnologii/vysokie_tunneli/).

Для переработки плоды ежевики должны иметь интенсивный ароматный вкус и окраску, высокий уровень растворимых сухих веществ и титруемой кислотности, низкий pH и низкую костистость. Указанные характеристики должны сохраняться, когда ягоды замораживают. Между сортами этой культуры есть существенные различия по содержанию фенольных соединений антиоксидантного комплекса (Connog et al., 2005), что позволяет вести отбор на улучшение этого показателя в потомстве.

Форма плодов ежевики может существенно варьировать (Грюнер, 2014), а значит, имеются перспективы ее селекционного улучшения. Важна выравненность формы, неприемлемы плоды раздвоенные или неправильные. Желательны ягоды округлые, конические или бочонковидные. Считается, что длинные ягоды могут обеспечить самый привлекательный вид свежих плодов (Clark, Finn, 2011).

Крупный размер ягод – одна из главных задач селекции ежевики, и является, кроме показателя товарности, компонентом продуктивности. Однако считается, что излишняя масса ягод (больше 10–15 г) нежелательна для переработки и размещения в упаковках, а также для ягодных смесей, где такие плоды будут преобладать. Крупными плодами обладают сорта Natchez, Triple Crown, Kiowa, Turí и целый ряд других (Якимов, 2010), которые служат потенциальными источниками генов этого признака. Масса ягоды при этом может несколько варьировать в пределах сорта в зависимости от условий и способов выращивания.

Продуктивность (урожайность с куста) у ежевики обычно высокая, но сильно различается как между сортами, так и в пределах одного сорта, в зависимости от климатических условий и технологии выращивания, и может достигать 20 кг и более. Однако избыточный урожай может привести к снижению побегообразовательной способности (Clark, Finn, 2011) и даже периодичности плодоношения. Поэтому управлять продуктивностью высокоурожайных сортов необходимо с помощью своевременной формировки побегов, их нормировки. Источники генов высокой продуктивности – сорта Thornfree, Chester Thornless, Black Satin, Loch Ness, Triple Crown и многие другие (Якимов, 2010).

5.4. Селекция на бесшипность

Создание новых бесшипных сортов – востребованное направление селекции ежевики. К настоящему времени в мире создано не менее 40 таких сортов, и это ценные источники генов данного признака для дальнейшей селекции. Сорта Thornfree, Smoothstem, Black Satin, Loch Ness, Loch Tay, Chester Thornless, Triple Crown, Casanska Bestrna, Orkan, Apache, Ouachita и многие другие, являющиеся потомками тетраплоидного ($2n = 4x = 28$) источника рецессивного гена этого признака – сорта Merton Thornless, могут использоваться в селекции на бесшипность. Учитывая, что данный ген привнесен в геноплазму относительно зимостойких тетраплоидных сортов, именно эти сорта, вероятно, следует использовать для селекции в условиях средней полосы России. На ранних этапах онтогенеза его носители идентифицируются по отсутствию желёзок на зародышевых листочках (Clark, Finn, 2011), благодаря чему отбор на этот признак можно вести уже в самом начале селекционного процесса.

Два других источника бесшипности – сорт Austin Thornless ($2n = 8x = 56$) с доминантным геном S_f , полученный в Англии, и Lincoln Logan ($2n = 6x = 42$) с доминантным геном S_{f1} , созданный в Новой Зеландии, используются при выведении сортов стелющегося типа, как правило, с более высоким, чем тетраплоидный, уровнем пloidности. Растения с геном S_f могут иметь шипы на базальной части стебля до высоты 30 см, в зоне же плодоношения стебли лишены колючек. Поэтому идентификация бесшипного потомства в данном случае возможна лишь по достижении сеянцами высоты более 0.3 м (Clark, Finn, 2011). Потомками сорта Austin Thornless являются бесшипные сорта Waldo, Black Perl, Nightfall, Black Diamond, полученные в Орегонском университете США. В числе последних достижений этого учреждения бесшипный сорт Wild Treasure, созданный путем скрещивания сорта Waldo и дикорастущего вида *R. ursinus* (Finn et al., 2010). Новыми бесшипными сортами с геном S_{f1} являются Columbia Star, Columbia Sunrise и Columbia Giant (Finn et al., 2014, 2018), которые могут быть источниками этого гена бесшипности в дальнейшей селекции. Такие сорта больше приспособлены для выращивания в южных регионах садоводства России, но при надежном укрытии на зиму, вероятно, могут возделываться и в любительских садах центральной России.

5.5. Селекция на устойчивость к болезням и вредителям

Основная масса выращиваемых сортов ежевики обладает высоким уровнем устойчивости к вредоносным организмам. Однако по мере активного выращивания ежевики все чаще появляются сообщения об увеличении случаев поражений грибными болезнями и вредителями – гораздо чаще, чем бактериями или вирусами (Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012). Селекционная работа на устойчивость сортов ежевики к болезням и вредителям была проведена путем простого отбора более здоровых или неинфицированных растений в популяции сеянцев (Clark, Finn, 2011). Чтобы стала понятной степень потенциальной опасности различных патогенов, ниже приводим информацию о наиболее вредоносных из них, которые в разной степени

представлены в регионах возделывания обсуждаемой культуры (Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012).

Самые распространенные в мире – грибные болезни ежевики: антракноз (*Gloeosporium venetum* Speg.), серая гниль (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) и лептосферия (*Leptosphaeria coniothyrium* (Fuckel) Sacc.). Заражение этими патогенами может сильно варьировать в зависимости от типа ягод, мест выращивания, погоды и ухода за растениями. Оранжевая ржавчина (*Gymnoconia peckiana* (Howe) Trott.) иногда наблюдается в насаждениях; при этом требуется удаление инфицированных растений. Устойчивость к оранжевой ржавчине есть почти у всех восточных (пряморослых) сортов США, за исключением сорта Navaho. В течение многих лет в южных штатах США самым опасным заболеванием в производстве ежевики считалось удвоение розетки – церкоспореллез (*Cercospora rubi* (G. Winter) Plakidas). Затем была идентифицирована устойчивость к этой болезни, которая оказалась связана с присутствием в геноплазме ежевики рецессивного гена бесшипности. Поэтому сорта, полученные от источника этого гена – сорта Merton Thornless, устойчивы к названной болезни (Clark, Finn, 2011). Однако при интенсивном заражении в штатах Миссисипи и Луизиана устойчивость не всегда сохранялась.

В некоторые годы в отдельных местах Чили, Мексики, Новой Зеландии и запада США отмечались болезни *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., *Septoria rubi* Westend, *Septocytia ruborum* (Lib.) Petr. и *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. Серьезную проблему в этих зонах и в зонах Великобритании и Европы может создать *Peronospora sparsa* Berk. Гибриды малины и ежевики, такие как Boysenberry и Loganberry, тоже могут значительно поражаться этой болезнью. Мучнистая роса (*Podosphaera macularis* Wallr.) наблюдается в некоторых зонах мира, особенно в Мексике. С увеличением посадок в Мексике и других зонах эти болезни становятся экономически более важными, и необходимо находить источники устойчивости и использовать их в селекции.

Самая распространенная из бактериальных болезней ежевики – это корневой рак (*Agrobacterium tumefaciens* [E.V. Smith & Townsend] Conn.), который может привести к ослаблению растений и существенной потере урожая. Одной из главных вирусных болезней представителей рода *Rubus* в течение многих лет была карликовость куста, вызываемая *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV), однако в наибольшей степени она проявлялась у видов малины (*R. idaeus*, *R. parviflorus*, *R. spectabilis*). Вирусы *Tomato ringspot virus* (ToRSV) и *Tobacco ringspot virus* (TRSV) выявлены в большинстве регионов, где производится ежевика.

Все производственные регионы имеют проблемы борьбы с вредителями ежевики. Чаще всего из вредителей встречаются: стеклянница малинная – *Pennisetia hylaeiformis* (Harris), златка – *Agrilus ruficollis* (Fabricius), клещ ежевичный – *Acalitus essigi* Hassan., и др. Некоторые производственные регионы сильно поражены вредителями, против которых требуются программы активной защиты. Так, в Новой Зеландии сорта Boysenberry, Marion и все другие представители рода *Rubus* атакуются почковой молью (*Heterocrossa rubophaga* Dugdale и *Eutorna phaula-*

cosma Meyrick). Серьезной проблемой в Новой Зеландии могут также быть зеленый овощной жук *Nezara viridula* L. и виды листоверток, включая *Epiphyas postvittana* Walker, *Planotortrix exessana* Walker и др. В 2008 г. в Калифорнии впервые сообщили о пятнистой крылатой дрозophile (*Drosophila suzukii* Matsumura) родом из Японии, а затем она распространилась широко по западным штатам и в Китае. Недавно ее идентифицировали в Европе. Глубина этой проблемы пока не изучена, но есть опасность, что данный вредитель станет главным для ежевики. Большая часть селекционных усилий направлена на полевые оценки семян по устойчивости к вредителю и на использование наиболее устойчивых из них в скрещиваниях (Clark, Finn, 2011; Finn, Clark, 2012).

Как видим, основную опасность болезни и вредители ежевики представляют для регионов с теплым климатом, в связи с чем центральная Россия может оказаться более безопасной для возделывания этой культуры. Однако селекция на устойчивость к биотическим факторам среды, безусловно, более эффективна при высоком естественном инфекционном фоне или с применением искусственного заражения.

По наблюдениям авторов данной статьи, в последние годы в Орловской области, где проводится это исследование, распространился жук-цветоед – оленка мохнатая (*Epicometis hirta* Poda), который наносит заметный ущерб раноцветущим сортам ежевики (особенно наиболее зимостойкому сорту Agawam). Это заставляет обратить особое внимание на вредителя и сорта, которые им не поражаются, для использования их в селекции.

6. Перспективы селекции ежевики в средней полосе России

Большие достижения селекции ежевики в мире, доступность для российских исследователей культуры новых сортов с комплексом ценных признаков, работы, проведенные на территории России по ее изучению, позволяют считать перспективным совершенствование сортимента этого растения не только на юге, но и в центральной части нашей страны. Климат этого региона может способствовать эффективному формированию генотипов с необходимыми признаками адаптивности, в первую очередь высокими морозо- и зимостойкостью, так как критические для культуры отрицательные температуры бывают здесь практически каждую зиму. При этом сам процесс отбора можно вести в полевых условиях, без использования искусственного промораживания растений.

Известно, что основная масса представителей подрода *Eubatus* Focke относится по экологической принадлежности к растениям-мезофитам. В природных популяциях юга России это проявляется в приуроченности к достаточно увлажненным и часто защищенным от активного солнца местам обитания (Юзепчук, 1941; Гроссгейм, 1952; Неронова, 1973; Оурецки, 1981). Для большинства сортов культуры также предпочтительны подобные условия. При этом в южной зоне жаркие засушливые периоды во время вегетации ежевики наступают практически ежегодно, вызывая нередко подпекание темных ягод с соответствующей потерей товарных качеств и даже усыханием генеративных органов (Семенова, Добренков, 2001).

В условиях же Орловской области, где планируется проводить селекционные исследования по ежевике, подобные периоды случаются значительно реже (два-четыре раза в 10 лет). В то же время они позволяют объективно оценивать степень засухоустойчивости культуры в этом регионе и проводить, при необходимости, селекционный отбор по этому показателю.

В числе других плюсов средней полосы России, необходимых для возделывания ежевики, можно назвать значительно меньшую, чем на юге, потенциальную опасность поражения культуры болезнями и вредителями в силу климатических барьеров, препятствующих их распространению. При уже имеющемся высоком потенциале устойчивости к этим вредоносным факторам, культура может оказаться очень перспективной для органического земледелия, актуальность и необходимость которого признана во многих регионах мира (Дорошенко и др., 2012) и России в частности (<https://soz.bio/o-soyuze/>). Однако отдельные вегетационные периоды в средней полосе бывают благоприятными для развития грибных инфекций, поэтому выявление устойчивых к ним генотипов ежевики при селекционных исследованиях здесь также возможно.

Отбор по другим приоритетным направлениям селекции культуры может вестись в регионе без каких-либо климатических и иных ограничений.

Заключение

К 2020 г. в ФГБНУ ВНИИСПК собрана и изучается коллекция ежевики в количестве 28 сортов мирового сортамента (3 сорта получены с МОС ВИР, 25 – из питомников «Дивный сад» Воронежской области и «Зеленый шум» Орловской области) и 18 отборных и элитных селекционных форм, полученных авторами статьи ранее. Селекционные формы были выращены из семян от свободного опыления ряда сортов, присланных во ВНИИСПК из Арканзасского университета США и Шведского института сельскохозяйственных наук в 1995 г. Отработаны элементы технологии выращивания сортового и селекционного генофонда с применением зимнего укрытия. Проведены первые скрещивания, нацеленные на реализацию приоритетов селекции культуры в регионе. Запланировано ежегодное пополнение коллекции ежевики новыми генетическими источниками хозяйственно полезных признаков, в первую очередь наиболее зимостойкими.

Анализ мировых тенденций и опыта в селекции и сортоизучении ежевики, а также результаты собственных исследований культуры, проведенных в условиях Орловской области, позволяют считать перспективной и целесообразной работу по совершенствованию сортамента этого растения в средней полосе России.

Все приоритетные направления и задачи селекции ежевики, обозначенные в зарубежных и отечественных селекционных программах, актуальны и для данного региона нашей страны, при этом важнейшим из них является в настоящее время создание сортов с высокой зимостойкостью.

Список литературы / References

Агроклиматический справочник по Орловской области. Л.: Гидрометеоздат, 1960;6-10.

- [Agroclimatic Reference Book of the Orel Region. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ., 1960;6-10. (in Russian)]
- Бологовская Р.П. Ежевика. Л.: Всесоюз. ин-т растениеводства; Тип. им. Володарского, 1934.
[Bologovskaya R.P. Blackberries. Leningrad, 1934. (in Russian)]
- Витковский В.Л. Малина и ежевика. В: Витковский В.Л. Плодовые растения мира. СПб.; М.; Краснодар, 2003;355-382.
[Vitkovskiy V.L. Raspberry and blackberry. In: Vitkovskiy V.L. Fruit Plants of the World. St. Petersburg; Moscow; Krasnodar, 2003;355-382. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (1). Сорта растений. Ежевика. М., 2019; 306. URL: http://gossortrf.ru/wp-content/uploads/2019/07/REESTR_2019-3.pdf
- [State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes (1). Plant varieties. Blackberry. Moscow, 2019; 306. URL: http://gossortrf.ru/wp-content/uploads/2019/07/REESTR_2019-3.pdf (in Russian)]
- Гроссгейм А.А. Флора Кавказа. М.; Л., 1952;5:44-58.
[Grossgeim A.A. Flora of the Caucasus. Moscow; Leningrad, 1952; 5:44-58. (in Russian)]
- Грюнер Л.А. Зимостойкость ежевики в Предгорной зоне Кавказа. Сб. науч. тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. Л., 1986; 106:85-86.
[Gruner L.A. Blackberry winter hardiness in the foothill area of the Caucasus. *Bulletin on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. Leningrad, 1986;106:85-86. (in Russian)]
- Грюнер Л.А. Особенности биологии и хозяйственная ценность сортов и форм ежевики в условиях Северного Кавказа: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 1992.
[Gruner L.A. Biologic features and commercial value of blackberry forms and varieties grown in the North Caucasus. Cand. Sci. (Agric.) Dissertation. St. Petersburg, 1992. (in Russian)]
- Грюнер Л.А. Ежевика. В: Седов Е.Н., Грюнер Л.А. (ред.). Помология. Земляника. Малина. Орехоплодные и редкие культуры. Орел, 2014;5:300-308.
[Gruner L.A. Blackberry. In: Sedov E.N., Gruner L.A. (Eds.). Pomology: Strawberries. Raspberries. Nut and Rare Crops. Orel, 2014; 5:300-308. (in Russian)]
- Грюнер Л.А. Адаптационные возможности ежевики в условиях Орловской области. *Соврем. садоводство*. 2019;3:27-41. DOI 10.24411/2312-6701-2019-10305. URL: <http://journal-vniispk.ru/pdf/2019/3/31.pdf>
- [Gruner L.A. Adaptive capabilities of blackberries in conditions of Orel region *Sovremennoe Sadovodstvo = Contemporary Horticulture*. 2019;3:27-41. DOI 10.24411/2312-6701-2019-10305. URL: <http://journal-vniispk.ru/pdf/2019/3/31.pdf> (in Russian)]
- Грюнер Л.А., Аникеенко А.П. Биохимия ежевики. В: Селекция и сорторазведение садовых культур: юбил. сб. науч. тр. Орел, 1995;266-273.
[Gruner L.A., Anikeyenko A.P. Biochemistry of blackberries. In: Breeding and Variety Cultivation of Orchard Crops. Orel, 1995;266-273. (in Russian)]
- Грюнер Л.А., Князев С.Д., Кулешова О.В. Элементы технологии выращивания ежевики в условиях Орловской области. *Вестн. рос. с.-х. науки*. 2018;4:31-34. DOI 10.30850/vrsn/2018/4/31-34.
[Gruner L.A., Knyasev S.D., Kuleshova O.V. Elements of blackberry growing technology in conditions of Orel region. *Vestnik Rossiyskoy Sel'skokhozyaystvennoy Nauki = Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2018;4:31-34. DOI 10.30850/vrsn/2018/4/31-34. (in Russian)]
- Грюнер Л.А., Кулешова О.В. Продолжительность вегетации и динамика роста побегов ежевики в условиях Орловской области. *Соврем. садоводство*. 2014;4:42-49. URL: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2014/4/pdf>
- [Gruner L.A., Kuleshova O.V. Vegetation length and dynamics of blackberry shoot growth in conditions of Orel region. *Sovremennoe*

- Sadovodstvo = Contemporary Horticulture*. 2014;4:42-49. URL: <http://journal.vniispsk.ru/pdf/2014/4/pdf> (in Russian)]
- Дорошенко Т.Н., Бузоверов А.В., Кондратенко А.Н., Чумаков С.С., Рязанова Л.Г., Сугоняев Е.С. Органические сады на юге России. Краснодар, 2012.
[Doroshenko T.N., Buzoverov A.V., Kondratenko A.N., Chumakov S.S., Ryazanova L.G., Sugonyayev E.S. Organic Orchards in Southern Russia. Krasnodar, 2012. (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985.
[Dospikhov B.A. Methods of the Field Experiment. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]
- Евдокименко С.Н., Кулагина В.Л. Оценка сортов ежевики и малино-ежевичных гибридов в условиях Брянской области. *Садоводство и виноградарство*. 2015;4:20-23.
[Evdokimenko S.N., Kulagina V.L. Evaluation of blackberry varieties and raspberry-blackberry hybrids in conditions of the Bryansk Region. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2015;4:20-23. (in Russian)]
- Захарова М.В. Особенности культуры ежевики на Северо-Западном Кавказе: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Краснодар, 2002.
[Zakharova M.V. Features of blackberry cultivation in the north-western Caucasus. Cand. Sci. (Agric.) Dissertation. Krasnodar, 2002. (in Russian)]
- Казаков И.В., Грюнер Л.А., Кичина В.В. Малина, ежевика и их гибриды. В: Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел, 1999;374-395.
[Kazakov I.V., Gruner L.A., Kichina V.V. Raspberries, blackberries, and their hybrids. In: Program and Methods of Variety Investigation of Fruit, Berry and Nut Crops. Orel, 1999;374-395. (in Russian)]
- Кичина В.В., Казаков И.В., Грюнер Л.А. Селекция малины и ежевики. В: Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел, 1995;368-386.
[Kichina V.V., Kazakov I.V., Gruner L.A. Raspberry and blackberry breeding. In: Program and Methods of Fruit, Berry, and Nut Breeding. Orel, 1995;368-386. (in Russian)]
- Князев С.Д., Голяева О.Д., Жук Г.П., Джафарова В.Е., Андрианова А.Ю. Производство оздоровленного посадочного материала ягодных и малораспространенных культур. Орел, 2012.
[Knyazev S.D., Golyaeva O.D., Zhuk G.P., Dzharafarova V.E., Andrianova A.Yu. Production of Healthy Planting Material for Berry and Rare Crops. Orel, 2012. (in Russian)]
- Колбас Н.Ю., Силва М.А., Еэсэдр П.Л., Решетников В.Н. Антоцианы и антиоксидантная активность плодов некоторых представителей рода *Rubus*. *Изв. НАН Беларуси*. 2012;1:5-10.
[Kolbas N.Y., Silva M.A., Teissendre P.L., Reshetnikov V.N. Anthocyanins and antioxidant activity of fruits certain representatives of genus *Rubus*. *Izvestiya NAN Belarusi = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2012;1:5-10. (in Russian)]
- Мичурин И.В. Ягодные культуры. В: Мичурин И.В. Итоги шестидесятилетних работ. М., 1949;432-438.
[Michurin I.V. Small fruit crops. In: Michurin I.V. Summation of Sixty Years of Work. Moscow, 1949;432-438. (in Russian)]
- Неронова Н.Л. О видовом разнообразии и распространении ежевики на Кавказе. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. Л., 1973;50(3):103-107.
[Neronova N.L. On the species diversity and distribution of blackberries in the Caucasus. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. Leningrad, 1973;50(3):103-107. (in Russian)]
- Оуреcki Д.К. Ежевика. В: Селекция плодовых растений (пер. с англ. под ред. Х.К. Еникеева). М., 1981;166-179.
[Ourecky D.K. Brambles. In: Janick J., Moore J.N. (Eds.) Advances in Fruit Breeding. West Lafayette, Indiana, Purdue University Press, 1975;98-129. (Russ. ed.: Advances in Fruit Breeding (translation from English Enikeev H.K. (Ed.). Moscow, 1981;166-179.))]
- Подорожный В.Н. Создание сортов ежевики для южной зоны садоводства. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2016;45:119-123.
[Podorozhny V.N. Creating varieties of blackberries for south zone of horticulture of Russia. *Plodovodstvo i Yagodovodstvo Rossii = Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia*. 2016;45:119-123. (in Russian)]
- Подорожный В.Н., Романова Е.В. Особенности размножения посадочного материала росляники зелеными черенками. В: Сб. статей дистанц. науч.-практ. конф. Мичуринск, 2010;2011-2116.
[Podorozhny V.N., Romanova E.V. Features of propagation of trailing blackberry planting material with soft wood cuttings. In: Proceedings of the Scientific and Practical Teleconference. Michurinsk, 2010;2011-2116. (in Russian)]
- Помология. Земляника. Малина. Орехоплодные и редкие культуры (под ред. Е.Н. Седова, Л.А. Грюнер). Орел, 2014;5:300-308.
[Sedov E.N., Gruner L.A. (Eds.) Pomology: Strawberries, Raspberries, Nut and Rare Crops. Orel, 2014;5:300-308. (in Russian)]
- Розанова М.А. Ягодоведение и ягодоводство. М.; Л., 1937;63-72.
[Rozenova M.A. Berry Study and Berry Industry. Moscow; Leningrad, 1937;63-72. (in Russian)]
- Семенова Л.Г., Добренков Е.А. Адаптационный потенциал ежевики в условиях западного предгорья Северного Кавказа. Майкоп, 2001.
[Semenova L.G., Dobrenkov E.A. The Adaptation Potential of Blackberries in the Western Foothills of the North Caucasus. Maykop, 2001. (in Russian)]
- Телепенько Ю.Ю. Морозостойкость сортив ожины (*Rubus subg. Eubatus* Focke) в умовах Західного Лісостепу України. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(1):124-131. DOI 10.21498/2518-1017.14.1.2018.126521.
[Telepenko Yu.Yu. Frost resistance of blackberry (*Rubus subg. Eubatus* Focke) cultivars western forest-steppe zone of Ukraine. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(1):124-131. DOI 10.21498/2518-1017.14.1.2018.126521. (in Ukrainian)]
- Шумейкер Дж.Ш. Культура малины и ежевики. В: Культура ягодных растений и винограда (пер. с англ. под ред. З.А. Метлицкого и А.М. Негруля). М., 1958;159-273.
[Shoemaker J.S. Culture of raspberry and blackberry. In: Small-Fruit Culture and Grapes. Moscow, 1958;159-273. (Russian translation)]
- Юзепчук С.В. Малина и ежевика. В: Флора СССР. М.; Л., 1941;8:21-58.
[Yuzepchuk S.V. Raspberry and blackberry. In: Flora of the USSR. Moscow; Leningrad, 1941;8:21-58. (in Russian)]
- Якимов В.В. Ежевика в России. Челябинск: Сад и огород, 2010.
[Yakimov V.V. Blackberry in Russia. Chelyabinsk: Sad i Ogorod Publ., 2010. (in Russian)]
- Andersen P.C. Blackberry. 2001. URL: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/HS/HS10400.pdf>
- Clark J.R. Primocane-fruiting blackberry breeding. *HortScience*. 2008; 43(6):1637-1639. DOI 10.21273/hortsci.43.6.1637.
- Clark J.R. Blackberry variety development and crop growing systems. 2013. URL: <http://cetulare.ucanr.edu/files/168371.pdf>
- Clark J.R. 'Prime-Ark® Freedom' primocane-fruiting thornless blackberry. *HortScience*. 2014;49(8):1097-1101. DOI 10.21273/HORTSCI.49.8.1097.
- Clark J.R., Finn Ch.E. New trends in blackberry breeding. *Acta Hort.* 2008;777:41-48. DOI 10.17660/ActaHortic.2008.777.2.
- Clark J.R., Finn C.E. Blackberry breeding and genetics. *Global Science Books (Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology)*. 2011;5:27-43. URL: https://www.researchgate.net/publication/289212567_blackberry_breeding_and_genetics
- Clark J.R., Finn C.E. Blackberry cultivation in the World. *Rev. Bras. Frutic.* 2014;36(1):46-57. DOI 10.1590/0100-2945-445/13.
- Clark J.R., Finn Ch.E., Strik B.C., Thompson E. Progress and challenges in primocane-fruiting blackberry breeding and cultural management. *Acta Hort.* 2012;926:387-392. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.926.54.
- Clark J.R., Moore J.N. 'Ouachita' thornless blackberry. *HortScience*. 2005;40(1):258-260.

- Clark J.R., Moore J.N. 'Natchez' thornless blackberry. *HortScience*. 2008;43(6):1897-1899. DOI 10.21273/HORTSCI.43.6.1897.
- Clark J.R., Worthington M., Ernst T. 'Caddo' thornless blackberry. *HortScience*. 2019;54(9):1632-1636. DOI 10.21273/HORTSCI14119-19.
- Connor A.M., Finn C.E., Alspach P.A. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity and total phenolic content among blackberry and hybrid berry cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2005; 130(4):527-533. DOI 10.21273/JASHS.130.4.527.
- Danek J., Kolodziejczak P. Breeding of blackberries for Polish climatic conditions. *Acta Hortic.* 1993;352:283-284. DOI 10.17660/ActaHortic.1993.352.40.
- Danek J., Orzeł A. Evaluation of the breeding value of selected blackberry genotypes. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 2004;12:29-33.
- Darrow G.M. Blackberry and Raspberry Improvement. *Yearbook*. 1937;496-533. URL: <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43893570/PDF>
- Finn Ch.E., Clark J.R. Emergence of blackberry as a world crop. *Chron Hort.* 2011;51(3):13-18.
- Finn Ch.E., Clark J.R. Blackberry. *Fruit Breed.* 2012;151-190. URL: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4419-0763-9_5.pdf
- Finn C.E., Strik B.C. Blackberry cultivars for Oregon. 2014. URL: <http://berrygrape.org/files/caneberries/blackberrycultivars>
- Finn C.E., Strik B.C., Yorgey B.M., Peterson M.E., Lee J., Martin R.R., Hall H.K. 'Columbia Star' thornless trailing blackberry. *HortScience*. 2014;49(8):1108-1112. DOI 10.21273/HORTSCI.49.8.1108.
- Finn C.E., Strik B.C., Yorgey B.M., Peterson M.E., Jones P.A., Martin R.R. 'Columbia Sunrise' thornless trailing blackberry. *HortScience*. 2018;53(2):256-260. DOI 10.21273/HORTSCI12673-17.
- Finn C.E., Strik B.C., Yorgey B.M., Qian M., Martin R.R., Peterson M.E. 'Wild Treasure' thornless trailing blackberry. *HortScience*. 2010;45(3):434-436. DOI 10.21273/HORTSCI.45.3.434.
- Focke W.O. Species *Ruborum*. Monographiae Generis *Rubi Prodromus*. Stuttgart, 1910.
- Lee J. Chapter 4. Blackberry fruit quality components, composition, and potential health benefits. In: Hall H.K., Funt R.C. (Eds.) *Blackberries and Their Hybrids*. 2017:49-62. DOI 10.1079/9781780646688.0049.
- Mettler D., Hatterman-Valenti H. Rotating cross-arm and winter row-covers for florican blackberry (*Rubus* subgenus *Rubus* Watson) production in North Dakota. *HortScience*. 2018;53(12):1810-1813. DOI 10.21273/HORTSCI13103-18.
- Milošević T., Milošević N., Glišić I., Mladenović J. Fruit quality attributes of blackberry grown under limited environmental conditions. *Plant Soil Environ.* 2012;58(7):322-327. DOI 10.17221/33/2012-PSE.
- Orzeł A., Simlat M., Danek J. Directions in raspberry and blackberry breeding program conducted in NIWA Berry Breeding Ltd., Brzezna, Poland. *ActaHortic.* 2016;1133:29-34. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1133.5.
- Stanisavljevic M. New small fruit cultivars from Cacak: 1. The new blackberry (*Rubus* sp.) cultivar 'Cacanska Bestrna.' *Acta Hortic.* 1999;505:291-296. DOI 10.17660/ActaHortic.1999.505.37. https://www.actahort.org/books/505/505_37.htm
- Strik B.C., Finn C.E. Blackberry production systems – a worldwide perspective. *Acta Hortic.* 2012;946:341-347. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.946.56.
- Strik B.C., Finn C.E., Clark J.R., Bañados P. Worldwide production of blackberries. *Acta Hortic.* 2008;777:209-218. DOI 10.17660/ActaHortic.2008.777.31.
- Takeda F., Glenn D.M., Tworkoski T. Rotating cross-arm trellis technology for blackberry production. *J. Berry Res.* 2013;3:25-40. DOI 10.3233/JBR-130044.
- Takeda F., Handley D.A. Winter protection method for blackberries. *HortScience*. 2006;41(4):1011. DOI 10.21273/HORTSCI.41.4.1011D.
- Thompson M.M. Chromosome numbers of *Rubus* cultivars at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience*. 1995;30(7):1453-1456.
- Wojcik-Seliga J., Wojcik-Gront E. Evaluation of blackberry and hybrid berry cultivars new to Polish climate – Short communication. *HortScience*. (Prague). 2013;40(2):88-91.

ORCID ID

L.A. Gruner orcid.org/0000-0001-6551-4369
B.B. Kornilov orcid.org/0000-0002-1039-044X

Благодарности. Авторы благодарят рецензентов и редакцию журнала за ценные замечания, сделанные в ходе обсуждения текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.11.2019. После доработки 18.06.2020. Принята к публикации 19.06.2020.

Содержание желтых пигментов в зерне твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): биосинтез, генетический контроль, маркерная селекция

П.Н. Мальчиков , М.Г. Мясникова

Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, пгт Безенчук, Самарская область, Россия

 e-mail: sagrs-mal@mail.ru


Аннотация. Зерно с высоким содержанием каротиноидных пигментов ценится за ярко-желтый цвет пасты, производимой из него, и провитаминную (витамин А) и антиоксидантную активность пигментов. Цель настоящего обзора – обобщение современных знаний о биосинтезе и генетическом контроле накопления пигментов в зерне твердой пшеницы и оценка основных результатов исследований и селекции за последние двадцать лет за рубежом и в России. Признак «концентрация каротиноидных пигментов в зерне» (Ypc) относится к разряду количественных. Тем не менее превалирование сильных аддитивных эффектов генов и высокая наследуемость способствовали значительному прогрессу в селекции по этому признаку. Методами молекулярного маркирования локусов количественных признаков (QTL), контролирующих синтез каротиноидных пигментов и значения индекса желтизны (YI), установлено их распределение по всем хромосомам генома твердой пшеницы. Основные генетические локусы, определяющие более 60 % варьирования признака, были картированы в хромосомах 7AL и 7BL. Вклад этих локусов связан с аллельными вариациями, влияющими на активность фермента фитоеинсинтетазы (PSY). В других хромосомах были локализованы минорные генетические факторы, из которых наиболее значимы QTL, расположенные в хромосомах 3AS (ассоциирован с геном LCYE-ликопин-ε-циклаза) и 4BS (аллель Lpx-B1.1c). При этом показано, что аллель Lpx-B1.1c вносит вклад в снижение активности липоксигеназы, окисляющей каротиноиды в процессе изготовления конечных продуктов. Рассмотрены и обсуждены проблемы использования молекулярных маркеров в селекционных программах, нацеленных на увеличение концентрации пигментов в зерне и улучшение цветочных характеристик пасты. Ключевые слова: твердая пшеница; каротиноиды; концентрация пигментов; индекс желтизны; маркерная селекция.

Для цитирования: Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Содержание желтых пигментов в зерне твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): биосинтез, генетический контроль, маркерная селекция. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):501-511. DOI 10.18699/VJ20.642

The content of yellow pigments in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grains: biosynthesis, genetic control, marker selection

P.N. Malchikov , M.G. Myasnikova

Samara Federal Research Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Samara Scientific Research Agriculture Institute named after N.M. Tulaikova, Bezenchuk, Samara region, Russia

 e-mail: sagrs-mal@mail.ru

Abstract. Grain with high contents of yellow pigments will add the natural bright-yellow colour to the paste, which unlike a paste with a high level of whiteness, are preferred by consumers. The provitamin activity (vitamin A) and antioxidant activity of the carotenoid pigment increase the biological and nutritional value of the grain with high contents of these pigments. The purpose of this review is to summarize modern knowledge about the biosynthesis and genetic control of pigment accumulation in durum wheat and to assess the main results of research and selection over the past 20 years abroad and in Russia. The trait "concentration carotenoid pigment in grain" (Ypc) is quantitative. However, the prevalence of strong additive gene effects and high heritability have contributed to significant progress in breeding for this trait. Molecular labeling of quantitative trait loci (QTL) that control the synthesis of the carotenoid pigment and the yellowness index (YI) found that they are distributed across all chromosomes of the durum wheat genome. The main QTLs, which determine 60 % of the variation of the trait, were mapped to 7AL and 7BL chromosome. The contribution of these QTLs is associated with allelic variations that control the activity of phytoene synthase (PSY). QTLs with minor effects found on the remaining chromosomes are also reliably mapped using molecular markers. As confirmed in a number of experiments, most of them are QTLs located on 3AS (linked to the LCYE (lycopene ε-cyclase) allele and on 4BS (the LpxB1.1c gene). It has been shown that the LpxB1.1c allele

contributes to a decrease in the activity of lipoxygenase, which oxidases carotenoids during the production of end products. This review considered and discusses the problems of molecular markers in breeding programs to increase the concentration of pigments in the grain and improve the color characteristics of the paste.

Key words: durum wheat; carotenoids; concentration pigment; yellow index; marker-assisted selection.

For citation: Malchikov P.N., Myasnikova M.G. The content of yellow pigments in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grains: biosynthesis, genetic control, marker selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):501-511. DOI 10.18699/VJ20.642 (in Russian)

Введение

Твердая пшеница (*Triticum durum* Desf.) ежегодно выращивается во всем мире на площади около 17.0 млн га. Производство зерна колеблется по годам от 32 до 42 млн тонн. Продукты из твердой пшеницы используются почти во всех странах, но основными регионами потребления являются страны Средиземноморского бассейна, где зерно твердой пшеницы применяется в качестве сырья для различных продуктов, в основном пасты и круп кус-кус и булгур (Kabbaj et al., 2017). Содержание и структура белка (качество клейковины), а также цвет изделий (макарон, крупа) – наиболее ценные для пищевой, технологической промышленности и на рынке конечных продуктов в этих регионах (Sisson, 2008; Mazzeo et al., 2017). Желтый цвет определяется накоплением каротиноидов в эндосперме, обладающих провитаминами и антиоксидантными свойствами. В процессе размола зерна, замеса теста и изготовления макарон происходит окисление кислородом воздуха полиненасыщенных жирных кислот, каротиноидов, фенолов, что приводит к накоплению бурого (коричневого) пигмента. Окисление катализируется ферментами: липоксигеназой, полифенолоксидазой, пероксидазой, альдегидоксидазой (N'Diaye et al., 2017). Наличие спексов (темных вкраплений) также может снижать уровень желтизны семолины и макаронных изделий (Васильчук и др., 2009).

Результаты изучения наследования всего комплекса желтых пигментов в зерне твердой пшеницы показали, что оно носит количественный характер с высокими значениями коэффициента наследуемости и преобладанием аддитивных эффектов генов (Clarke et al., 1998; Borelli et al., 1999; Digesù et al., 2009; Blanco et al., 2011; Roncallo et al., 2012; Schulthess et al., 2013). В связи с этим правомерно предположение о том, что этот признак удобен для молекулярного маркирования соответствующих QTL и их картирования на хромосомах.

Биосинтез, содержание и распределение каротиноидов в зерновке твердой пшеницы

Средняя концентрация каротиноидов в зерне твердой пшеницы составляет 6.2 ± 0.13 мг/кг в сухом весе (Brandolini et al., 2015) с варьированием, в зависимости от сорта и условий среды (год, пункт), от 2.8 до 12.3 мг/кг (Colasuonno et al., 2017a). По мнению Н.С. Васильчука с коллегами (2009), в Поволжье при низкой активности окислительных ферментов достаточно иметь зерно с концентрацией 4.5 мг/кг для получения макарон золотисто-желтого цвета. Каротиноиды – не единственные желтые пигменты в зерне пшеницы и других злаков. Сравнивая общую концентрацию каротиноидов, определенную методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ВЭЖХ), с общим содержанием пигментов, А.М. Digesù с коллегами (2009) показали, что доля каротиноидов у культивируемых и диких тетраплоидных видов пшеницы составила 33.2 % от общего количества желтых пигментов. По результатам своих исследований А. Blanco с коллегами (2011) также сообщили о доле каротиноидов, составившей 37 % в общем объеме желтых пигментов, что означает наличие в экстрактах твердой пшеницы неизвестных желтых пигментов, поглощающих свет при 435 нм. По данным (Fu et al., 2017), полученным при изучении канадских сортов твердой пшеницы Navigator и Strongfield, фенольные соединения могут вносить существенный вклад в степень желтизны при экстракции пигментов. Brandolini с коллегами (2008) пришли к выводу, что, хотя каротиноиды являются наиболее важными пигментами при определении желтого цвета пшеничной муки и макарон, их точное измерение может быть достигнуто только с помощью ВЭЖХ анализа. Тем не менее среди желтых пигментов именно по каротиноидам имеется более подробная научная информация.

К каротиноидам относятся пигменты – каротины и кантофиллы. Химически они представляют собой изопреноидные углеводороды, содержащие 40 углеродных атомов (Кретович, 1986). Биосинтез каротиноидов тщательно исследован на различных растениях – арабидопсисе, рисе, кукурузе, перце, томатах, апельсине и других культурах (Colasuonno et al., 2017a; Rodrigues-Concepcion et al., 2018; Sun et al., 2018).

В зерне твердой пшеницы представлен широкий набор каротиноидных пигментов: лютеин, β -каротин, зеаксантин, β -криптоксантин, β -апокаротенал, антраксантин, тараксантин (лютеин-5,6-эпоксид), авоксантин и трити-коксантин. Каротины α и β в основном находятся в зародыше, превалирующий в зерне среди каротиноидов лютеин (86–94 %) одинаково распределен по слоям и частям зерновки (Digesù et al., 2009). Его доля в семолине при размоле зерна твердой пшеницы составляет 83 %, во фракциях отрубей – 75 % (Fu et al., 2017). Установлено, что характер распределения желтых пигментов по фракциям, выделяемым в процессе размола, варьирует, в зависимости от генотипа. Концентрация лютеина в эндосперме сорта Navigator была выше, чем в отрубях, в то же время у сорта Strongfield наблюдалась обратная закономерность (Fu et al., 2017). В процессе помола и получения крупки (семолины) концентрация большинства каротиноидных пигментов уменьшается, что связано с увеличением контакта измельченных частиц зерна с кислородом воздуха и активностью ферментов. Лютеин и зеаксантин имеют более высокую стабильность при помоле и изготовлении конечных продуктов, по сравнению с другими каротиноидами (Kean et al., 2011).

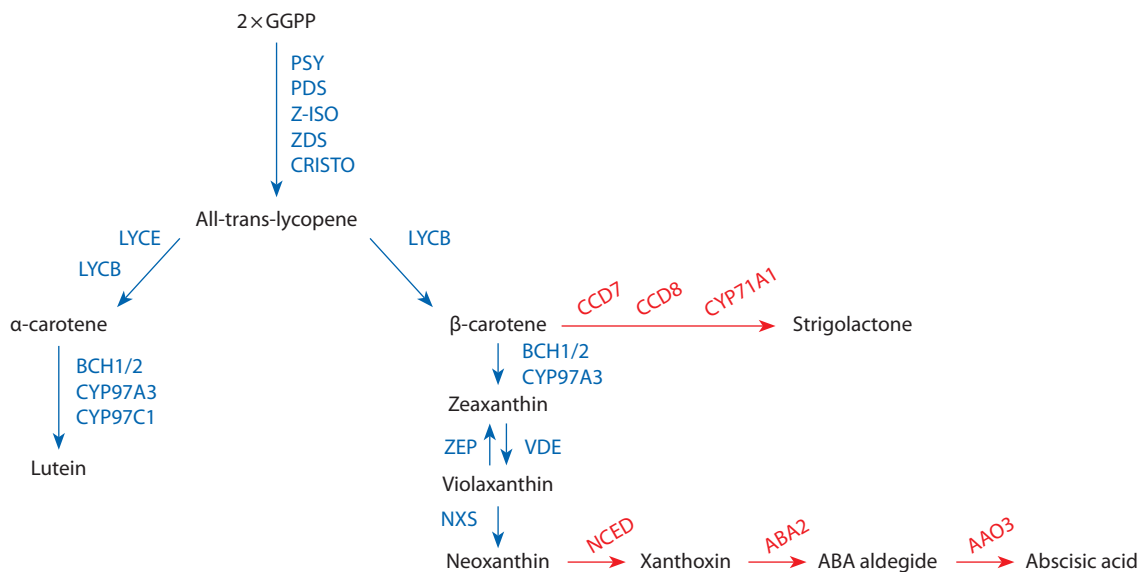


Схема биохимических реакций каротиноидного пути. Из: (Colasuonno et al., 2019).

Основные компоненты биосинтетической цепи обозначены черным цветом; все вовлеченные в процесс синтеза каротиноидов ферменты – синим; ферменты диоксигеназной группы, участвующие в расщеплении каротиноидов в вегетирующих растениях в стрессовых условиях с эффектом накопления ингредиентов гормональной природы – абсцизовой кислоты и стриголактонов, показаны красным цветом.

Накопление каротинов в зерне, особенно β -каротина, обуславливает изменение интенсивности окраски семолины от желто-оранжевого до красноватого оттенка. Ксантофиллы обеспечивают желто-оранжевую окраску крупки и макарон. Схема биосинтеза каротиноидов показана на рисунке. Исходным веществом для биохимического синтеза каротинов служит 5-углеродный (C-5) изопреноид – изопентилпирофосфат. Конденсация этого изопреноида представляет собой основу для образования геранилгеранилпирофосфата (C-20). В результате соединения двух молекул геранилгеранилпирофосфата при участии фермента фитоенсинтетазы образуется фитоен (C-40) – первое промежуточное вещество в биосинтезе каротинов. Этот этап является ключевым – скорость биосинтеза и накопления фитоена влияет на весь пул каротиноидов (Cazonelli, Pogson, 2010; Ke et al., 2019). Фитоен в результате десатурации под действием ферментов фитоендесатуразы (PDS), z-каротиндесатуразы (ZDS), каротинизомеразы (CRISTO) и последовательного удаления четырех атомов водорода превращается в ликопин. Ликопин – каротиноид, определяющий красную и оранжевую окраску плодов, – исходное вещество для синтеза α -каротина/лютеина (класс ксантофиллов) – главного каротиноида зерна твердой пшеницы и β -каротина/зеаксантина (класс ксантофиллов) – главного компонента каротиноидных пигментов в зерне кукурузы (Zhang, Dubcovsky, 2008). Дальнейшее гидроксילирование α -каротина приводит к образованию желтого зейкоксантина и лютеина. Трансформация β -каротина продуцирует образование β -криптоксантина, зеаксантина, антраксантина, виолаксантина и неоксантина. Эти реакции катализируются двумя негемовыми β -каротингидроксилазами (BCH1 и BCH2) и двумя гемгидроксилазами (CYP97A и CYP97C) соответственно (Sun et al., 2018). Последняя фаза биосинтеза каротиноидов, катализируемая неоксантинооксидазой (NXS), заключается

в превращении виолаксантина в неоксантин. Окисление виолаксантина и неоксантина приводит к образованию ксантоксина, превращаемого в растительный гормон – абсцизовую кислоту (АВА), которая способствует регулярному и сбалансированному накоплению пигментов в растениях и формированию устойчивости к абиотическим стрессам (Al-Babilli, Bowmeester, 2015; Nisar et al., 2015). Еще одна ветвь трансформации β -каротина представляет превращение его под действием ферментов диоксигеназной группы (CCD7, CCD8, CYP71A1) в стриголактоны – ингредиенты гормональной природы, регулирующие развитие и ростовые процессы растений (Colasuonno et al., 2019).

Методы определения общего и компонентного состава каротиноидных пигментов в зерне

Содержание пигментов в зерне, крупке и макаронах относится к сложным признакам. Для общего и компонентного определения их содержания существует несколько методов. Эталонные методы для определения общего содержания каротиноидов – стандартный метод 152 (ICC Method 152, 1990) Международной ассоциации науки и техники о зерне (ICC) и международный официальный метод (AACC 14-50.01 (AACC International, 2013)). Эти две процедуры основаны на экстракции всех пигментов в водонасыщенном n-бутаноле с последующим спектрофотометрическим количественным определением оптической плотности спиртового экстракта при 435.5 нм (длина волны максимального поглощения лютеина, доминирующего каротиноида в твердой пшенице). В качестве альтернативы концентрации для характеристики насыщенности пигментами зерна применяется индекс желтизны (YI) на основе количественного определения коэффициента отражения света. Хроматограф Minolta CR-300 (Konica

Minolta Pty Ltd, Macquarie Park, NSW), оснащенный импульсной ксеноновой дуговой лампой, – наиболее часто используемый инструмент для анализа индекса желтизны. Этот прибор позволяет определять коэффициенты индекса желтизны и коричневатости (100-L) семолины и макарон. В России в некоторых селекционных центрах для определения индекса желтизны применяется прибор Specol 10 по методологии, предложенной Н.С. Васильчуком (2001). Методы быстройдействующей жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) с применением инфракрасной спектроскопии позволяют определить химический состав каротиноидных пигментов и измерить количество каждого компонента в крупке и пасте (Brandolini et al., 2008; Fu et al., 2017).

Картирование локусов, контролирующих синтез пигментов

Концентрация пигментов в зерне твердой пшеницы контролируется различными генами с аддитивными эффектами и зависит от условий внешней среды (Васильчук и др., 2009; Мальчиков, 2009; Schulthess, Schwember, 2013; Гапонов и др., 2018; Мясникова и др., 2019). Систематическое сортоизучение в различных экологических условиях дает необходимую информацию о свойствах сортов и наличии у них соответствующих QTL. Достоверные, значительные и стабильные различия между генотипами по величинам YPC (Yellow Pigment Concentration) и YI (Yellowness Index) свидетельствуют о функционировании локусов количественного признака. Для маркирования и локализации QTL используют рекомбинантно-инбредные линии (RIL), созданные от двуродительских скрещиваний контрастных по величине признака сортов и отобранные в поколениях (от одного парного скрещивания) из беккроссных или дигаллоидных популяций (Elouafi et al., 2001; Pozniak et al., 2007; Singh et al., 2009; Colasuonno et al., 2014). В настоящее время для этих целей используется метод полногеномного генотипирования для поиска корреляций между генотипами и фенотипами в наборах селекционных линий, образцов генетических коллекций и выявления аллельных вариантов молекулярных маркеров и функциональных генов (Vargas et al., 2016; Colasuonno et al., 2017a; Fiedler et al., 2017). В последнее десятилетие этот подход получил распространение благодаря наличию большого количества ДНК-маркеров, равномерно распределенных в геноме, полученных на основе однонуклеотидного полиморфизма (SNP) и совершенствования статистических инструментов (Чесноков, Артемьева, 2011; Maccaferri et al., 2011; Wang et al., 2014; Sehgal, Dreisigacker, 2019). Картирование QTL предполагает хромосомную локализацию локуса в геноме по результатам оценки признаков, полученных в нескольких экспериментах.

Воспроизводимость результатов может зависеть от влияния на признак в исследуемой картирующей популяции многочисленных генов с аддитивными эффектами, родительских компонентов, взаимодействия генотип–среда, числа используемых маркеров и способа измерения каротиноидов. В настоящее время для YPC и YI идентифицирован 81 QTL, включая синглетоны и кластеры QTL, которые распределены по всем хромосомам (Colasuonno et al., 2019). Локализация некоторых QTL была подтверж-

дена с использованием нескольких картирующих популяций, что указывает на присутствие стабильных аллелей, влияющих на улучшение цвета и пищевой ценности зерна твердой пшеницы. Стабильные QTL были обнаружены в хромосомах 1A, 1B, 2A, 2B, 3B, 4A, 6A, 6B, 7A, 7B (Parker et al., 1998; Hessler et al., 2002; Patil et al., 2008; Zhang et al., 2009; Pozniak et al., 2012).

По эффектам на фенотипическую вариабельность признаков QTL распределяются на группы с сильным (40 %), средним (10–40 %) и незначительным (<10 %) влиянием (Colasuonno et al., 2019). Главные локусы с сильным влиянием на YPC и YI были картированы в хромосоме 7AL и дистальной области 7BL (Elouafi et al., 2001; Pozniak et al., 2007; Patil et al., 2008; Zhang, Dubcovsky, 2008). В частности, в длинном плече хромосомы 7A были идентифицированы два QTL с противоположными эффектами. Локус с негативным эффектом по отношению к признакам YPC и YI был ассоциирован с аллельными вариациями гена альдегидоксидазы (AO) – фермента, катализирующего деградацию каротиноидов в результате их окисления (Colasuonno et al., 2014, 2017b). Второй (QTL-73), расположенный в области локализации гена *Psy-1*, оказывал положительный эффект (до 60 % вариации) на признак YPC. Аналогичные ассоциации QTL и YPC установлены в хромосоме 7BL – негативный эффект одного локуса на фенотипическое проявление YPC составлял 29 %, позитивное влияние второго локуса – 52 % (He et al., 2008, 2009; Zhang, Dubcovsky, 2008). В публикации (N'Diaye et al., 2017) сообщается о картировании YPC и YI методом конструирования гаплотипных блоков. Гаплотипные блоки формируются с применением насыщенных молекулярных SNP карт. При этом SNP, расположенные в хромосоме в пределах 5.3 сМ, группируют в один гаплотипный блок, определяющий один локус, который обозначается префиксом “hap” с указанием номера хромосомы и порядкового номера локуса на хромосоме. Этот подход подтвердил существование высокозначимого QTL (hap_7A_32, маркер *Tdurum_conting_54832_139*) в хромосоме 7AL, объясняющего 35.6 % фенотипической дисперсии общего пигмента и индекса желтизны в семолине твердой пшеницы и связанного с локусом *Psy-A1*. Использование подобного метода подтвердило достоверную значимость QTL в хромосомах 2A (hap_2A_18), 7B (hap_7B_36) и 4B (hap_4B_6).

Незначительные по эффектам QTL обнаружены в хромосомах 3A (Parker et al., 1998), 4A и 5A (Hessler et al., 2002), 2A, 4B и 6B (Pozniak et al., 2007), 4B и 6B (Zhang, Dubcovsky, 2008), 1A, 3B и 5B (Patil et al., 2008), 3B и 5B (Howitt et al., 2009), 1A, 1B, 3B и 4A (Zhang et al., 2009).

Гены, участвующие в биосинтезе каротиноидов и их окислении в процессе изготовления конечных продуктов

В настоящее время получена информация о генах-кандидатах, расположенных в регионах локализации локусов со значимым влиянием на признаки YPC и YI. В данном случае к ним относятся гены, контролирующие активность основных ферментов биосинтеза каротиноидов пшеницы, и катаболические гены, вызывающие деградацию каротиноидов. Количественные различия генотипов по на-

Таблица 1. Гены и их маркеры, связанные с концентрацией желтых пигментов в зерне и цветом макарон, расположенные в геномах А и В пшеницы

Ген	Локус	Аллель, гаплотип	Маркер	Хромосома	Лит. источник
PSY-1	Psy-A1	hap_7A_32	T.durum_conting54832_139	7AL	N'Diaye et al., 2017
		PsyA1a, PsyA1b	YP7A	7AL	He et al., 2008; Ravel et al., 2013
		PsyA1a, PsyA1b, PsyA1c	YP7A-2	7AL	He et al., 2009; Crawford, Francki, 2013; Ravel et al., 2013;
		Psy-A1o , Psy-A1e, Psy-A1p , Psy-A1a Psy-A1c, Psy-A1t	Psy-A1_STS	7AL	Singh et al., 2009; Crawford, Francki, 2013
		PSY1-AI	YP7A-2, Psy-1SSR Qyp.macs-7A	7AL	Campos et al., 2016; Vargas et al., 2016; Patil et al., 2018
		Psy-A1a, Psy-A1k, Psy-A1ka, Psy-A1kb, PsyA1e, Psy-A1ca, Psy-A1cb, Psy-A1p, PsyA1ra, Psy-A1rb, Psy-A1j, Psy-A1t	Psy-A1_R_49	7AL	Ravel et al., 2013
Psy-B1	hap_7B_36			7BL	N'Diaye et al., 2017
		Psy-B1a, Psy-B1b	YP7B-1		He et al., 2009; Ravel et al., 2013
		Psy-B1c	YP7B-2		He et al., 2009
		Psy-B1d	YP7B-3		»
		Psy-B1e, Psy-B1a, Psy-B1aa, Psy-B1b, Psy-B1ca, PsyB1m, Psy-B1d	YP7B-4		Ravel et al., 2013
PSY-2	PSY-B2		Xwmc73 – Xgwm274 -wPT-3661	5BS	Colasuonno et al., 2014
ZDS	Zds-A1	Zds-A1a, Zds-A1b	YP2A-1		Dong et al., 2012
LCYE	e-LCY (lutein)	e-LYC3Aa, e-LYC3Ab3A		3A	Crawford, Francki, 2013
Lipoxygenase activity (LOX)					
Lpx-B1	Lpx-B1.1	hap_4B_6 Lpx-B1.1c	T.durum_conting51688_681	4BS	Verlotta et al., 2010
Polyphenol oxidase activity (PPO)					
PPO	Tc1		Xgwm312@2A	2AL	Watanabe et al., 2006
	Tc2			2BL	»
PPO-1	PPO-A1	PPO-A1b, PPO-A1f, PPO-A1e, PPO-A1g, hap_2A-18	PPO18, MG18, BobWhite_c41527_201	2AL	He et al., 2009; Taranto et al., 2012; N'Diaye et al., 2017

коплению пигментов связаны с аллельным разнообразием генов PSY – фитоенсинтетазы (Pozniak et al., 2007; He et al., 2008; Dibari et al., 2012; Colasuonno et al., 2014; Campos et al., 2016), LCYE – ликопин-ε-циклазы (Howitt et al., 2009; Crawford, Francki, 2013), LCYB – ликопин-β-циклазы (Zeng et al., 2015), HYD – β-гидроксилазы (Qin et al., 2012), PDS (фитоендесатуразы) и ZDS – каротиндесатуразы (Cong et al., 2010). Катаболические гены контролируют активность альдегидоксидазы – АО (Colasuonno et al., 2017b), полифенолоксидазы – PPO (Watanabe et al., 2004, 2006; Si et al., 2012), липоксигеназы – LOX или Lpx (DeSimone et al., 2010; Randhawa et al., 2013) и пероксидазы – PER (Ficco et al., 2014), снижающих концентрацию пигментов и потребительские качества конечных продуктов. Наиболее значимые гены, их аллельные варианты и маркеры обсуждаются в тексте и представлены в табл. 1.

Как уже отмечено, ключевым ферментом в сложной цепочке биосинтеза каротиноидов является PSY. Известны три различных гена, кодирующих активность этого фермента: PSY 1, PSY 2, PSY 3, картированные в гомеологичных хромосомах 7-, 5- и 3-й групп соответственно (Dibari

et al., 2012). Ген PSY-1 был локализован в хромосомах 7A и 7B твердой пшеницы. Обнаружено, что ген PSY-B1, расположенный в хромосоме 7B, сегрегирует совместно с QTL, ассоциированным с каротиноидным пулом, с изменчивостью YI и YPC от низкого уровня (10 %) до среднего (10–30 %). Ген PSY-A1, расположенный в хромосоме 7A, ведет себя как кодоминантный маркер, объясняет фенотипическую изменчивость, в зависимости от генофона, в диапазоне от среднего (10–30 %) до высокого (30–50 %) и очень высокого (> 50 %) уровня (Colasuonno et al., 2014). В целом влияние альтернативных аллелей PSY-A1, по-видимому, является наиболее важным в изменчивости концентрации пигментов и индекса желтизны крупки. Этот вывод основан на результатах изучения различных популяций твердой пшеницы (Campos et al., 2016; Vargas et al., 2016; Patil et al., 2018). Ген PSY-B2, локализованный в 5BS, не оказывал существенного влияния на концентрацию каротиноидов в зерне и крупке (Colasuonno et al., 2014). Локализованный в длинном плече хромосомы 5B ген PSY-B3 повышал экспрессию в листьях и корнях в условиях абиотического стресса (засуха, засоление)

Таблица 2. Распределение генов и аллелей Lpx-B1 среди сортов разных периодов селекции (Verlotta et al., 2010)

Сорта	Страна	Гаплотипы		
		I (Lpx-B1.1b +Lpx-B1.3)	II (Lpx-B1.1a +Lpx-B1.2)	III (Lpx-B1.c +Lpx-B1.2)
Сорта, созданные до 1971 г.				
Matarese, Trinakria, Timilia, Grifoni, Capeiti 8	Италия	+		
Aziziah	Ливия	+		
Kiperounda	Кипр	+		
Polesine	Италия		+	
Russello	Италия		+	
Taganrog	СССР		+	
Cannizzara	Италия			+
Сорта, созданные в 1971–1990 гг.				
Primadur, Tresor, Neodur	Франция		+	
Karel, Latino, Duilio	Италия		+	
Valnova, Valgerardo, Creso, Grazia, Ofanto, Valforte, Simeto	Италия			+
Produra	США			+
Сорта, созданные в 1991–2005 гг.				
Marco, Gianni, Bronte, Rusticano, Tiziana, Svevo, Giotto, Iride, Dupri, Italo, Radioso, Claudio, Torrebianca	Италия		+	
Brindur, Nefer	Франция		+	
Messapia, Gargano, Carpio, Cirillo, Adamello, Colosseo, Quadrato, Ciccio, Vesuvio, Platani, Giusto, Solex, S. Carlo, Bradano, Preco, Fortore, Varano, Lesina, Zenit	Италия			+
Colorado	Италия/США			+
Navigator	Канада			+
Strongfield	Канада		+	

Примечание. «+» означает принадлежность к гаплотипу.

и был связан с увеличением пула абсцизовой кислоты (Dibari et al., 2012). Гены, контролирующие активность других ферментов, также имеют значимое влияние на концентрацию пигментов в зерне и конечных продуктах. Так, ген ликопин-ε-циклазы (LCYE), ассоциированный с QTL на хромосоме 3A, играет определяющую роль в процессах накопления лютеина – главного каротиноида зерна твердой пшеницы (Howitt et al., 2009). Ген z-каротиндесатуразы (ZDS), маркируемый кодоминантным функциональным маркером YP2A-1 на основе полиморфизма двух аллелей, расположенный на хромосоме 2A, объяснял 11.3 % фенотипической дисперсии YPC и YU в популяции дигаплоидных линий (Dong et al., 2012).

Наиболее четко выражены гены-кандидаты, участвующие в катаболическом пути окисления каротиноидов. Липоксигеназа (Lpx) у растений продуцирует активные формы кислорода, приводящие к деградации каротиноидов и обесцвечиванию конечных продуктов, получаемых из зерна твердой пшеницы (Borrelli et al., 2003). У твердой пшеницы существуют разные гены Lpx (Borrelli, Trono, 2016). На стадии зрелого зерна у сортов с контрастной активностью (окислительной способностью) была установлена различная степень транскрипции генов Lpx-1 и Lpx-3, в то время как транскрипты Lpx-2 на стадии зрелого зерна отсутствовали (De Simone et al., 2010). Ло-

кус Lpx-B1 расположен на коротком плече хромосомы 4B, в котором обнаружены три тесно сцепленных гена: Lpx-B1.1, Lpx-B1.2 и Lpx-B1.3. Ген Lpx-B1.1 представлен тремя аллелями – Lpx-B1.1a, Lpx-B1.1b, Lpx-B1.1c (Hessler et al., 2002; Carrera et al., 2007; Verlotta et al., 2010). Анализ QTL у твердой пшеницы показал, что 35–54.0 % вариации активности Lpx объясняется Lpx-B1. Аллель Lpx-B1.1c отличается делецией в нуклеотидной последовательности от второго интрона до последнего экзона (Carrera et al., 2007). Этот аллель коррелирует с высоким уровнем желтизны и относительно слабой деградацией пигментов в макаронных изделиях (Carrera et al., 2007; Verlotta et al., 2010). Изучение коллекции твердой пшеницы с включением в нее ландрасов и современных сортов позволило идентифицировать три гаплотипа: первый включал гены и аллели – Lpx-B1.3+Lpx-B1.b, второй – Lpx-B1.2+Lpx-B1.1a и третий – Lpx-B1.2+Lpx-B1.1c. Эти гаплотипы демонстрировали, соответственно, высокий, средний и низкий уровни функциональных транскриптов Lpx-B1 и ферментативной активности в созревшем зерне.

Известны коммерческие сорта-носители разных генов, Lpx-B1.1, Lpx-B1.2, Lpx-B1.3, и аллелей в локусе Lpx-B1.1. В частности, сорта Kofa и Augeo содержат аллель Lpx-B1.1c. Описаны возможности накопления каротиноидов и генетика липоксигеназы у сортов: Prima-

dur (имеет высокое содержание каротиноидов и высокую активность липоксигеназы), Cosmodur (высокая концентрация каротиноидов, низкая активность липоксигеназы – Lrx-B1.1c), Trinakria (низкая концентрация каротиноидов, высокая активность липоксигеназы), Creso (низкое содержание каротиноидов и низкая активность липоксигеназы – Lrx-B1.1c) (De Simone et al., 2010). По данным A. Verlotta с коллегами (2010) в табл. 2 показано распределение сортов разных периодов селекции (до 1971 г. и в 1971–2005 гг.) по их принадлежности к различным гаплотипам. Вызывает внимание увеличение частоты встречаемости второго и третьего гаплотипов в сортах последних периодов селекции. Необходимо подчеркнуть, что этот результат достигнут селекционерами без понимания и учета в селекционных процедурах генетики окислительных процессов в зерне.

Второй по значимости воздействия на цвет конечных продуктов катаболический фермент – полифенолоксидаза (PPO). Активность фермента контролируют два гена, идентифицированных на гомеологичных хромосомах второй группы, 2A и 2B (Jimenez, Dubcovsky, 1999; Simeone et al., 2002; Watanabe et al., 2004, 2006). В частности, R. Simeone с коллегами (2002) сообщили о значительном генетическом эффекте на активность PPO локуса на длинном плече 2A хромосомы. Гены Tc1 и Tc2 в дистальных частях 2AL и 2BL на расстоянии 46.08 и 40.7 сМ от центромеры картированы N. Watanabe с коллегами (2004). Изучение RIL, полученной от скрещивания сортов Jennah Khetifa и Cham 1, показало, что локус в хромосоме 2A обеспечивал 49.1 % активности PPO, низкая активность сегрегировала с молекулярным маркером Xgwm312@2A (Watanabe et al., 2006).

Два гомологичных семейства PPO были картированы по второй гомеологичной группе хромосом и названы PPO-1 (PPO-A1 и PPO-B1) и PPO-2 (PPO-A2 и PPO-B2) (Beecher et al., 2012). Использование маркера, специфичного для мягкой пшеницы (PPO18), для анализа твердой пшеницы позволило обнаружить четыре аллеля PPO-A1: PPO-A1b, PPO-A1f, PPO-A1e, PPO-A1g (He et al., 2009). Используя 111 образцов твердой пшеницы, F. Taranto с коллегами (2012) определили связь различных аллелей PPO-A1 с уровнем активности фермента. Аллель PPO-A1f был связан с высокой, тогда как PPO-A1b и PPO-A1g – с низкой активностью фермента. Эти ученые разработали также новый маркер (MG18), способный обнаружить те же аллели, что и при помощи маркера PPO18, но более эффективно и с более низкой вариабельностью активности PPO внутри каждой группы сортов, несущих один и тот же аллель (Taranto et al., 2012). В маркер-ассоциированной селекции с целью снижения активности PPO целесообразно использовать и паралогичные гены PPO-B1 и PPO-B2 с применением соответствующих маркеров MG08 и MG33, предложенных F. Taranto с коллегами (2015). Гены PPO-B1 и PPO-B2 были расположены на расстоянии 11.4 сМ от центромеры на хромосоме 2BL. Скрининг коллекции твердой пшеницы с помощью маркеров MG08 и MG33 позволил идентифицировать четыре и два аллеля соответственно, включая три новых аллеля гена PPO-B1: PPO-B1b, PPO-B1c и PPO-B1d, и один новый аллель PPO-B2 – PPO-B2d. Маркер MG33 способен

распознавать два аллеля PPO-B2, связанных с высокой (PPO-B2d) и низкой (PPO-B2a) активностью фермента (Taranto et al., 2015).

Значительное влияние на признаки YI, YPC и цвет макаронных изделий оказывает альдегидоксидаза (АО; EC 1.2.3.1) (Colasuonno et al., 2017b). Три изоформы фермента пшеницы, АО1, АО2, АО3, были локализованы на 2-, 5-, 7-хромосомных группах соответственно. Третий ген альдегидоксидазы, АО-А3, расположенный на хромосоме 7AL, связан с QTL, влияющим на признаки YI и YPC (Colasuonno et al., 2017b). Эксперименты с двумя сортами, Ciccio (низкое содержание каротиноидов в зерне) и Svevo (высокое содержание каротиноидов), с применением метода qRT-PCR выявили высокий уровень экспрессии гена АО-А3 у первого сорта и низкий у второго, что подтверждает отрицательный эффект продуктов гена в период накопления каротиноидов. На основе SNP данных, соответствующих изоформе фермента, на хромосоме 7AL картирован маркер IWB59875, который предложен для процедур маркерной селекции для повышения содержания каротиноидов в зерне и цвета макаронных изделий (Colasuonno et al., 2017b).

Пероксидазы – ферменты, катализирующие общую реакцию: $ROOH + H_2O_2 = ROH + H_2O + 1/2O_2$ (Feillet et al., 2000). Паста, произведенная из зерна сортов с высоким уровнем активности пероксидазы, имеет буро-коричневый цвет и низкие потребительские качества (Sisson, 2008). В то же время в процессе изготовления макарон пероксидаза не проявляется в связи с недоступностью перекиси водорода (Ficco et al., 2014). Активность ферментов этой группы в зерне твердой пшеницы значительно меньше, чем в зерне мягкой пшеницы. В связи с этим большинство исследований по их изучению проведено на мягкой пшенице. В литературе отсутствуют сведения о специфических маркерах в геноме твердой пшеницы, связанных с QTL или генами низкой активности. В ряде публикаций отмечено, что гены пероксидазы расположены в гомеологичных хромосомах групп 1, 2, 3, 4 и 7 (Liu et al., 1990; Wei et al., 2015). В зерне твердой пшеницы установлено функционирование 12 изоформ пероксидазы, различающихся по активности в период налива, созревания и прорастания зерна. Некоторые изоформы имеют специфическую локализацию в зерне – перикарп, эндосперм, зародыш. Наиболее важная изоформа, P-5, расположена в эндосперме и оказывает значимое влияние на потемнение (коричневатость) макаронных изделий (Feillet et al., 2000). При использовании полногеномного секвенирования и нулли-тетрасомных линий сорта Чайниз Спринг обнаружены и локализованы два гена, TaPod-A2 и TaPod-D1, на хромосомах 7AS и 7DS. Анализ SNP выявил для двух аллелей локуса TaPod-D1 два функциональных маркера, POD-7D1 и POD-7D6, с высокой и низкой активностью пероксидазы соответственно (Geng et al., 2019). Эти данные, полученные на мягкой пшенице, с учетом ортологичности геномов А и В в перспективе можно адаптировать к проблемам маркерной селекции твердой пшеницы. В отечественной литературе известна публикация А.А. Вьюшкова (2004), в которой приведены значительные сортовые различия твердой пшеницы по активности пероксидазы в крупке (эндосперме).

Результаты и перспективы применения MAS в селекции твердой пшеницы

Несмотря на большое количество работ по локализации и маркированию QTL, связанных с высокой концентрацией каротиноидов в зерне и крупке, результаты прямой проверки применения MAS (селекция с помощью маркеров) представлены ограниченно. Patil с коллегами (2018) сообщили о высокой эффективности использования маркера *Psy-A1SSR*, сцепленного с QTL и локусом *Psy-A1*, на хромосоме 7AL. Маркер *Psy-1SSR* разработан на основе вариаций в промоторной области *PSY-1*, он позволяет идентифицировать восемь аллелей *Psy-A1* и семь аллелей *Psy-B1* одновременно. Маркер *Psy-A1SSR*, расположенный в 7AL в большом QTL для YPC, вместе с ранее установленным маркером *Qyr.macs-7A* был идентифицирован в популяции RIL-PDW233/Bhalegaon 4. Родительский сорт PDW 233 в этой популяции является носителем QTL высокой концентрации пигментов. Эти маркеры были применены для улучшения индийских сортов MACS 3125 и HI8498 с низкой концентрацией пигментов (3.57 и 3.26 ppm соответственно), которые были взяты в качестве рекуррентных родителей в скрещиваниях с PDW 233 – донором QTL для YPC с высокой концентрацией пигментов (8.36 ppm). Селекционные линии, полученные с применением методов MAS на основе MACS 3125 и HI8498, показали значительное увеличение YPC: 6.16–7.7 и 5.0–7.46 ppm соответственно. В настоящее время MAS используется в CIMMYT и в Канаде для отбора селекционных линий с низкой активностью липоксигеназы при помощи маркера *LOXA*, нацеленного на аллель *Lpx-B1.1c* (Randhawa et al., 2013; Dreisigacker et al., 2016; N'Diaye et al., 2017, 2018).

В России во всех лабораториях, осуществляющих селекцию на увеличение концентрации каротиноидов в зерне, индекса желтизны семолины и конечных продуктов, применяются методы традиционной селекции. За период научной селекции и особенно за последние 30 лет эти признаки были улучшены. Сорта, созданные на первых этапах, – Мелянопус 69, Гордеиформе 432, Мелянопус 26, Гордеиформе 179, Гордеиформе 675, накапливают в зерне 3.6–5.0 ppm каротиноидных пигментов. Сорта, широко возделывавшиеся в 60–80-х годах XX в., – Безенчукская 105, Харьковская 46, Безенчукская 139, – превышают этот уровень незначительно (~5 %) (Мясникова и др., 2019). Положительные изменения наблюдались у сортов Светлана (1987 – год включения в реестр) и Саратовская золотистая (1993), которые накапливали 6.0–7.0 ppm пигментов в зерне (Васильчук, 2001). Среди современных сортов яровой твердой пшеницы заметно выделяются по содержанию каротиноидов в зерне Безенчукская золотистая (8.5–9.0 ppm) и Безенчукская крепость (7.5–8.5 ppm). Весь набор современных сортов образует непрерывный ряд изменчивости с шагом в 10–15 % и разницей между крайними вариантами в 200 % (Безенчукская золотистая – Алтайская нива). Изучение отечественных сортов разных этапов селекции в одиннадцати экологических средах позволило установить, что фенотипическое варьирование признака определяется генотипической и средовой вариансами с незначительными эффектами генотип-средовых взаимодействий. По результатам кластерного анализа

параметров адаптивности, стабильности и отзывчивости, сорта отчетливо распределялись на кластеры. В группу с оптимальным сочетанием величины, стабильности и отзывчивости признака вошли Безенчукская золотистая, Безенчукская крепость, Безенчукская 210, Саратовская золотистая. Эти генотипы рекомендуется использовать для создания рекомбинантных инбредных линий с целью маркирования QTL, контролирующих синтез каротиноидов в зерне твердой пшеницы, и организации на этой основе маркер-опосредованной технологии селекции (Мясникова и др., 2019).

Заключение

Результаты исследований, рассмотренные в этой статье, показывают реализованные за последние двадцать лет цели в понимании биохимических, генетических механизмов регулирования метаболизма каротиноидных пигментов в твердой пшенице. Данные, полученные на разнообразном растительном материале с применением современных классов ДНК-маркеров, и согласованные в разнообразных экспериментах генетические карты позволили выявить наиболее важные гены, участвующие в контроле биосинтеза, накопления и катаболизма каротиноидов. Наиболее изученными и подтвержденными в ряде экспериментов QTL являются те, которые расположены на хромосомах 3AS (связаны с геном *LCYE*), 7AL и 7BL (оба тесно связаны с аллелями *PSY 1*). Перспективно для MAS применение маркера *LOXA*, нацеленного на аллель *Lpx-B1.1c* для снижения активности липоксигеназы. Технология MAS с использованием известных для этих QTL маркеров отличается от методов традиционной фенотипической селекции высокой производительностью и эффективностью. В то же время в ряде исследований были представлены данные о том, что большинство QTL не могут быть широко использованы в процедурах MAS, что связано с уровнем их валидации в фенотипических соотношениях в локально адаптированных группах селекционного материала (Pozniak et al., 2012).

Другие QTL, представленные и охарактеризованные в обзоре, требуют дополнительных исследований для идентификации генов-кандидатов, участвующих в накоплении/деградации каротиноидов. В перспективе можно ожидать широкое внедрение методов геномной селекции в программы улучшения цвета конечных продуктов из твердой пшеницы. С учетом аддитивных эффектов генов, контролирующих уровень пигментов и превалирование генотипа признака над средой, применение методов геномной селекции позволит ускорить селекционный процесс на основе не только молекулярной идентификации функционирующих в популяции необходимых QTL, но и целенаправленного получения трансгрессий в результате пирамидирования различных генов. В связи с этим дальнейший акцент в селекционно-генетических мероприятиях будет сделан на анализе генетической изменчивости в коллекциях зародышевой плазмы твердой пшеницы и мутантных популяциях. Перспективны методы редактирования генома с использованием CRIS-Cas9, если их применять, исходя из понимания функций гомеологичных генов с аддитивным эффектом (Patil et al., 2018). Характеристика каждого гена позволит вырабатывать стратегии

диверсификации генетической системы каротиноидных пигментов и расширить существующие вариации, доступные селекционерам.

Непосредственное применение маркеров QTL, апробированных на растительном материале зарубежных стран в России в процедурах MAS и геномной селекции, возможно, если в качестве доноров использовать сорта зарубежной селекции, несущие соответствующие QTL и маркеры. При этом маркеры должны быть эффективными в экологических зонах российских селекционных центров. Однако и в этом случае могут быть проблемы преодоления недостаточной адаптивности привлекаемых в качестве исходного материала генотипов. Селекция на увеличение концентрации пигментов в зерне и продуктах его переработки в России, безусловно, может использовать генетический материал и маркеры, разработанные в иностранных центрах, но базироваться она должна на отечественном исходном материале и адаптированных к нему технологиях маркер-опосредованной селекции.

Список литературы / References

- Васильчук Н.С. Селекция яровой твердой пшеницы. Саратов, 2001. [Vasil'chuk N.S. Spring Durum Wheat Breeding. Saratov, 2001. (in Russian)]
- Васильчук Н.С., Гапонов С.Н., Еременко Л.В., Паршикова Т.М., Попова В.М., Шутарева Г.М., Куликова В.А. Селекция твердой яровой пшеницы на высокое содержание каротиноидов в зерне. В: Сборник научных трудов ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии. Саратов: ООО Ракурс, 2009;89-90. [Vasil'chuk N.S., Gaponov S.N., Eremenko L.V., Parshikova T.M., Popova V.M., Shutareva G.M., Kulikova V.A. Breeding of spring durum wheat for carotenoid-rich grain. In: Collection of Scientific Papers of the South-East Agricultural Research Institute of the Russian Agricultural Academy. Saratov: Rakurs Company, 2009;89-90. (in Russian)]
- Вьюшков А.А. Селекция яровой пшеницы в Среднем Поволжье. Самара: ООО «СамЛюкс», 2004. [Vyushkov A.A. Spring Wheat Breeding in the Middle Volga region. Samara: SamLyuks Company, 2004. (in Russian)]
- Гапонов С.Н., Попова В.М., Шутарева Г.И., Цетва Н.М., Цетва И.С., Паршикова Т.М. Получение новых источников для селекции яровой твердой пшеницы – гарантия создания стабильных стрессоустойчивых сортов. *Аграр. вестн. Юго-Востока*. 2018;3:30-31. [Gaponov S.N., Popova V.M., Shutareva G.I., Tsetva N.M., Tsetva I.S., Parshikova T.M. Obtaining new sources for breeding spring durum wheat warrants the raise of stable stress-resistant varieties. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka = Agrarian Bulletin of the South-East*. 2018;3:30-31. (in Russian)]
- Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высш. шк., 1986. [Kretovich V.L. Plant Biochemistry. Moscow: Vysshaya shkola, 1986. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н. Селекция яровой твердой пшеницы в Среднем Поволжье. Кинель, 2009. [Malchikov P.N. Spring Durum Wheat Breeding in the Middle Volga Region. Kinel, 2009. (in Russian)]
- Мясникова М.Г., Мальчиков П.Н., Шаболкина Е.Н., Анисимкина Н.В., Розова М.А., Чахеева Т.В. Результаты селекции твердой пшеницы в России на содержание каротиноидных пигментов в зерне. *Зерновое хозяйство России*. 2019;6(66):37-40. DOI 10.31367/2079-8725-2019-66-6-37-40. [Myasnikova M.G., Malchikov P.N., Shabolkina E.N., Anisimkina N.V., Rozova M.A., Chakheeva T.V. The results of durum wheat breeding in Russia for carotenoid pigments content in kernels. *Zer-*
- noye Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2019;6(66):37-40. DOI 10.31367/2079-8725-2019-66-6-37-40. (in Russian)]
- Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Ассоциативное картирование у растений. *С.-х. биология*. 2011;46(5):3-16. [Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Associative mapping in plants. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2011;46(5):3-16. (in Russian)]
- AACC International. AACC International Official Method 14-50.01. In: Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Tenth ed. (MN, USA: St. Paul), 2013.
- Al-Babili S., Bouwmeester H.J. Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015;66(1):161-186. DOI 10.1146/annurev-arplant-043014-14759.
- Beecher B.S., Carter A.H., See D.R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2012;124:1463-1473. DOI 10.1007/s00122-012-1801-2.
- Blanco A., Colasuonno P., Gadaleta A., Mangini G., Schiavulli A., Simeone R., Digesu A.M., De Vita P., Mastrangelo A.M., Cattivelli L. Quantitative trait loci for yellow pigment concentration and individual carotenoid compounds in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 2011;54(2):255-264. DOI 10.1016/j.jcs.2011.07.002.
- Borrelli G.M., De Leonardi A.M., Fares C., Platani C., Di Fonzo N. Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chem.* 2003;80:225-231. DOI 10.1094/cchem.2003.80.2.225.
- Borelli G.M., Troccoli A., Di Fonzo N., Fares C. Durum wheat lipoxygenase activity and other parameters that affect pasta color. *Cereal Chem.* 1999;76:335-340. DOI 10.1094/CCHEM.1999.76.3.335.
- Borrelli G.M., Trono D. Molecular approaches to genetically improve the accumulation of health-promoting secondary metabolites in staple crops-A case study: the Lipoxygenase-B1 genes and regulation of the carotenoid content in pasta products. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:1177. DOI 10.3390/ijms17071177.
- Brandolini A., Hidalgo A., Gabriele S., Heun M. Chemical composition of wild and feral diploid wheats and their bearing on domesticated wheats. *J. Cereal Sci.* 2015;63:122-127. DOI 10.1016/j.jcs.2015.03.005.
- Brandolini A., Hidalgo A., Moscaritolo S. Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *J. Cereal Sci.* 2008;47:599-609. DOI 10.1016/j.jcs.2007.07.005.
- Campos K.M., Royo C., Schulthess A., Villegas D., Matus I., Ammar K., Schwember A.R. Association of phytoene synthase Psy1-A1 and Psy1-B1 allelic variants with semolina yellowness in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Euphytica*. 2016;207:109-117. DOI 10.1007/s10681-015-1541-x.
- Carrera A., Echenique V., Zhang W., Helguera M., Manthey F., Schraeger A., Picca A., Cervigna G., Dubcovsky J. A deletion at the Lpx-B1 locus is associated with low lipoxygenase activity and improved pasta color in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). *J. Cereal Sci.* 2007;45:67-77. DOI 10.1016/j.jcs.2006.07.001.
- Cazzonelli C.I., Pogson B.J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 2010;15:266-274. DOI 10.1016/j.tplants.2010.02.003.
- Clarke J.M., Clarke F.R., McCaig T.N. Heritability of content in three durum wheat crosses. In: Proc. Ninth Int. Wheat Genetics Symposium. Saskatoon, 1998;2:182-184.
- Colasuonno P., Gadaleta A., Giancaspro A., Nigro D., Giove S., Incerti O., Mangini G., Signorile A., Simeone R., Blanco A. Development of a high-density SNP-based linkage map and detection of yellow pigment content QTLs in durum wheat. *Mol. Breed.* 2014;34:1563-1578. DOI 10.1007/s11032-014-0183-3.
- Colasuonno P., Lozito M.L., Marcotuli I., Nigro D., Giancaspro A., Mangini G., De Vita P., Mastrangelo A.M., Pecchioni N., Houston K., Simeone R., Gadaleta A., Blanco A. The carotenoid biosynthetic and catabolic genes in wheat and their association with yellow

- pigments. *BMC Genomics*. 2017a;18:122. DOI 10.1186/s12864-016-3395-6.
- Colasuonno P., Marcotuli I., Blanco A., Maccaferri M., Condorelli G.E., Tuberosa R., Parada R., de Camargo A.C., Schwember A.R., Gadaleta A. Carotenoid pigment content in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*): an overview of quantitative trait loci and candidate genes. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1347. DOI 10.3389/fpls.2019.01347.
- Colasuonno P., Marcotuli I., Lozito M. L., Simeone R., Blanco A., Gadaleta A. Characterization of aldehyde oxidase (AO) genes involved in the accumulation of carotenoid pigments in wheat grain. *Front. Plant Sci.* 2017b;8:863. DOI 10.3389/fpls.2017.00863.
- Cong L., Wang C., Li Z., Chen L., Yang G., Wang Y., He G. cDNA cloning and expression analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) phytoene and ζ -carotene desaturase genes. *Mol. Biol. Rep.* 2010;37:3351-3361. DOI 10.1007/s11033-009-9922-7.
- Crawford A.C., Francki M.G. Chromosomal location of wheat genes of the carotenoid biosynthetic pathway and evidence for a catalase gene on chromosome 7A functionally associated with flour b* colour variation. *Mol. Genet. Genomics*. 2013;288:483-493. DOI 10.1007/s00438-013-0767-3.
- De Simone V., Menzo V., De Leonardis A.M., Ficco D.B.M., Trono D., Cattivelli L., De Vita P. Different mechanisms control lipoxygenase activity in durum wheat kernels. *J. Cereal Sci.* 2010;52:121-128. DOI 10.1016/j.jcs.2010.04.003.
- Dibari B., Murat F., Chosson A., Gautier V., Poncet C., Lecomte P., Mercier I., Berges H., Pont C., Blanco A., Salse J. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses. *BMC Genomics*. 2012;13:221. DOI 10.1186/1471-2164-13-221.
- Digesù A.M., Platani C., Cattivelli L., Mangini G., Blanco A. Genetic variability in yellow pigment components in cultivated and wild tetraploid wheats. *J. Cereal Sci.* 2009;50:210-218. DOI 10.1016/j.jcs.2009.05.002.
- Dong C.H., Ma Z.Y., Xia X.C., Zhang L.P., He Z.H. Allelic variation at the *TaZds-A1* locus on wheat chromosome 2A and development of a functional marker in common wheat. *J. Integr. Agric.* 2012;11:1067-1074. DOI 10.1016/S2095-3119(12)60099-9.
- Dreisigacker S., Sehgal D., Reyes Jaimez A., Luna Garrido B., Muñoz Zavala S., Núñez Ríos C. CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding. Mexico: CIMMYT, 2016.
- Elouafi I., Nachit M.M., Martin L.M. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Hereditas*. 2001;135:255-261. DOI 10.1111/j.1601-5223.2001.t01-1-00255.x.
- Feillet P., Autran J.-C., Icard-Vernière C. Mini review pasta brownness: An assessment. *J. Cereal Sci.* 2000;32:215-233. DOI 10.1006/jcsc.2000.0326.
- Ficco D.B.M., Mastrangelo A.M., Trono D., Borrelli G.M., De Vita P., Fares C., Beleggia R., Platani C., Papa R. The colours of durum wheat: a review. *Crop Pasture Sci.* 2014;65(1):1-15. DOI 10.1071/cp13293.
- Fiedler J.D., Salsman E., Liu Y., Michalak de Jiménez M., Hegstad J.B., Chen B., Manthey F.A., Chao S., Xu S., Elias M.E., Li X. Genome-wide association and prediction of grain and semolina quality traits in durum wheat breeding populations. *Plant Genome*. 2017;10(3):1-12. DOI 10.3835/plantgenome2017.05.0038.
- Fu B.X., Chiremba C., Pozniak C.J., Wang K., Nam S. Total phenolic and yellow pigment contents and antioxidant activities of durum wheat milling fractions. *Antioxidants*. 2017;6:78. DOI 10.3390/antiox6040078.
- Geng H., Shi J., Fuerst E.P., Wei J., Morris C.F. Physical mapping of peroxidase genes and development of functional markers for TaPod-D1 on bread wheat chromosome 7D. *Front. Plant Sci.* 2019;10:523. DOI 10.3389/fpls.2019.00523.
- He X.Y., He Z.H., Morris C.F., Xia X.C. Cloning and phylogenetic analysis of polyphenol oxidase genes in common wheat and related species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2009;56:311. DOI 10.1007/s10722-008-9365-3.
- He X.Y., Zhang Y.L., He Z.H., Wu Y.P., Xiao Y.G., Ma C.X., Xia X.C. Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116:213-221. DOI 10.1007/s00122-007-0660-8.
- Hessler T.G., Thomson M.J., Benschler D., Nachit M.M., Sorrells M.E. Association of a lipoxygenase locus, Lpx-B1, with variation in lipoxygenase activity in durum wheat seeds. *Crop Sci.* 2002;42(5):1695-1700. DOI 10.2135/cropsci2002.1695.
- Howitt C.A., Cavanagh C.R., Bowerman A.F., Cazzonelli C., Rampling L., Mimica J.L., Pogson B.J. Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Funct. Integr. Genomics*. 2009;9(3):363-376. DOI 10.1007/s10142-009-0121-3ICC.
- ICC Method 152, in Standard Methods of the International Association for Cereal Science and Technology. Detmold, Germany: Verlag Moritz Schäfer ICC, 1990.
- Jimenez M., Dubcovsky J. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat. *Plant Breed.* 1999;118:395-398. DOI 10.1046/j.1439-0523.1999.00393.x.
- Kabbaj H., Sall A.T., Al-Abdallat A., Geleta M., Amri A., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Ortiz R., Bassi F.M. Genetic diversity within a Global panel of durum wheat (*Triticum durum*) landraces and modern germplasm reveals the history of alleles exchange. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1277. DOI 10.3389/fpls.2017.01277.
- Ke Q., Kang L., Kim H.S., Xie T., Liu C., Ji C.Y., Kim H.S., Park W.S., Ahn M.J., Wang S., Li H., Deng X., Kwak S.S. Down-regulation of lycopene ϵ -cyclase expression in transgenic sweetpotato plants increases the carotenoid content and tolerance to abiotic stress. *Plant Sci.* 2019;281:52-60. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.01.002.
- Kean E.G., Bordenave N., Ejeta G., Hamaker B.R., Ferruzzi M.G. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and decorticated yellow endosperm sorghum porridge. *J. Cereal Sci.* 2011;54:450-459. DOI 10.1016/j.jcs.2011.08.010.
- Liu C.J., Chao S., Gale M.D. The genetical control of tissue-specific peroxidases, Per-1, Per-2, Per-3, Per-4, and Per-5 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1990;79(3):305-313. DOI 10.1007/bf01186072.
- Maccaferri M., Sanguineti M.C., Demontis A., El-Ahmed A., Garcia del Moral L., Maalouf F., Nachit M., Nserallah N., Ouabbou H., Rhouma S. Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *J. Exp. Bot.* 2011;62(2):409-438. DOI 10.1093/jxb/erq287.
- Mazzeo M.F., Di Stasio L., D'Ambrosio C., Arena S., Scaloni A., Corneti S., Ceriotti A., Tuberosa R., Siciliano R.A., Picariello G., Mamone G. Identification of early represented gluten proteins during durum wheat grain development. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65(15):3242-3250. DOI 10.1021/acs.jafc.7b00571.
- N'Diaye A., Haile J.K., Cory A.T., Clarke F.R., Clarke J.M., Knox R.E., Pozniak C.J. Single marker and haplotype-based association analysis of semolina and pasta colour in elite durum wheat breeding lines using a high-density consensus map. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170941. DOI 10.1371/journal.pone.0170941.
- N'Diaye A., Haile J.K., Nilsen K.T., Walkowiak S., Ruan Y., Singh A.K., Clarke F.R., Clarke J.M., Pozniak C.J. Haplotype loci under selection in Canadian durum wheat germplasm over 60 years of breeding: Association with grain yield, quality traits, protein loss, and plant height. *Front. Plant Sci.* 2018;9(1589):1-19. DOI 10.3389/fpls.2018.01589.
- Nisar N., Li L., Lu S., Khin N.C., Pogson B.J. Carotenoid metabolism in plants. *Mol. Plant*. 2015;8:68-82. DOI 10.1016/j.molp.2014.12.007.
- Parker G.D., Chalmers K.J., Rathjen A.J., Langridge P. Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998;97(1-2):238-245. DOI 10.1007/s001220050891.

- Patil R.M., Oak M., Deshpande A., Tamhankar S. Development of a robust marker for Psy-1 homoeologs and its application in improvement of yellow pigment content in durum wheat. *Mol. Breed.* 2018; 38:136. DOI 10.1007/s11032-018-0895-x.
- Patil R., Oak M., Tamhankar S., Sourdille P., Rao V. Mapping and validation of a major QTL for yellow pigment content on 7AL in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*). *Mol. Breed.* 2008; 21(4):485-496. DOI 10.1007/s11032-007-9147-1.
- Pozniak C.J., Clarke J.M., Clarke F.R. Potential for detection of marker-trait associations in durum wheat using unbalanced, historical phenotypic datasets. *Mol. Breed.* 2012;30:1537-1550. DOI 10.1007/s11032-012-9737-4.
- Pozniak C.J., Knox R.E., Clarke F.R., Clark J.M. Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:525-537. DOI 10.1007/s00122-006-0453-5.
- Qin X., Zhang W., Dubcovsky J., Tian L. Cloning and comparative analysis of carotenoid beta-hydroxylase genes provides new insights into carotenoid metabolism in tetraploid (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) and hexaploid (*Triticum aestivum*) wheat grains. *Plant Mol. Biol.* 2012;80:631-646. DOI 10.1007/s11103-012-9972-4.
- Randhawa H.S., Asif M., Pozniak C., Clarke J.M., Graf R.J., Fox S.L., Humphaeys D.G., Knox R.E., DePaw R.M., Singh A.K., Cuthbert R.D., Hucl P., Spaner D. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. *Plant Breed.* 2013;132:458-471. DOI 10.1111/pbr.12057.
- Ravel C., Dardevet M., Leenhardt F., Bordes J., Joseph J.L., Perretant M.R., Exbrayat F., Poncet C., Balfourier F., Chanliaud E., Charmet G. Improving the yellow pigment content of bred wheat flour by selecting the three homeologous copies of *Psy1*. *Mol. Breed.* 2013;31:87-89. DOI 10.1007/S11032-012-9772-1.
- Rodriguez-Concepcion M., Avalos J., Bonet M.L., Boronat A., Gomez-Gomez L., Hornero-Mendez D., Limon M.C., Melendez-Martinez A.J., Olmedilla-Alonso B., Palou A., Ribot J., Rodrigo M.J., Zacarias L., Zhu C. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog. Lipid Res.* 2018;70:62-93. DOI 10.1016/j.plipres.2018.04.004.
- Roncallo P.F., Cervigni G.L., Jensen C., Miranda R., Carrera A.D., Helguera M., Echenique V. QTL analysis of main and epistatic effects for flour color traits in durum wheat. *Euphytica.* 2012;185:77-92. DOI 10.1007/s10681-012-0628-x.
- Roncallo P., Echenique V. Identification of molecular markers associated with yield and quality traits for Argentinean durum wheat breeding programs. In: Options Méditerranéennes. Proceedings of the International Symposium on Genetics and Breeding of Durum Wheat. Rome, Italy: CHEAM, 2014;577-582.
- Schulthess A., Schwember A.R. Improving durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) grain yellow pigment content through plant breeding. *Cienc. Invest. Agr.* 2013;40:475-490. <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v40i3.1157>.
- Sehgal D., Dreisigacker S. Haplotypes-based genetic analysis: benefits and challenges. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(7):803-808. DOI 10.18699/VJ19.37.
- Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M., Blanco A. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2002;7:763-769.
- Si H., Ma C., Wang X., He X. Variability of polyphenol oxidase (PPO) alleles located on chromosomes 2A and 2D can change the wheat kernel PPO activity. *Aust. J. Crop Sci.* 2012;6(3):444-449.
- Singh A., Reimer S., Pozniak C.J., Clarke F.R., Clarke J.M., Knox R.E., Singh A.K. Allelic variation at *Psy1-A1* and association with yellow pigment in durum wheat grain. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:1539-1548. DOI 10.1007/s00122-009-1001-x.
- Sissons M. Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. *Food Global Sci.* 2008;2:75-90.
- Sun T., Yuan H., Cao H., Yazdani M., Tadmor Y., Li L. Carotenoid metabolism in plants: The role of plastids. *Mol. Plant.* 2018;11:58-74. DOI 10.1016/j.molp.2017.09.010.
- Taranto F., Delvecchio L.N., Mangini G., Del Faro L., Blanco A., Pasqualone A. Molecular and physico-chemical evaluation of enzymatic browning of whole meal and dough in a collection of tetraploid wheats. *J. Cereal Sci.* 2012;55:405-414. DOI 10.1016/j.jcs.2012.02.005.
- Taranto F., Mangini G., Pasqualone A., Gadaleta A., Blanco A. Mapping and allelic variations of *Ppo-B1* and *Ppo-B2* gene-related polyphenol oxidase activity in durum wheat. *Mol. Breed.* 2015;35:80. DOI 10.1007/s11032-015-0272-y.
- Vargas V.H., Schulthess A., Royo C., Matus I., Schwember A.R. Transcripts levels of Phytoene synthase 1 (*Psy-1*) are associated to semolina yellowness variation in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*). *J. Cereal Sci.* 2016;68:155-163. DOI 10.1016/j.jcs.2016.01.011.
- Verlotta A., De Simone V., Mastrangelo A.M., Cattivelli L., Papa R., Trono D. Insight into durum wheat *Lpx-B1*: a small gene family coding for the lipoxygenase responsible for carotenoid bleaching in mature grains. *BMC Plant Biol.* 2010;10:263. DOI 10.1186/1471-2229-10-263.
- Wang S., Wong D., Forrest K., Allen A., Chao S., Huang B.E., Maccaferri M., Salvi S., Milner S.S., Cattivelli L., Mastrangelo A.M., Whan A., Stephan S., Sarker G., Wieseke R., Plieske S. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12:787-796. DOI 10.1111/pbi.12183.
- Watanabe N., Akond A.S.M.G.M., Nachit M.M. Genetic mapping of the gene affecting polyphenol oxidase activity in tetraploid durum wheat. *J. Appl. Genet.* 2006;47:201-205. DOI 10.1007/BF03194624.
- Watanabe N., Takeuchi A., Nakayama A. Inheritance and chromosomal location of the homoeologous genes affecting phenol colour reaction of kernels in durum wheat. *Euphytica.* 2004;139:87-93. DOI 10.1007/s10681-004-2255-7.
- Wei J., Geng H., Zhang Y., Liu J., Wen W., Zhang Y., Xia X., Chen X., He Z. Mapping quantitative trait loci for peroxidase activity and developing gene-specific markers for *TaPod-A1* on wheat chromosome 3AL. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128:2067-2076. DOI 10.1007/s00122-015-2567-0.
- Zeng J., Wang X., Miao Y., Wang C., Zang M., Chen X., Li M., Li X., Wang O., Li K., Chang J., Wang G., Yang G., He G. Metabolic engineering of wheat provitamin A by simultaneously overexpressing *CrtB* and silencing carotenoid hydroxylase (*TaHYD*). *J. Agric. Food Chem.* 2015;63:9083-9092. DOI 10.1021/acs.jafc.5b04279.
- Zhang W., Dubcovsky J. Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116:635-645. DOI 10.1007/s00122-007-0697-8.
- Zhang Y., Wu Y., Xiao Y., He Z., Zhang Y., Yan J., Zhang Y., Xia X., Ma C. QTL mapping for flour and noodle colour components and yellow pigment content in common wheat. *Euphytica.* 2009;165(3):435-444. DOI 10.1007/s10681-008-9744-z.

ORCID ID

P.N. Malchikov orcid.org/0000-0002-2141-6836
M.G. Myasnikova orcid.org/0000-0002-7224-0308

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.04.2020. После доработки 23.06.2020. Принята к публикации 23.06.2020.

Изучение влияния детерминант митохондриального импорта в структуре нРНК на активность комплекса нРНК/SpCas9 *in vitro*

Э.Г. Закирова¹, Ю.В. Вяткин², Н.А. Верещагина³, В.В. Музыка⁵, И.О. Мазунин⁴, К.Е. Орищенко¹ ✉

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

² ООО «АкадемДжин», Новосибирск, Россия

³ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

⁴ Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

⁵ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: keor@bionet.nsc.ru

Аннотация. О том, что нарушения структуры митохондриального генома приводят к широкому спектру нейромышечных и нейродегенеративных заболеваний, известно уже давно, но до сих пор не найдено эффективного метода лечения болезней митохондриального происхождения. В основном проблемы с терапией подобных заболеваний обусловлены состоянием гетероплазии митохондриальной ДНК (мтДНК). Ввиду многокопийности митохондриального генома мутантные копии мтДНК часто сосуществуют с молекулами дикого типа в одной органелле. Клинические симптомы митохондриальных заболеваний и степень их манифестации напрямую зависят от количества мутантных молекул мтДНК в клетке. Смещая уровень гетероплазии в сторону молекул дикого типа мтДНК, возможно добиться снижения негативного влияния мутации. Для этой цели разработано несколько генно-терапевтических подходов на основе TALE-нуклеаз и нуклеаз типа «цинковые пальцы», однако конструирование белковых доменов таких систем является долгим и трудоемким процессом. Система CRISPR/Cas9 принципиально отличается от данных систем простотой использования, высокой эффективностью и механизмом действия. Все присущие характеристики и возможности системы делают ее перспективным инструментом в области генетической инженерии митохондрий. В настоящей статье мы впервые демонстрируем, что модификации направляющей РНК за счет встройки последовательностей, способствующих импорту нРНК в митохондрии, не влияют на функциональную активность комплекса нРНК/SpCas9 в условиях *in vitro*. Полученные результаты указывают на возможность модификации системы с сохранением ее функциональности и использования в перспективе для редактирования митохондриального генома.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК; CRISPR/Cas9; детерминанты импорта в митохондрии; гетероплазия.

Для цитирования: Закирова Э.Г., Вяткин Ю.В., Верещагина Н.А., Музыка В.В., Мазунин И.О., Орищенко К.Е. Изучение влияния детерминант митохондриального импорта в структуре нРНК на активность комплекса нРНК/SpCas9 *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(5):512-518. DOI 10.18699/VJ20.643

Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex *in vitro*

E.G. Zakirova¹, Y.V. Vyatkin², N.A. Verechshagina³, V.V. Muzyka⁵, I.O. Mazunin⁴, K.E. Orishchenko¹ ✉

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

² AcademGene Ltd., Novosibirsk, Russia

³ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

⁴ Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russia

⁵ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: keor@bionet.nsc.ru

Abstract. It has long been known that defects in the structure of the mitochondrial genome can cause various neuromuscular and neurodegenerative diseases. Nevertheless, at present there is no effective method for treating mitochondrial diseases. The major problem with the treatment of such diseases is associated with mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy. It means that due to a high copy number of the mitochondrial genome, mutant copies of mtDNA coexist with wild-type molecules in the same organelle. The clinical symptoms of mitochondrial diseases and the degree of their manifestation directly depend on the number of mutant mtDNA molecules in the cell. The possible way to reduce adverse effects of the mutation is by shifting the level of heteroplasmy towards the wild-type mtDNA molecules. Using this idea, several gene therapeutic approaches based on TALE and ZF nucleases have been developed for this purpose. However, the construction of protein domains of such systems is rather long and laborious process. Meanwhile, the CRISPR/Cas9 system is fundamentally different from protein systems in that it is easy to use,

highly efficiency and has a different mechanism of action. All the characteristics and capabilities of the CRISPR/Cas9 system make it a promising tool in mitochondrial genetic engineering. In this article, we demonstrate for the first time that the modification of gRNA by integration of specific mitochondrial import determinants in the gRNA scaffold does not affect the activity of the gRNA/Cas9 complex *in vitro*.

Key words: mitochondrial DNA; CRISPR/Cas9; the mitochondrial import determinants; heteroplasmy.

For citation: Zakirova E.G., Vyatkin Y.V., Verechshagina N.A., Muzyka V.V., Mazunin I.O., Orishchenko K.E. Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex *in vitro*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(5):512-518. DOI 10.18699/VJ20.643

Введение

Технология CRISPR/Cas9, разработанная на основе системы защиты бактерий и архей от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей чужеродной ДНК, зарекомендовала себя в качестве эффективного и многофункционального инструмента в области редактирования ядерного генома практически любого организма. В отличие от белковых систем геномного редактирования (технологий ZFN и TALEN), механизм действия системы CRISPR/Cas9 основывается на комплементарном узнавании 20 нуклеотидов направляющей РНК (нРНК) в целевой последовательности гена и последующем внесении двуцепочечного разрыва, благодаря привлечению к месту разрезания нуклеазы Cas9 (Jinek et al., 2012).

Для сайт-специфического распознавания и расщепления ДНК-последовательности мишени необходимо, чтобы компоненты системы (нРНК и Cas9) сформировали активный эффекторный комплекс (Jinek et al., 2014; Jiang, Doudna, 2017). Так, посредством связывания петель в шпильках на 3'-конце молекулы нРНК и аминокислотных остатков нуклеазного домена Cas9 происходят идентификация сайта посадки нуклеазы и ее конформационное преобразование, приводящее к индукции нуклеазной активности фермента (Wright et al., 2015). По сути, от комплементарности специфических последовательностей нРНК и Cas9 зависят термодинамическая стабильность комплекса, и, следовательно, последующая эффективность разрезания ДНК-мишени (Anders et al., 2014). При анализе кристаллической структуры взаимодействия нуклеазы с дуплексом нРНК-ДНК (Nishimasu et al., 2014) выявлено, что четыре пары нуклеотидов (п. н.) в петлях шпильки tetraloop и stem loop 2 нРНК выступают за пределы рибонуклеопротеинового комплекса нРНК/Cas9 и полностью свободны от взаимодействия с боковыми цепями аминокислот Cas9 (Nishimasu et al., 2014; Konermann et al., 2015). Мы предположили, что замещение свободных петель нРНК аналогичными шпильчатыми структурами из других видов РНК не повлияет на функциональную активность всего комплекса. Уже было показано, что подобные модификации применяются для эпигенетической регуляции экспрессии ядерных генов (Mali et al., 2013; Konermann et al., 2015; Komor et al., 2017). Очевидно, что молекулу нРНК можно реконструировать и для манипуляций с митохондриальным геномом.

В клетках с ядерной ДНК экспрессируется огромное количество молекул РНК, которые выполняют разнообразные функции. При этом известно, что в митохондриях способны импортироваться лишь единичные варианты РНК (Jeandard et al., 2019). Ввиду отсутствия общего мнения по поводу транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии, вопрос о применении системы CRISPR/Cas9

для супрессии мутаций мтДНК также остается спорным. Однако существует ряд опубликованных работ, утверждающих наличие специфических детерминант целевого импорта цитозольных РНК в митохондрии. Впервые частичная локализация синтетических РНК, модифицированных F- и D-доменами дрожжевой tRNA^{Lys} (CUU), была продемонстрирована на митохондриях дрожжей в условиях стресса (Martin et al., 1979; Kamenski et al., 2007). С использованием данных шпилек другим ученым также удалось сконструировать рекомбинантные молекулы РНК, которые эффективно импортируются в митохондрии млекопитающих и там блокируют репликацию специфических молекул мтДНК (Comte et al., 2013; Tonin et al., 2014). Аналогичные исследования, но с применением РНК-компонентов рибонуклеаз RP (Doersen et al., 1985; Holzmann et al., 2008) и MRP (Chang, Clayton, 1987), участвующих в митохондриальных матричных процессах млекопитающих, позволили предположить, что домены этих типов РНК могут также служить в качестве детерминант целевого импорта в митохондрии (Wang et al., 2012). Все обнаруженные цитозольные РНК, транспортируемые в митохондрии, являются малыми, некодирующими и содержат палиндромные последовательности, образующие шпильки, ответственные за импорт РНК. Введение таких вторичных структур в последовательность нРНК, вероятно, также может способствовать ее транспортировке в матрикс митохондрий.

В настоящем исследовании впервые проведена работа по модификации РНК-компонента системы CRISPR/Cas9–нРНК для ее направленного импорта во внутримитохондриальное пространство. Поскольку белковый компонент CRISPR/Cas9 ранее уже был адаптирован для импорта в матрикс митохондрий (Орищенко и др., 2016), перепрограммирование нРНК даст возможность манипулировать уровнем гетероплазмы мтДНК в митохондриях млекопитающих.

Материалы и методы

Плазмидные конструкции. Фрагмент митохондриальной ДНК человека, включающий протоспейсер в гене mtND1, амплифицировали с применением ПЦР при использовании праймеров L2797 5'-GTCCCTAAACTACCAACCTGC-3' и H3733 5'-ATGATGGCTAGGGTGACTTC-3' и высокоточной полимеразы Q5, согласно рекомендациям производителя. Подбор последовательности, направляющей РНК на целевой участок мтДНК, осуществляли *in silico* с помощью онлайн-платформы Benchling (<https://benchling.com/>). Выбор нРНК с наименьшим числом потенциальных неспецифических сайтов был произведен посредством онлайн-сервиса на сайте <http://crispr.mit.edu/>. Карты плазмидных векторов нРНК с модификация-

ми построены при помощи программного обеспечения SnapGene (<https://www.snapgene.com/>). Все конструкции проанализированы *in silico* для предсказания вторичной структуры с использованием программы RNAfold из пакета ViennaRNA (Lorenz et al., 2011). Для сборки плазмид, экспрессирующих нРНК, олигонуклеотиды с перекрывающимися концами гибридизовали и встраивали в вектор экспрессии gRNA Cloning Vector, любезно предоставленный George Church (Addgene plasmid # 41824; <http://n2t.net/addgene:41824>; RRID:Addgene_41824), методом бесшовной сборки по Гибсону. Сборку плазмид по методу Гибсона (NEB, США) осуществляли согласно инструкции фирмы-производителя. Правильность сборки конструкций подтверждали секвенированием по методу Сэнгера.

Реакции *in vitro* расщепления ДНК-субстрата. Направляющие РНК транскрибировали *in vitro* с использованием набора быстрого высокоэффективного синтеза РНК HiScribe T7 согласно рекомендациям производителя (NEB E2050). Полученные нРНК очищали фенол-хлороформной экстракцией с последующим осаждением этанолом. Концентрацию синтезированной РНК измеряли посредством спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific) и затем разбавляли до рабочей концентрации 300 нМ. Реакцию расщепления проводили в объеме 30 мкл: 1 мкл 1 мкМ нуклеазы Cas9 (конечная концентрация ~30 нМ) *Streptococcus pyogenes* (NEB M0386L), 3 мкл 10× реакционного буфера для нуклеазы Cas9 (NEB B0386A), 1 мкл 300 нМ нРНК. Конечный объем реакции доводили водой, не содержащей нуклеаз. После предварительной инкубации в течение 10 мин при 25 °С в реакционную смесь добавляли 1 мкл 30 нМ ДНК-субстрата и инкубировали при 37 °С в течение 45 мин. Реакции расщепления останавливали добавлением 1 мкл 20 мг/мл протеиназы К (NEB P8107S) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Образовавшиеся продукты расщепления анализировали методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле. Наличие фрагментов 678 и 298 п. н. свидетельствовало о специфическом расщеплении ДНК-субстрата. Реакции *in vitro* расщепления проводили в трех независимых повторах. Эффективность разрезания ДНК-субстрата определяли при количественной оценке ДНК в бэндах гель-денситометрии в программном обеспечении Image Lab (Bio-Rad, США). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Результаты

Дизайн модифицированных вариантов направляющей РНК. Для изучения влияния модификаций нуклеотидной последовательности направляющей РНК на активность системы CRISPR/Cas9 *in vitro* был проведен дизайн их первичной структуры. Поскольку петли tetraloop и stem loop 2 конститутивной части нРНК (рис. 1, а) частично выступают за пределы рибонуклеопротеинового комплекса (Nishimasu et al., 2014), можно предположить, что введение модификаций в эти локусы не должно повлиять на аффинность связывания всего комплекса с целевой последовательностью ДНК, а также на его функциональную активность. Поэтому нуклеотиды GAAA соответствующих петель (tetraloop или stem loop 2) нРНК заменяли

последовательностью нуклеотидов одной из четырех детерминант импорта РНК в митохондрии: шпильки HD, HF, RP, MRP (см. рис. 1, б) – во всех возможных конформациях (прямая, обратная, комплементарная, обратнo-комплементарная). В результате было получено 32 варианта нРНК со встройкой в структуру tetraloop или stem loop 2 детерминант импорта РНК в митохондрии в разных конформациях. Для каждого варианта модифицированной нРНК была предсказана вторичная структура с использованием веб-сервера RNAfold из пакета программного обеспечения ViennaRNA (Lorenz et al., 2011). Предсказанные *in silico* структуры модифицированных нРНК сравнивали с идеальной теоретической, в которой петли tetraloop или stem loop 2 не были изменены. Для каждой из детерминант импорта было отобрано по одной наиболее оптимальной конформации при встройке в каждую из петель tetraloop или stem loop 2 нРНК. Всего получено восемь вариантов модифицированных нРНК, вторичные структуры которых имели минимальные отличия от немодифицированной нРНК (см. таблицу). Варианты модифицированных нРНК клонировали в вектор gRNA-cloning vector. Вариант HF-SL клонировать не удалось из-за технических трудностей, которые, вероятнее всего, связаны со вторичной структурой в нуклеотидной последовательности.

Анализ влияния модификаций нРНК на функциональную активность комплекса нРНК/Cas9 *in vitro*.

Оценку функциональной активности комплекса нуклеазы Cas9 с различными вариантами модифицированных нРНК проводили с использованием реакций *in vitro* расщепления субстрата ДНК. В реакциях применяли нРНК, синтезированную при помощи *in vitro* транскрипции с РНК-полимеразой T7, и коммерческую рекомбинантную нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*. В качестве субстрата добавляли двуцепочечный фрагмент ДНК длиной 976 п. н., амплифицированный посредством ПЦР. Протоспейсер подбирали таким образом, чтобы в случае успешного внесения комплексом нРНК/Cas9 двуцепочечного разрыва в ДНК-субстрат образовывалось два фрагмента длиной 298 и 678 п. н. В качестве контроля проводили реакции *in vitro* расщепления с немодифицированной нРНК (NEG) и без добавления нРНК. Все реакции осуществляли в трех независимых повторах. Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов реакций *in vitro* расщепления представлены на рис. 2, а. При использовании всех вариантов модифицированных нРНК происходит специфическое расщепление ДНК-субстрата с образованием фрагментов ожидаемого размера. Таким образом, несмотря на внесенные модификации в структуру направляющей РНК, комплекс нРНК/Cas9 сохраняет свою функциональную активность.

Количественную оценку эффективности разрезания ДНК-субстрата осуществляли посредством денситометрии. Эффективность расщепления определяли по отношению плотности пикселей в полосах, соответствующих расщепленному ДНК-субстрату, к исходному неразрезанному фрагменту (см. рис. 2, б). Эффективность разрезания ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с немодифицированной РНК (NEG) составляет 67 %. Модификация нРНК путем встройки детерминанты импорта HD в прямую конформации в петлю stem loop 2 нРНК (вариант HD-SLO) статистически значимо ($p \leq 0.05$) снижала

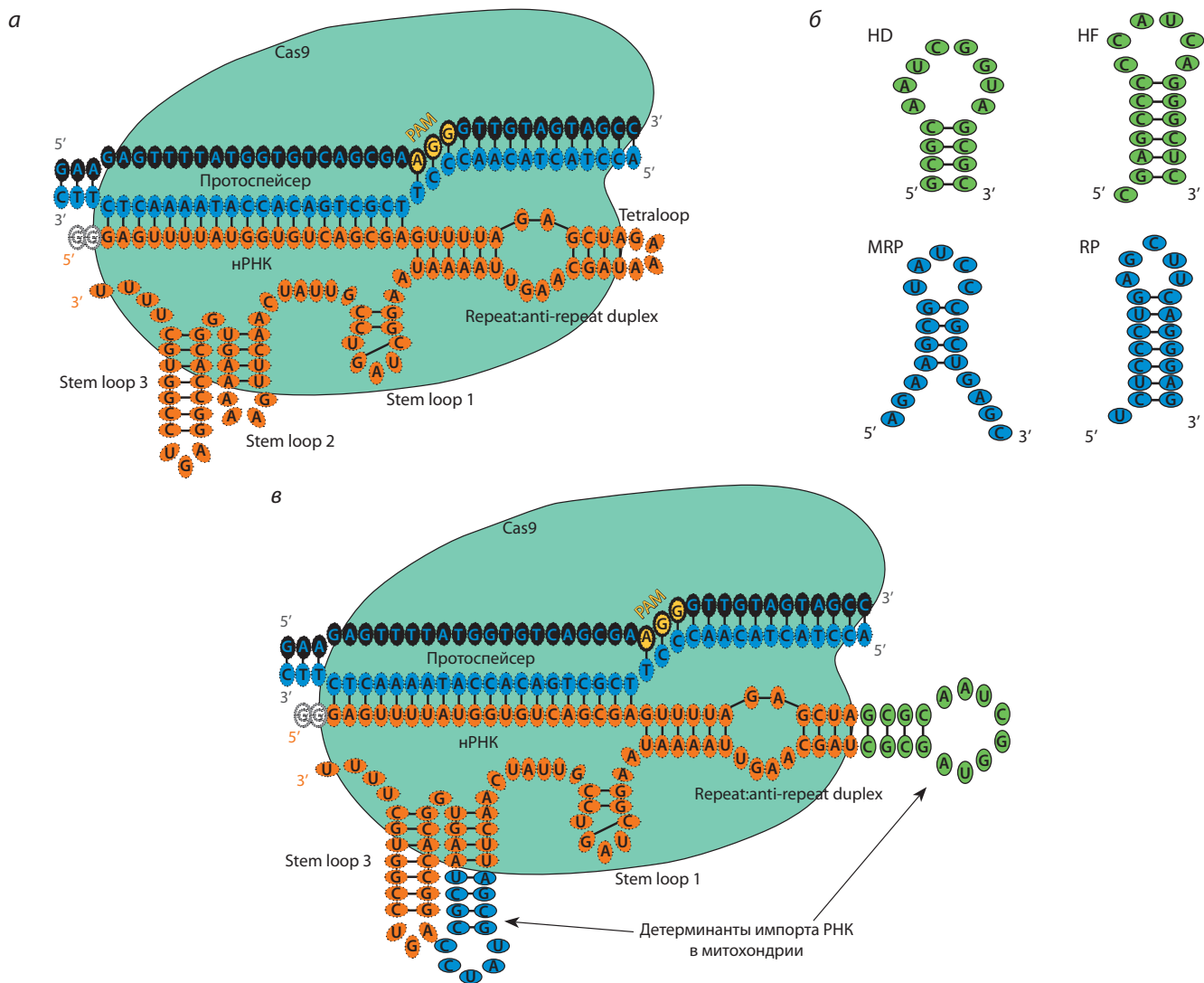


Рис. 1. Дизайн рекомбинантных молекул нРНК.

a – организация комплекса ДНК-нРНК-Cas9, где петли tetraloop и stem loop 2 нРНК свободны от взаимодействия с нуклеазой; *б* – структура шпилек, предположительно выступающих в качестве детерминант импорта РНК в митохондрии; *в* – пример замещения участков петель конstitutивной части нРНК детерминантами импорта.

Характеристика модифицированных направляющих РНК

Модификация нРНК	Расположение детерминанты импорта	Конформация детерминанты импорта	5'–3' вторичная структура нРНК
NEG	Без модификаций	–	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....)))) Tetraloop Stem loop 2
MRP-TLR	Tetraloop	Обратная	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
RP-TLO	Tetraloop	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HD-TLO	Tetraloop	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HF-TLR	Tetraloop	Обратная	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
MRP-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
RP-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HD-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))
HF-SLO	Stem loop 2	Прямая	((((((.....)))))).....(((.....)))((((.....))))

Примечание. Вторичная структура нРНК представлена в виде точно-скобочной модели. Каждый из символов соответствует основанию в нуклеотидной последовательности нРНК. Скобка обозначает спаренное основание в последовательности нРНК. Точками обозначены неспаренные основания, которые соответствуют петлям в структуре шпилек. Немодифицированные шпильки tetraloop и stem loop 2 выделены серым цветом.

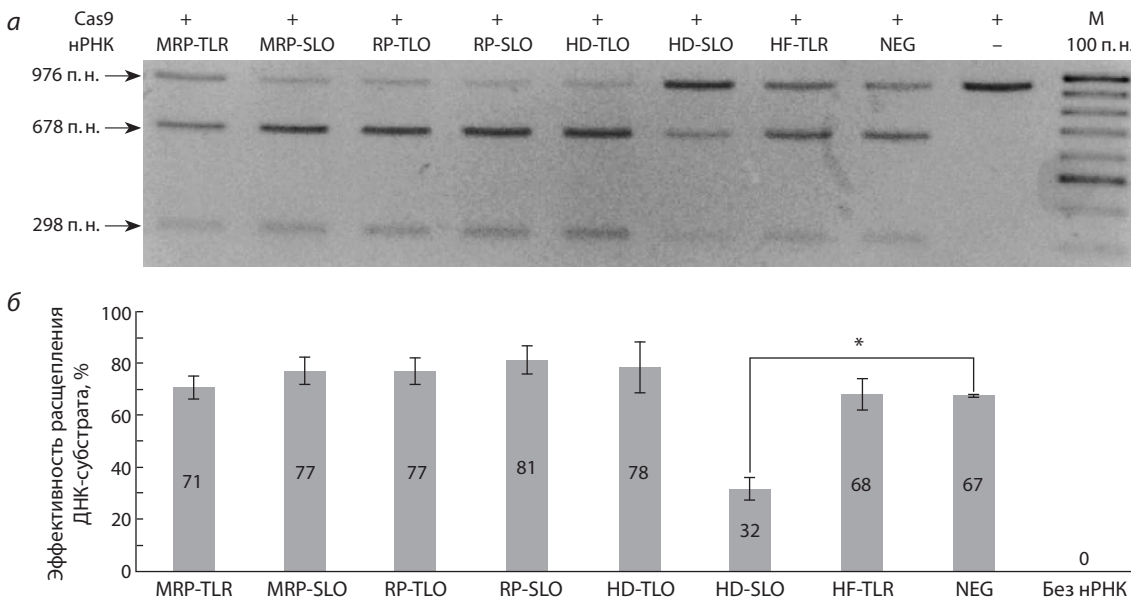


Рис. 2. Расщепление *in vitro* ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с различными вариантами модифицированных нРНК. *a* – продукты реакций *in vitro* расщепления анализировали при использовании электрофореза в агарозном геле; *б* – эффективность расщепления ДНК-субстрата оценивали с помощью денситометрии; стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов. М – ДНК-маркер с шагом 100 п. н.; * значимые различия ($p \leq 0.05$) между средними значениями эффективности расщепления ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с немодифицированной нРНК и с модифицированной нРНК.

эффективность расщепления ДНК-субстрата до 32 %, т. е. более чем в два раза по сравнению с немодифицированной РНК (NEG). Другие варианты модификаций нРНК не приводили к каким-либо статистически значимым изменениям в эффективности расщепления ДНК-субстрата.

Обсуждение

Система CRISPR/Cas9 произвела революцию в технологиях редактирования ядерной ДНК и открыла новые возможности как для изучения фундаментальных биологических процессов, так и для разработки подходов лечения заболеваний человека. Адаптация CRISPR/Cas9 для манипуляций с митохондриальной ДНК – цель многих лабораторий по всему миру (Verechshagina et al., 2019). Однако убедительно продемонстрировать эффективную работу подобной системы в митохондриях никому так и не удалось, причем существует мнение, что митохондрии, – возможно, единственные структуры, для которых адаптировать систему CRISPR/Cas9 не получится (Gammage et al., 2018).

Трудности с адаптацией системы для работы в митохондриях прежде всего связаны с тем, что для импорта во внутреннее пространство митохондрии компонентам системы необходимо преодолеть барьер в виде внешней и внутренней митохондриальных мембран. В состав митохондрий входит около 1500 тыс. белков, которые выполняют разнообразные функции, и при этом только 13 из них закодированы в мтДНК и синтезируются непосредственно в митохондриях (Calvo, Mootha, 2010). Неудивительно, что существуют молекулярные механизмы импорта белков во все компартменты митохондрий, и они подробно изучены (Pfanter et al., 2019). Ранее нами (Орищенко и др., 2016), а также другими группами исследователей (Jo et al., 2015; Loutre et al., 2018; Bian et al., 2019) было показано, что

добавление сигнала митохондриальной локализации с N-конца нуклеазы Cas9 приводит к эффективному импорту Cas9 в матрикс митохондрий. Таким образом, один из компонентов системы CRISPR/Cas9 может быть доставлен во внутреннее пространство митохондрий.

Второй этап адаптации CRISPR/Cas9 системы для модификаций мтДНК – импорт нРНК в митохондрии. К сожалению, в настоящее время молекулярные механизмы транспорта РНК через митохондриальные мембраны у млекопитающих не описаны, и нет единого мнения относительно того, какие РНК импортируются, какую функцию они выполняют в митохондриях и через какие каналы осуществляется транспорт. Поэтому разработка подходов импорта направляющей РНК в митохондрии – наиболее узкое место на пути адаптации системы.

Несмотря на это, существует большое количество актуальных публикаций, в которых экспериментально демонстрируется импорт разнообразных типов РНК в митохондрии (Rubio et al., 2008; Wang et al., 2010; Fan et al., 2019; Jeandard et al., 2019). Как правило, детерминантой импорта в таких РНК является шпильчатая структура типа стебель-петля. Показано, что шпильки HF и HD в транспортной РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* отвечают за импорт в митохондрии tRNA^{Lys} CUU (tRK1). Добавление этих шпилек в структуру других РНК приводило к импорту в митохондрии *in vivo* и восстановлению функций нарушенных патогенными мутациями в мтДНК (Kazakova et al., 1999; Kamenski et al., 2010; Gowher et al., 2013; Tonin et al., 2014). Установлено также, что шпильки RP и MRP в структуре H1 РНК и 7-2 РНК соответственно, выполняют функции детерминант импорта в митохондрии (Wang et al., 2010; Noh et al., 2016; Markantone et al., 2018). Поэтому можно предположить, что добавление подобных детерминант в структуру направляющей РНК позво-

лит достичь ее эффективного импорта в матрикс митохондрий.

Ранее оба компонента системы CRISPR/Cas9 уже подвергались многочисленным модификациям с целью увеличения эффективности и специфичности системы, а также расширения функциональных возможностей. В направляющей РНК выделяют несколько структурных элементов: спейсер – участок длиной около 20 нуклеотидов с 5'-конца нРНК, комплементарный целевой последовательности ДНК в геноме, четыре шпильки – вторичные структуры РНК типа стебель-петля (tetraloop, stem loop 1 или nexus, stem loop 2 и stem loop 3), причем в структуре шпильки tetraloop выделяют нижний стебель, выступ и верхний стебель (Briner et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). С помощью направленного мутагенеза выявлено, что выступ и stem loop 1 (nexus) – ключевые элементы в структуре нРНК, необходимые для активности системы CRISPR/Cas9. В свою очередь, верхний стебель в шпильке tetraloop и шпилька stem loop 2 могут быть значительно модифицированы или даже полностью удалены из нРНК, и при этом активность комплекса нРНК/Cas9 сохраняется (Briner et al., 2014; Kopernmann et al., 2015). Более того, при увеличении длины шпилек tetraloop и stem loop 2 повышались стабильность нРНК и эффективность сборки комплекса нРНК и неактивной нуклеазы Cas9 (Ma et al., 2016; Shao et al., 2016). Поэтому мы предположили, что внесение детерминант митохондриального импорта именно в эти структуры нРНК приведет к ее митохондриальной локализации и не повлияет на функциональную активность комплекса нРНК/Cas9.

В нашей работе шпильки HD, HF, RP и MRP были встроены в структуру tetraloop или stem loop 2 нРНК в разнообразных конформациях. Влияние модификаций нРНК на функциональную активность комплекса нРНК/Cas9 оценивали посредством реакций *in vitro* расщепления субстрата ДНК. При использовании всех вариантов модифицированной нРНК происходило специфическое расщепление ДНК-субстрата (см. рис. 2, а), что указывает на то, что введенные нами модификации не нарушают процесс формирования комплекса нРНК/Cas9, специфичность связывания комплекса с ДНК-субстратом, а также нуклеазную активность Cas9. Однако необходимо отметить, что некоторые из модификаций нРНК приводили как к увеличению, так и к снижению эффективности расщепления ДНК-субстрата комплексом нРНК/Cas9. Это может быть связано с влиянием модификаций на стабильность нРНК, эффективность формирования комплекса нРНК/Cas9, а также нуклеазную активность Cas9 (Nowak et al., 2016).

В работе (Loutre et al., 2018) был применен аналогичный подход для импорта нРНК в матрикс митохондрий, только детерминанты импорта были добавлены на 5'- либо 3'-конец нРНК. В случае модификации 3'-конца активность комплекса нРНК/Cas9 *in vitro* была сравнимой с активностью комплекса при использовании немодифицированной РНК, тогда как при модификации 5'-конца активность комплекса значительно снижалась. Сокращение активности комплекса нРНК/Cas9 при использовании в реакции *in vitro* нРНК с модифицированным 5'-концом, скорее всего, связано с процессированием и деградацией 5'-конца модифицированной нРНК, что было продемонстрировано ранее для нРНК с увеличенным районом спейсера, а также

встройкой с 5'-конца MS2 и PP7 шпилек (Ran et al., 2013; Zalatan et al., 2015; Nowak et al., 2016). Модификация 3'-конца также может негативно сказываться на уровне экспрессии и стабильности нРНК, что, в свою очередь, повлияет на активность комплекса нРНК/Cas9 (Zalatan et al., 2015).

Заключение

Таким образом, оптимальным местом для модификации нРНК и, в частности, встройки детерминант импорта в митохондрию являются шпильки tetraloop и stem loop 2. Однако все варианты модификаций необходимо тестировать не только *in vitro*, но и *in vivo* на клеточных линиях, анализируя как активность комплекса нРНК/Cas9, так и эффективность импорта обоих компонентов в митохондрии.

Список литературы / References

- Орищенко К.Е., Софронова Ю.К., Чупахин Е.Г., Лунев Е.А., Мазунин И.О. Импорт нуклеазы Cas9 в митохондрии. *Гены и клетки*. 2016;11(2):100-105.
[Orishchenko K.E., Sofronova J.K., Chupakhin E.G., Lunev E.A., Mazunin I.O. Delivery Cas9 into mitochondria. *Geny i Kletki = Genes and Cells*. 2016;11(2):100-105. (in Russian)]
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014;513(7519):569-573. DOI 10.1038/nature13579.
- Bian W.P., Chen Y.L., Luo J.J., Wang C., Xie S.L., Pei D.S. A knock-in strategy for editing human and zebrafish mitochondrial DNA using mito-CRISPR/Cas9 system. *ACS Synth. Biol.* 2019;8(4):621-632. DOI 10.1021/acssynbio.8b00411.
- Briner A.E., Donohue P.D., Goma A.A., Selle K., Slorach E.M., Nye C.H., Haurwitz R.E., Beisel C.L., May A.P., Barrangou R. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Mol. Cell*. 2014;56(2):333-339. DOI 10.1016/j.molcel.2014.09.019.
- Calvo S.E., Mootha V.K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2010;11(1):25-44. DOI 10.1146/annurev-genom-082509-141720.
- Chang D.D., Clayton D.A. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science*. 1987;235:1178-1184. DOI 10.1126/science.2434997.
- Comte C., Tonin Y., Heckel-Mager A.-M., Boucheham A., Smirnov A., Auré K., Lombès A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):418-433. DOI 10.1093/nar/gks965.
- Doersen C.J., Guerrier-Takada C., Altman S., Attardi G. Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J. Biol. Chem.* 1985; 260(10): 5942-5949.
- Fan S., Tian T., Chen W., Lv X., Lei X., Zhang H., Sun S., Cai L., Pan G., He L., Ou Z., Lin X., Wang X., Perez M.F., Tu Z., Ferrone S., Tannous B.A., Li J. Mitochondrial miRNA determines chemoresistance by reprogramming metabolism and regulating mitochondrial transcription. *Cancer Res.* 2019;79(6):1069-1084. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-2505.
- Gammage P.A., Moraes C.T., Minczuk M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized. *Trends Genet.* 2018;34(2):101-110. DOI 10.1016/j.tig.2017.11.001.
- Gowher A., Smirnov A., Tarassov I., Entelis N. Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase. *PLoS One.* 2013;8(6):e66228. DOI 10.1371/journal.pone.0066228.
- Holzmann J., Frank P., Löffler E., Bennett K.L., Gerner C., Rossmannith W. RNase P without RNA: identification and functional re-

- constitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*. 2008;135(3):462-474. DOI 10.1016/j.cell.2008.09.013.
- Jeandard D., Smirnova A., Tarassov I., Barrey E., Smirnov A., Entelis N. Import of non-coding RNAs into human mitochondria: A critical review and emerging approaches. *Cells*. 2019;8(3):286. DOI 10.3390/cells8030286.
- Jiang F., Doudna J.A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 2017;46(1):505-529. DOI 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI 10.1126/science.1225829.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014;343(6176):1247997. DOI 10.1126/science.1247997.
- Jo A., Ham S., Lee G.H., Lee Y.I., Kim S., Lee Y.S., Shin J.H., Lee Y. Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:305716. DOI 10.1155/2015/305716.
- Kamenski P., Kolesnikova O., Jubenot V., Entelis N., Krashennikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol. Cell*. 2007;26(5):625-637. DOI 10.1016/j.molcel.2007.04.019.
- Kamenski P., Smirnova E., Kolesnikova O., Krashennikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *Mitochondrion*. 2010;10(3):284-293. DOI 10.1016/j.mito.2010.01.002.
- Kazakova H.A., Entelis N.S., Martin R.P., Tarassov I.A. The amino-acceptor stem of the yeast tRNA(Lys) contains determinants of mitochondrial import selectivity. *FEBS Lett.* 1999;442(2-3):193-197. DOI 10.1016/S0014-5793(98)01653-6.
- Komor A.C., Badran A.H., Liu D.R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*. 2017;168(1-2):20-36. DOI 10.1016/j.cell.2016.10.044.
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2015;517(7536):583-588. DOI 10.1038/nature14136.
- Lorenz R., Bernhart S.H., Höner zu Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 2011;6(1):26. DOI 10.1186/1748-7188-6-26.
- Loutre R., Heckel A.M., Smirnova A., Entelis N., Tarassov I. Can mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and contra. *IUBMB Life*. 2018;70(12):1233-1239. DOI 10.1002/iub.1919.
- Ma H., Tu L.C., Naseri A., Huisman M., Zhang S., Grunwald D., Pederson T. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(5):528-530. DOI 10.1038/nbt.3526.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Markantone D.M., Towheed A., Crain A.T., Collins J.M., Celotto A.M., Palladino M.J. Protein coding mitochondrial-targeted RNAs rescue mitochondrial disease *in vivo*. *Neurobiol. Dis.* 2018;117:203-210. DOI 10.1016/j.nbd.2018.06.009.
- Martin R.P., Schneller J.M., Stahl A.J., Dirheimer G. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry*. 1979;18(21):4600-4605. DOI 10.1021/bi00588a021.
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Noh J.H., Kim K.M., Abdelmohsen K., Yoon J.H., Panda A.C., Munk R., Kim J., Curtis J., Moad C.A., Wohler C.M., Indig F.E., de Paula W., Dudekula D.B., De S., Piao Y., Yang X., Martindale J.L., de Cabo R., Gorospe M. HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP. *Genes Dev*. 2016;30(10):1224-1239. DOI 10.1101/gad.276022.115.
- Nowak C.M., Lawson S., Zerez M., Bleris L. Guide RNA engineering for versatile Cas9 functionality. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(20):9555-9564. DOI 10.1093/nar/gkw908.
- Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019;20:267-284. DOI 10.1038/s41580-018-0092-0.
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013;8:2281-2308. DOI 10.1038/nprot.2013.143.
- Rubio M.A., Rinehart J.J., Krett B., Duvezin-Caubet S., Reichert A.S., Söll D., Alfonzo J.D. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(27):9186-9191. DOI 10.1073/pnas.0804283105.
- Shao S., Zhang W., Hu H., Xue B., Qin J., Sun C., Sun Y., Wei W., Sun Y. Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(9):e86-e86. DOI 10.1093/nar/gkw066.
- Tonin Y., Heckel A.M., Vysokikh M., Dovydenko I., Meschaninova M., Rötig A., Munnich A., Venyaminova A., Tarassov I., Entelis N. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 2014;289(19):13323-13334. DOI 10.1074/jbc.M113.528968.
- Verechshagina N., Nikitchina N., Yamada Y., Harashima H., Tanaka M., Orishchenko K., Mazunin I. Future of human mitochondrial DNA editing technologies. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq. Anal.* 2019;30(2):214-221. DOI 10.1080/24701394.2018.1472773.
- Wang G., Chen H.-W.W., Oktay Y., Zhang J., Allen E.L., Smith G.M., Fan K.C., Hong J.S., French S.W., McCaffery J.M., Lightowers R.N., Morse H.C., Koehler C.M., Teitell M.A. PNPase regulates RNA import into mitochondria. *Cell*. 2010;142(3):456-467. DOI 10.1016/j.cell.2010.06.035.
- Wang G., Shimada E., Zhang J., Hong J.S., Smith G.M., Teitell M.A., Koehler C.M. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(13):4840-4845. DOI 10.1073/pnas.1116792109.
- Wright A.V., Sternberg S.H., Taylor D.W., Staahl B.T., Bardales J.A., Kornfeld J.E., Doudna J.A. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(10):2984-2989. DOI 10.1073/pnas.1501698112.
- Zalatan J.G., Lee M.E., Almeida R., Gilbert L.A., Whitehead E.H., La Russa M., Tsai J.C., Weissman J.S., Dueber J.E., Qi L.S., Lim W.A. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*. 2015;160(1-2):339-350. DOI 10.1016/j.cell.2014.11.052.

ORCID ID

K.E. Orishchenko orcid.org/0000-0001-9718-9038

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИЦиГ СО РАН «Молекулярно-генетические основы регуляции экспрессии генов, морфологии, дифференцировки и перепрограммирования клеток» (№ 0324-2019-0042-C-01), при частичной поддержке бюджетного проекта № 0259-2019-0001 и гранта РФФИ № 17-75-20015.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.11.2019. После доработки 24.03.2020. Принята к публикации 27.05.2020.

Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания

К.С. Задесенец, Н.Б. Рубцов 

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

 e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Аннотация. При проведении многочисленных и разнообразных молекулярно-цитогенетических исследований микродиссекционные ДНК-библиотеки и ДНК-пробы зарекомендовали себя как надежный и эффективный инструмент как в диагностике и анализе хромосомных патологий человека, так и в работах, посвященных изучению реорганизации хромосом в ходе кариотипической эволюции. Важным преимуществом микродиссекционных ДНК-проб перед хромосомоспецифичными ДНК-пробами, полученными с помощью хромосомного сортирования, является возможность их приготовления из хромосомного материала индивидуальных животных без дополнительного этапа создания клеточных культур, предназначенных для производства большого числа метафазных хромосом. Одно из основных условий успешного использования микродиссекционной техники – идентификация целевой хромосомы на препаратах метафазных хромосом, что позволяет, используя микроманипуляционную технику, осуществлять сбор непосредственно ее материала с цитологических препаратов. В настоящей работе предложена технология создания ДНК-проб для индивидуальных хромосом даже в том случае, когда рутинное окрашивание не дает провести их надежную идентификацию. Представленный подход апробирован при получении наборов хромосомоспецифичных ДНК-проб для хромосом двух видов свободноживущих плоских червей рода *Macrostomum* – *M. mirumnovem* и *M. cliftonensis*. Кариотипы этих видов содержат три пары мелких, близких по размеру метацентрических хромосом, надежная идентификация которых после окрашивания красителем Гимза оказалась невозможной. Раздельный сбор всех метафазных хромосом из одной метафазной пластинки с последующей амплификацией их ДНК позволил создать ДНК-пробы, специфически окрашивающие исходные хромосомы при проведении даже частичной супрессионной гибридизации *in situ*. При анализе результатов такой супрессионной гибридизации *in situ* идентифицированы хромосомы, из которых были получены ДНК-пробы. Последующее пулирование ДНК-проб, созданных из гомологичных хромосом, способствовало увеличению интенсивности их специфического окрашивания при проведении их супрессионной гибридизации *in situ*. Это, в свою очередь, обеспечило возможность успешного применения предлагаемого подхода в экспериментах, посвященных изучению кариотипической эволюции в роде *Macrostomum*, а также при анализе хромосомных перестроек, имеющих место в лабораторных культурах *M. mirumnovem*.


Ключевые слова: микродиссекция метафазных хромосом; микродиссекционные ДНК-пробы; флуоресцентная *in situ* гибридизация; сиквенс-независимая полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-o

Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes when chromosome identification by routine staining is impossible

K.S. Zadesenets, N.B. Rubtsov 

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

 e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Abstract. Application of microdissected DNA libraries and DNA probes in numerous and various modern molecular cytogenetic studies showed them as an efficient and reliable tool in the analysis of chromosome reorganization during karyotypic evolution and in the diagnosis of human chromosome pathology. An important advantage of DNA probe generation by metaphase chromosome microdissection followed by sequence-independent polymerase chain reaction in comparison with the method of DNA probe generation using chromosome sorting is the possibility of DNA probe preparation from chromosomes of an individual sample without cell line establishment

for the production of a large number of metaphase chromosomes. One of the main requirements for successful application of this technique is a possibility for identification of the chromosome of main interest during its dissection and collection of its material from metaphase plates spread on the coverslip. In the present study, we developed and applied a technique for generation of microdissected DNA probes in the case when chromosome identification during microdissection appeared to be impossible. The technique was used for generation of two sets of Whole Chromosome Paints (WCPs) from all chromosomes of two species of free-living flatworms in the genus *Macrostomum*, *M. mirumnovem* and *M. cliftonensis*. The single-copy chromosome technique including separate collection of all chromosomes from one metaphase plate allowed us to generate WCPs that painted specifically the original chromosome by Chromosome *In Situ* Suppression Hybridization (CISS-Hybridization). CISS-Hybridization allowed identifying the original chromosome(s) used for DNA probe generation. Pooled WCPs derived from homologous chromosomes increased the intensity and specificity of chromosome painting provided by CISS-Hybridization. In the result, the obtained DNA probes appeared to be good enough for application in our studies devoted to analysis of karyotypic evolution in the genus *Macrostomum* and for analysis of chromosome rearrangements among the worms of laboratory cultures of *M. mirumnovem*.

Key words: metaphase chromosome microdissection; Whole Chromosome Paints; FISH; sequence-independent polymerase chain reaction.

For citation: Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes when chromosome identification by routine staining is impossible. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-o

Введение

Сравнительная цитогенетика как отдельное направление в биологии возникла практически сразу после разработки методов приготовления качественных препаратов метафазных хромосом. Ее прогресс во многом обусловлен развитием методов идентификации хромосом и хромосомных районов. Начиная с 1970-х гг. для сравнительного цитогенетического анализа хромосом разных видов млекопитающих и птиц успешно использовали технику GTG-дифференциального окрашивания хромосом (Graphodatsky et al., 2000). Следующим этапом было использование локализации в хромосомах гомологичных генов в качестве маркеров гомеологических хромосом и хромосомных районов у разных видов млекопитающих. Первые исследования были основаны на результатах определения хромосомной локализации генов с помощью панелей межвидовых гибридов соматических клеток (Rubtsov et al., 1981) и сравнения паттернов GTG-окрашивания хромосом, содержащих гомеологичные гены (Rubtsov et al., 1988).

Значительный прогресс в сравнительной цитогенетике оказался связан с разработкой методов гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, которые позволили проводить локализацию клонированных фрагментов ДНК с точностью до небольшого района хромосомы, а затем и специфически окрашивать целые хромосомы и протяженные хромосомные районы (Nesterova et al., 1991). Одним из ключевых моментов в развитии сравнительной цитогенетики оказалась разработка методов создания цельнохромосомных ДНК-проб, супрессионная гибридизация *in situ* которых полностью и специфично окрашивала исходные хромосомы и гомеологичные хромосомы и их районы в хромосомах других видов (Ferguson-Smith, Trifonov, 2007). В настоящее время такие цельнохромосомные ДНК-пробы получают либо из сортированных с помощью проточной цитометрии метафазных хромосом, либо из хромосом, собранных из распластанных на стекле метафазных пластинок, амплификацией ДНК собранных хромосом в полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером MW6 или с помощью специа-

лизированных китов WGA (whole genome amplification). Качество таких цельнохромосомных ДНК-проб зависит как от эффективности амплификации собранного хромосомного материала, числа копий хромосом, ДНК которых используется на старте такой амплификации, так и от сохранности ДНК собираемого хромосомного материала. Если при применении хромосомного сортирования высокое качество цельнохромосомных ДНК-проб может быть достигнуто сбором тысяч хромосомных копий, то в случае микродиссекции их число не может быть велико из-за большой трудоемкости этой процедуры, а проблемы идентификации целевой хромосомы могут сделать использование микродиссекционной технологии еще более проблематичной.

С проблемой идентификации рутинно окрашенных хромосом мы столкнулись при молекулярно-цитогенетическом анализе хромосом свободноживущих червей рода *Macrostomum*. В соответствии с их кариотипами виды рода *Macrostomum* могут быть разделены на три группы. Описание двух групп видов с кариотипами $2n = 6$ и $2n = 12$, состоящими из мелких метацентрических хромосом, предполагает, что в их эволюции могла иметь место недавняя полная дупликация генома. Эта гипотеза хорошо согласуется с результатами молекулярно-цитогенетического анализа асимметричных кариотипов видов *M. lignano* и *M. janickei*, в кариотипах которых были выявлены четкие следы недавно прошедшей полногеномной дупликации (Zadesenets et al., 2017a, b). Кроме удвоения генома в их эволюции имели место слияния одного гаплоидного набора предковых хромосом в единую крупную метацентрическую хромосому (Zadesenets et al., 2017a, b).

Гипотеза об удвоении числа хромосом в результате полногеномной дупликации может быть проверена созданием ДНК-проб из индивидуальных хромосом вида с кариотипом $2n = 12$ и дальнейшего проведения их супрессионной гибридизации *in situ* с метафазными хромосомами этого вида. Специфическое окрашивание в таком эксперименте двух пар паралогичных хромосом цельнохромосомными ДНК-пробами свидетельствовало бы о недавнем удвоении генома предкового вида. Проб-

лемой создания необходимых для проведения такого исследования ДНК-проб является сходство морфологии всех хромосом у известных в настоящее время видов с кариотипом $2n = 12$ (Zadesenets et al., 2020).

Нами проводятся кариотипирование новых видов рода *Macrostomum*, которые могли бы быть вовлечены в такие исследования, а также разработка методов создания ДНК-проб, специфично окрашивающих индивидуальные хромосомы видов, кариотип которых состоит из морфологически неразличимых хромосом. Настоящая работа посвящена решению этой задачи.

Материалы и методы

Лабораторные культуры свободноживущих червей. В работе использованы лабораторные культуры видов *M. cliftonensis* и *M. mirumnovem*, любезно предоставленные L. Schärer (Зоологический институт Университета Базеля, Швейцария). Кариотип *M. cliftonensis* ($2n = 6$) состоит из трех пар маленьких метацентрических хромосом, близких по размеру и морфологии (Zadesenets et al., 2020). Кариотипирование *M. mirumnovem* выявило высокое кариотипическое разнообразие, с наиболее часто встречающимся кариотипом ($2n = 9$) (Zadesenets et al., 2020). В настоящем исследовании взяты только особи с этим кариотипом.

Приготовление препаратов метафазных хромосом. При кариотипировании индивидуальных червяков (длина взрослой особи варьирует, в зависимости от вида, от 0.5 до 1 мм) препараты метафазных хромосом готовили согласно разработанному ранее протоколу кариотипирования индивидуальных особей (Zadesenets et al., 2016). Для описания кариотипа анализировали не менее 10 метафазных пластинок. Препараты для проведения микродиссекции готовили из 100 особей в соответствии со стандартным протоколом приготовления препаратов метафазных хромосом, разработанным ранее. Препараты делали на чистых влажных холодных покровных стеклах (60 мм × 24 мм × 0.17 мм) (Zadesenets et al., 2016).

Окрашивание метафазных хромосом. Метафазные хромосомы для рутинного кариотипирования окрашивали красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (VectaShield, США) в соответствии со стандартным протоколом. Метафазные хромосомы для микродиссекции окрашивали 0.1 % красителем Гимза (Sigma) в течение трех мин при комнатной температуре, затем ополаскивали в дистиллированной воде и слегка подсушивали. После подсушивания хромосомы должны были оставаться достаточно мягкими и легко резаться оттянутой стеклянной иглой.

Микроскопический анализ. Микроскопические изображения окрашенных метафазных хромосом и результаты флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) регистрировали с помощью CCD-камеры, установленной на люминесцентном микроскопе AxioPlan 2 (ZEISS, Германия). Для микроскопического анализа хромосом, окрашенных красителем DAPI, и результатов FISH использовали комплекты фильтров #49, #10 и #15 (ZEISS, Германия). Для регистрации и анализа микроскопических изображений применяли программное обеспечение AxioVision (ZEISS, Германия) или ISIS4 (METASystems GmbH, Гер-

мания). Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ).

Микродиссекция метафазных хромосом и получение микродиссекционных ДНК-проб. Основы техники микродиссекции метафазных хромосом видов рода *Macrostomum* и сиквенс-независимой амплификации ДНК диссектированного материала для получения ДНК-проб в основном были описаны ранее (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b). То есть для микродиссекции использовали полные метафазные пластинки, хромосомы в которых были хорошо распластаны, отсутствовали контакты и налегания хромосом. Положение хромосом в метафазной пластинке позволяло собрать материал всех хромосом в отдельные пробирки, не касаясь других хромосом. Для микродиссекции хромосом вида *M. mirumnovem* были взяты особи с кариотипом $2n = 9$ (одна самая крупная метафазная хромосома – ММ1, пара крупных метацентриков – ММ2 и три пары мелких метацентрических хромосом ММ3–ММ5). Материал диссектированной хромосомы под микроскопическим контролем переносили в 40 нл реакционной смеси (Zadesenets et al., 2016), помещенные в оттянутый силиконизированный носик пипетки Пастера. Микроскопический контроль гарантировал надежный и полный перенос материала. Затем материал помещали в готовую реакционную смесь объемом 10 мкл в 0.5 мл пробирке. Далее подготовку ДНК к амплификации и саму амплификацию выполняли согласно ранее описанному протоколу (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b). После завершения полимеразной цепной реакции (ПЦР) полученный продукт метили в 20 дополнительных циклах ПЦР в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, конъюгированных с флуорохромами: Flu-12-dUTP [fluorescein-5(6)-carboxamidocaproyl-[5(3-aminoallyl)2'-deoxyuridine-5'-Triphosphate] (Biosan, Новосибирск, Россия) или TAMRA-5-dUTP (5-tetramethylrhodamine-dUTP) (Biosan), используя Whole Genome Amplification 3 Kit (WGA3, Sigma-Aldrich, США) (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b). Пары ДНК-проб, полученных из гомологичных хромосом, определяли проведением супрессионной гибридизации *in situ* с хромосомами исходного вида.

Супрессионная гибридизация *in situ* с метафазными хромосомами *M. cliftonensis* и *M. mirumnovem*. Из-за очень небольшого размера особей *M. cliftonensis* и *M. mirumnovem* (длина взрослой особи не превышает 1.22 и 1.17 мм соответственно) (Schärer et al., 2020) получение достаточного количества Cot1/Cot2 ДНК (фракция высокоповторенной ДНК) для проведения полноценной супрессионной гибридизации *in situ* с цельнохромосомными ДНК-пробами не представляется возможным. Ранее нами была разработана модификация супрессионной гибридизации *in situ* для использования с микродиссекционными ДНК-пробами хромосом червей рода *Macrostomum* (Zadesenets et al., 2017a, b, 2020). Такой вариант супрессионной гибридизации *in situ* давал специфическое окрашивание эухроматиновых районов исходной хромосомы, более интенсивный сигнал в районах структурного гетерохроматина, обогащенных повторными последовательностями, гомологичными ДНК, входящей в состав используемой

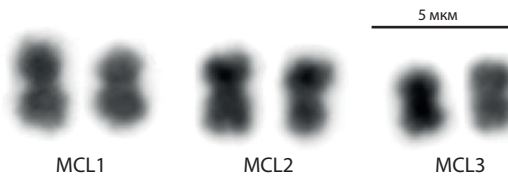


Рис. 1. Кариотип *M. cliftonensis* ($2n = 6$), состоящий из трех пар метацентрических хромосом со схожими размерами и морфологией.

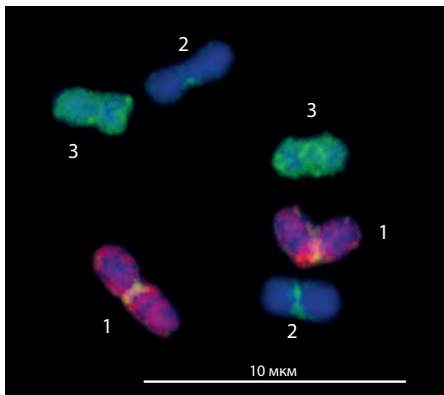


Рис. 2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* цельнохромосомных ДНК-проб, специфичных хромосомам 1 (красный сигнал) и 3 (зеленый сигнал) *M. cliftonensis* с метафазными хромосомами *M. cliftonensis*. Цифрами указаны номера хромосом.



Рис. 3. Кариотип *M. mirumnovem* ($2n = 9$), состоящий из трех крупных хромосом MMI1–MMI2 и трех пар мелких хромосом MMI3–MMI5.

ДНК-пробы, и менее интенсивное окрашивание районов других хромосом, содержащих диспергированные повторенные последовательности.

Результаты и обсуждение

Хромосомы лабораторной аутбредной культуры червей *M. cliftonensis*. Перед проведением микродиссекции для получения цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis* было проведено повторное кариотипирование 100 особей лабораторной культуры, поддерживаемой в ИЦиГ СО РАН. Установлено, что все проанализированные метафазные пластинки у всех исследованных особей имели стандартный для *M. cliftonensis* кариотип $2n = 6$, состоящий из трех пар метацентрических хромосом (рис. 1).

Создание и тестирование цельнохромосомных микродиссекционных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis*. Для генерации цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis* на покровном стекле (60 мм × 2 мм × 0.17 мм) был приготовлен препарат метафаз-

ных хромосом. После его высушивания он был ополоснут в фосфатном буфере (рН = 7.2) и немедленно покрашен красителем Гимза, подсушен так, чтобы метафазные хромосомы оставались мягкими, легко собирались со стекла оттянутой силиконизированной стеклянной иглой, управляемой микроманипулятором, не разваливаясь на фрагменты. Такой вариант подготовки хромосом для микродиссекции уменьшал деградацию ДНК и позволял проводить количественный сбор хромосомного материала. Поочередно все хромосомы с выбранной метафазной пластинки были собраны и перенесены в коллекционные капли в оттянутых силиконизированных кончиках пастеровских пипеток (диаметр оттянутого кончика составлял около 40 мкм). Микродиссекцию проводили на инвертированном микроскопе AxioVert10, оборудованном двумя микроманипуляторами, один из которых управлял оттянутой стеклянной иглой, а другой служил для позиционирования пастеровской пипетки с оттянутым кончиком во время переноса диссектированного материала. Для обеспечения оптимального по направлению подвода иглы к диссектируемой хромосоме на микроскопе был установлен вращающийся скользящий столик (ZEISS, Германия). После переноса диссектированного материала хромосом в пастеровские пипетки материал помещали в пробирки в 10 мкл реакционной смеси (Zadesenets et al., 2016). Для гарантии полного переноса материала оттянутый кончик пастеровской пипетки обламывали в пробирке. Далее подготовку ДНК для амплификации и саму амплификацию осуществляли согласно стандартному протоколу (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b, 2020). Продукт ПЦР метили и проводили двухцветную супрессионную гибридизацию *in situ* для оценки качества ДНК-проб и определения ДНК-проб, полученных из гомологичных хромосом.

Все полученные ДНК-пробы при проведении супрессионной гибридизации *in situ* окрашивали хромосомы соответствующей исходной пары, а также давали сигнал в прицентромерных районах других хромосом (рис. 2), что объясняется неполной супрессией гибридизации повторенных последовательностей. ДНК-библиотеки, приготовленные из материала гомологичных хромосом, были объединены. ДНК-пробы, приготовленные на основе таких объединенных ДНК-библиотек, при проведении супрессионной гибридизации *in situ* давали более интенсивный и более специфический сигнал на исходной хромосоме. Они также продолжали более интенсивно окрашивать прицентромерные районы остальных хромосом. Интенсивность окрашивания эухроматиновых районов других хромосом не увеличилась. Проведение двухцветной супрессионной гибридизации *in situ* полученных ДНК-проб не выявило транслокаций хромосомных районов у *M. cliftonensis*, подтверждая заключение о высокой стабильности кариотипа *M. cliftonensis*, сделанное на основании результатов рутинного кариотипирования.

Создание и тестирование цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. mirumnovem*. Так как особи вида *M. mirumnovem* показали высокое кариотипическое разнообразие (Zadesenets et al., 2020), то для создания ДНК-проб были выбраны хромосомы метафазной пластинки, соответствующей наиболее часто встречающемуся кариотипу $2n = 9$ (рис. 3). При создании микродиссекцион-

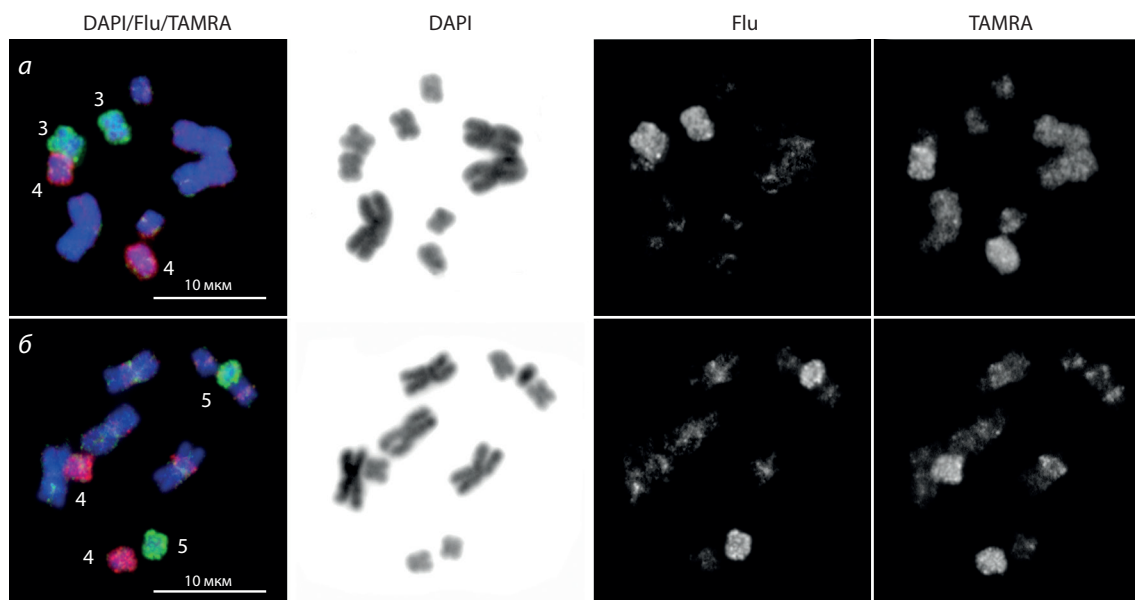


Рис. 4. Флуоресцентная гибридизация *in situ* целых хромосомных ДНК-проб с метафазными хромосомами *M. mirumnovem*. а – ДНК-пробы, полученные из пар хромосом MMI3 (зеленый сигнал) и MMI4 (красный сигнал); б – ДНК-пробы, полученные из пар хромосом MMI4 (красный сигнал) и MMI5 (зеленый сигнал). Цифрами указаны номера хромосом.

ных ДНК-проб были соблюдены те же принципы и технические решения, которые были реализованы при получении целых хромосомных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis*. Отдельно был собран материал всех девяти хромосом метафазной пластинки, амплификацией их ДНК получены ДНК-пробы, проведена FISH с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* и определены пары ДНК-проб, специфичные гомологичным хромосомам. Такие микродиссекционные ДНК-библиотеки были объединены и в дальнейшем использованы для производства целых хромосомных ДНК-проб. В результате комплект ДНК-проб включал четыре целых хромосомных ДНК-пробы из пар хромосом MMI2–MMI5 и ДНК-пробу из одной копии хромосомы MMI1.

Целых хромосомных ДНК-пробы, полученные из маленьких метацентрических хромосом MMI3–MMI5, интенсивно и специфически окрашивали исходные хромосомы, давали сигнал в прицентромерных районах других хромосом, слабо неспецифически окрашивали эухроматиновые районы других метацентриков. Однако паттерн окрашивания крупных хромосом оказался более сложным. Супрессионная *in situ* гибридизация ДНК-проб из хромосом MMI3–MMI5 неравномерно и менее интенсивно окрашивала разные районы хромосомы MMI2, и еще менее интенсивно и равномерно – разные районы хромосомы MMI1 (рис. 4).

Супрессионная гибридизация *in situ* ДНК-проб, полученных из хромосом MMI1 и MMI2, интенсивно окрашивала исходные хромосомы. Однако окрашивание хромосом было неравномерным. На слабоконденсированных хромосомах участки интенсивной флуоресценции чередовались с менее интенсивно окрашенными районами. Неожиданным результатом является очень слабый флуоресцентный сигнал, который супрессионная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб, происходящих из

крупных метацентрических хромосом, дала на мелких метацентрических хромосомах. Мы полагаем, что полученные паттерны окрашивания хромосом *M. mirumnovem* указывают на имевшую место в эволюционном сценарии этого вида полногеномную дупликацию с последующей реорганизацией генома, возможно, ведущей к его редиплоидизации. Сходный сценарий геномной и кариотипической эволюции ранее описан для другой филогенетической линии этого рода, включающей виды *M. lignano* и *M. janickei* (Schärer et al., 2020; Zadesenets et al., 2020).

Закключение

Предложенный и опробованный подход получения целых хромосомных ДНК-проб позволил создать ДНК-пробы, эффективно выявляющие материал исходных хромосом, а также паралогичные районы хромосом, возникшие в результате недавней полногеномной дупликации и последующей реорганизации хромосом.

Список литературы / References

- Ferguson-Smith M.A., Trifonov V. Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(12):950-962. DOI 10.1038/nrg2199.
- Graphodatsky A.S., Yang F., O'Brien P.C.M., Serdukova N., Milne B.S., Trifonov V., Ferguson-Smith M.A. A comparative chromosome map of the Arctic fox, Red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding. *Chromosome Res.* 2000;8(3):253-263. DOI 10.1023/A:1009217400140.
- Nesterova T., Rubtsov N., Zakian S., Matveeva V., Graphodatsky A. Mapping of the silver fox genes: assignments of the genes for ME1, ADK, PP, PEPA, GSR, MPI, and GOT1. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991;56(2):125-127. DOI 10.1159/000133065.
- Rubtsov N., Graphodatsky A., Matveeva V., Radjabli S., Nesterova T., Kulbakina N., Zakian S. Silver fox gene mapping: conserved chromosome regions in the order Carnivora. *Cytogenet. Cell Genet.* 1988;48(2):95-98. DOI 10.1159/000132598.
- Rubtsov N., Radjabli S., Gradov A., Serov O. Chinese hamster × American mink somatic cell hybrids: characterization of clone panel and


- assignment of the genes for malate dehydrogenase-NADP-1 and malate dehydrogenase-NAD-1. *Theor. Appl. Genet.* 1981;60:99. DOI 10.1007/BF00282425.
- Schärer L., Brand J.N., Singh P., Zadesenets K.S., Stelzer C.-P., Viktorin G.A. phylogenetically informed search for an alternative *Macrostomum* model species, with notes on taxonomy, mating behavior, karyology, and genome size. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2020;58:41-65. DOI 10.1111/jzs.12344.
- Zadesenets K.S., Ershov N.I., Berezikov E., Rubtsov N.B. Chromosome evolution in the free-living flatworms: first evidence of intrachromosomal rearrangements in karyotype evolution of *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida). *Genes.* 2017a;8:298. DOI 10.3390/genes8110298.
- Zadesenets K., Jetybayev I., Schärer L., Rubtsov N. Genome and karyotype reorganization after whole genome duplication in free-living flatworms of the genus *Macrostomum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21:680. DOI 10.3390/ijms21020680.
- Zadesenets K.S., Schärer L., Rubtsov N.B. New insights into the karyotype evolution of the free-living flatworm *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Sci. Rep.* 2017b;7:6066. DOI 10.1038/s41598-017-06498-0.
- Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One.* 2016;11:e0164915. DOI 10.1371/journal.pone.0164915.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00211).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.12.2019. После доработки 17.03.2020. Принята к публикации 21.03.2020. Опубликована онлайн 20.05.2020.

Миграцию клеток зародышевой линии в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* негативно регулируют окружающие соматические клетки

Н.В. Дорогова¹, А.С. Хрущева¹, Ю.А. Галимова², Д.Ю. Ощепков¹, Д.Е. Маслов³, Е.Д. Шведкина³, К.А. Ахметова^{1,4}, С.А. Фёдорова¹ 

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

² Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия


⁴ Университет Алабамы, Бирмингем, отдел биохимии и молекулярной генетики, медицинский факультет, Бирмингем, Алабама, США

 e-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

Аннотация. Клеточная миграция – важный морфогенетический процесс, необходимый на разных этапах индивидуального развития и функционирования организма. Инициация и поддержание состояния движения клеток требуют активации множества факторов, участвующих в регуляции транскрипции, преобразованиях сигналов, адгезивных взаимодействиях, модуляциях мембран и цитоскелета. Однако клеточная миграция зависит не только от статуса клеток, способных к активному движению, но и от состояния окружающих клеток, с которыми взаимодействуют движущиеся клетки. Окружающие клетки или матрикс не просто формируют субстрат для перемещения, но могут также участвовать в пространственно-временной регуляции миграции. В настоящее время нет точных представлений о генетических механизмах этой регуляции. Чтобы определить роль клеточного окружения в регуляции индивидуальной клеточной миграции, в настоящей работе мы изучали миграцию клеток зародышевой линии (КЗЛ) в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster*. В норме, КЗЛ обособляются на 3-й стадии эмбриогенеза на заднем полюсе эмбриона. Во время гастрюляции (6–7-я стадии) КЗЛ в виде консолидированной группы пассивно перемещаются внутрь эмбриона и оказываются в кармане первичной кишки. Далее КЗЛ индивидуализируются, приобретают амебондную форму, активно перемещаются сквозь эпителий кишки и мигрируют в 5–6-й брюшные сегменты эмбриона, где формируют парные первичные гонады. Мы провели скрининг генов, экспрессирующихся в окружающем КЗЛ эпителии в раннем эмбриогенезе и влияющих на их миграцию. Выявили гены *mys*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1* и *hop*, РНК-интерференция которых приводит к преждевременной активной миграции КЗЛ на 4–7-й стадиях эмбриогенеза. Эти гены можно разделить на две группы: модуляторы активности JAK/STAT сигнального каскада, индуцирующего миграцию в КЗЛ, – гены *stat92E*, *Tre-1*, *hop*, и гены, вовлеченные в морфогенез и поляризацию эпителия, т.е. модифицирующие проницаемость эпителиального барьера, – *mys*, *Hph*. Так как снижение количества продуктов каждого из этих генов приводило к преждевременной миграции КЗЛ, то можно сделать вывод, что в норме на ранних стадиях эмбриогенеза соматическое окружение негативно регулирует миграцию клеток зародышевой линии. Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; эмбриогенез; клетки зародышевой линии; миграция клеток; формирование эмбриональных гонад.

Для цитирования: Дорогова Н.В., Хрущева А.С., Галимова Ю.А., Ощепков Д.Ю., Маслов Д.Е., Шведкина Е.Д., Ахметова К.А., Фёдорова С.А. Миграцию зародышевой линии в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* негативно регулируют окружающие соматические клетки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):525-532. DOI 10.18699/VJ20.644

Migration of primordial germline cells is negatively regulated by surrounding somatic cells during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*


N.V. Dorogova¹, A.S. Khruscheva¹, Yu.A. Galimova², D.Yu. Oshchepkov¹, D.E. Maslov³, E.D. Shvedkina³, K.A. Akhmetova^{1,4}, S.A. Fedorova¹ 

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

² Institute of Molecular and Cellular Biology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ University of Alabama at Birmingham, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine, Birmingham, Alabama, USA

 e-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

Abstract. Cell migration is an important morphogenetic process necessary at different stages of individual development and body functioning. The initiation and maintenance of the cell movement state requires the activation of many factors involved in the regulation of transcription, signal transduction, adhesive interactions, modulation of membranes and the

cytoskeleton. However, cell movement depends on the status of both migrating and surrounding cells, interacting with each other during movement. The surrounding cells or cell matrix not only form a substrate for movement, but can also participate in the spatio-temporal regulation of the migration. At present, there is no exact understanding of the genetic mechanisms of this regulation. To determine the role of the cell environment in the regulation of individual cell migration, we studied the migration of primordial germline cells (PGC) during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. Normally, PGC are formed at the 3rd stage of embryogenesis at the posterior pole of the embryo. During gastrulation (stages 6–7), PGC as a consolidated cell group passively transfers into the midgut primordium. Further, PGC are individualized, acquire an amoeboid form, and actively move through the midgut epithelium and migrate to the 5–6 abdominal segment of the embryo, where they form paired embryonic gonads. We screened for genes expressed in the epithelium surrounding PGC during early embryogenesis and affecting their migration. We identified the *myc*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1*, and *hop* genes, whose RNA interference leads to premature active PGC migration at stages 4–7 of embryogenesis. These genes can be divided into two groups: 1) modulators of JAK/STAT pathway activity inducing PGC migration (*stat92E*, *Tre-1*, *hop*), and 2) *myc* and *Hph* involved in epithelial morphogenesis and polarization, i.e. modifying the permeability of the epithelial barrier. Since a depletion of each of these gene products resulted in premature PGC migration, we can conclude that, normally, the somatic environment negatively regulates PGC migration during early *Drosophila* embryogenesis.

Key words: *Drosophila melanogaster*; embryogenesis; germline cells; cell migration; embryonic gonad development.

For citation: Dorogova N.V., Khruscheva A.S., Galimova Iu.A., Oshchepkov D.Yu., Maslov D.E., Shvedkina E.D., Akhmetova K.A., Fedorova S.A. Migration of primordial germline cells is negatively regulated by surrounding somatic cells during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):525-532. DOI 10.18699/VJ20.644

Введение

Клеточная миграция – важный морфогенетический процесс, необходимый на разных этапах индивидуального развития и функционирования организма. Масштабная миграция клеток происходит во время формирования зародышевых слоев, затем на этапе закладки и последующего формирования органов и тканей (Aman, Piotrowski, 2010; Schumacher, 2019). Некоторые дифференцированные клетки также сохраняют способность к миграции при выполнении своих специализированных функций (Ratheesh et al., 2015; Barros-Becker et al., 2017; Sharouri-Moghaddam et al., 2018). Инициация и поддержание состояния движения клеток требуют активации множества факторов, участвующих в регуляции транскрипции, преобразованиях сигналов, адгезивных взаимодействиях, модуляциях мембран и цитоскелета (Devreotes, Horwitz, 2015). Молекулярно-генетическая природа этих процессов эволюционно консервативна и имеет высокую гомологию в клеточных типах и у разных организмов. Поэтому различные аспекты клеточной миграции и механизмы ее регуляции эффективно изучаются на модельных организмах как *in vivo*, так и *in vitro*. Одной из таких моделей является эмбрион *Drosophila melanogaster* (Reig et al., 2014).

Эмбрион дрозофилы на ранних этапах развития представляет собой синцитий. В течение первых 15 мин (1-я стадия эмбриогенеза) происходит слияние мужского и женского пронуклеусов, сопровождающееся 13 раундами эмбриональных митозов. На 3-й стадии развития эмбриона обособляются первые клетки – клетки зародышевой линии (КЗЛ), которые формируются на заднем полюсе эмбриона в области половой плазмы. Остальные ядра продолжают дробление и только на 5-й стадии эмбриогенеза приобретают клеточные мембраны в процессе целлюляризации. В течение гастрюляции группа тесно связанных между собой КЗЛ пассивно перемещается с заднего полюса внутрь эмбриона за счет инвагинации клеточного слоя будущей эндодермы и, таким образом, оказывается в кармане первичной кишки. На 10-й стадии эмбриогенеза КЗЛ в кармане первичной кишки теряют межклеточные

контакты, индивидуализируются и приобретают амебонную форму. Одновременно в клетках первичной кишки активируется процесс эпителиально-мезенхимального перехода, в результате которого они частично теряют апикально-базальную поляризацию, сопровождающуюся ослаблением межклеточных контактов. Эти процессы позволяют КЗЛ активно перемещаться сквозь стенки первичной кишки и мигрировать в область формирования первичных гонад. В ходе активной миграции КЗЛ разделяются на две группы, которые в 5-м брюшном сегменте эмбриона объединяются с мезодермальными клетками и формируют парные эмбриональные гонады (Dansereau, Lasko, 2008; Richardson, Lehmann, 2010).

Мы показали, что транскрипционный фактор GAGA (GAF) участвует в регуляции миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе (Дорогова и др., 2016). У мутантов по гену *Trl*, кодирующему GAF, КЗЛ в раннем эмбриогенезе вместо пассивного перемещения консолидированной группой начинают активно мигрировать с заднего полюса внутрь эмбриона. При этом КЗЛ теряют округлую форму, у них возникают выросты цитоплазмы, подобные ламеллоподиям, они хаотично двигаются, не участвуя в итоге в формировании гонад. Нами было показано, что в самих КЗЛ белок GAF отсутствует, а эффект их преждевременной миграции в раннем эмбриогенезе зависит от экспрессии *Trl* в соматических клетках, окружающих КЗЛ (Дорогова и др., 2016). Настоящая работа посвящена выявлению генов-мишеней транскрипционного фактора GAF, участвующих в регуляции миграции КЗЛ со стороны окружающих их эпителиальных клеток.

Материалы и методы

В работе использована линия *D. melanogaster* дикого типа *Hikone AW* из фонда лаборатории генетики клеточного цикла Института цитологии и генетики СО РАН. Остальные линии получены из стоковых центров Мишима (National Institute of Genetics, NIG, Япония) и Блумингтон (Bloomington Stocks Centre, США), номера линий и их генотипы представлены в табл. 1. Все перечисленные в

Таблица 1. Линии мух, используемые в работе

Ген	Стоковый центр	Номер линии	Генотип
+/+	Bloomington	4	Линия дикого типа, контроль 1
<i>tub-GAL4</i>	Bloomington	30029	y[1] w[11 18]; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7 P{ry[+t7.2] = neoFRT}82B/TM6B, Tb[1]
<i>myc</i>	NIG	51454	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03189}attP40
<i>myc</i>	Bloomington	25783	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiPJF01761}attP2
<i>stat92E</i>	Bloomington	33637	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00035}attP2
<i>Tre-1</i>	NIG	HMS00433	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>Hph</i>	Bloomington	34717	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01196}attP2
<i>Hph</i>	NIG	1114R-2	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2/TM3,Sb
<i>hop</i>	NIG	2720R-1	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>hop</i>	NIG	HMS00779	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>for</i>	NIG	10033R-1	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>for</i>	NIG	GL00026	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP40
<i>mbc</i>	NIG	10379R-1	y[1] v[1]; P{TRiP}attP40/CyO
<i>mbc</i>	NIG	HMC03172	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>pod1</i>	Bloomington	41705	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02270}attP2
<i>pod1</i>	Bloomington	31219	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiPJF01774}attP2
<i>rib</i>	NIG	HMC03083	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03083}attP2
<i>rib</i>	NIG	7230R-2	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>ptp4E</i>	Bloomington	38369	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01838}attP2
<i>ptp4E</i>	Bloomington	60008	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS05000}attP40
<i>tll</i>	NIG	HMS01316	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>tll</i>	Bloomington	27242	y[1] v[1]; P{TRiPJF02545}attP2
<i>tao</i>	NIG	HMS01226	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>tao</i>	Bloomington	31226	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiPJF01803}attP2
<i>shg</i>	Bloomington	27698	y[1] v[1]; P{TRiPJF02769}attP2/TM3, Sb1
<i>shg</i>	NIG	HMS00693	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>Sdc</i>	NIG	10497Rb-2	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>bbg</i>	NIG	HMJ23903	y[1] v[1]; P{TRiPJF02769}attP2/TM3, Sb1
<i>unc-115a</i>	NIG	31352R-3	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2
<i>Crk</i>	NIG	HMJ22995	y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2

табл. 1 линии содержат генетические конструкции для эктопической РНК-интерференции соответствующих генов. Для индукции РНК-интерференции осуществляли скрещивание линий, несущих интерферирующую генетическую конструкцию под UAS-промотором с линией, имеющей драйвер *tub-GAL4*, повсеместно экспрессирующий дрожжевой транскрипционный фактор GAL, специфично связывающийся с UAS-промотором. Мух содержали на стандартной агар-агар/кукурузной среде при температуре 25 °С.

Выделение, фиксацию и окраску эмбрионов антителами осуществляли согласно методике, описанной ранее (Dorogova et al., 2014). Для этого оплодотворенных самок оставляли откладывать яйца в течение ночи, затем проводили сбор и фиксацию эмбрионов. Фиксированные эмбрионы хранили в метаноле при -20 °С, для анализа их

регидрировали и окрашивали антителами. В работе были использованы первичные антитела rabbit anti-Vasa (разведение 1 : 30, SC 30210, Santa Cruz Biotechnology) и вторичные антитела anti-rabbit Alexa 568 (разведение 1 : 300, Molecular probe, A-11011). После инкубации с антителами препараты окрашивали раствором DAPI (2 мг/мл в 1 × PBS, pH 7.4) 5 мин и заключали в Mowiol, содержащий 10 % DABCO. Для каждой комбинации (РНК-интерференции исследуемого гена, индуцируемой повсеместным драйвером *tub-GAL4*), суммарно анализировали 400–500 эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза, в качестве контролей использовали линию дикого типа *Hikone AW*, драйвер *tub-GAL4*, а также перечисленные в табл. 1 линии без индукции РНК-интерференции. В каждом контроле проанализировано 100–200 эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза. Анализ и фотографирование препаратов

выполняли с помощью микроскопа AxioImager Z1 с приставкой ApoTome (Zeiss, Германия) и фотокамеры AxioCam MR (Zeiss).

Биоинформатический анализ проводили, используя базы данных FlyExpress, Fly-FISH и Berkeley Drosophila Genome Project, DRoID. Сопоставляя данные из перечисленных баз, получили выборку генов, экспрессирующихся на нужных стадиях эмбриогенеза и потенциально регулируемых GAGA-фактором. Наличие неканонических сайтов связывания анализировали при помощи оригинального программного пакета SITECON (Omelina et al., 2011). Для этого использовали регуляторные области 500 и 1000 нуклеотидных пар выше старта транскрипции.

Результаты

Ранее мы показали, что у мутантов по гену *Trl*, кодирующему транскрипционный фактор GAGA (GAF), нарушена миграция КЗЛ в эмбриогенезе (Дорогова и др., 2016). Недостаток GAF приводит к преждевременному транзитерминальному перемещению КЗЛ с заднего полюса внутрь эмбриона. Нами выявлено, что эффект преждевременной миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе зависит от зиготической экспрессии *Trl* в соматических клетках заднего полюса эмбриона. Так как GAF – регулятор транскрипции, то логично было предположить, что его влияние на миграцию КЗЛ происходит опосредованно, через его гены-мишени. Экспериментально подтверждено связывание GAF с промоторами примерно 300 генов (van Steensel et al., 2003; Omelina et al., 2011), участвующих в большом разнообразии фундаментальных клеточных процессов.

Для определения роли клеточного окружения в регуляции и осуществлении индивидуальной клеточной миграции в раннем эмбриогенезе мы провели скрининг генов, экспрессирующихся на 4–6-й стадиях эмбриогенеза в соматических клетках, окружающих КЗЛ (т. е. области экспрессии гена *Trl* на этих стадиях, паттерн экспрессии подтверждался данными литературы и из базы Berkeley Drosophila Genome Project, <https://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>), и получили выборку из 81 гена. В выборку попали гены *stat92E*, *hop*, *Trl*, *Tre-1*, которые являются известными регуляторами миграции клеток (Kunwar et al., 2003, 2008; Li et al., 2003; Sheng et al., 2009; Дорогова и др., 2016). Согласно базе данных DRoID, 67 % генов из полученной выборки – потенциальные мишени транскрипционного фактора GAF. Поэтому полученная выборка генов была затем проанализирована при помощи оригинального программного пакета SITECON (Omelina et al., 2011) на наличие сайтов связывания GAF. Для анализа использованы регуляторные области 500 нуклеотидных пар выше старта транскрипции. В результате были выявлены 39 потенциальных сайтов связывания GAF типа GAGnGAG и 68 сайтов GAGnnnGAG в области –500...+1. В качестве первичной проверки функциональности найденных сайтов мы проанализировали наличие пиков связывания GAF из базы данных ModEncode (Embryo_0_12h_GAF_ChIP_chip; <http://www.modencode.org/>) и выяснили, что только для 7 из 39 GAGnGAG сайтов и для 6 из 68 сайтов GAGnnnGAG из выборки (–500...+1) не показано связывания с GAF в эмбриогенезе (а также для двух генов не было данных).

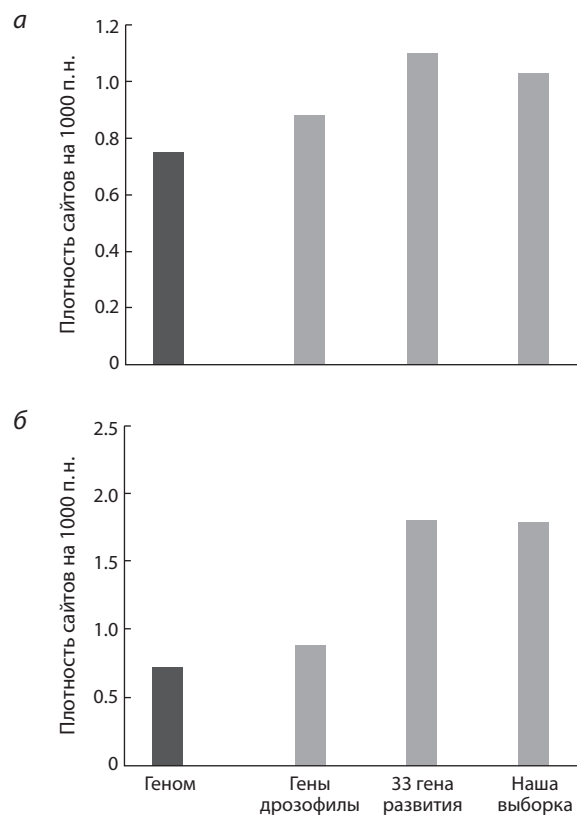


Рис. 1. Плотность распределения потенциальных сайтов связывания GAF (на 1000 нуклеотидов) типа GAGnGAG (a) и GAGnnnGAG (б) по различным выборкам генов.

Черный столбец – плотность сайтов по всему геному дрозофилы, серые столбцы – плотность сайтов в промоторных районах (–500...+1) различных выборок генов: «гены дрозофилы» – 6947 случайных генов, «33 гена развития» – гены развития дрозофилы (Omelina et al., 2011), «наша выборка» – выборка генов, экспрессирующихся в эпителиальных клетках заднего полюса эмбриона на 4–6-й стадиях развития.

Интересно отметить, что плотность распределения сайтов связывания GAF в районах –500...+1 от старта инициации транскрипции генов, экспрессирующихся в раннем эмбриогенезе в соматических клетках, окружающих КЗЛ, неслучайна (рис. 1), она превышает среднюю плотность распределения таких сайтов (на 1000 п.н.) на геном (например, плотность распределения сайтов GAGnnnGAG в области –500...+1 превышает среднюю плотность на геном более чем в два раза) и, что особенно любопытно, соответствует плотности сайтов GAF в генах раннего развития. В нашей выборке были гены, действительно экспрессирующиеся в раннем эмбриогенезе, однако большинство из них не являются генами раннего развития.

Мы проанализировали миграцию КЗЛ при РНК-интерференции ряда генов, запускаемой посредством GAL4/UAS системы с помощью повсеместного драйвера *tub-GAL4* (табл. 2, рис. 2). Для многих генов были доступны линии с РНК-интерференцией разных участков этих генов, в таких случаях мы использовали эти линии в независимых экспериментах по исследованию миграции КЗЛ в эмбриогенезе. В качестве контроля были: линии дикого типа *Hikone AW*, линия, содержащая драйвер *tub-GAL4*, и линии с *UAS –RNAi* (без индукции интерференции).

Таблица 2. Фенотипы миграции КЗЛ при РНК-интерференции соответствующего гена

Ген, номер линии	Область экспрессии на 1–5-й стадиях эмбриогенеза	Наблюдаемый фенотип при РНК-интерференции
<i>mys</i> 51454	1–4-я стадии – повсеместно*	Преждевременная миграция КЗЛ на 5-й стадии
<i>mys</i> 25783	5-я стадия – в эпителиальных клетках на полюсах эмбриона	Преждевременная миграция КЗЛ на 5-й стадии
<i>mbc</i> 51446	1–4-я стадии – повсеместно*, 5-я стадия – бластодермальные клетки, кроме КЗЛ	Ранняя миграция не нарушена, но при выходе из кармана первичной кишки на 11-й стадии КЗЛ теряют ориентацию
<i>mbc</i> 10379R-1		Ранняя миграция не нарушена, но есть слабые нарушения направления миграции КЗЛ на 11-й стадии
<i>hop</i> 32979	1–4-я стадии – сильная повсеместно*, 5-я стадия – слабая повсеместно, включая КЗЛ	Нарушение выхода КЗЛ из первичной кишки на 10-й стадии
<i>hop</i> 00779		Нарушение выхода КЗЛ из первичной кишки на 10-й стадии
<i>stat92E</i> 33637	1–5-я стадии – повсеместно*	Преждевременная миграция на ранних стадиях и в среднем эмбриогенезе, часть КЗЛ остается в кармане на 10–11-й стадиях
<i>Hph</i> 1114R	1–4-я стадии – повсеместно*, исчезает к 5-й стадии	Высокий уровень гибели эмбрионов, многие эмбрионы не доживают до гастрюляции, у выживших гастрюляция и формирование эпителия идут с нарушениями, КЗЛ растекаются по поверхности, раскиданы хаотично
<i>Hph</i> 34717		Высокая смертность в среднем эмбриогенезе. У выживших есть нарушения на ранних и поздних стадиях, КЗЛ растекаются по поверхности
<i>Tre-1</i> 3171R	1–5-я стадии – задний полюс эмбриона, область половой плазмы	Примерно одна треть эмбрионов гибнет, есть нарушения гастрюляции, миграция КЗЛ нарушена и на ранних, и на средних стадиях
<i>Tre-1</i> HMS00433		Примерно одна треть эмбрионов гибнет, есть нарушения гастрюляции, миграция КЗЛ нарушена и на ранних, и на средних стадиях
<i>ptp4E</i> 60008	1–5-я стадии – повсеместно* с постепенным снижением	Нарушения миграции КЗЛ есть на 10–11-й стадиях, часть клеток остается в кармане кишки
<i>ptp4E</i> 38369		На 10–11-й стадиях часть КЗЛ остается в кармане кишки
<i>pod1</i> 31219	1–5-я стадии – повсеместно*	Нет нарушений
<i>pod1</i> 41705		»
<i>rib</i> 7230R-2	1–4-я стадии – экспрессии нет,	»
<i>rib</i> 50682	5-я стадия – в эпителиальных клетках на полюсах эмбриона	»
<i>for</i> 10033R-1	1–3-я стадии – повсеместно*,	»
<i>for</i> GL00026	4-я стадия – повсеместно, кроме КЗЛ, 5-я стадия – в эпителиальных клетках на заднем полюсе эмбриона	»
<i>tll</i> HMS01316	1–4-я стадии – экспрессии нет,	»
<i>tll</i> 27242	5-я стадия – половая плазма	»
<i>tao</i> HMS01226	1–4-я стадии – повсеместно*,	»
<i>tao</i> 31226	5-я стадия – КЗЛ	»
<i>shg</i> 27698	1–5-я стадии – повсеместно*	»
<i>shg</i> HMS00693		»
<i>bbg</i> HMJ23903	1–4-я стадии – экспрессии нет, 5–6-я стадии – в эпителиальных клетках на заднем полюсе эмбриона	»
<i>unc-115a</i>	1–4-я стадии – повсеместно*, деградирует к 5-й стадии	»
<i>Sdc</i> 10497	1–6-я стадии – повсеместно*, кроме КЗЛ	Эмбрион деградирует, и КЗЛ гибнут на ранних стадиях, нарушений миграции нет
<i>Crk</i> 22995	1–6-я стадии – повсеместно*	Нарушения есть только на 10-й стадии при миграции через кишку: не все КЗЛ мигрируют, часть остается в кармане

* Повсеместно – означает локализацию мРНК соответствующего гена по всему объему эмбриона, включая область половой плазмы на 1–3-й стадиях и сформировавшиеся КЗЛ на 4–6-й стадиях (если не указано другое).

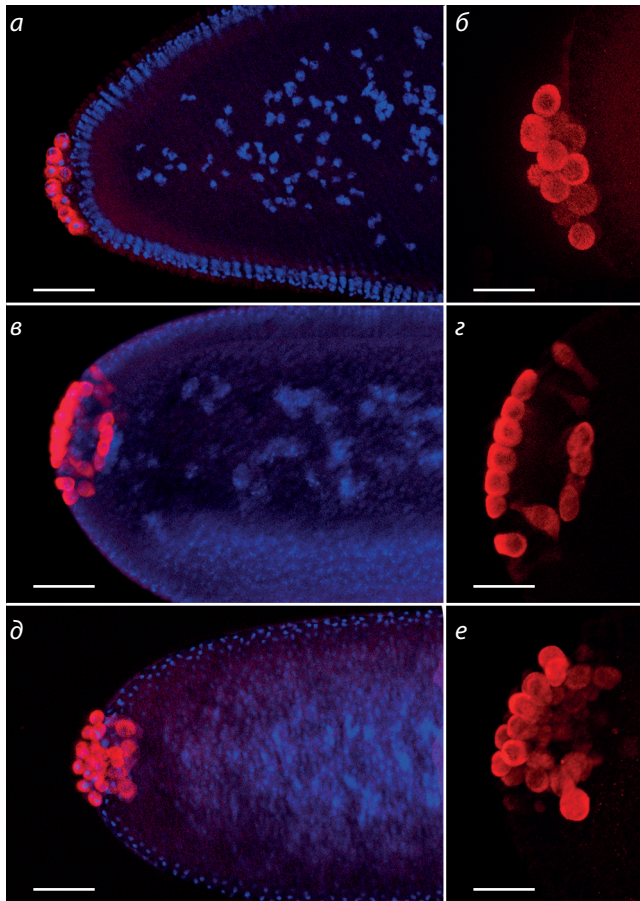


Рис. 2. Клетки зародышевой линии на 4–5-й стадиях эмбрионального развития в норме (а, б) и у *tub-GAL4/UAS-myc-RNAi* (в, з) и *tub-GAL4/UAS-Hph-RNAi* (д, е).

а, б – в норме примордиальные зародышевые клетки располагаются на заднем полюсе эмбриона и имеют характерную для этой стадии сферическую форму; в, з – преждевременная миграция КЗЛ в *tub-GAL4/UAS-myc-RNAi* эмбрионах; д, е – преждевременная миграция КЗЛ в *tub-GAL4/UAS-Hph-RNAi* эмбрионах. Ядра окрашены DAPI (синий), КЗЛ – антителами к белку VASA (красный). Масштаб: а, в, д – 30 мкм; б, з, е – 50 мкм.

Во всех контрольных образцах преждевременная миграция КЗЛ не наблюдалась.

Обнаружена преждевременная миграция КЗЛ в раннем эмбриогенезе при РНК-интерференции генов *myc* (~90 %, $n^* = 60$; * здесь и далее n – число просмотренных эмбрионов *tub-GAL4/UAS-RNAi* на 4–5-й стадиях эмбриогенеза), *Hph* (~70 %, $n = 45$), *stat92E* (~90 %, $n = 50$), *Tre-1* (~70 %, $n = 40$) и *hop* (~40 %, $n = 40$). При этом интерференция генов *stat92E*, *Tre-1* и *hop*, помимо нарушений в раннем эмбриогенезе, приводила еще и к нарушениям миграции КЗЛ в среднем эмбриогенезе, на 10–11-й стадиях. Часть генов, *shg*, *hop*, *mbc*, *Hph*, *ptp4E* и *Crk*, оказалась вовлеченной только в процесс миграции КЗЛ сквозь первичную кишку на 10–11-й стадиях. В случае интерференции генов *tll*, *tao*, *for*, *bbg*, *unc-115a*, *Sdc*, *pod1* и *rib* никакого влияния на миграцию КЗЛ в эмбриогенезе нами не выявлено.

Обсуждение

Обнаруженный ранее феномен преждевременной миграции КЗЛ, зависящей от экспрессии гена *Trl* в окружающих КЗЛ соматических клетках (Дорогова и др., 2016),

побудил нас к поиску других генов, регулирующих миграцию КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Любопытно, что 67 % генов, экспрессирующихся на 4–6-й стадиях эмбриогенеза в эпителиальных клетках, окружающих КЗЛ, оказались потенциальными мишенями транскрипционного фактора GAF, что позволяет предполагать его участие в регуляции миграции клеток зародышевой линии. Мы сравнили полученные нами данные с транскрипционной регуляцией других типов мигрирующих клеток в эмбрионе дрозофилы (Bae et al., 2017) – соматических клеток висцеральной мезодермы (предшественники продольных мышц кишечника, мигрируют коллективным потоком) и гемоцитов (эквивалент клеток крови, мигрируют индивидуально). Среди 73 генов, имеющих общие профили экспрессии в обоих типах мигрирующих соматических клеток, экспрессия 64 генов (88 %) может регулироваться транскрипционным фактором. Интересно также отметить, что плотность распределения сайтов связывания GAF в промоторных районах генов из нашей выборки почти двукратно превышает случайную плотность и соответствует плотности распределения сайтов GAF в генах раннего развития (Omelina et al., 2011). Таким образом, можно предположить, что GAF не только регулирует эмбриональную миграцию клеток, но также служит регулятором раннего развития эмбриона дрозофилы.

Так как гены, участвующие в регуляции миграции эмбриональных клеток, «обогащены» мишенями транскрипционного фактора GAF, то мы использовали этот факт для дальнейшей селекции генов, участвующих в регуляции миграции КЗЛ со стороны окружающей их соматических клеток. Для 17 генов из полученной выборки мы проанализировали их влияние на миграцию КЗЛ и выявили ряд генов, негативно регулирующих этот процесс. Мы показали, что РНК-интерференция генов *myc*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1* и *hop* приводит к преждевременному трансэпителиальному перемещению КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Участие трех последних генов в регуляции миграции КЗЛ было известно и ранее. Так, ген *hop* (*hopscotch*) кодирует Янус-киназу (JAK-киназу), а ген *stat92E* – транскрипционный фактор STAT92E (Signal Transducer and Activator of Transcription), оба этих белка – активаторы эволюционно консервативного JAK/STAT сигнального каскада, индуцирующего миграцию различных клеток у дрозофилы, мышей и людей (Li et al., 2003; Silver et al., 2005). Наблюдаемая нами преждевременная миграция КЗЛ при РНК-интерференции гена *hop* хорошо согласуется с данными J. Li с коллегами (2003), которые показали, что ген *hop* экспрессируется только в соматических клетках эмбриона, а его мутации приводят к гиперактивации STAT92E, вызывая преждевременную миграцию клеток зародышевой линии. Следует отметить, что для инициации миграции необходима активация JAK/STAT пути в самих КЗЛ. На стадии раннего эмбриогенеза в КЗЛ этот сигнальный каскад активируется киназой Tor (Li et al., 2003). В соматических клетках, окружающих КЗЛ, этот сигнальный каскад активируется JAK-киназой и, по-видимому, контролирует реорганизацию цитоскелета и поляризацию эпителиальных клеток.

Участие JAK/STAT в морфогенезе и поляризации эпителия было определено для многих тканей, включая эм-

бриональный кишечник дрозофилы (Josten et al., 2004). Ген *Tre-1* также относится к JAK/STAT-пути и кодирует рецептор G-белка (GPCR) – трансмембранный рецептор хемоаттрактантов (Kunwar et al., 2003, 2008; Sheng et al., 2009). Активация *Tre-1* инициирует серьезные внутриклеточные перестроения – клетка меняет свою поляризацию, изменяется регуляция цитоскелета, что в совокупности создает условия для активного перемещения клетки. Показано, что на ранних стадиях эмбриогенеза *Tre-1* также необходим для поляризации клеток (Richardson, Lehmann, 2010). Мы полагаем, что РНК-интерференция этого гена может приводить к более слабой поляризации эпителиальных клеток и, как следствие, к повышению их проницаемости.

Наиболее интересными нам представляются полученные результаты об участии в регуляции миграции КЗЛ генов *mus* и *Hph*. Ген *mus* (другое название – *dm, diminutive*) кодирует хорошо известный транскрипционный фактор, гомологичный протоонкогену Мус позвоночных, необходимый для пролиферации и роста клеток. Удивительно, но в недавнем скрининге модуляторов инвазии опухолей обнаружено, что Мус препятствует распространению и метастазированию опухоли (Ma et al., 2017). Эктопическая экспрессия человеческого сМус эффективно подавляла JNK-зависимую клеточную инвазию и миграцию в клеточных линиях как дрозофилы, так и аденокарциномы легкого человека (Ma et al., 2017). Эти исследователи выяснили, что Мус со своим транскрипционным партнером усиливают экспрессию тирозинкиназы *puc* (*pucered*), которая, с одной стороны, вовлечена в поляризацию и морфогенез эпителиальных клеток, а с другой, является ингибитором JNK сигнального каскада, критически необходимого для опухолевых инвазий и миграции клеток (Ma et al., 2017). Следовательно, снижение уровня Мус в соматических клетках способно провоцировать миграцию КЗЛ за счет увеличения проницаемости окружающих соматических клеток.

Ген *Hph* (*HIF prolyl hydroxylase*) кодирует HIF пролил-4-гидролазу – ядерный транспортер белков и сенсор кислорода в клетке. Мутации по этому гену нарушают формирование эмбриональных трахей у дрозофилы. Кроме того, показано, что от дозы гена *Hph* зависит скорость миграции соматических бордюрных клеток в оогенезе дрозофилы: сверхэкспрессия гена *Hph* в этих клетках ускоряла их движение, тогда как истощение по этому белку приводило к замедлению миграции (Doronkin et al., 2010). При этом в клеточных клонах, мутантных по *Hph*, наблюдалось снижение уровня экспрессии транскрипционного фактора *slbo* (*slow border cells*) – ключевого регулятора миграции бордюрных клеток, и *shg* (*shotgun*), кодирующего белок клеточной адгезии ДЕ-кадгерин (Doronkin et al., 2010).

Таким образом, выявленные нами негативные регуляторы миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе можно разделить на две группы: модификаторы активности JAK/STAT сигнального каскада, индуцирующего миграцию клеток у различных организмов, и гены, вовлеченные в поляризацию и морфогенез эпителия. Первая группа генов в норме снижает инвазивный потенциал мигрирующих клеток зародышевой линии, а вторая отвечает за непроницаемость эпителиального слоя.

Заключение

В настоящей работе мы провели скрининг генов, вовлеченных в миграцию КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Особенностью нашего скрининга был поиск регуляторов миграции не в самих мигрирующих КЗЛ, а в окружающих их соматических клетках. Выявлено пять генов, *mus*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1* и *hop*, РНК-интерференция которых приводит к преждевременной миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Феномен преждевременной миграции демонстрирует, что окружающие клетки, в частности эпителиальные, не просто формируют субстрат для перемещения КЗЛ, но и могут влиять на этот процесс регуляторно. Однако именно этот аспект регуляции миграции слабо изучен и далек от понимания. Тем не менее он представляет интерес и требует дальнейшего детального изучения, поскольку прослеживается гомология с другими вариантами индивидуальной клеточной миграции, в том числе связанными с метастазированием.

Список литературы / References

- Дорогова Н.В., Хрущева А.С., Федорова Е.В., Огиенко А.А., Баричева Э.М. Роль фактора GAGA в миграции примордиальных зародышевых клеток и формировании гонад дрозофилы. *Онтогенез*. 2016;47(1):40-48. DOI 10.7868/S0475145016010031. [Dorogova N.V., Fedorova E.V., Ogienko A.A., Baricheva E.M., Khrushcheva A.S. Role of GAGA factor in *Drosophila* primordial germ cell migration and gonad development. *Russ. J. Dev. Biol.* 2016;47(1):33-40. DOI 10.1134/S1062360416010033.]
- Aman A., Piotrowski T. Cell migration during morphogenesis. *Dev. Biol.* 2010;341(1):20-33. DOI 10.1016/j.ydbio.
- Bae Y.K., Macabenta F., Curtis H.L., Stathopoulos A. Comparative analysis of gene expression profiles for several migrating cell types identifies cell migration regulators. *Mech. Dev.* 2017;148:40-55. DOI 10.1016/j.mod.2017.04.004.
- Barros-Becker F., Lam P.Y., Fisher R., Huttenlocher A. Live imaging reveals distinct modes of neutrophil and macrophage migration within interstitial tissues. *J. Cell Sci.* 2017;130(22):3801-3808. DOI 10.1242/jcs.206128.
- Dansereau D.A., Lasko P. The development of germline stem cells in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* 2008;450:3-26. DOI 10.1007/978-1-60327-214-8_1.
- Devreotes P., Horwitz A.R. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(8):a005959. DOI 10.1101/cshperspect.a005959.
- Dorogova N.V., Fedorova E.V., Bolobolova E.U., Ogienko A.A., Baricheva E.M. GAGA protein is essential for male germ cell development in *Drosophila*. *Genesis*. 2014;52(8):738-751. DOI 10.1002/dvg.22789.
- Doronkin S., Djagaeva I., Nagle M.E., Reiter L.T., Seagroves T.N. Dose-dependent modulation of HIF-1 α /sima controls the rate of cell migration and invasion in *Drosophila* ovary border cells. *Oncogene*. 2010;29(8):1123-1134. DOI 10.1038/onc.2009.407.
- Josten F., Fuss B., Feix M., Meissner T., Hoch M. Cooperation of JAK/STAT and Notch signaling in the *Drosophila* foregut. *Dev. Biol.* 2004;267(1):181-189. DOI 10.1016/j.ydbio.2003.11.016.
- Kunwar P.S., Sano H., Renault A.D., Barbosa V., Fuse N., Lehmann R. Tre1 GPCR initiates germ cell transepithelial migration by regulating *Drosophila melanogaster* E-cadherin. *J. Cell Biol.* 2008;183(1):157-168. DOI 10.1083/jcb.200807049.
- Kunwar P.S., Starz-Gaiano M., Bainton R.J., Heberlein U., Lehmann R. Tre1, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells. *PLoS Biol.* 2003;1(3):E80. DOI 10.1371/journal.pbio.0000080.
- Li J., Xia F., Li W.X. Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 2003;5(5):787-798. DOI 10.1016/s1534-5807(03)00328-9.

- Ma X., Huang J., Tian Y., Chen Y., Yang Y., Zhang X., Zhang F., Xue L. Myc suppresses tumor invasion and cell migration by inhibiting JNK signaling. *Oncogene*. 2017;36:3159-3167. DOI 10.1038/onc.2016.463.
- Omelina E.S., Baricheva E.M., Oshchepkov D.Y., Merkulova T.I. Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes. *Comput. Biol. Chem.* 2011;35:363-370. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2011.10.008.
- Ratheesh A., Belyaeva V., Siekhaus D.E. *Drosophila* immune cell migration and adhesion during embryonic development and larval immune responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015;36:71-79. DOI 10.1016/j.ccb.2015.07.003.
- Reig G., Pulgar E., Concha M.L. Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development*. 2014;141(10):1999-2013. DOI 10.1242/dev.101451.
- Richardson B.E., Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(1):37-49. DOI 10.1038/nrm2815.
- Schumacher L. Collective cell migration in development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1146:105-116. DOI 10.1007/978-3-030-17593-1_7.
- Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmacili S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-6440. DOI 10.1002/jcp.26429.
- Sheng X.R., Posenau T., Gumulak-Smith J.J., Matunis E., Van Dorren M., Wawersik M. Jak-STAT regulation of male germline stem cell establishment during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Biol.* 2009;334(2):335-344. DOI 10.1016/j.ydbio.2009.07.031.
- Silver D.L., Geisbrecht E.R., Montell D.J. Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development*. 2005;132(15):3483-3492. DOI 10.1242/dev.01910.
- van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J. Genomewide analysis of *Drosophila* GAGA factor target genes reveals context-dependent DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(5):2580-2585. DOI 10.1073/pnas.0438000100.

ORCID ID

S.A. Fedorova orcid.org/0000-0001-8257-4654

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00321. Работа Н.В. Дороговой и С.А. Фёдоровой поддержана базовым бюджетным проектом № 0324-2019-0042-С-01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.03.2020. После доработки 11.05.2020. Принята к публикации 18.05.2020.

Влияние диеты с повышенным содержанием жира на липидный профиль ооцитов мышей

Е.Ю. Брусенцев¹, Э.А. Чуйко^{1,2}, К.А. Окотруб³, Т.Н. Игонина¹, И.Н. Рожкова¹, Д.С. Рагаева¹, С.В. Раннева^{1,2}, В.А. Напримеров^{1,4}, С.Я. Амстиславский^{1,2} 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт автоматизации и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия


 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Аннотация. Существуют предпосылки того, что у женщин с ожирением возможно снижение качества ооцитов. При этом остается неясным, как связано это изменение с ожирением: опосредованно или напрямую, через изменение содержания и/или состава липидов в ооцитах. Целью настоящей работы было изучение на мышах влияния богатой жирами диеты, применяемой к самкам-донорам, на качественный состав и общее количество липидов в незрелых и созревших *in vivo* ооцитах. Установлено, что диета, богатая липидами, приводит к увеличению массы тела самок мышей по сравнению с контролем ($p < 0.001$; 44.77 ± 1.46 и 35.22 ± 1.57 соответственно), а также уровня холестерина ($p < 0.05$; 2.06 ± 0.10 и 1.78 ± 0.10 соответственно) и триглицеридов ($p < 0.05$; 2.13 ± 0.23 и 1.49 ± 0.21 соответственно) в крови этих животных. Эта диета не повлияла на степень ненасыщенности внутриклеточных липидов незрелых (0.207 ± 0.004 в эксперименте и 0.206 ± 0.002 в контроле) и зрелых ооцитов (0.212 ± 0.005 в эксперименте и 0.211 ± 0.003 в контроле). При созревании ооцитов *in vivo* наблюдалось возрастание содержания внутриклеточных липидов. В зрелых ооцитах количество липидов было больше в экспериментальной группе по сравнению с контролем ($p < 0.01$; 8.15 ± 0.37 и 5.83 ± 0.14 соответственно). Выявлено увеличение количества внутриклеточных липидов при созревании ооцитов как после стандартной диеты ($p < 0.05$; 4.72 ± 0.48 и 5.83 ± 0.14 соответственно), так и после диеты, богатой жирами ($p < 0.001$; 3.45 ± 0.62 и 8.15 ± 0.37 соответственно). Таким образом, при созревании ооцитов мышей *in vivo* возрастает содержание внутриклеточных липидов, богатая жирами диета приводит к повышенному содержанию липидов в зрелых ооцитах.

Ключевые слова: мыши; диета; ооциты; внутриклеточные липиды; нильский красный; конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; спектроскопия комбинационного рассеяния света.

Для цитирования: Брусенцев Е.Ю., Чуйко Э.А., Окотруб К.А., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Раннева С.В., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Влияние диеты с повышенным содержанием жира на липидный профиль ооцитов мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):533-538. DOI 10.18699/VJ20.645

Effects of a high-fat diet on the lipid profile of oocytes in mice


Е.Ю. Brusentsev¹, Е.А. Chuyko^{1,2}, К.А. Okotrub³, Т.Н. Igonina¹, И.Н. Rozhkova¹, Д.С. Ragaeva¹, С.В. Ranneva^{1,2}, В.А. Naprimerov^{1,4}, С.Я. Amstislavsky^{1,2} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Automation and Electrometry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Abstract. There are evidences that obese women exhibit a detrimental oocyte quality. However, it remains unclear how this change is associated with obesity, indirectly – or directly through a change in the content and/or composition of lipids in oocytes. The aim of this work was to study effects of a high-fat diet applied to female donor mice on the amount and qualitative composition of lipids of immature and *in vivo* matured oocytes. A high-fat diet caused larger body weight in female mice compared with the control ($p < 0.001$; 44.77 ± 1.46 and 35.22 ± 1.57 , respectively), and increased the blood levels of cholesterol ($p < 0.05$; 2.06 ± 0.10 and 1.78 ± 0.10 , respectively) and triglycerides ($p < 0.05$; 2.13 ± 0.23 and 1.49 ± 0.21 , respectively). At the same time, this diet does not affect the level of unsaturation of lipids in immature (0.207 ± 0.004 in the experiment and 0.206 ± 0.002 in the control) and matured oocytes (0.212 ± 0.005 in the experiment and 0.211 ± 0.003 in the control). Total lipid content increased during *in vivo* maturation of mouse oocytes. The amount of lipids was greater in mature oocytes in the experimental group compared to the control ($p < 0.01$; 8.15 ± 0.37 and 5.83 ± 0.14 , respectively). An increase in intracellular lipid amount during oocyte maturation was revealed both after a standard diet ($p < 0.05$; 4.72 ± 0.48 and 5.83 ± 0.14 , respectively) and after a

fat-rich diet ($p < 0.001$; 3.45 ± 0.62 and 8.15 ± 0.37 , respectively). Thus, during *in vivo* oocyte maturation in mice the content of intracellular lipids enhanced, the high-fat diet aggravated this dynamics of lipid increase during *in vivo* maturation of oocytes.

Key words: mice; diet; oocytes; intracellular lipids; Nile Red; confocal laser scanning microscopy; Raman spectroscopy.

For citation: Brusentsev E.Yu., Chuyko E.A., Okotrub K.A., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Ragaeva D.S., Ranneva S.V., Naprimerov V.A., Amstislavsky S.Ya. Effects of a high-fat diet on the lipid profile of oocytes in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):533-538. DOI 10.18699/VJ20.645 (in Russian)

Введение

Ооцит и клетки кумулюса, составляющие кумулюс-ооцитный комплекс (КОК), содержат липидные гранулы (ЛГ), которые связаны с другими органеллами, участвующими в клеточном метаболизме (Kruip et al., 1983; Dunning et al., 2014; Ellenrieder et al., 2016). Предыдущие исследования, проведенные при помощи световой и электронной микроскопии, выявили связь между эндоплазматическим ретикуломом, митохондриями и ЛГ в ооцитах крупного рогатого скота; эти кластеры назвали метаболическими единицами (Kruip et al., 1983). Тесная связь между этими органеллами способствует клеточному метаболизму, в частности β -окислению липидов (Ellenrieder et al., 2016). Цитоплазматические ЛГ являются хранилищами жиров, которые могут быть использованы в качестве энергетического субстрата (Thiam et al., 2013). Гидрофобное содержимое этих гранул, состоящее в основном из триацилглицеридов и сложных эфиров стеролов, таких как холестерин, окружено монослоем фосфолипидов (Walther, Farese, 2009). В настоящее время ЛГ считают активными внутриклеточными структурами, играющими важную роль в клеточном гомеостазе (Walther, Farese, 2009; Welte, Gould, 2017). Кроме того, недавние исследования показали их протекторную, а также регуляторную функцию, в частности их участие в белковом метаболизме и работе ядра (Welte, Gould, 2017).

Влияние ожирения на качество ооцитов – важный медицинский аспект. Избыточная масса тела отрицательно сказывается на репродуктивном здоровье людей, о чем свидетельствуют клинические данные, полученные при применении вспомогательных репродуктивных технологий – ВРТ (Robker, 2008; Souter et al., 2011; Dickey et al., 2012). Установлено, что у женщин с ожирением наблюдается снижение качества ооцитов в циклах ВРТ по сравнению с имевшими нормальный вес тела (Robker, 2008). Между тем не ясно, связано ли это с избыточной массой тела пациенток либо с изменением содержания и состава липидов в ооцитах (Pantasri et al., 2015).

Эффект обогащенной липидами диеты на развитие ооцитов подтверждается и в экспериментах на различных видах животных (Zeron et al., 2002; Minge et al., 2008; Wu et al., 2010; Dunning et al., 2014). Так, в работе на мышах, в которой самок держали на диете с повышенным содержанием жиров, продемонстрировано, что у особей с вызванным таким питанием ожирением было низкое качество ооцитов, а эмбрионы из них хуже развивались в культуре *in vitro* (Minge et al., 2008). Однако до сих пор остается неизвестным, что именно вызывает эти изменения. Цель нашей работы – изучение на мышах влияния богатой жирами диеты, применяемой к самкам-донорам, на качественный состав и общее количество внутриклеточных липидов незрелых и зрелых ооцитов мышей.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В исследовании для получения незрелых и зрелых ооцитов использовано 56 самок-доноров мышей линии CD1 в возрасте 2.5 мес. (16 в контроле и 40 в экспериментальной группе) и 6 стерильных самцов этой же линии. Животных содержали в клетках с подстилкой из опилок в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия): при комфортной температуре 22–24 °С, свободном доступе к полнорационному сухому гранулированному корму для лабораторных грызунов «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) и очищенной воде, 12:12-часовом цикле дня:ночи. Все эксперименты на животных одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Оценка эффективности диеты. Самок-доноров содержали как на стандартной диете (контроль), так и на специализированной, когда дополнительно к обычному корму животным добавляли свиное сало и семена подсолнечника (экспериментальная группа). Пищевые добавки начинали давать с возраста пяти недель. Откормочный эксперимент длился в течение восьми недель. Для подтверждения эффективности диеты мышей обеих групп взвешивали перед эвтаназией, а также у самок натошак собирали кровь после декапитации, центрифугировали при 3250 об/мин (1000 g) в течение 5 мин, после чего собирали плазму и оценивали уровень холестерина и триглицеридов с использованием наборов Холестерин-Ново (АО «Вектор-Бест», Россия) и Триглицериды-Ново (АО «Вектор-Бест»), как рекомендовано производителем.

Незрелые ооциты получали от 10 самок в контрольной и 30 – в экспериментальной группе. Животных на стадии проэструса подвергали эвтаназии при помощи декапитации. Яичники извлекали и измельчали в среде Flushing Solution (FertiPro, Бельгия). Выделенные КОК оценивали под стереомикроскопом Leica S8 APO с увеличением $\times 80$ (Leica Microsystems, Германия). Для исследования брали только те КОК, в которых было не менее пяти слоев кумулюсных клеток, плотно прилегающих к прозрачной оболочке ооцита (Hillier et al., 1985). Если КОК имели существенные дефекты, то их отбраковывали.

Получение стерильных самцов. Стерилизацию самцов проводили путем вазэктомии не менее чем за две недели до начала эксперимента, как было описано ранее (Hogan et al., 1994). Самцов мышей линии CD1 в возрасте шести недель наркотизировали при помощи внутрибрюшинного введения 0.25 мг/кг препарата медетомедина гидрохлорида (Domitor 1 mg/mL, Orion-Corporation, Фин-

ляндия) и через 10 мин – 50 мг/кг препарата золетила (Zoletil, SA, Virbac Sante Animale, Франция). После наркотизации подкожно вводили антибиотик: 0.01 мл амоксициллина тригидрата 150 мг/мл (ОАО «Синтез», Россия). Затем животных помещали на подогреваемый столик, шерсть в зоне операционного поля сбрасывали, а кожу обрабатывали 70 % этиловым спиртом. При помощи хирургических ножниц делали горизонтальный надрез кожных покровов мошонки длиной ~5 мм. Подтягивали эпидидимисы к краю хирургической раны и разворачивали их так, чтобы были видны семенные канатики. Семявыносящие каналы отделяли от сопряженных тканей и пережигали раскаленным пинцетом в двух местах, удаляя участок канала между ними. Эпидидимисы возвращали в первоначальное положение. Затем в рану засыпали 2 мг амоксициллина тригидрата (ОАО «Синтез»). Зашивали надрезы наложением двух швов и обрабатывали их Рауносаном (ООО «Апи-Сан», Россия).

Получение зрелых ооцитов. Для выделения зрелых ооцитов проводили стерильное спаривание с использованием шести вазэктомированных самцов. В эксперименте участвовало 16 самок (6 в контроле и 10 в экспериментальной группе). Зрелые ооциты выделяли через 20–22 ч после стерильного спаривания. С этой целью выполняли эвтаназию самок-доноров при помощи декапитации, извлекали яичники с прилегающими к ним яйцеводами. Органы переносили в питательную среду M2 (Merck, Германия), разрезали ампулярную часть яйцевода и извлекали зрелые ооциты. Для удаления кумулюсных клеток использовали гиалуронидазу (Merck) в концентрации 80 МЕ/мл (Brinster, 1971).

Определение степени ненасыщенности липидов. Методом рамановской спектроскопии (комбинационного рассеяния света – КРС) было выполнено сравнение ненасыщенности липидов в незрелых и зрелых ооцитах. Для исследования изменений в степени ненасыщенности липидов измеряли спектры КРС в диапазоне от 1000 до 3000 см^{-1} . Для каждого ооцита измеряли от 30 до 60 спектров КРС от разных локальных областей клетки. Латеральный и продольный размеры областей, от которых измеряли комбинационное рассеяние света, составляли ~1 и 10 мкм соответственно. Для каждого отдельного набора данных с использованием метода главных компонент выделяли вклад липидов, аналогично подходу, применявшемуся ранее на эмбрионах мыши (Okotrub et al., 2017). Для характеристики ненасыщенности углеводородных цепочек липидов исследовали соотношение интенсивностей пиков КРС, относящихся к валентным колебаниям двойных C=C связей (~1660 см^{-1}) и симметричным валентным колебаниям метиленовых групп (2850 см^{-1}). Ооциты переносили в стеклянный контейнер с лункой, глубиной 300 мкм в капле среды KSOM (Merck), покрывали тонким листом слюды и герметизировали. Измерения осуществляли с использованием лабораторной экспериментальной установки, состоящей из модифицированного микроскопа (Orthoplan, Leitz, Германия) и решетчатого монохроматора SP2500i (Princeton Instruments, Trenton, NJ, США), оснащенного многоканальным детектором Spec-10:256E/LN (Princeton Instruments). Точность определения абсолютной частоты КРС была более чем 1 см^{-1} ; спектральное разрешение

составляло 2.5 см^{-1} . Для возбуждения КРС использовали излучение твердотельного лазера (Excelsior, Spectra Physics, США) с длиной волны 532.1 нм.

Оценка общего количества липидов ооцитов. Оценка изменения внутриклеточного состава липидов в ооцитах мышей после содержания самок-доноров на двух диетах проведена при помощи окрашивания флуорохромом Nile Red красным – Nile Red Staining Kit (Merck) с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (КЛСМ). Метод подробно описан ранее (Romek et al., 2011), при этом нами внесены изменения. Ооциты перед исследованием были зафиксированы в 4 % параформальдегиде (Merck) на фосфатном буфере – PBS (Merck) в течение двух часов, затем трижды отмыты в 50 мкл PBS с содержанием одного мг/мл поливинилпирролидона (Merck) по 5 мин каждая. Стоковый раствор флуорохрома Nile Red (1 мг/мл) был приготовлен посредством разведения красителя в диметилсульфоксиде. Перед окрашиванием стоковый раствор разводили до рабочей концентрации 10 мкг/мл. Ооциты инкубировали в рабочем растворе в течение трех часов при 37 °С, чтобы добиться максимальной интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов, как описано ранее (Genicot et al., 2005). Материал в капле PBS монтировали на предметные стекла.

Изображения образцов получали с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия) с применением программного обеспечения Zen 2012 (Black Edition) (Zeiss). Все образцы фотографировали объективом Plan-Apochromat ×20 (0.8 NA), возбуждение флуорохрома проводили на длине волны 488 нм аргонным газовым лазером на мощности 0.1 % × 30 мВт ≈ 30 мкВт, главное дихроичное зеркало было выбрано на 488 нм. Разрешение детектора 512 × 512 пикселей, с задержкой на каждый пиксель в 3.15 мкс. Для детекции сигнала использовали GaAsP детектор (Gallium Arsenic Phosphorus). Полная трехмерная визуализация ооцитов была выполнена с помощью опции Z-stack, установленной на толщину оптического среза в 2.5 мкм. Спектры производили на длинах волн 494–687 нм, с шагом в 9 нм. Число оптических срезов – 40, общая толщина всех оптических срезов – 100 мкм. Все изображения были созданы детектированием в режиме счета фотонов. Итоговое изображение представляет из себя трехмерную матрицу, где для каждого элемента имеется информация о числе детектированных фотонов (абсолютное число фотонов – а. ч. ф.). Для вычитания фона делали три изображения на стекле, где отсутствует материал, при тех же условиях, что были описаны выше, с последующим вычислением среднего. Все оптические срезы (как образца, так и фона) суммировали с применением скрипта для ImageJ, чтобы сформировать итоговое изображение. Для вычитания фоновой флуоресценции использовали Python 3.8 с библиотекой OpenCV.

Статистический анализ. Данные анализировали посредством языка программирования R 3.6.2 и с графической оболочкой RStudio Desktop 1.1.463. Анализ на нормальность распределения данных проводили критерием согласия Андерсона–Дарлинга, с учетом коэффициентов эксцесса и асимметрии. Корреляцию между массой тела

и уровнем холестерина в крови самок-доноров ооцитов, а также между массой тела самок-доноров ооцитов и абсолютным числом фотонов оценивали с использованием ранговой корреляции Стьюдента. Значения представлены как среднее \pm SEM. Различия средних между группами оценивали *t*-критерием Стьюдента, а для неравных дисперсий – критерием Кохрана–Кокса. Уровень значимости принимали при $p < 0.05$.

Результаты

Данные по влиянию диеты на массу животных, уровень холестерина и триглицеридов в крови представлены в табл. 1. Установлено, что диета с высоким содержанием липидов статистически достоверно ($p < 0.001$) приводит к увеличению веса тела животных по сравнению с контролем. Диета с повышенным содержанием липидов достоверно ($p < 0.05$) вызывала повышение уровня холестерина и триглицеридов в крови по сравнению с контрольной группой. Имелась достоверная корреляция ($r = 0.68$; $p < 0.01$) между массой тела самок-доноров и уровнем холестерина в их крови.

Результаты по влиянию диеты на степень ненасыщенности липидов в незрелых и зрелых ооцитах приведены в табл. 2. В ходе исследований не выявлено достоверных различий по степени ненасыщенности липидов в незрелых и зрелых ооцитах после содержания самок-доноров на двух разных диетах.

Влияние диеты на содержание липидов в незрелых и зрелых ооцитах продемонстрировано на рис. 1 и 2. В результате проведенной работы не выявлено различий по количеству липидов в незрелых ооцитах после содержания самок-доноров на двух разных диетах. Но в зрелых ооцитах количество липидов было больше ($p < 0.01$) в группе мышей, бывших на диете, богатой жирами, по сравнению с контролем (8.15 ± 0.37 и 5.83 ± 0.14 млн фотонов соответственно). Кроме того, установлено возрастание количества внутриклеточных липидов у зрелых ооцитов, по сравнению с незрелыми, как у самок, находящихся на стандартной диете (5.83 ± 0.14 и 4.72 ± 0.48 млн фотонов соответственно, $p < 0.05$), так и у самок, содержащихся на диете, богатой жирами (8.15 ± 0.37 и 3.45 ± 0.62 млн фотонов соответственно, $p < 0.001$). Имелась достоверная корреляция ($r = 0.91$, $p < 0.001$) между массой тела самок-доноров и количеством внутриклеточных липидов в ооцитах.

Таблица 1. Влияние диеты на массу тела, концентрацию холестерина и триглицеридов в крови мышей линии CD1

Параметр	Группа (число животных)	
	Контроль (n = 16)	Жирная диета (n = 40)
Масса тела, г	35.22 \pm 1.57	44.77 \pm 1.46***
Концентрация холестерина, мМ	1.78 \pm 0.10	2.06 \pm 0.10*
Концентрация триглицеридов, мМ	1.49 \pm 0.21	2.13 \pm 0.23*

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Степень ненасыщенности внутриклеточных липидов в незрелых и зрелых ооцитах мышей линии CD1 в зависимости от диеты

Ооциты	Группа (число ооцитов)	
	Контроль	Жирная диета
Незрелые (n)	0.206 \pm 0.002 (n = 3)	0.207 \pm 0.004 (n = 3)
Зрелые (n)	0.211 \pm 0.003 (n = 6)	0.212 \pm 0.005 (n = 10)

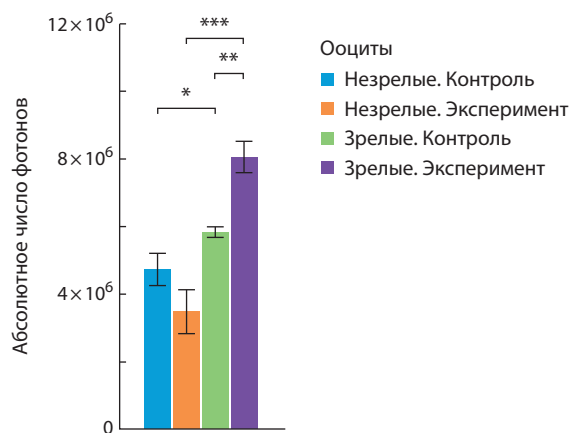


Рис. 1. Общая интенсивность флуоресценции липидов незрелых и зрелых ооцитов мышей линии CD1.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

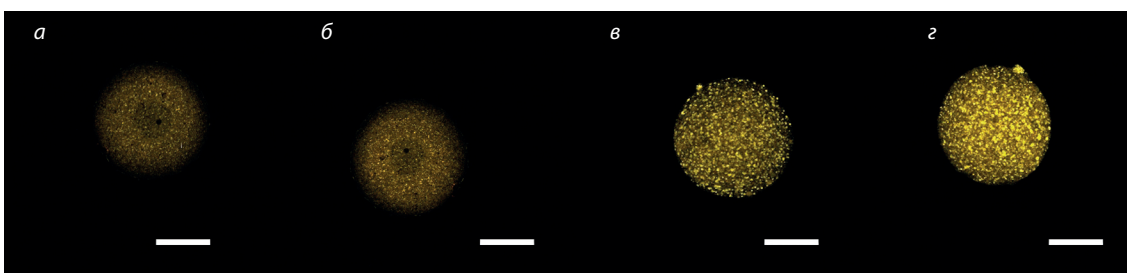


Рис. 2. Незрелые и зрелые ооциты мышей линии CD1 после окрашивания нильским красным с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией.

Незрелые ооциты: а – контрольная группа; б – экспериментальная; зрелые ооциты: в – контрольная группа; з – экспериментальная. Цвет соответствует длине волны свечения внутриклеточных липидов. Шкала 30 мкм.

Обсуждение

В ходе проведенных экспериментов установлено, что диета с повышенным содержанием липидов приводит к увеличению массы тела мышей, а также повышению уровня холестерина и триглицеридов в их крови, что соответствует данным других исследователей (Ma et al., 2012; Li et al., 2018). В настоящее время есть несколько работ, в которых ученые пытаются оценить липидный профиль ооцитов *in vivo* после влияния диеты (Zeron et al., 2002; Wu et al., 2010; Li et al., 2018). Результаты этих работ достаточно противоречивы.

Используемая нами диета не повлияла на качественный состав липидов в незрелых и зрелых ооцитах мышей от самок-доноров с ожирением. Эти данные могут быть обусловлены тем, что диета была сбалансирована по насыщенным и ненасыщенным жирным кислотам, поэтому никаких изменений качественного состава липидов в ооцитах не происходило, как описано ранее в экспериментах со сходным дизайном (Dunning et al., 2014; Amstislavsky et al., 2019). Более того, в работе, проведенной на овцах (Zeron et al., 2002), отмечено, что диета, богатая полиненасыщенными жирными кислотами (с добавлением рыбьего жира), влияла на изменение состава внутриклеточных липидов в клетках кумулюса, но не в незрелых ооцитах, что может быть связано с высоким содержанием в добавке ненасыщенных жирных кислот.

В нашем исследовании обнаружено, что при содержании самок-доноров на диете, богатой жирами, липидов в зрелых ооцитах становилось больше, чем в контроле, т.е. при применении стандартной диеты. Между тем в незрелых ооцитах не было различий по общему количеству липидов при содержании мышей на разных диетах. Некоторые исследования на мышах отмечают возрастание количества липидов в незрелых ооцитах при содержании мышей на жирной диете (Wu et al., 2010). Однако в недавно опубликованной работе (Li et al., 2018) продемонстрировано возрастание числа крупных липидных гранул в клетках кумулюса, но не в самих незрелых ооцитах. Возможно, наблюдаемое в нашем эксперименте отсутствие повышения общего уровня липидов в незрелых ооцитах после специальной обогащенной жирами диеты связано с тем, что эти липиды уходят в другие клетки, в частности кумулюса, в то время как на последующей стадии развития происходит накопление липидов непосредственно в ооцитах.

Противоречия в выводах описанных выше работ, выполненных разными группами исследователей, могут быть связаны с различиями между линиями, а также с тем, что употреблялись корма, отличающиеся по своему составу. В целом можно сказать, что, в отличие от многочисленных работ, в которых используется модель изменения качественного и количественного состава липидов в репродуктивных клетках, культивируемых *in vitro* (Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019), аналогичные эксперименты в условиях *in vivo* сопряжены с воздействием большого числа различных факторов, что, по-видимому, и приводит к разнородности результатов.

Обнаружена динамика возрастания количества липидов от незрелых ооцитов к зрелым, наблюдавшаяся при обеих диетах. Но более выраженной эта зависимость была при

диете с повышенным содержанием жира. Действительно, жирные кислоты, имеющиеся в крови матери, ответственны за липидный профиль фолликулярной жидкости, из которой они поступают в ооцит через окружающую его клетки кумулюса (Valckx et al., 2014). Ранее с помощью микро- и спектроскопических методов были исследованы распределение, локализация и размер липидных гранул в процессе созревания ооцитов мышей (Dunning et al., 2014; Bradley et al., 2016). В частности, при использовании когерентного антистоксового комбинационного рассеяния выявлено возрастание размера и числа агрегированных ЛГ при созревании ооцитов мышей как *in vivo*, так и *in vitro* (Bradley et al., 2016). Сходная закономерность отмечена в работе на крупном рогатом скоте: полуколичественным методом с применением КЛСМ и флуорохрома BODIPY продемонстрировано достоверное возрастание внутриклеточных липидов при созревании ооцитов *in vitro*, хотя при созревании ооцитов *in vivo* наблюдалась лишь тенденция к такому возрастанию (Collado et al., 2017).

Однако в работе на свиньях показано снижение количества внутриклеточных липидов по мере развития ооцитов *in vivo*: на стадии герминального везикула содержание липидов было на 21 % выше, чем у созревших до стадии метафазы второго деления мейоза (Romek et al., 2011). Таким образом, имеются и видовые отличия в изменении содержания внутриклеточных липидов в ходе созревания ооцитов (Romek et al., 2011; Dunning et al., 2014; Bradley et al., 2016; Collado et al., 2017). В частности, у свиней снижение количества жиров в ходе созревания ооцитов, вероятней всего, связано с их активным расщеплением, так как у этого вида животных липиды могут выступать в качестве основного энергетического субстрата (Bradley, Swann, 2019).

Заключение

Результаты нашего исследования показывают, что увеличение содержания липидов по мере созревания *in vivo* ооцитов мышей может быть усилено при содержании самок-доноров на диете, богатой жиром. Есть вероятность того, что липиды в большом количестве поступают в ооцит мыши из клеток кумулюса при его созревании (Li et al., 2018). Большее количество липидов в зрелых ооцитах, полученных от самок-доноров, содержащихся на диете, богатой жирами, по сравнению с контролем, по всей видимости, может быть связано с накоплением энергетического субстрата и особенностями метаболизма ожиревших особей, например неспособностью клетки быстро утилизировать поступающие жиры. Имеются примеры того, что фактический состав жирных кислот в ЛГ ооцитов зависит от рациона матери, который определяет жирные кислоты, доступные для ооцита во время развития яйцников (Bradley, Swann, 2019).

Таким образом, диета, богатая липидами, приводит к увеличению массы тела самок мышей, а также повышает уровень холестерина и триглицеридов в крови этих животных. Содержание самок-доноров на такой диете не влияет на качественный состав липидов незрелых и зрелых ооцитов. При этом наблюдается повышение общего содержания липидов при созревании ооцитов мышей *in vivo*. Диета, обогащенная жирами, приводит к большему накоплению липидов в зрелых ооцитах.

Список литературы / References

- Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Амстиславский С.Я. Роль липидных гранул в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих. *Онтогенез*. 2019;50(5):297-305. DOI 10.1134/S0475145019050100.
- [Brusentsev E.Yu., Mokrousova V.I., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Amstislavsky S.Ya. Role of lipid droplets in the development of oocytes and preimplantation embryos in mammals. *Rus. J. Devel. Biol.* 2019;50(5):230-237. <https://doi.org/10.1134/S1062360419050102>.]
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizoli P. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review. *Biopreserv. Biobank*. 2019;17(1):76-83. DOI 10.1089/bio.2018.0039.
- Bradley J., Pope I., Masia F., Sanusi R., Langbein W., Swann K., Borri P. Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy. *Development*. 2016;143(12):2238-2247. DOI 10.1242/dev.129908.
- Bradley J., Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 2019;63:93-103. DOI 10.1387/ijdb.180355ks.
- Brinster R.L. Measuring embryonic enzyme activity. In: Daniel J.C. Jr. (Ed.). *Method in Mammalian Embryology*. San Francisco: Freeman, 1971;215-227.
- Collado M., da Silveira J.C., Sangalli J.R., Andrade G.M., Sousa L.R.D.S., Silva L.A., Meirelles F.V., Perecin F. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Sci. Rep.* 2017;7(1):2645. DOI 10.1038/s41598-017-02467-9.
- Dickey R.P., Xiong X., Gee R.E., Pridjian G. Effect of maternal height and weight on risk of preterm birth in singleton and twin births resulting from *in vitro* fertilization: a retrospective cohort study using the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System. *Fertil. Steril.* 2012;97(2):349-354. DOI 10.1016/j.fertnstert.2011.11.017.
- Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*. 2014;148(1):15-27. DOI 10.1530/REP-13-0251.
- Ellenrieder L., Opalinski L., Becker L., Kruger V., Mirus O., Straub S.P., Ebell K., Flinner N., Stiller S.B., Guiard B., Meisinger C., Wiedemann N., Schleiff E., Wagner R., Pfanner N., Becker T. Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10. *Nat. Commun.* 2016;7:13021. DOI 10.1038/ncomms13021.
- Genicot G., Leroy J.L.M.R., Van Soom A., Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*. 2005;63(4):1181-1194. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.06.006.
- Hillier S.G., Siddiquey A.K., Winston R.M. Fertilization *in vitro* of cumulus-enclosed mouse oocytes: effect of timing of the ovulatory hCG injection. *Int. J. Fertil.* 1985;30(2):34-38.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1994.
- Kruip T.A., Cran D.G., Van Beneden T.H., Dieleman S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 1983;8(1):29-47. DOI 10.1002/mrd.1120080105.
- Li J., Wang S., Wang B., Wei H., Liu X., Hao J., Duan Y., Hua J., Zheng X., Feng X., Yan X. High-fat-diet impaired mitochondrial function of cumulus cells but improved the efficiency of parthenogenetic embryonic quality in mice. *Anim. Cells Syst. (Seoul)*. 2018;22(4):243-252. DOI 10.1080/19768354.2018.1497707.
- Ma W., Yang X., Liang X. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: a prospective study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012;10:68. DOI 10.1186/1477-7827-10-68.
- Minge C.E., Bennett B.D., Norman R.J., Robker R.L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology*. 2008;149(5):2646-2656. DOI 10.1210/en.2007-1570.
- Okotrub K.A., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Raman spectroscopy reveals the lipid phase transition in preimplantation mouse embryos during freezing. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017;635:37-43. DOI 10.1016/j.abb.2017.10.001.
- Pantazis T., Wu L.L., Hull M.L., Sullivan T.R., Barry M., Norman R.J., Robker R.L. Distinct localisation of lipids in the ovarian follicular environment. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015;27(4):593-601. DOI 10.1071/RD14321.
- Robker R.L. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*. 2008;15(2):115-121. DOI 10.1016/j.pathophys.2008.04.004.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*. 2011;75(1):42-54. DOI 10.1016/j.theriogenology.2010.06.040.
- Souter I., Baltagi L.M., Kuleta D., Meeker J.D., Petrozza J.C. Women, weight, and fertility: the effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. *Fertil. Steril.* 2011;95(3):1042-1047. DOI 10.1016/j.fertnstert.2010.11.062.
- Thiam A.R., Farese R.V. Jr., Walther T.C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(12):775. DOI 10.1038/nrm3699.
- Valckx S.D., Arias-Alvarez M., De Pauw I., Fievez V., Vlaeminck B., Fransen E., Bols P.E., Leroy J.L. Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014;12:13. DOI 10.1186/1477-7827-12-13.
- Walther T.C., Farese R.V. The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1791(6):459-466. DOI 10.1016/j.bbali.2008.10.009.
- Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017;1862(10):1260-1272. DOI 10.1016/j.bbali.2017.07.006.
- Wu L.L., Dunning K.R., Yang X., Russell D.L., Lane M., Norman R.J., Robker R.L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 2010;151(11):5438-5445. DOI 10.1210/en.2010-0551.
- Zeron Y., Sklan D., Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2002;61:271-278. DOI 10.1002/mrd.1156.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, № 19-016-00025, а также бюджетных проектов ИЦиГ СО РАН, № 0324-2019-0041-C-01 и ИАиЭ СО РАН, № ААААА17-117052410033-9. Эксперименты по флуоресцентной микроскопии осуществлены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>). Эксперименты по измерению КРС проведены с использованием оборудования ЦКП «Высокоразрешающая спектроскопия газов и конденсированных сред» (ИАиЭ СО РАН, Новосибирск).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.02.2020. После доработки 22.05.2020. Принята к публикации 22.05.2020.

Генетические маркеры о распространении древних морских охотников в Приохотье

Б.А. Малярчук

Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

✉ e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Аннотация. Представлен обзор сведений о генетическом полиморфизме современного и древнего населения Севера Азии и Америки с целью реконструкции истории миграций древних морских охотников в Охотоморском регионе. Проанализированы данные о полиморфизме митохондриальной ДНК и распространенности «арктической» мутации – варианта rs80356779-A гена *CPT1A*. Известно, что «арктический» вариант гена *CPT1A* с высокой частотой распространен в современных популяциях эскимосов, чукчей, коряков и других народов Охотоморского региона, хозяйственный уклад которых связан с морским зверобойным промыслом. Согласно палеогеномным данным, самые ранние находки «арктического» варианта гена *CPT1A* обнаружены у гренландских и канадских палеоэскимосов (4 тыс. лет назад), представителей токаревской культуры Северного Приохотья (3 тыс. лет назад) и носителей культуры позднего дзёмона острова Хоккайдо (3.5–3.8 тыс. лет назад). Результаты анализа позволили выявить несколько миграционных событий, связанных с распространением морских охотников в Охотоморском регионе. Самая поздняя миграция, оставившая следы у носителей культуры эпи-дзёмон (2.0–2.5 тыс. лет назад), привнесла с севера Приохотья на Хоккайдо и соседние территории Приамурья митохондриальную гаплогруппу G1b и «арктический» вариант гена *CPT1A*. Следы более ранней миграции, также привнесшей «арктическую» мутацию, зарегистрированы у населения позднего дзёмона Хоккайдо (3.5–3.8 тыс. лет назад). Проведен филогенетический анализ митохондриальных геномов, относящихся к редкой гаплогруппе C1a, встречающейся у населения Дальнего Востока и Японии, но в филогенетическом отношении родственной C1-гаплогруппам американских индейцев. Результаты показали, что дивергенция митохондриальных линий в пределах гаплогруппы C1a происходила в диапазоне от 7.9 до 6.6 тыс. лет назад, а возраст японской ветви гаплогруппы C1a составляет ~5.2 тыс. лет. Пока неизвестно, связана ли эта миграция с распространением «арктического» варианта гена *CPT1A* или же присутствие C1a-гаплотипов у населения островов Японии маркирует собой еще один, более ранний, эпизод миграционной истории, связывающей население северо-западной Пацифики и Северной Америки. Ключевые слова: митохондриальная ДНК; ген *CPT1A*; популяции человека; палеогеномика; культура морских охотников; Охотоморский регион.

Для цитирования: Малярчук Б.А. Генетические маркеры о распространении древних морских охотников в Приохотье. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):539-544. DOI 10.18699/VJ20.646

Genetic markers on the distribution of ancient marine hunters in Priokhotye

B.A. Malyarchuk

Institute of Biological Problems of the North of the Far-East Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

✉ e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Abstract. This is a review of studies on the genetic polymorphism of modern and ancient populations of the north of Asia and America, with the aim of reconstructing the history of migrations of ancient marine hunters in the Okhotsk Sea region. The data on mitochondrial DNA polymorphism and the “Arctic” mutation distribution – the rs80356779-A variant of the *CPT1A* gene – were analyzed. It is known that the “Arctic” variant of the *CPT1A* gene is widely distributed in modern populations of the Eskimos, Chukchis, Koryaks, and other peoples of the Okhotsk Sea region, whose economic structure is associated with marine hunting. According to paleogenomic data, the earliest cases of the “Arctic” variant of the *CPT1A* gene were found in the Greenland and Canadian Paleoeskimos (4 thousand years ago), among representatives of the Tokarev culture of the Northern Priokhotye (3 thousand years ago), and among the bearers of the culture of the late Jomon of Hokkaido (3.5–3.8 thousand years ago). The results of the analysis revealed several migration events associated with the spread of marine hunters in the Okhotsk Sea region. The latest migration, which left traces on bearers of the Epi-Jomon culture (2.0–2.5 thousand years ago), introduced the mitochondrial haplogroup G1b and the “Arctic” variant of the *CPT1A* gene from the north of Priokhotye to Hokkaido and neighboring territories of the Amur Region. Traces of earlier migration, which also brought the “Arctic” mutation, were recorded in the Hokkaido population of the late Jomon period (3.5–3.8 thousand years ago). A phylogenetic analysis of mitochondrial genomes belonging to the rare haplogroup C1a, found in populations of the Far East and Japan, but phylogenetically related to the C1-haplogroups of the Amerindians, was carried out. The results of the analysis showed that the divergence of

mitochondrial lineages within the C1a haplogroup occurred in the range from 7.9 to 6.6 thousand years ago, and the age of the Japanese branch of the C1a haplogroup is approximately 5.2 thousand years. It is not yet known whether this migration is associated with the spread of the "Arctic" variant of the *CPT1A* gene or the presence of C1a haplotypes in the population of the Japanese islands marks another, earlier, episode of the migration history linking the populations of Northwest Pacific and North America.

Key words: mitochondrial DNA; *CPT1A* gene; human populations; paleogenomics; culture of marine hunters; Okhotsk Sea region.

For citation: Malyarchuk B.A. Genetic markers on the distribution of ancient marine hunters in Priokhotye. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):539-544. DOI 10.18699/VJ20.646. (in Russian)

Введение

Согласно результатам археологических и палеогеномных исследований, 4,5–2,8 тысячелетия назад в обширном регионе – от Чукотки и Аляски и до Гренландии – существовала общность племен (палеоэскимосов), объединявшая искусных охотников на морских млекопитающих (Rasmussen et al., 2010; Flegontov et al., 2019). Предполагается, что формирование высокоспециализированной культуры морских зверобоев проходило главным образом на американском континенте и связано с развитием «арктической традиции малых орудий», а на Чукотке палеоэскимосские памятники возрастом от 3,5 до 2,9 тыс. лет обнаружены в ограниченном числе мест – на острове Врангеля и поселении Уненен (Гребенюк и др., 2019). По палеогеномным данным, первая миграция предков палеоэскимосов из Сибири в Америку произошла ~5,5 тыс. лет назад (Rasmussen et al., 2010). В генетическом отношении палеоэскимосы ближе всего к современным чукотско-камчатским народам (корякам, чукчам, ительменам), а не американским индейцам (Flegontov et al., 2019). Результатом другой миграции из Сибири в Америку (~4 тыс. лет назад) стало появление собственно современных эскимосов (неоэскимосов) севера Америки, Гренландии и Чукотки (Achilli et al., 2013). Неоэскимосы формировались на палеоэскимосской основе, но, несмотря на объединяющую носителей этих культур традицию морского зверобойного промысла, в генетическом отношении они различались (Rasmussen et al., 2010; Raghavan et al., 2014; Flegontov et al., 2019; Sikora et al., 2019).

Установлены также две волны обратных миграций из Америки на крайний Северо-Восток Азии. Одна из них связана с миграцией палеоэско-алеутских групп ~3,5 тыс. лет назад, а другая – с миграциями неоэскимосов ~2,5 тыс. лет назад (Гребенюк и др., 2019; Flegontov et al., 2019; Grugni et al., 2019; Sikora et al., 2019). В результате первой из указанных обратных миграций на Чукотке возникла палеоэскимосская традиция, а в Северном Приохотье – токаревская культура (Гребенюк и др., 2019). Результатом второй обратной миграции стало развитие неоэскимосских культур в Берингоморье (Raghavan et al., 2014; Flegontov et al., 2019).

Генетические маркеры древних морских охотников

Генетическая реконструкция событий, произошедших на крайнем Севере Азии и Америки, стала возможной благодаря исследованиям распределения вариантов митохондриальной ДНК (мтДНК) и Y-хромосомы, наследуемых по материнской и отцовской линиям соответствен-

но, у современного и древнего населения этого региона. Исследования полиморфизма мтДНК показали, что только несколько митохондриальных гаплогрупп объединяют генетически популяции крайнего Севера Америки (эскимосов) и Северо-Востока Азии (эскимосов, чукчей и коряков) – это гаплогруппы A2a, A2b, D2a и D4b1a2a1a (Derenko et al., 2007; Tamm et al., 2007; Dryomov et al., 2015). Гаплогруппа D2a маркирует собой предков палеоэскимосов, поскольку она характерна для представителей палеоэскимосских культур Саккак и Дорсет, а также токаревской культуры Северного Приохотья, а остальные гаплогруппы связаны уже с относительно недавней неоэскимосской экспансией (Raghavan et al., 2014; Flegontov et al., 2019; Sikora et al., 2019). Аналогично по распределению вариантов Y-хромосомы только гаплогруппа Q-B143 маркирует древний палеоэско-алеутский компонент, отмеченный также у современных коряков, чукчей и юкагиров (Rasmussen et al., 2010; Malyarchuk et al., 2011; Karmin et al., 2015; Grugni et al., 2019). Между тем присутствие мужской гаплогруппы Q-B34 у азиатских эскимосов и коряков связано с обратной миграцией, приведшей к появлению неоэскимосских культур на Чукотке (Grugni et al., 2019).

Из аутосомных генетических вариантов наиболее интересна «арктическая» мутация гена *CPT1A*, кодирующего карнитин пальмитоилтрансферазу типа IA – один из ключевых ферментов транспорта жирных кислот в митохондрии. В результате нуклеотидной замены G→A в локусе rs80356779 гена *CPT1A* образуется аминокислотная замена пролина на лейцин в позиции 479 фермента *CPT1A* (замена P479L), которая относится к числу патологических, поскольку приводит к понижению ферментативной активности *CPT1A* (Greenberg et al., 2009). Проведенные исследования установили, что «арктическая» мутация rs80356779-A с высокой частотой распространена только на крайнем Севере Азии и Америки (Rajakumar et al., 2009; Lemas et al., 2012; Clemente et al., 2014; Мальярчук и др., 2016). Ее частота составила более 70 % у американских и гренландских эскимосов, 66 – у коряков, 56 – у чукчей и 30 % – у охотских эвенов (Мальярчук и др., 2016). Результаты филогенетического анализа протяженных участков гена *CPT1A* продемонстрировали однократное возникновение мутации rs80356779-A у эскимосов, чукчей и коряков (Clemente et al., 2014), а ее появление у эвенов и эвенков связано не с независимым происхождением этого варианта полиморфизма, а с межэтническими контактами (Мальярчук и др., 2016).

Обнаружено, что поддержанию высокой частоты «арктического» варианта гена *CPT1A* у эскимосов, чукчей и

коряков способствовал отбор, связанный, в первую очередь, с адаптацией к традиционной диете морских зверобоев, основанной на потреблении жира и мяса ластоногих и китов (Clemente et al., 2014). По всей видимости, в ответ на высокий уровень кетогенеза, возникающий при постоянном потреблении жирной пищи, у морских охотников произошли некоторые изменения метаболизма, например у них отпала необходимость в высокой активности ферментов метаболизма полиненасыщенных жирных кислот, которыми богаты продукты морского зверобойного промысла. Аминокислотная замена R479L как раз приводит к снижению каталитической активности фермента CPT1A (Greenberg et al., 2009). В результате носители «арктического» варианта в большей степени защищены от кетогенеза, что вполне оправданно при соблюдении традиционной диеты, но в современных условиях (в случае отхода от традиционной диеты) эта аминокислотная замена стала вредной. Так, у эскимосов Северной Америки и Гренландии – носителей «арктической» мутации в гомозиготном состоянии (их частота составляет 40–70 % в различных популяциях) – дефицит фермента CPT1A сопровождается гипокетонной гипогликемией, синдромом внезапной детской смерти, большей предрасположенностью к ожирению, диабету 2-го типа, жировой болезни печени и др. (Greenberg et al., 2009). Вызывает тревогу, таким образом, высокая частота гомозиготного носительства «арктического» варианта (генотип rs80356779-AA) у коренного населения крайнего Северо-Востока Азии (47 % у коряков, 33 у чукчей и 8 % у охотских эвенов), тем более в условиях отсутствия неонатального скрининга «арктической» мутации у новорожденных детей коренного населения.

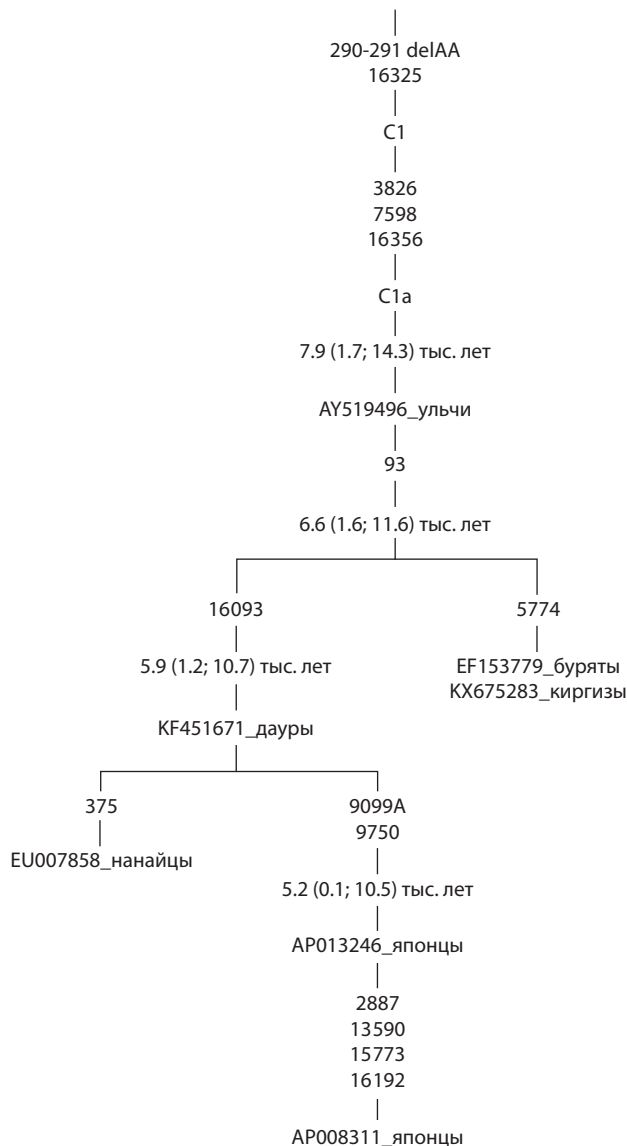
Распространенность «арктического» варианта гена *CPT1A* в современных и древних популяциях

Предполагается, что распространению «арктического» варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Северо-Восточной Азии способствовали миграции морских охотников вдоль побережий северных морей (Малярчук, 2018). Кроме эскимосов, чукчей и коряков, случаи этой мутации мозаично были зарегистрированы у эвенов Якутии (с частотой 1 %) (Малярчук и др., 2016), долганоганасанского населения Таймыра (3 %) (Smolnikova et al., 2015), нанайцев северокитайской провинции Хэйлуцзян (10.3 %) (Li et al., 2018). Поскольку в соседних по отношению к указанным этническим группам популяциях «арктический» вариант гена *CPT1A* отсутствовал, то наиболее вероятным представляется, что случаи нахождения варианта rs80356779-A вдали от Чукотки и Северного Приохотья могут объясняться миграциями древних морских охотников. Согласно археологическим данным, группы морских охотников из Берингоморья проникали на Таймыр ~3 тыс. лет назад (Гурвич, Симченко, 1980). Неоднократно также археологами отмечалась экспансия морских охотников с севера на юг вдоль побережья Охотского моря (Лебединцев, 1990; Vefu, Chard, 2017).

Результаты молекулярного датирования показали, что эволюционный возраст «арктического» варианта гена *CPT1A* составляет от 6 до 23 тыс. лет (Clemente et al.,

2014). Между тем сведения палеогеномных исследований позволяют считать, что «арктическая» мутация появилась у коренного населения Арктического и Охотоморского регионов на протяжении последних четырех тысячелетий. Согласно палеогеномным данным, «арктическая» мутация отсутствовала у представителей позднего палеолита арктической Восточной Сибири (стоянка Яна, 32.5 тыс. лет назад) (Sikora et al., 2019) и Юго-Восточной Сибири (стоянка Мальта, 24 тыс. лет назад) (Raghavan et al., 2014), а также в Северной Америке у представителя культуры Кловис (12.6 тыс. лет назад) (Rasmussen et al., 2014) – девочки из погребения Upward Sun River (Аляска, 11.5 тыс. лет назад) (Moreno-Mayar et al., 2018) и Кенневикского человека (8.3–9.2 тыс. лет назад) (Rasmussen et al., 2015). В мезолите и неолите «арктическая» мутация также не была выявлена по результатам исследований древнего индивидуума из Дуванного Яра (Чукотка, ~9.8 тыс. лет назад), а также древних жителей пещеры Чертовы ворота (Приморье, ~7.5 тыс. лет назад) (Sikora et al., 2019). «Арктический» вариант отсутствовал также у индивидуумов стоянки Усть-Белая (Прибайкалье, 4.5–6.6 тыс. лет назад) (Sikora et al., 2019).

Впервые «арктический» вариант гена *CPT1A* был обнаружен в гетерозиготном состоянии у палеоэскимоса, представляющего культуру Саккак из Гренландии (4 тыс. лет назад), а также с частотой ~50 % у канадских и гренландских представителей палеоэскимосской культуры Дорсет (1.4–1.6 тыс. лет назад) (Rasmussen et al., 2010; Clemente et al., 2014). «Арктический» вариант зарегистрирован также у двух представителей токаревской культуры (Северное Приохотье, 3 тыс. лет назад) и у древних жителей эскимосского поселения Эквен (Чукотка, 1.9–2.1 тыс. лет назад) (Sikora et al., 2019). Недавние исследования продемонстрировали, что и для представителей Южного Приохотья – носителей культуры позднего дзёмона (Хоккайдо, 3.5–3.8 тыс. лет назад) также был характерен «арктический» вариант гена *CPT1A* (Kanzawa-Kiriyama et al., 2019). Авторы предположили, что частота варианта rs80356779-A в популяции позднего дзёмона Хоккайдо была высокой, а ее закреплению способствовал тот факт, что древние жители активно охотились на морских животных (морских котиков, сивучей, морских львов, дельфинов). Возможно, что присутствие «арктического» варианта у представителей позднего дзёмона Хоккайдо связано с воздействием древних северо-восточноазиатских популяций, повлиявших также и на предков других народов Приамурья и Сахалина – например нивхов, у которых также обнаружен «арктический» вариант гена *CPT1A* (Zhou et al., 2019). Между тем результаты исследования полиморфизма мтДНК показали, что для древнего и современного населения Хоккайдо преемственность от древности до современности сохраняется для митохондриальных гаплогрупп N9b, D4h2 и M7a, которые отсутствуют у народов Северо-Востока Азии (коряков, ительменов, чукчей) (Adachi et al., 2018). Общим же звеном для всех указанных популяций служит присутствие гаплогруппы G1b. Эта гаплогруппа мтДНК появилась у представителей эпи-дзёмона на Хоккайдо 2.0–2.5 тыс. лет назад и распространена у современных айнов с частотой около 16 % (Adachi et al., 2011). Ее появление явно связано



Филогенетическое дерево целых митохондриальных геномов, относящихся к гаплогруппе C1a.

Транзиции указаны на ветвях дерева, для трансверсий отмечен результат замены нуклеотидов, делеции обозначены как del. Эволюционный возраст кластеров мтДНК (в тыс. лет) приведен в соответствии со скоростью мутаций в целом митогеноме, равной 1.665×10^{-8} замен на сайт в год (Soares et al., 2009). Для митогеномов показаны номера в GenBank, а также этническая принадлежность. Филогенетическое дерево построено с помощью программы mtPhyl 4.015 <https://sites.google.com/site/mtphyl/home>.

с миграциями с северо-востока, поскольку гаплогруппа G1b установлена как у мезолитического индивидуума из Дуванного Яра (Чукотка, 9,8 тыс. лет назад), так и у токаревых (3 тыс. лет назад) (Sikora et al., 2019). По всей видимости, на Хоккайдо эта гаплогруппа мтДНК попала в связи с распространением токаревской культуры на юг Приохотья.

Экспансия носителей митохондриальной гаплогруппы G1b на рубеже нашей эры в популяциях Охотоморского региона, вероятно, повлекла за собой и распространение «арктического» варианта гена *CPT1A*. Однако поскольку гаплогруппа G1b не обнаружена на Хоккайдо в бо-

лее раннее время (т. е. 3,5–3,8 тыс. лет назад), то вполне возможно, что источник «арктического» варианта гена *CPT1A* у них мог быть связан с другой, более ранней, миграцией. Анализ данных о полиморфизме мтДНК у населения северной части Восточной Азии показывает, что в литературе имеются сведения о присутствии в восточноазиатских популяциях очень редкой митохондриальной гаплогруппы C1a, которая в филогенетическом смысле является сестринской ветвью по отношению к распространенным у индейцев Америки гаплогруппам C1b, C1c и C1d. Гаплогруппа C1a обнаружена у японцев (0,5 %) (Maruyama et al., 2003), ульчей (0,6 %) (Starikovskaya et al., 2005), ороков Сахалина (11,5 %) (Бермишева и др., 2005), нанайцев (1,2 %) (Tamm et al., 2007), дауров (2,2 %) (Kong et al., 2003), монголов (1,3 %) (Kolman et al., 1996; Derenko et al., 2007), алтайцев (0,7 %) (Dulik et al., 2012), бурят (0,7 %) (Derenko et al., 2007), киргизов (0,5 %) (Tamm et al., 2007), казахов (0,8 %) (Tamm et al., 2007). Предполагается, что присутствие гаплогруппы C1a на северо-востоке Азии связано с обратной миграцией из Америки (Tamm et al., 2007), произошедшей ~8,6 тыс. лет назад, судя по эволюционному возрасту этой гаплогруппы мтДНК (Derenko et al., 2010). Конечно, по результатам филогенетического анализа и возрасту гаплогруппы трудно определить, когда именно была предполагаемая миграция. Неизвестно, появились ли мутации, определяющие гаплогруппу C1a (рисунок), в Азии или же произошел перенос в Азию уже сформировавшейся гаплогруппы C1a, возникшей очень локально в Америке.

Филогенетический анализ всех известных к настоящему времени C1a-митогеномов показывает, что эволюционный возраст гаплогруппы составляет ~8 тыс. лет, а дивергенция основных гаплотипов от корневой последовательности мтДНК произошла ~6,6 тыс. лет назад, при этом японская ветвь гаплогруппы C1a имеет возраст ~5,2 тыс. лет (см. рисунок). Таким образом, учитывая достаточно широкий диапазон времени формирования «арктического» варианта гена *CPT1A* (от 6 до 23 тыс. лет назад), можно предположить, что C1a-миграция из американской части Берингии могла быть осуществлена носителями «арктического» варианта гена *CPT1A*. В таком случае находит объяснение присутствие как C1a-гаплотипов мтДНК у современных японцев и народов Сахалина и Приамурья, так и «арктического» варианта гена *CPT1A* у представителей позднего дзёмона Хоккайдо и современных народов Сахалина и Приамурья. В настоящее время ареал C1-гаплогрупп у народов Америки смещен к югу, однако палеогеномные исследования установили присутствие C1b-гаплотипа на Аляске 11,5 тыс. лет назад (Taskneuy et al., 2015). Поэтому вполне вероятно, что митохондриальные генофонды берингийцев включали в свой состав C1-линии, одна из которых могла стать родоначальницей гаплогруппы C1a.

В отношении происхождения «арктического» варианта гена *CPT1A* установлено, что для варианта rs80356779-A предковым является гаплотип, характерный для населения Восточной Азии (Clemente et al., 2014). Однако этапы дальнейших изменений этого гаплотипа, приведших к возникновению «арктической» мутации, равно как и место ее происхождения (Америка или Азия) пока неизвестны.

Заключение

Полученные результаты позволили выявить несколько миграционных событий, связанных с распространением морских зверобоев в Охотоморском регионе. Самая поздняя миграция, оставившая следы у носителей культуры эпи-дзёмон, привнесла с севера Приохотья на Хоккайдо и соседние территории Приамурья митохондриальную гаплогруппу G1b и «арктический» вариант гена *CPT1A*. Следы более ранней миграции, также привнесшей «арктическую» мутацию, зарегистрированы у населения позднего дзёмона Хоккайдо. Пока неизвестно, связана ли эта миграция с распространением митохондриальной линии C1a или же присутствие C1a у населения островов Японии маркирует собой еще один, более ранний, эпизод миграционной истории, связывающей население Берингии и всего Охотоморского региона. Следует отметить, что в этногенетической литературе уже давно существует предположение об этногенетическом родстве предков нивхов, чукчей, коряков, эскимосов и американских индейцев (Jochelson, 1926). Предполагается также существование в прошлом циркумохотской культурной общности, имевшей глубокие связи с сопредельными культурами азиатского побережья и островов северо-западной Пацифики и Северной Америки (Лебединцев, 2003).

Список литературы / References

- Бермишева М.А., Кутуев И.А., Спицын В.А., Виллемс Р., Батырова А.З., Коршунова Т.Ю., Хуснутдинова Э.К. Анализ изменчивости митохондриальной ДНК в популяции ороков. *Генетика*. 2005;41(1):78-84.
[Bermisheva M.A., Kutuev I.A., Spitsyn V.A., Villems R., Batyrova A.Z., Korshunova T.Yu., Khusnutdinova E.K. Analysis of mitochondrial DNA variation in the population of Oroks. *Russ. J. Genet.* 2005;41(1):66-71.]
- Гребенюк П.С., Федорченко А.Ю., Лебединцев А.И., Малярчук Б.А. Древние культуры крайнего Северо-Востока Азии и этногенетические реконструкции. *Том. журн. лингвистических и антропологических исследований*. 2019;2(24):110-136. DOI 10.23951/2307-6119-2019-2-110-136.
[Grebennyuk P.S., Fedorchenko A.Yu., Lebedintsev A.I., Malyarchuk B.A. The ancient cultures of the extreme northeast Asia and ethnogenetic reconstructions. *Tomskii Jurnal Lingvistikeskikh i Antropologicheskikh Isssledovaniy = Tomsk J. Linguistics Anthropol.* 2019;2(24):110-136. DOI 10.23951/2307-6119-2019-2-110-136. (in Russian)]
- Гурвич И.С., Симченко Ю.Б. Этногенез юкагиров. В: Этногенез народов Севера. М.: Наука, 1980;141-151.
[Gurvich I.S., Simchenko Y.B. Ethnogenesis of the Yukagirs. In: *Ethnogenesis of the Peoples of the North*. Moscow: Nauka Publ., 1980;141-145. (in Russian)]
- Лебединцев А.И. Древние приморские культуры Северо-Западного Приохотья. Л.: Наука, 1990.
[Lebedintsev A.I. Ancient Coastal Cultures of the Northwestern Okhota Region. Leningrad: Nauka Publ., 1990. (in Russian)]
- Лебединцев А.И. К проблеме происхождения древних приморских культур Севера Дальнего Востока. *Археология, этнография и антропология Евразии*. 2003;2:87-93.
[Lebedintsev A.I. On the origin of ancient coastal cultures of the northern Far East. *Archeologiya, Etnografiya i Antropologiya Evrazii = Archaeology, Ethnology, and Anthropology of Eurasia*. 2003;2:87-93. (in Russian)]
- Малярчук Б.А. Долговременные ген-средовые взаимодействия и генетика нарушенной метаболизма в популяциях коренного населения Северо-Востока Азии. *Экологическая генетика*. 2018;16(2):30-35. DOI 10.17816/ecogen16230-35.
[Malyarchuk B.A. Long-term gene-environment interactions and genetics of metabolic disorders in aboriginal populations of North-east Asia. *Ekologicheskaya Genetika = Ecol. Genet.* 2018;16(2):30-35. DOI 10.17816/ecogen16230-35. (in Russian)]
- Малярчук Б.А., Деренко М.В., Денисова Г.А., Литвинов А.Н. Распространенность арктического варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):571-575. DOI 10.18699/VJ16.130.
[Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Denisova G.A., Litvinov A.N. Distribution of the Arctic variant of the *CPT1A* gene in indigenous populations of Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5):571-575. DOI 10.18699/VJ16.130. (in Russian)]
- Achilli N., Perego U.A., Lancioni H., Olivieri A., Gandini F., Hooshiar Kashani B., Battaglia V., Grugni V., Angerhofer N., Rogers M.P., Herrera R.J., Woodward S.R., Labuda D., Smith D.G., Cybulski J.S., Semino O., Malhi R.S., Torroni A. Reconciling migration models to the Americas with the variation of North American native mtgenomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(35):14308-14313. DOI 10.1073/pnas.1306290110.
- Adachi N., Kakuda T., Takahashi R., Kanzawa-Kiriyama H., Shinoda K.I. Ethnic derivation of the Ainu inferred from ancient mitochondrial DNA data. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2018;165(1):139-148. DOI 10.1002/ajpa.23338.
- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., Kitano T., Matsumura H., Fujiyama R., Sawada J., Tanaka M. Mitochondrial DNA analysis of Hokkaido Jomon skeletons: remnants of archaic maternal lineages at the southwestern edge of former Beringia. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2011;146(3):346-360. DOI 10.1002/ajpa.21561.
- Befu H., Chard C.S. A prehistoric maritime culture of the Okhotsk Sea. *Lat. Am. Antiq.* 1964;30(1):1-18.
- Clemente F.J., Cardona A., Inchley C.E., Peter B.M., Jacobs G., Pagan L., Lawson D.J., ..., Tyler-Smith C., Villems R., Nielsen R., Metspalu M., Malyarchuk B., Derenko M., Kivisild T. A selective sweep on a deleterious mutation in the *CPT1A* gene in Arctic populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2014;95:584-589. DOI 10.1016/j.ajhg.2014.09.016.
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G., Dambueva I., Perkova M., Dorzhu C., Luzina F., Lee H.K., Vanecek T., Villems R., Zakharov I. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(5):1025-1041. DOI 10.1086/522933.
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G., Rogalla U., Perkova M., Dambueva I., Zakharov I. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in northern Asia. *PLoS One*. 2010;5(12):e15214. DOI 10.1371/journal.pone.0015214.
- Dryomov S.V., Nazhmidenova A.M., Shalaurova S.A., Morozov I.V., Tabarev A.V., Starikovskaya E.B., Sukernik R.I. Mitochondrial genome diversity at the Bering Strait area highlights prehistoric human migrations from Siberia to northern North America. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23(10):1399-13404. DOI 10.1038/ejhg.2014.286.
- Dulik M.C., Zhadanov S.I., Osipova L.P., Askapuli A., Gau L., Gokcumen O., Rubinstein S., Schurr T.G. Mitochondrial DNA and Y chromosome variation provides evidence for a recent common ancestry between native Americans and indigenous Altaians. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(2):229-246. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.12.014.
- Flegontov P., Altunışık N.E., Changmai P., Rohland N., Mallick S., Adamski N., Bolnick D.A., ..., Veselovskaya E., Hayes M.G., O'Rourke D.H., Krause J., Pinhasi R., Reich D., Schiffels S. Palaeo-Eskimo genetic ancestry and the peopling of Chukotka and North America. *Nature*. 2019;570(7760):236-240. DOI 10.1038/s41586-019-1251-y.
- Greenberg C.R., Dilling L.A., Thompson G.R., Seargeant L.E., Haworth J.C., Phillips S., Chan A., Vallance H.D., Waters P.J., Sinclair G., Lillquist Y., Wanders R.J., Olpin S.E. The paradox of the

- carnitine palmitoyltransferase type Ia P479L variant in Canadian Aboriginal populations. *Mol. Genet. Metab.* 2009;96:201-207. DOI 10.1016/j.ymgme.2008.12.018.
- Grugni V., Raveane A., Ongaro L., Battaglia V., Trombetta B., Colombo G., Capodiferro M.R., Olivieri A., Achilli A., Perego U.A., Motta J., Tribaldos M., Woodward S.R., Ferretti L., Cruciani F., Torroni A., Semino O. Analysis of the human Y-chromosome haplogroup Q characterizes ancient population movements in Eurasia and the Americas. *BMC Biol.* 2019;17(1):3. DOI 10.1186/s12915-018-0622-4.
- Jochelson W. The ethnological problems of Bering Sea. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 1926;26(1):90-95.
- Kanzawa-Kiryama H., Jinam T.A., Kawai Y., Sato T., Hosomichi K., Tajima A., Adachi N., Matsumura H., Kryukov K., Saitou N., Shinoda K. Late Jomon male and female genome sequences from the Funadomari site in Hokkaido, Japan. *Anthropol. Sci.* 2019;127(2): 83-108. DOI 10.1537/ase.190415.
- Karmin M., Saag L., Järve M., Vicente M., Wilson Sayres M.A., Pagan L., DeGiorgio M., ..., Tyler-Smith C., Underhill P., Willerslev E., Nielsen R., Metspalu M., Villems R., Kivisild T. A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture. *Genome Res.* 2015;25(4):459-466. DOI 10.1101/gr.186684.114.
- Kolman C.J., Sambuughin N., Bermingham E. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics.* 1996;142(4):1321-1334. PMID: 8846908.
- Kong Q.P., Yao Y.G., Sun C., Bandelt H.J., Zhu C.L., Zhang Y.P. Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;73(3):671-676. DOI 10.1086/377718.
- Lemas D.J., Wiener H.W., O'Brien D.M., Hopkins S., Stanhope K.L., Havel P.J., Allison D.B., Fernandez J.R., Tiwari H.K., Boyer B.B. Genetic polymorphisms in carnitine palmitoyltransferase 1A gene are associated with variation in body composition and fasting lipid traits in Yup'ik Eskimos. *J. Lipid Res.* 2012;53:175-184. DOI 10.1194/jlr.P018952.
- Li Q., Dong K., Xu L., Jia X., Wu J., Sun W., Zhang X., Fu S. The distribution of three candidate cold-resistant SNPs in six minorities in North China. *BMC Genomics.* 2018;19(1):134. DOI 10.1186/s12864-018-4524-1.
- Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G., Maksimov A., Wozniak M., Grzybowski T., Dambueva I., Zakharov I. Ancient links between Siberians and Native Americans revealed by subtyping the Y chromosome haplogroup Q1a. *J. Hum. Genet.* 2011;56:583-588. DOI 10.1038/jhg.2011.64.
- Maruyama S., Minaguchi K., Saitou N. Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic analysis of mtDNA lineages in the Japanese populations. *Int. J. Legal Med.* 2003;117(4):218-225. DOI 10.1007/s00414-003-0379-2.
- Moreno-Mayar J.V., Potter B.A., Vinner L., Steinrücken M., Rasmussen S., Terhorst J., Kamm J.A., Albrechtsen A., Malaspina A.S., Sikora M., Reuther J.D., Irish J.D., Malhi R.S., Orlando L., Song Y.S., Nielsen R., Meltzer D.J., Willerslev E. Terminal Pleistocene Alaskan genome reveals first founding population of Native Americans. *Nature.* 2018;553(7687):203-207. DOI 10.1038/nature25173.
- Raghavan M., DeGiorgio M., Albrechtsen A., Moltke I., Skoglund P., Korneliusen T.S., Grønnow B., ..., Meldgaard M., Bustamante C., O'Rourke D.H., Jakobsson M., Gilbert M.T., Nielsen R., Willerslev E. The genetic prehistory of the New World Arctic. *Science.* 2014;345(6200):1255832. DOI 10.1126/science.1255832.
- Rajakumar C., Ban M.R., Cao H., Young T.K., Bjerregaard P., Hegele R.A. Carnitine palmitoyltransferase IA polymorphism P479L is common in Greenland Inuit and is associated with elevated plasma apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 2009;50:1223-1228. DOI 10.1194/jlr.P900001-JLR200.
- Rasmussen M., Anzick S.L., Waters M.R., Skoglund P., DeGiorgio M., Stafford T.W. Jr., ..., Manica A., Gupta R., Metspalu M., Bustamante C.D., Jakobsson M., Nielsen R., Willerslev E. The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. *Nature.* 2014;506(7487):225-229. DOI 10.1038/nature13025.
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S., Albrechtsen A., Moltke I., Metspalu M., ..., Brunak S., Sicheritz-Pontén T., Villems R., Nielsen R., Krogh A., Wang J., Willerslev E. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature.* 2010;463(7282):757-762. DOI 10.1038/nature08835.
- Rasmussen M., Sikora M., Albrechtsen A., Korneliusen T.S., Moreno-Mayar J.V., Poznik G.D., Zollikofer C.P.E., de León M.P., Allentoft M.E., Moltke I., Jónsson H., Valdiosera C., Malhi R.S., Orlando L., Bustamante C.D., Stafford T.W. Jr., Meltzer D.J., Nielsen R., Willerslev E. The ancestry and affiliations of Kennewick Man. *Nature.* 2015;523(7561):455-458. DOI 10.1038/nature14625.
- Sikora M., Pitulko V., Sousa V., Allentoft M.E., Vinner L., Rasmussen S., Margaryan A., ..., Sajantila A., Lahr M.M., Durbin R., Nielsen R., Meltzer D., Excoffier L., Willerslev E. The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene. *Nature.* 2019;570(7760):182-188. DOI 10.1038/s41586-019-1279-z.
- Smolnikova M.V., Tereshchenko S.Y., Freidin M.B. The "Arctic variant" specific mutation P479L in *CPT1A* gene predisposing to carnitine palmitoyltransferase-1A deficiency in two Russian far north aboriginal populations: A retrospective genotyping of newborn screening cards. *Mol. Genet. Metab.* 2015;114:341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.12.308>.
- Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M., Rito T., Röhl A., Salas A., Oppenheimer S., Macaulay V., Richards M.B. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;84(6):740-759. DOI 10.1016/j.ajhg.2009.05.001.
- Starikovskaya E.B., Sukernik R.I., Derbeneva O.A., Volodko N.V., Ruiz-Pesini E., Torroni A., Brown M.D., Lott M.T., Hosseini S.H., Huoponen K., Wallace D.C. Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups. *Ann. Hum. Genet.* 2005;69(1): 67-89. DOI 10.1046/j.1529-8817.2003.00127.x.
- Tackney J.C., Potter B.A., Raff J., Powers M., Watkins W.S., Warner D., Reuther J.D., Irish J.D., O'Rourke D.H. Two contemporaneous mitogenomes from terminal Pleistocene burials in eastern Beringia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(45):13833-13838. DOI 10.1073/pnas.1511903112.
- Tamm E., Kivisild T., Reidla M., Metspalu M., Smith D.G., Mulligan C.J., Bravi C.M., Rickards O., Martinez-Labarga C., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A., Golubenko M.V., Stepanov V.A., Gubina M.A., Zhadanov S.I., Ossipova L.P., Damba L., Voevoda M.I., Dipierri J.E., Villems R., Malhi R.S. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One.* 2007;2(9):e829. DOI 10.1371/journal.pone.0000829.
- Zhou S., Xie P., Quobion A., Ambalavanan A., Dionne-Laporte A., Spiegelman D., Bourassa C.V., Xiong L., Dion P.A., Rouleau G.A. Genetic architecture and adaptations of Nunavik Inuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(32):16012-16017. DOI 10.1073/pnas.1810388116.

ORCID ID

B.A. Malyarchuk orcid.org/0000-0002-0304-0652**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-09-00144).**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.02.2020. После доработки 29.04.2020. Принята к публикации 05.05.2020.