

Научный рецензируемый журнал

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ21.016

## Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

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

## Редакционная коллегия

*Т.Г. Амстиславская* – д-р биол. наук (Россия)  
*Е.Е. Андронов* – канд. биол. наук (Россия)  
*Ю.С. Аульченко* – д-р биол. наук (Россия)  
*Д.А. Афонников* – канд. биол. наук, доцент (Россия)  
*Е.В. Березиков* – канд. биол. наук, проф. (Нидерланды)  
*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/VJ21.016

**Founders**

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

**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.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

## Генетическая инженерия

- 139 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению иммуногенности вируса осповакцины. *С.Н. Щелкунов, Т.В. Бауэр, С.Н. Якубицкий, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, С.А. Пьянков*
- 147 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L. *Г.Н. Ралдугина, Т.Ж. Хоанг, Х.Б. Нгок, И.В. Карпычев*
- 157 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Положительный опыт применения биобаллистического подхода к картофелю сортов Аксор и Невский. *Н.П. Малахова, Ю.А. Скиба, Г.А. Исакова, Д.А. Найзабаева, Б.К. Тезекбаева, Г.А. Исмагулова, Э.Р. Мальцева* (на англ. языке)

## Селекция растений на иммунитет и качество

- 164 **ОБЗОР**  
Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу. *Т.С. Фролова, В.А. Черенко, О.И. Синицына, А.В. Кочетов*
- 171 **ОБЗОР**  
Проблемы и возможности изучения пивоваренных признаков ячменя с использованием молекулярно-генетических подходов. *Н.В. Трубочеева, Л.А. Першина*
- 178 **ОБЗОР**  
Антоцианы как компоненты функционального питания. *Р.С. Юдина, Е.И. Гордеева, О.Ю. Шоева, М.А. Тихонова, Е.К. Хлесткина*

## Генетика животных

- 190 **ОБЗОР**  
Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота. *Н.С. Юдин, А.А. Юрченко, Д.М. Ларкин*
- 202 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК. *Н.В. Вдовина, И.Б. Юрьева*

## Физиологическая генетика

- 208 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Дифференциальная экспрессия 10 генов, ассоциированных с агрессивным поведением, в гипоталамусе двух поколений крыс, селекционируемых по реакции на человека. *Н.В. Климова, И.В. Чадаева, С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина*
- 216 **ОБЗОР**  
Роль кортикотропин-рилизинг гормона и его рецепторов в регуляции нейрофизиологических и поведенческих реакций на стресс. *Е.В. Сухарева*

## Генетика микроорганизмов

- 224 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал. *Э.А. Халилова, С.Ц. Котенко, Э.А. Исламмагомедова, А.А. Абакарова, Н.А. Черных, Д.А. Аливердиева*
- 234 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске. *А.В. Бардашева, Н.В. Фоменко, Т.В. Калымбетова, И.В. Бабкин, С.О. Кретьен, Е.В. Жираковская, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова*

## Genetic engineering

- 139 ORIGINAL ARTICLE  
Mutations in the *A34R* gene increase the immunogenicity of vaccinia virus. *S.N. Shchelkunov, T.V. Bauer, S.N. Yakubitskiy, A.A. Sergeev, A.S. Kabanov, S.A. Pyankov*
- 147 ORIGINAL ARTICLE  
An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants. *G.N. Raldugina, T.Z. Hoang, H.B. Ngoc, I.V. Karpichev*
- 157 ORIGINAL ARTICLE  
A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy. *N.P. Malakhova, Y.A. Skiba, G.A. Iskakova, D.A. Naizabayeva, B.K. Tezekbaeva, G.A. Ismagulova, E.R. Maltseva*

## Plant breeding for immunity and quality

- 164 REVIEW  
Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis. *T.S. Frolova, V.A. Cherenko, O.I. Sinitsyna, A.V. Kochetov*
- 171 REVIEW  
Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches. *N.V. Trubacheeva, L.A. Pershina*
- 178 REVIEW  
Anthocyanins as functional food components. *R.S. Yudina, E.I. Gordeeva, O.Yu. Shoeva, M.A. Tikhonova, E.K. Khlestkina*

## Animal genetics

- 190 REVIEW  
Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds. *N.S. Yudin, A.A. Yurchenko, D.M. Larkin*
- 202 ORIGINAL ARTICLE  
Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites. *N.V. Vdovina, I.B. Yuryeva*
- Physiological genetics
- 208 ORIGINAL ARTICLE  
Differential expression of 10 genes in the hypothalamus of two generations of rats selected for a reaction to humans. *N.V. Klimova, I.V. Chadaeva, S.G. Shichevich, R.V. Kozhemyakina*
- 216 REVIEW  
The role of the corticotropin-releasing hormone and its receptors in the regulation of stress response. *E.V. Sukhareva*
- Microbial genetics
- 224 ORIGINAL ARTICLE  
Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Dagestan) and their biotechnological potential. *E.A. Khalilova, S.T. Kotenko, E.A. Islammagomedova, A.A. Abakarova, N.A. Chernyh, D.A. Aliverdiyeva*
- 234 ORIGINAL ARTICLE  
Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk. *A.V. Bardasheva, N.V. Fomenko, T.V. Kalymbetova, I.V. Babkin, S.O. Chretien, E.V. Zhirakovskaya, N.V. Tikunova, V.V. Morozova*

## Мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению иммуногенности вируса осповакцины

С.Н. Щелкунов<sup>1, 2</sup>✉, Т.В. Бауэр<sup>1</sup>, С.Н. Якубицкий<sup>1</sup>, А.А. Сергеев<sup>1</sup>, А.С. Кабанов<sup>1</sup>, С.А. Пьянков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

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

✉ snshchel@vector.nsc.ru

**Аннотация.** Самым простым и надежным способом защиты от вирусных инфекций является вакцинопрофилактика. При этом наибольшей протективной эффективностью обладают живые вакцины, в основе которых используют слабовирулентные для человека вирусы, близкородственные патогенным, или аттенуированные (ослабленные за счет мутаций/делеций в вирусном геноме) варианты патогенного для человека вируса. Вакцинация против оспы с использованием живого вируса осповакцины (*vaccinia virus*, VACV), близкородственного вирусу натуральной оспы, сыграла важнейшую роль в успехе программы глобальной ликвидации оспы, которая осуществлялась под эгидой Всемирной организации здравоохранения. Прекращение после 1980 г. противосспенной вакцинации привело к тому, что огромная часть населения Земли в настоящее время не имеет иммунитета не только к оспе, но и любым другим зоонозным ортопоксвирусным инфекциям. Это создает возможность циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции и, как следствие, приводит к изменению экологии и круга чувствительных хозяев для разных видов ортопоксвирусов. При этом использование классической живой вакцины на основе VACV для защиты от этих инфекций в настоящее время не приемлемо, так как она может обуславливать тяжелые побочные реакции. В связи с этим все более актуальной становится разработка новых безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека и животных. Аттенуация (ослабление вирулентности) VACV достигается в результате направленной инактивации определенных генов вируса и обычно приводит к уменьшению эффективности размножения VACV *in vivo*. Следствием этого может быть снижение иммунного ответа при введении аттенуированного вируса пациентам в стандартных дозах. Часто используемым для встройки/инактивации в геноме VACV является ген тимидинкиназы, нарушение которого приводит к аттенуации вируса. В данной работе изучено, как введение двух точечных мутаций в ген *A34R* аттенуированного штамма L1VP-GFP (TK-), увеличивающих выход внеклеточных оболочечных вирионов (EEV), влияет на свойства пато- и иммуногенности варианта VACV L1VP-GFP-A34R при интраназальном заражении лабораторных мышей. Показано, что увеличение продукции EEV рекомбинантным штаммом VACV L1VP-GFP-A34R не меняет аттенуированный фенотип, характерный для родительского штамма L1VP-GFP, но приводит к существенно большей продукции VACV-специфичных антител. Ключевые слова: вирус осповакцины; направленные мутации; аттенуация; иммуногенность.

**Для цитирования:** Щелкунов С.Н., Бауэр Т.В., Якубицкий С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Пьянков С.А. Мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению иммуногенности вируса осповакцины. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):139-146. DOI 10.18699/VJ21.017

## Mutations in the *A34R* gene increase the immunogenicity of vaccinia virus

S.N. Shchelkunov<sup>1, 2</sup>✉, T.V. Bauer<sup>1</sup>, S.N. Yakubitskiy<sup>1</sup>, A.A. Sergeev<sup>1</sup>, A.S. Kabanov<sup>1</sup>, S.A. Pyankov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

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

✉ snshchel@vector.nsc.ru

**Abstract.** Vaccination is the most simple and reliable approach of protection to virus infections. The most effective agents are live vaccines, usually low-virulence organisms for humans and closely related to pathogenic viruses or attenuated as a result of mutations/deletions in the genome of pathogenic virus. Smallpox vaccination with live vaccinia virus (VACV) closely related to smallpox virus played a key role in the success of the global smallpox eradication program carried out under the World Health Organization auspices. As a result of the WHO decision as of 1980 to stop smallpox vaccination, humankind has lost immunity not only to smallpox, but also to other zoonotic, orthopoxvirus-caused human infections. This new situation allows orthopoxviruses to circulate in the human population and, as a consequence, to alter several established concepts of the ecology and range of sensitive hosts for various orthopoxvirus species. Classic VACV-based live vaccine for vaccination against orthopoxvirus infections is out of the question, because it can cause severe side effects. Therefore, the development of new safe vaccines against orthopoxviral infections of humans and animals is an important problem. VACV attenuation by modern approaches carried out



by targeted inactivation of certain virus genes and usually leads to a decrease in the effectiveness of VACV *in vivo* propagation. As a result, it can cause a diminishing of the immune response after administration of attenuated virus to patients at standard doses. The gene for thymidine kinase is frequently used for insertion/inactivation of foreign genes and it causes virus attenuation. In this research, the effect of the introduction of two point mutations into the A34R gene of attenuated strain L1VP-GFP (TK<sup>-</sup>), which increase the yield of extracellular enveloped virions (EEV), on the pathogenicity and immunogenicity of VACV L1VP-GFP-A34R administered intranasally to laboratory mice were studied. It was shown that increase in EEV production by recombinant strain VACV L1VP-GFP-A34R does not change the attenuated phenotype characteristic of the parental strain L1VP-GFP, but causes a significantly larger production of VACV-specific antibodies.

Key words: vaccinia virus; target mutations; attenuation; immunogenicity.

**For citation:** Shchelkunov S.N., Bauer T.V., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Pyankov S.A. Mutations in the A34R gene increase the immunogenicity of vaccinia virus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):139-146. DOI 10.18699/VJ21.017 (in Russian)

## Введение

Вакцинопрофилактика – самый надежный способ защиты от вирусных инфекций. При этом наиболее эффективными являются живые вакцины, в основе которых используют слабовирулентные для человека вирусы, близкородственные патогенным, или аттенуированные (ослабленные за счет мутаций/делетий в вирусном геноме) варианты патогенного для человека вируса (Щелкунов, 1998; Зверев, Юминова, 2012).

В течение долгих лет оспопрививания в XIX–XX вв. в разных частях света сформировалась практика использования разных штаммов вируса, который в прошлом веке отнесен к виду *Vaccinia virus* (VACV), входящему в состав рода *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae. В отечественной литературе данный вирус принято называть вирусом осповакцины (Fenner et al., 1988; Shchelkunov, 2013; Sanchez-Sampedro et al., 2015). Точное происхождение этих штаммов в большинстве случаев неизвестно, они различаются между собой патогенностью при инфицировании различных видов лабораторных животных и реактогенностью при вакцинации людей (Shchelkunov et al., 2005; Kretzschmar et al., 2006; Jacobs et al., 2009; Sanchez-Sampedro et al., 2015). В процессе массовой вакцинации все штаммы VACV обуславливали в небольшом проценте случаев тяжелые побочные реакции, включая энцефалиты и энцефаломиелиты, иногда приводившие к гибели вакцинируемых. Поэтому в 1980 г. после подтверждения глобальной ликвидации оспы была принята резолюция Всемирной ассамблеи здравоохранения, настоятельно призывающая все страны прекратить вакцинацию населения против оспы<sup>1</sup>.

С появлением возможности реконструирования генома VACV методами генетической инженерии в 80-х гг. прошлого века этот вирус стали использовать в качестве молекулярного вектора для создания поливалентных вакцин против различных инфекций, а затем и онколитических вариантов VACV (Kutinova et al., 1995; Shchelkunov et al., 2003, 2018; Jacobs et al., 2009; Thirunavukarasu et al., 2013; Sanchez-Sampedro et al., 2015; Goncharova et al., 2016; Li Y. et al., 2017; Guo et al., 2019). При этом важнейшим стал вопрос о биологической безопасности создаваемых рекомбинантных VACV.

Прекращение противооспенной вакцинации привело к тому, что огромная часть населения Земли в настоящее

время не имеет иммунитета не только к оспе, но и любым другим зоонозным ортопоксвирусным инфекциям. Это создает возможность циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции и, как следствие, приводит к изменению экологии и круга чувствительных хозяев для разных видов ортопоксвирусов (Shchelkunov, 2013). Поэтому вспышки заболеваний, обусловленных зоонозными ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян, вирус оспы коров и VACV, все чаще в последние годы регистрируют у людей на разных континентах (Albarnaz et al., 2018; Reynolds et al., 2019; Styczynski et al., 2019). При этом использование классической живой вакцины на основе VACV для защиты от этих инфекций в настоящее время не приемлемо, так как она может обуславливать тяжелые побочные реакции, особенно у людей с ослабленной иммунной системой или иммунодефицитами (в том числе у ВИЧ-инфицированных). В связи с этим все более актуальной является разработка современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека и животных (Shchelkunov, 2011).

Аттенуация VACV часто достигается в результате направленной инактивации определенных генов вируса и обычно приводит к снижению эффективности размножения VACV *in vivo*. Следствием этого может быть снижение иммунного ответа при введении аттенуированного вируса пациентам в стандартных дозах (Moss, 2011; Sanchez-Sampedro et al., 2015; Albarnaz et al., 2018). Поэтому важно осуществлять поиск вирусных генов, модификация которых может привести к повышению иммуногенности аттенуированного VACV без увеличения его вирулентности (Shchelkunov, Shchelkunova, 2020).

VACV формирует две инфекционные формы вирионов. Подавляющее большинство вирусного потомства составляют внутриклеточные зрелые вирионы (intracellular mature virion, IMV), которые накапливаются в зараженной клетке в значительном количестве и попадают в окружающую среду только после разрушения клетки. Небольшой процент синтезируемых вирусных частиц покрывается дополнительной липопротеиновой оболочкой и на раннем этапе цикла развития вируса выходит на поверхность клеток и находится в ассоциированном с клеткой состоянии (cell-associated virion, CEV). Часть CEV отделяется от поверхности клетки и переходит в свободное состояние, называемое внеклеточными оболочечными вирионами (extracellular enveloped virion, EEV) (Smith et al., 2002). Данная форма для большинства штам-

<sup>1</sup> World Health Assembly, 33. Global Smallpox Eradication. World Health Organization. 1980. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/155529>

мов VACV составляет менее 1 % всего потомства вируса (Payne, 1980). При этом EEV VACV эффективнее IMV проникают в клетки (Locker et al., 2000) и обеспечивают быстрое распространение вируса по организму (Payne, 1980; Blasco et al., 1993; Smith et al., 2002).

Снижение эффективности размножения *in vivo* аттенуированного варианта VACV должно приводить к пропорциональному уменьшению продукции EEV и, как следствие, снижению ранней диссеминации вируса по организму. Мы предположили, что увеличение выхода EEV-аттенуированного VACV может обуславливать более выраженный противовирусный иммунный ответ.

Одним из перспективных в этом направлении объектов исследования является ген *A34R* VACV (Blasco et al., 1993). Он кодирует белок A34, входящий в состав липопротеиновой оболочки внеклеточных вирионов (EEV) и контролирует эффективность их отделения от поверхности зараженной клетки и выхода в свободном виде в межклеточное пространство (Blasco et al., 1993; McNulty et al., 2011; Monticelli et al., 2019). У большинства изученных штаммов VACV при размножении их в культурах клеток млекопитающих на раннем этапе инфекции в виде EEV формируется менее 1 % вирусного потомства. Остальные вирионы находятся внутри клетки в виде IMV и CEV, которые выходят в окружающую среду только после лизиса зараженной клетки (Payne, 1980; Smith et al., 2002). В результате множественных пассажей штамма NYCBH VACV при внутримозговом заражении мышей получен нейротропный штамм IHD-J VACV (Lee et al., 1992), который способен продуцировать EEV в количестве до 30 % всего вирусного потомства и формировать кометобразные бляшки на монослое чувствительных клеток (Payne, 1980; Blasco et al., 1993). Оказалось, что различия в аминокислотной последовательности белка A34 другого нейротропного штамма, WR VACV (образование менее 1 % EEV от инфекционного потомства вируса на культуре клеток), от аналогичного белка штамма IHD-J VACV составляют лишь две точечные позиции: Asp110 → Asn и Lys151 → Glu (Blasco et al., 1993). Показано, что замена гена *A34R* в штамме WR VACV на вариант этого гена из штамма IHD-J существенно увеличивает выход EEV-формы и это приводит к более эффективной диссеминации онколитических вариантов VACV, а также улучшенной противораковой активности таких вирусов *in vivo* (Kirn et al., 2008; Thirunavukarasu et al., 2013).

Целью данной работы явилось изучение влияния введения двух точечных мутаций в ген *A34R*, увеличивающих выход EEV, на свойства пато- и иммуногенности аттенуированного варианта VACV L1VP-GFP при интраназальном заражении лабораторных мышей.

## Материалы и методы

**Вирусы, культура клеток.** В работе использовали клон 14 штамма VACV L1VP (L1VP), полученный нами ранее трехкратным пересевом через бляшку из-под агарозного покрытия методом предельного разведения (Yakubitskiy et al., 2015), а также штамм L1VP-GFP, полученный на его основе встройкой гена зеленого флуоресцентного белка в состав вирусного гена тимидинкиназы (Petrov et al., 2013). Вирусы выращивали и титровали на культу-

ре клеток почки африканской зеленой мартовки линии CV-1 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, как описано С.Н. Щелкуновым и коллегами (2020).

**Получение вируса L1VP-GFP с точечными мутациями в гене *A34R*.** Рекомбинантный штамм L1VP-GFP-A34R получали методом временной доминантной селекции на основе VACV L1VP-GFP с использованием плазмиды pMGCgpt-A34R\*, содержащей мутантный вариант гена *A34R* (Asp110 → Asn, Lys151 → Glu), как описано Т.В. Бауэр и сотрудниками (2020).

**Оценка уровня продукции внеклеточной формы вирусов.** Анализ уровня продукции EEV штаммов L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R проводили на 90 % монослое клеток линии CV-1, полученном на 6-луночных планшетах. Монослой клеток CV-1 заражали исследуемым вирусом со множественностью 10 БОЕ/клетка в трех повторах. Через 6 и 24 ч после заражения отбирали аликвоты надклеточной жидкости, а оставшиеся клетки подвергали трем циклам замораживания–оттаивания. Титр вируса в надклеточной жидкости и суспензии лизированных клеток определяли методом бляшек на культуре CV-1.

**Животные.** В исследованиях использовали инбредных разнополых мышей линии BALB/c, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями гуманного содержания и использования животных в экспериментальных исследованиях. Исследования и манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (разрешение № 06-09.2019 от 03.09.2019).

**Оценка патогенности вирусов для мышей.** Использовали 3–5-недельных мышей линии BALB/c массой 13–16 г. Препараты вирусов L1VP, L1VP-GFP, L1VP-GFP-A34R или физиологический раствор вводили животным интраназально (и/н), как описано С.Н. Щелкуновым и коллегами (2020). Применяли дозы заражения  $10^8$  или  $10^7$  БОЕ/30 мкл/животное. В каждой группе экспериментальных животных было по 6 особей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали внешние клинические признаки заболевания (взъерошенность шерсти, адинамия, тремор) в течение 14 сут.

**Выявление вирусов в слизи носа и легких.** Забор носовой перегородки и легких у мышей осуществляли через 3, 7, 10 сут после введения препаратов вирусов или физиологического раствора, предварительно выполнив процедуру эвтаназии методом цервикальной дислокации. В каждой временной точке образцы брали от трех животных и анализировали их индивидуально. Готовили 10% гомогенаты методом механической дезинтеграции с последующим добавлением питательной среды ДМЕМ. После нескольких актов замораживания–оттаивания в полученных гомогенатах определяли титры вирусов методом бляшек на монослое культуры клеток CV-1.

**Оценка нейровирусности вирусов.** Группам по 10 особей 2–3-дневных мышей-сосунков линии BALB/c интрацеребрально (и/ц) вводили рекомбинантные штаммы L1VP-GFP, L1VP-GFP-A34R или исходный L1VP в дозе

10 БОЕ/10 мкл/мышь. Животным контрольной группы и/ц вводили по 10 мкл физиологического раствора. За мышами наблюдали в течение 14 сут, учитывая количество погибших.

**Получение сывороток крови экспериментальных животных.** Через 28 сут после и/н введения препаратов VACV или физиологического раствора у мышей проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров. Из крови мышей была получена сыворотка путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием. Индивидуальные образцы сывороток крови мышей хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Иммуноферментный анализ сывороток крови.** Иммуноферментный анализ (ИФА) индивидуальных сывороток крови мышей выполняли согласно С.Н. Щелкунову и коллегам (2020). В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV L1VP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95 % вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

## Результаты

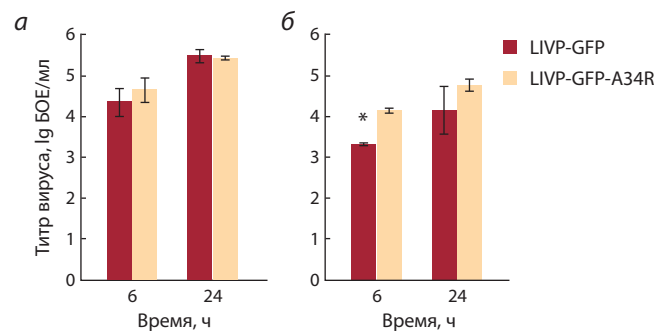
### Сравнение уровней продукции EЕV вирусами L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R

Оценку продукции EЕV-формы вирионов штамма L1VP-GFP и полученного на его основе мутантного варианта L1VP-GFP-A34R, кодирующего белок A34 с аминокислотными заменами Asp110 → Asn и Lys151 → Glu, осуществляли при заражении монослоя клеток линии CV-1 со множественностью 10 БОЕ/клетка.

Результаты этих экспериментов демонстрируют, что уровни продукции IMV обоих вирусов на культуре клеток не имеют достоверных различий (рис. 1, а). В то же время вирус L1VP-GFP-A34R продуцирует EЕV в значительно больших количествах по сравнению с исходным для него вариантом L1VP-GFP, особенно на раннем этапе инфекции (см. рис. 1, б). Через 6 ч после заражения VACV, мутантный по гену *A34R*, производит в семь раз больше внеклеточных вирионов по сравнению с родительским штаммом L1VP-GFP.

### Патогенность штаммов VACV при интраназальном введении мышам

Для оценки патогенности VACV L1VP, L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R мышам линии BALB/c препараты вирусов вводили и/н в дозах  $10^8$  или  $10^7$  БОЕ/30 мкл/животное. Группе мышей отрицательного контроля и/н наносили по 30 мкл физиологического раствора. В каждой группе экспериментальных животных было по 6 особей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали внешние клинические признаки заболевания в течение 14 сут. Начиная с третьих суток после инфицирования штаммом L1VP у мышей наблюдали клинические проявления заболевания: взъерошенность шерсти, адинамию, тремор. Для штаммов L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R не удалось выявить выраженных признаков заболевания за все время наблюдения.



**Рис. 1.** Динамика увеличения титра вирусов L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R после заражения культуры клеток CV-1.

а – общий титр; б – титр внеклеточной формы вируса в надклеточной жидкости. \* различия достоверны при  $p < 0.05$ .

Поскольку большинство штаммов VACV при инфицировании взрослых мышей даже в высоких дозах не приводят к их гибели, общепринятым методом оценки патогенности вариантов этого вируса является регистрация изменения массы тела животных после заражения (Belyakov et al., 2003; Dai et al., 2008; Sumner et al., 2016; Phelps et al., 2017). Выполненные нами эксперименты показали, что наряду с внешними признаками заболевания при и/н заражении мышей штаммом L1VP наблюдается дозозависимое снижение массы тела животных, а рекомбинантные варианты L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R не обуславливают изменений массы тела мышей, отличных от контрольных животных (рис. 2). Пик заболевания мышей приходился на 6–8-е сут после заражения VACV L1VP.

### Оценка наличия вирусов в слизистой носовой перегородки и легких

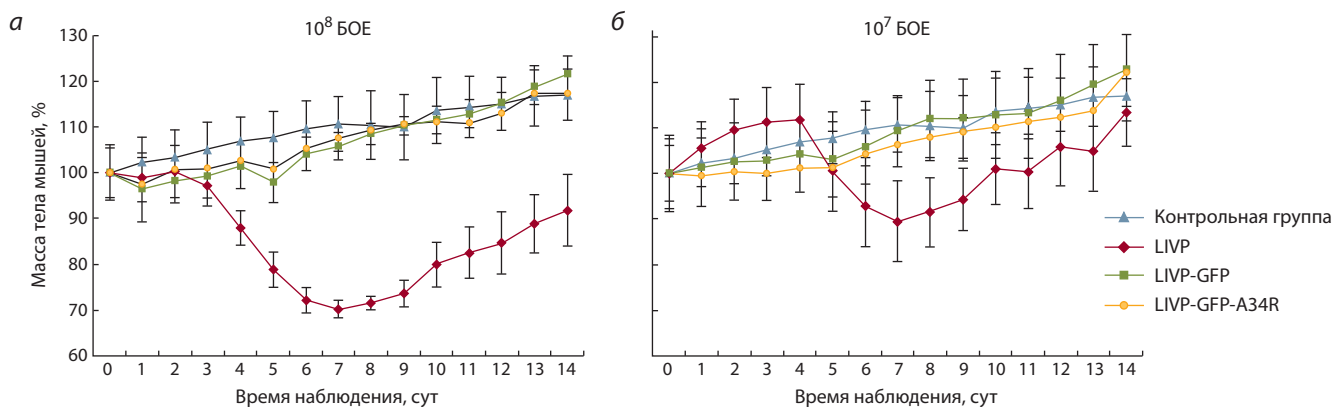
Для сравнения эффективности размножения в слизистой носовой перегородки и легких после и/н заражения мышей вирусами L1VP, L1VP-GFP или L1VP-GFP-A34R на 3, 7 и 10-е сут эксперимента у трех животных для каждой дозы инфицирования ( $10^8$  или  $10^7$  БОЕ) извлекали соответствующие ткани и готовили 10% гомогенаты, в которых определяли концентрацию VACV методом бляшек.

Результаты этих анализов указывают на то, что штамм VACV L1VP с гораздо большей эффективностью размножается *in vivo* по сравнению с аттенуированными вариантами VACV L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R (рис. 3). На 10-е сут после инфицирования в слизистой носовой перегородки и легких мышей выявлялся только родительский штамм L1VP.

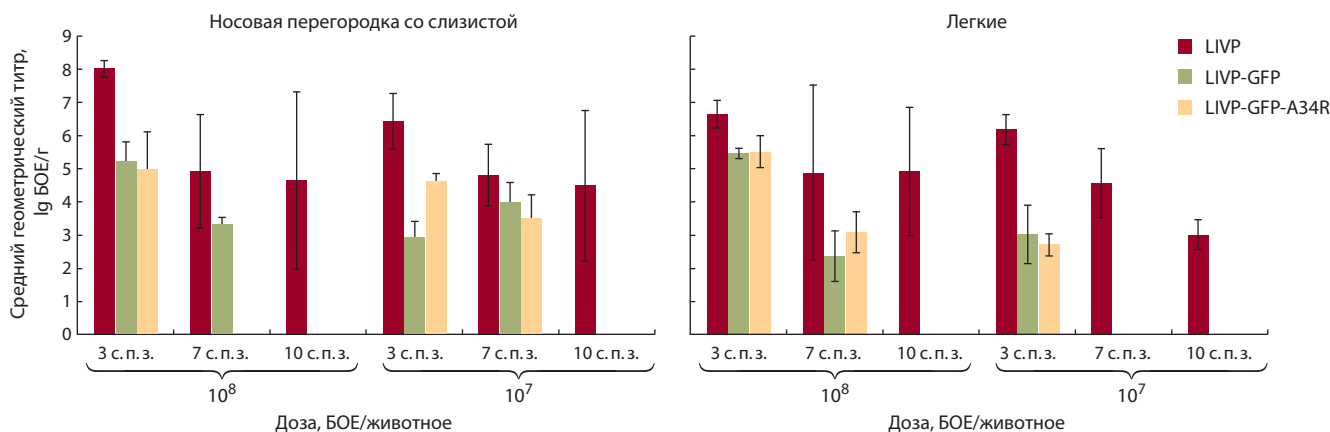
### Нейровирулентность вариантов VACV

Для изучения способности вирусов L1VP, L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R вызывать гибель новорожденных мышей при и/ц заражении (доза 10 БОЕ/10 мкл/мышь) использовали группы по 10 особей, за которыми вели наблюдение в течение 14 сут после инфицирования. К концу эксперимента 90 % мышей, зараженных VACV L1VP, погибли. Для штамма L1VP-GFP гибель мышей составила 20 %, для L1VP-GFP-A34R – 10 % (рис. 4). В контрольной группе (инъекция физиологического раствора) смертности животных не наблюдали.



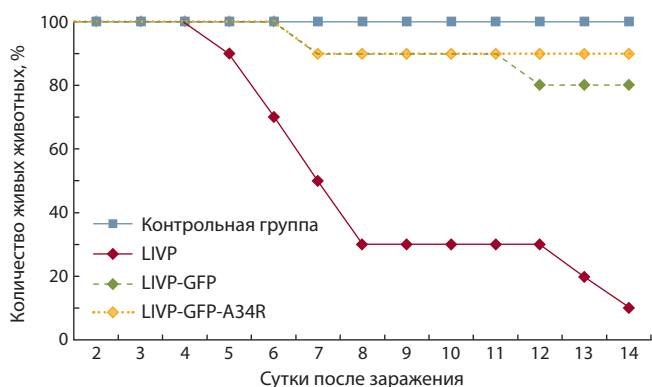


**Рис. 2.** Изменение массы тела мышей после интраназального введения штаммов L1VP, L1VP-GFP или L1VP-GFP-A34R VACV в дозах  $10^8$  БОЕ/мышь (а),  $10^7$  БОЕ/мышь (б) и физиологического раствора (контрольная группа).



**Рис. 3.** Накопление VACV в слизистой носовой перегородки и легких мышей, интраназально зараженных штаммами L1VP, L1VP-GFP или L1VP-GFP-A34R в разных дозах.

с.п.з. – сутки после заражения.



**Рис. 4.** Динамика гибели новорожденных мышей при интрацеребральном заражении штаммами L1VP, L1VP-GFP или L1VP-GFP-A34R VACV.

### Иммуногенность штаммов VACV

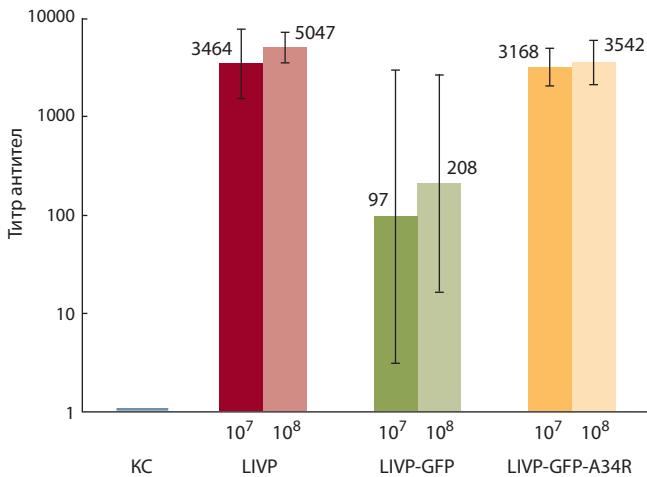
Иммуногенность вариантов VACV L1VP, L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R оценивали в тесте ИФА по уровню индуцируемых ими вирусспецифических антител в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут после и/н инфицирования разными дозами вирусов ( $10^7$  или  $10^8$  БОЕ/мышь).

Аттенуированный рекомбинантный штамм L1VP-GFP индуцировал достоверно меньший уровень VACV-специфических антител по сравнению с исходным штаммом L1VP (рис. 5). Введение же целевых мутаций в гене *A34R* привело к значительному увеличению антительного ответа на инфекцию мышей вариантом VACV L1VP-GFP-A34R.

### Обсуждение

Ранее мы показали, что в результате встройки гена *Gfp* в состав вирусного гена тимидинкиназы штамма L1VP (ТК<sup>-</sup>-фенотип) происходит значительная аттенуация созданного варианта VACV L1VP-GFP и, как следствие, снижение его иммуногенности. При этом наибольшую чувствительность к VACV лабораторные мыши проявляли при и/н инокуляции (Щелкунов и др., 2020). Поэтому сравнительную оценку свойств пато- и иммуногенности изучаемых штаммов VACV в данной работе осуществляли при и/н способе введения, который наиболее близок к естественному пути передачи вируса.

Продемонстрировано, что *A34R* VACV является одним из важных генов, контролирующих выход EEV из зараженных клеток (Blasco et al., 1993; Smith et al., 2002; Breiman et al., 2013). Лабораторные штаммы WR и IHD-J



**Рис. 5.** Титры IgG сывороток крови интраназально инфицированных мышей вирусами LIVP, LIVP-GFP и LIVP-GFP-A34R в ИФА против цельновирионного антигена.

Цифрами над столбиками указаны средние геометрические значения обратного титра VACV-специфических IgG для групп из 6 животных. Инфицирующие дозы вирусов 10<sup>7</sup> или 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь. KC – контрольная сыворотка.

VACV, значительно различающиеся по уровню продукции EЕV, по аминокислотной последовательности этого белка имеют отличия лишь в двух позициях – 110 и 151. С-концевой лектиноподобный домен вирусного гликопротеина А34, находящийся на поверхности внеклеточных вирионов, обеспечивает высокоспецифичное взаимодействие вирионов с углеводами на поверхности клеток. Замена Lys151 → Glu в составе этого домена белка А34 снижает эффективность связывания СЕV VACV с поверхностью клетки и увеличивает выход EЕV в окружающую среду (Blasco et al., 1993; Earley et al., 2008; McNulty et al., 2011).

Район гликопротеина А34 VACV с 80-го по 130-й аминокислотный остаток является областью взаимодействия вирусных белков А34 и В5, и данный комплекс поверхностных белков EЕV играет важную роль в связывании этой формы вирионов с поверхностью клеток (Monticelli et al., 2019). Мутация Asp110 → Asn в гликопротеине А34 влияет на его связывание с белком В5 и, возможно, приводит к дополнительному увеличению выхода EЕV.

Рассмотренные мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению продукции EЕV-формы VACV, не снижают инфекционность вируса (McIntosh, Smith, 1996). Более того, известно, что EЕV инфицируют клетки с большей эффективностью по сравнению с IMV и различаются по механизму адсорбции на поверхности плазматической мембраны и проникновения внутрь клетки (Locker et al., 2000).

В данной работе в качестве объекта исследования мы использовали аттенуированный рекомбинантный вирус LIVP-GFP, который показал онколитическую эффективность на разных животных моделях (Petrov et al., 2013; Goncharova et al., 2016; Shchelkunov et al., 2018). В состав гена *A34R* этого вируса ввели точечные мутации, приводящие к заменам Asp110 → Asn и Lys151 → Glu в

кодируемом им белке. При заражении клеток линии CV-1 обнаружили, что на ранних этапах инфекции мутантный вариант вируса LIVP-GFP-A34R значительно превосходит родительский штамм LIVP-GFP по продукции EЕV (см. рис. 1). При этом аттенуированный фенотип вируса LIVP-GFP-A34R не отличался от LIVP-GFP (см. рис. 2).

В ранее выполненных работах показано, что при и/н заражении мышей линии BALB/c пик накопления VACV в легких приходится на 4–5-е сут (Payne, 1980; Lee et al., 1992). Для сравнения эффективности размножения вирусов LIVP, LIVP-GFP и LIVP-GFP-A34R *in vivo* определяли содержание вирусов в слизистой носовой перегородки (первичный очаг инфекции) и легких мышей на 3, 7 и 10-е сут эксперимента. Результаты этих исследований показали (см. рис. 3), что штамм VACV LIVP с гораздо большей эффективностью размножается *in vivo* по сравнению с аттенуированными вариантами VACV LIVP-GFP и LIVP-GFP-A34R. При этом введенные мутации в ген *A34R* не увеличивают накопление LIVP-GFP-A34R в легких мышей по сравнению с LIVP-GFP.

Поскольку наиболее тяжелыми побочными реакциями при вакцинации с использованием живого VACV являются энцефалит и энцефаломиелит, необходимо изучать нейровирулентность получаемых штаммов VACV. Общепринятым методом оценки нейротоксичности VACV является внутримозговое заражение мышей-сосунков (Li Z. et al., 2004). Исследования продемонстрировали (см. рис. 4), что LIVP-GFP и LIVP-GFP-A34R практически не различаются между собой по данному показателю и проявляют значительно сниженную нейровирулентность по сравнению с родительским штаммом LIVP.

Для того чтобы выяснить, как введение мутаций, увеличивающих продукцию EЕV, влияет на иммуногенность VACV, аттенуированного в результате инактивации вирусного гена тимидинкиназы, сыворотки крови мышей, полученные через 28 сут после и/н инфицирования LIVP, LIVP-GFP или LIVP-GFP-A34R разными дозами (10<sup>7</sup> или 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь), оценивали в тесте ИФА по уровню VACV-специфичных антител. Полученные данные (см. рис. 5) показывают, что аттенуированный рекомбинантный штамм LIVP-GFP индуцировал достоверно меньший уровень VACV-специфичных антител по сравнению с исходным штаммом LIVP, а введение целевых мутаций в гене *A34R* привело к значительному увеличению продукции VACV-специфичных IgG в ответ на инфекцию мышей LIVP-GFP-A34R.

## Заключение

Таким образом, увеличение продукции EЕV в результате введения двух точечных мутаций в ген *A34R* рекомбинантного штамма VACV LIVP-GFP не меняет его аттенуированный фенотип, но приводит к существенно большей продукции VACV-специфичных антител.

Следует отметить, что встрайку целевых генов в состав гена тимидинкиназы VACV часто используют при создании рекомбинантных вирусов (Mackett, 1987; Sanchez-Sampedro et al., 2015). Следовательно, полученные в данной работе результаты важно учитывать при конструировании безопасных и эффективных поливалентных живых вакцин на основе VACV.

## Список литературы / References

- Бауэр Т.В., Трегубчук Т.В., Щелкунов С.Н., Максютюв Р.А., Гаврилова Е.В. Получение вируса осповакцины с повышенной продукцией внеклеточных оболочечных вирионов и направляющим синтезом GM-CSF как перспективной основы для создания противоопухолевых препаратов. *Медицинская иммунология*. 2020;22(2):371-378. DOI 10.15789/1563-0625-OVV-1594. [Bauer T.V., Tregubchak T.V., Shchelkunov S.N., Maksyutov R.A., GavriloVA E.V. Obtaining vaccinia virus with increased production of extracellular enveloped virions and directing GM-CSF synthesis as a promising basis for development of antitumor drug. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2020;22(2):371-378. DOI 10.15789/1563-0625-OVV-1594. (in Russian)]
- Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012;S1:33-42. [Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2012;S1:33-42. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н. Противовирусные вакцины: от Дженнера до наших дней. *Соровский образовательный журнал*. 1998;7:43-50. [Shchelkunov S.N. Antivirus vaccines: from Jenner to date. *Sorosovskiy Obrazovatelnyy Zhurnal = Soros Education Journal*. 1998;7:43-50. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах их введения мышам. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375. [Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375. (in Russian)]
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*. 2018;10:e101. DOI 10.3390/v10030101.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9458-9463. DOI 10.1073/10.1073/pnas.1233578100.
- Blasco R., Sisler J.R., Moss B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: Effect of a point mutation in the lectin homology domain of the *A34R* gene. *J. Virol*. 1993;67(6):3319-3325.
- Breiman A., Carpentier D.C.J., Ewles H.A., Smith G.L. Transport and stability of the vaccinia virus A34 protein is affected by the A33 protein. *J. Gen. Virol*. 2013;94:720-725. DOI 10.1099/vir.0.049486-0.
- Dai K., Liu Y., Liu M., Xu J., Huang W., Huang X., Liu L., Wan Y., Hao Y., Shao Y. Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan vaccinia virus with deleted *C12L* and *A53R* genes. *Vaccine*. 2008;26(39):5062-5071. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.06.011.
- Earley A.E., Chan W.M., Ward B.M. The vaccinia virus B5 protein requires A34 for efficient intracellular trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of wrapping and incorporation into progeny virions. *J. Virol*. 2008;82(5):2161-2169. DOI 10.1128/JVI.01971-07.
- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Goncharova E.P., Ruzhenkova J.S., Petrov I.S., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A. Oncolytic virus efficiency inhibited growth of tumour cells with multiple drug resistant phenotype *in vivo* and *in vitro*. *J. Transl. Med*. 2016;14(1):e241. DOI 10.1186/s12967-016-1002-x.
- Guo Z.S., Lu B., Guo Z., Giehl E., Feist M., Dai E., Liu W., Storck W.J., He Y., Liu Z., Bartlett D.L. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *J. Immunother. Cancer*. 2019;7(1):6. DOI 10.1186/s40425-018-0495-7.
- Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future. *Antiviral Res*. 2009;84:1-13. DOI 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- Kirn D.H., Wang Y., Liang W., Contag C.H., Thorne S.H. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res*. 2008;68(7):2071-2075. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-6515.
- Kretzschmar M., Wallinga J., Teunis P., Xing S., Mikolajczyk R. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med*. 2006;3:e272. DOI 10.1371/journal.pmed.0030272.
- Kutinova L., Ludvikova V., Simonova V., Otarova M., Krystoforova J., Hainz P., Press M., Kunke D., Vonka V. Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine*. 1995;13(5):487-493.
- Lee M.S., Roos J.M., McGuigan L.C., Smith K.A., Cormier N., Cohen L.K., Roberts B.E., Payne L.G. Molecular attenuation of vaccinia virus: Mutant generation and animal characterization. *J. Virol*. 1992;66(5):2617-2630.
- Li Y., Zhu Y., Chen S., Li W., Yin X., Li S., Xiao P., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Generation of an attenuated Tiantan vaccinia virus strain by deletion of multiple genes. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017;7:462. DOI 10.3389/fcimb.2017.00462.
- Li Z., Rubin S.A., Taffs R.E., Merchinsky M., Ye Z., Carbone K.M. Mouse neurotoxicity test for vaccinia-based smallpox vaccines. *Vaccine*. 2004;22:1486-1493. DOI 10.1016/j.vaccine.2003.10.022.
- Locker J.K., Kuehn A., Schleich S., Rutter G., Hohenberg H., Wepf R., Griffiths G. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for IMV but not the EEV. *Mol. Biol. Cell*. 2000;11:2497-2511. DOI 10.1091/mbc.11.7.2497.
- Mackett M. Recombinant live virus vaccines. *Immunol. Lett*. 1987;16(3-4):243-248. DOI 10.1016/0165-2478(87)90153-2.
- McIntosh A.A.G., Smith G.L. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J. Virol*. 1996;70(1):272-281.
- McNulty S., Powell K., Erneux C., Kalman D. The host phosphoinositide 5-phosphatase SHIP2 regulates dissemination of vaccinia virus. *J. Virol*. 2011;85(14):7402-7410. DOI 10.1128/JVI.02391-10.
- Monticelli S.R., Earley A.K., Tate J., Ward B.M. The ectodomain of the vaccinia virus glycoprotein A34 is required for cell binding by extracellular virions and contains a large region capable of interaction with glycoprotein B5. *J. Virol*. 2019;93(4):e01343-18. DOI 10.1128/JVI.01343-18.
- Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev*. 2011;239(1):8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.
- Payne L.G. Significance of extracellular enveloped virus in the *in vitro* and *in vivo* dissemination of vaccinia. *J. Gen. Virol*. 1980;50:89-100.
- Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the L1VP-GFP recombinant vaccinia virus. *Dokl. Biol. Sci*. 2013;451(1):248-252. DOI 10.1134/S0012496613040133.
- Phelps A., Gates A.J., Eastaugh L., Hillier M., Ulaeto D.O. Comparative efficacy of intramuscular and scarification routes of administration of live smallpox vaccine in a murine challenge model. *Vaccine*. 2017;35:3889-3896. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.05.058.
- Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. Monkeypox re-emergence in Africa: a call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2019;17(2):129-139. DOI 10.1080/14787210.2019.1567330.

- Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*. 2015;7:1726-1803. DOI 10.3390/v7041726.
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003756. DOI 10.1371/journal.ppat.1003756.
- Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011;29S:D49-D53. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005.
- Shchelkunov S.N., Nesterov A.E., Ryazankin I.A., Ignat'ev G.M., Sandakhchiev L.S. Development of a candidate polyvalent live vaccine against human immunodeficiency, hepatitis B, and orthopoxviruses. *Dokl. Biochem. Biophys*. 2003;390:180-183.
- Shchelkunov S.N., Razumov I.A., Kolosova I.V., Romashchenko A.V., Zavjalov E.L. Virotherapy of the malignant U87 human glioblastoma in the orthotopic xenotransplantation mouse SCID model. *Dokl. Biochem. Biophys*. 2018;478:30-33. DOI 10.1134/S1607672918010088.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Genes that control vaccinia virus immunogenicity. *Acta Naturae*. 2020;12(1):33-41. DOI 10.32607/actanaturae.10935.
- Smith G.L., Vanderplasschen A., Law M. The formation of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol*. 2002;83:2915-2931. DOI 10.1099/vir.0.18733-0.
- Styczynski A., Burgado J., Walteros D., Usme-Ciro J., Laiton K., Farias A.P., Nakazawa Y., Chapman C., Davidson W., Mauldin M., Morgan C., Martinez-Ceron J., Patina E., Lopez Sepulveda L.L., Torres C.P., Cruz Suarez A.E., Olaya G.P., Riveros C.E., Cepeda D.Y., Lopez L.A., Espinosa D.G., Gutierrez Lozada F.A., Li Y., Satheskumar P.S., Reynolds M., Gracia-Romero M., Petersen B. Seroprevalence and risk factors possibly associated with emerging zoonotic vaccinia virus in a farming community, Colombia. *Emerg. Infect. Dis*. 2019;25(12):2169-2176. DOI 10.3201/eid2512.181114.
- Sumner R.P., Ren H., Ferguson B.J., Smith G.L. Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators. *Vaccine*. 2016;34:4827-4834. DOI 10.1016/j.vaccine.2016.08.002.
- Thirunavukarasu P., Sathiah M., Gorry M.C., O'Malley M.E., Ravindranathan R., Austin F., Thorne S.H., Guo Z.S., Bartlett D.I. A rationally designed A34R mutant oncolytic poxvirus: Improved efficacy in peritoneal carcinomatosis. *Mol. Ther*. 2013;21(5):1024-1033. DOI 10.1038/mt.2013.27.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2015;7(4):113-121.

---

#### ORCID ID

S.N. Shchelkunov [orcid.org/0000-0002-6255-9745](https://orcid.org/0000-0002-6255-9745)  
T.V. Bauer [orcid.org/0000-0002-4954-9905](https://orcid.org/0000-0002-4954-9905)  
S.N. Yakubitskiy [orcid.org/0000-0002-0496-390X](https://orcid.org/0000-0002-0496-390X)

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006).

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

Поступила в редакцию 04.08.2020. После доработки 06.10.2020. Принята к публикации 06.10.2020.



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L.

Г.Н. Ралдугина<sup>1</sup>, Т.Ж. Хоанг<sup>1,2</sup>, Х.Б. Нгок<sup>1</sup>, И.В. Карпычев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт сельскохозяйственной генетики, Ханой, Вьетнам

✉ raldugina42@mail.ru

**Аннотация.** Семядольные и листовые экспланты двух сортов ярового рапса (канолы) были трансформированы с использованием *Agrobacterium tumefaciens*, несущими генетическую конструкцию с геном-маркером *gfp*. Для уменьшения доли витрифицированных побегов-регенерантов мы оптимизировали содержание сахарозы в среде регенерации. Анализ потомства, полученного от растений поколения T<sub>0</sub>, показал, что в ряде линий распределение маркера *gfp* не подчинялось сегрегации моногенного признака по Менделю для самоопыляемых растений, в то время как в потомстве других линий маркер *gfp* полностью отсутствовал, хотя его присутствие было подтверждено у всех отобранных растений T<sub>0</sub>. Обнаружено, что у индивидуальных трансформантов *gfp* наследуется случайным образом по всему центральному цветonoсу, его наличие в геноме проростков не зависело от местоположения стручка. Таким образом, в образовании гамет растений T<sub>0</sub> участвовали оба типа клеток – трансформированные и нетрансформированные. Помимо того, сегрегация маркера различалась у растений линий T<sub>1</sub>, полученных черенкованием первичного трансформанта, в зависимости от местоположения черенка на стебле исходного растения, что указывает на химерность растений данного поколения. Далее установлено, что черенкование растений с последующим размножением семенами, образовавшимися в результате самоопыления, приводило к увеличению доли трансгенных растений в следующих поколениях. Полученные результаты показывают, что трансформанты были химерными, т.е. их ткани содержали как трансгенные, так и нетрансгенные клетки, и эта химерность передавалась в последующие поколения. Кроме состава питательных сред, на появление химерных растений во время трансформации влияют такие факторы, как генотип растения и тип экспланта. Основываясь на этих результатах, мы разработали упрощенный метод, состоящий из нескольких раундов комбинации черенкования, получения семян методом самоопыления и последующей отбраковки растений дикого типа, который позволил значительно обогатить популяции потомков исходных трансформантов рапса растениями, трансгенными по маркеру *gfp*.

Ключевые слова: наследование трансгена; трансформация; химера; витрификация (гипергидратация); рапс (канола).

**Для цитирования:** Ралдугина Г.Н., Хоанг Т.Ж., Нгок Х.Б., Карпычев И.В. Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):147-156. DOI 10.18699/VJ21.018

## An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants

G.N. Raldugina<sup>1</sup>, T.Z. Hoang<sup>1,2</sup>, H.B. Ngoc<sup>1</sup>, I.V. Karpichev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> NKLPСB, Agricultural Genetics Institute, Hanoi, Vietnam

✉ raldugina42@mail.ru

**Abstract.** Cotyledon and leaf explants of two spring rapeseed varieties were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* harboring a genetic construct with the *gfp* marker gene. In order to reduce the proportion of hyper-hydrated shoots, which appeared during regenerant formation, we optimized sucrose content in the regeneration media. Analysis of the progeny obtained from T<sub>0</sub> regenerants showed that in a number of lines the distribution of the *gfp* marker did not follow Mendelian segregation of a monogenic trait in self-pollinated plants, while in the progeny of the other lines of transgenic plants, the *gfp* marker was completely absent, although its presence had been confirmed in all selected T<sub>0</sub> plants. We also found that in individual transformants *gfp* is randomly inherited throughout the central peduncle; its presence in the genome of seedlings does not depend on the location of the pod. Thus, both transformed and non-transformed cells were involved in the formation of gametes in T<sub>0</sub> plants. In addition, marker segregation was different in plants of the T<sub>1</sub> line obtained by nodal cuttings of a primary transformant, depending on the location of the cuttings on the stem of the original plant, indicating that the nature of T<sub>1</sub> generation plants was also chimeric. Furthermore, we showed that propagation of plants by cutting followed by propagation by seeds formed as a result of self-pollination led to an increase in the proportion of transgenic plants in subsequent gene-

rations. The results obtained during the course of this study show that the transformants were chimeric, i.e. their tissues contained both transgenic and non-transgenic cells, and this chimeric nature was passed on to subsequent generations. We found that, in addition to nutrient media composition, other factors such as plant genotype and explant type also contribute to the rising of chimeric plants during transformation. Based on these results, we developed a simplified method, which consists of several rounds of a combination of cutting, seed production by self-pollination, and subsequent culling of wild-type plants, which significantly enriched descendent populations of the original rapeseed transformants with plants transgenic for the *gfp* marker.

Key words: transgene inheritance; transformation; chimera; vitrification; rapeseeds.

**For citation:** Raldugina G.N., Hoang T.Z., Ngoc H.B., Karpichev I.V. An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):147-156. DOI 10.18699/VJ21.018

## Введение

Перенос чужеродной ДНК в растения в настоящее время стал обычной процедурой для многих видов. Однако осложнения, возникающие при регенерации побегов, могут препятствовать получению трансгенных растений.

С серьезными проблемами исследователи сталкиваются, когда законы Менделя по какой-то причине нарушаются при наследовании трансгена, интегрированного в геном полученных во время трансформации рекомбинантных растений. Это усложняет как саму экспериментальную работу, так и интерпретацию ее результатов, и потому требует дополнительного тщательного изучения.

Чужеродная ДНК, интегрированная в геном, обычно наследуется по законам Менделя и сегрегирует в строго определенных соотношениях в зависимости от количества локусов интеграции. Но в ряде случаев эти правила нарушаются и трансгены наследуются совершенно случайно (Sarmah et al., 2004; Popelka et al., 2006). В таких случаях предполагают, что неменделевское наследование может быть вызвано различными перестройками, которые происходят во время интеграции трансгенов (Walters et al., 1992; Tizaoui, Kchouk, 2012). Неканоническое наследование можно объяснить и образованием генотипических химер при регенерации растений (Schmülling, Schell, 1993).

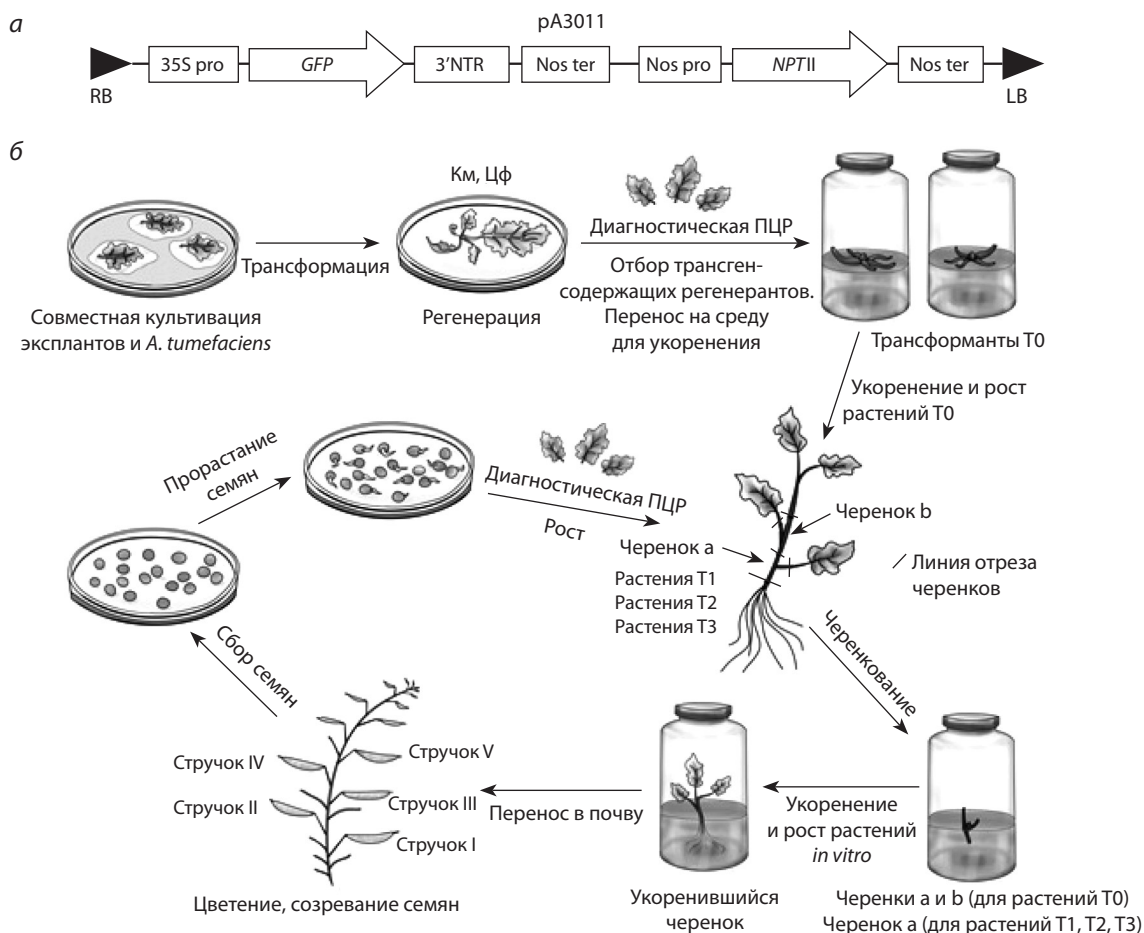
Трансгенные растения-химеры были описаны для многих видов (Costa et al., 2002; Flachowsky et al., 2008). Появление химерных растений во время трансформации может быть обусловлено несколькими причинами, например неэффективностью селективного давления вместе с присутствующей у самих растений эндогенной устойчивостью к селективным агентам (Rakosy-Tican et al., 2007), а также защитой нетрансформированных клеток от действия селективного агента фактор-устойчивыми трансформированными клетками при регенерации (Domínguez et al., 2004). Таким образом, наиболее вероятно, что трансформированные растения-химеры происходят из группы клеток, а не из одной клетки первичного экспланта (Zhu et al., 2007). Причины образования химер редко обсуждаются в литературе, в то время как выяснение этих механизмов поможет устранить возможность появления химер. Выявить причины формирования химер помогает использование генов-репортеров, таких как гены устойчивости к антибиотикам или гербицидам, а также генов, экспрессия которых может вызывать окрашивание или свечение трансформированных клеток (Zvereva, Romanov, 2000). Одним из таких «окрашивающих» репортеров является ген *gfp*, выделенный из люминесцирующей медузы

*Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962). GFP оказался полезным инструментом для мониторинга регенерации побегов во время трансформации у ряда видов растений (Malysenko et al., 2003; Faize et al., 2010).

Образование химерных растений во время регенерации затрудняет дальнейшую работу с трансформантами; при этом доля трансгенных растений в популяции потомства может значительно уменьшаться, как при черенковании, так при размножении растений T0 семенами. Чтобы получить генетически гомогенные трансгенные растения-потомки поколения T0 при использовании вегетативного размножения, необходимо разработать подходы по удалению химер из растений-потомков, созданных данным путем. Для этого сначала необходимо выяснить факторы, способствующие формированию химерных растений рапса, что может быть достигнуто путем изучения наследования маркера *gfp* у потомков первичных регенерантов, полученных при трансформации. Кроме того, мы поставили целью разработать достаточно простой подход, который поможет устранить химеры и обогатить полученные популяции потомков трансформантов растениями, содержащими трансген.

## Материалы и методы

**Получение растительного материала и приготовление эксплантов.** В исследовании использовались два яровых сорта рапса *Brassica napus* L. – Вестар (канадского происхождения) и Подмосковный (русского происхождения). Семядоли пятидневных семян, пророщенных *in vitro*, или сегменты листьев растений, размноженных черенками и затем выращенных *in vitro* в течение 10–12 недель, использовали в качестве эксплантов. Перед прорастанием семена стерилизовали 1 мин 70 % этанолом и 20 мин 20 % раствором промышленного гипохлорита натрия (Доместос, Россия), 5 раз промывали стерильной дистиллированной водой и затем помещали на агаризованную 1/2 среду Мурасиге–Скуга (МС), не содержащую гормонов, с добавлением 0.5 % сахарозы. Чашки Петри с семенами ставили в камеру без света и выдерживали там в течение 24 ч, затем переносили в световую камеру фитотрона с циклом 12/12 ч (день/ночь) при интенсивности освещения 250 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и дневных/ночных температурах 20–22/17–19 °С. Через 5 дней семядольные листья проростков использовали для получения эксплантов. Листовые экспланты получали, разрезая листовую пластинку с предварительно удаленной основной жилкой на 5 мм сегменты.



**Рис. 1.** Схемы использованной генетической конструкции (а) и опыта по обогащению популяций потомков трансгенных растений *gfp*-положительными растениями (б). Создан с помощью программы Paint Tool Sai 2.0.

а – карта области Т-ДНК в составе плазмиды рА3011, которая была использована для трансформации семядольных и листовых эксплантов рапса. 35S pro – промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S; *GFP* – кодирующая область гена GFP; 3'NTR – 3'-нетранслируемая последовательность гена нопалинсинтазы (NOS); Nos ter и Nos pro – соответственно терминатор и промотор гена нопалинсинтазы; *NPTII* – кодирующая область гена неомицинфосфотрансферазы; RB и LB – правая и левая границы Т-ДНК.

б – схема обогащения популяции потомков трансгенных растений *Brassica napus* L. растениями, содержащими маркер *gfp*. *gfp*-положительные растения поколения T0 черенковали, затем черенки (а и б) высаживали в сосуды со средой для укоренения *in vitro*, после чего подросшие саженцы а и б высаживали в почву для получения семян. Для посадки в почву использовали только нижние черенки (а) растений следующего по отношению к T0 поколения. Описанный цикл черенкования и получения семян от растений, выращенных только из нижних черенков, повторяли для поколений T2 и T3 и для последующих поколений при необходимости. Черенки: а – первый (нижний), б – второй (верхний). Диагностическая ПЦР – ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной из одного листа каждого из отдельных регенерантов с праймерами для маркера *gfp*; трансформант T0 – трансген-положительный регенерант; растение T0 – укоренившийся побег-трансформант T0.

Все регенерационные среды содержали 7 г/л агара. Перед добавлением агара и последующим автоклавированием рН сред доводили до 5.8.

**Агробактериальная трансформация и регенерация растений.** Для трансформации растений использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 с генетической конструкцией рА3011, содержащей *gfp* в качестве маркерного гена, и селективным маркером *nptII* (рис. 1, а). Конструкция была любезно предоставлена д-ром Петром Ивановым, кафедра вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Культуры *A. tumefaciens* выращивали в жидкой среде LB, содержащей 50 мг/л рифампицина (Рф) и 50 мг/л канамицина (Км), при энергичном встряхивании при 25 °C в течение 24 ч.

Метод получения трансгенных растений путем совместного культивирования эксплантов с клетками *A. tumefa-*

*ciens* на поверхности агаризованной среды был описан ранее (Malyshenko et al., 2003; Danilova et al., 2009). После 2 дней совместного культивирования в темноте на среде для каллусогенеза (среда МС, содержащая 3 % сахарозы, 2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК), 4 мг/л кинетина, 0.1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д)) оба типа эксплантов переносили на среду для морфогенеза (среда МС, содержащая 0.7 или 1 % сахарозы, 8 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 1.0 мг/л НУК) с добавлением 800 мг/л цефотаксима (Цф), 3 мг/л абсцизовой кислоты (АБК) и 5 мг/л AgNO<sub>3</sub> и затем помещали в световую камеру (световой цикл 12/12 ч день/ночь при интенсивности освещения 250 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, дневная/ночная температура 20–22/17–19 °C). В конце двухнедельной инкубации экспланты переносили на среду для морфогенеза без АБК, но с добавлением 500 мг/л Цф. Для

семядольных эксплантов в зависимости от требований конкретного эксперимента в среду добавляли Км (15 мг/л). Через 5–6 недель сформированные побеги отделяли от эксплантов и помещали на среду для укоренения (0.7 % сахарозы, 1/2 макро-МС, полный набор микроэлементов, 0.1 мг/л НУК). На данной стадии в среду добавляли Цф в концентрации 300 мг/л.

Трансгенные растения поколения T0 обоих сортов, у которых присутствие маркера *gfp* было подтверждено с помощью ПЦР, были расчленены, и как нижний (а), так и верхний (б) черенки были посажены *in vitro* на среду для укоренения (см. рис. 1, б). После формирования корней растения пересаживали в почву и выращивали в фитотроне (цикл 12/12 ч день/ночь при интенсивности света 250 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и дневной/ночной температуре 20–22/17–19 °С) для образования семян. Для анализа распределения трансгенных и нетрансгенных семян в стручках, созревших на цветоносах растений T0 после самоопыления, семена из каждого стручка каждой отдельной кисти собирали и после дезинфекции высевали на поверхность твердой среды 1/2 МС, содержащей 0.5 % сахарозы. Канамицин в среду не добавляли, поскольку трансгенные по *gfp* семена не всегда содержали *nptII* и обе группы семян (как дикого типа, так и *gfp*-трансгенные) плохо прорастали на средах с Км. Проростки подвергали скринингу на маркерные гены с использованием диагностической ПЦР. Для получения растений T1 все семена из стручков каждого отдельного растения T0 смешивали, проращивали, как описано выше, отбирая только *gfp*<sup>+</sup> проростки. Семена, созревшие на растениях последующих поколений, использовали в дальнейших экспериментах. Схема вышеописанных экспериментов приведена на рис. 1, б.

**Скрининг растений на наличие маркерных генов.** Плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток методом щелочного лизиса (Green, Sambrook, 2013). Суммарную ДНК растений для ПЦР-анализа выделяли с использованием метода, описанного в работе (Fulton et al., 1995).

Трансформанты и растения поколений T0, T1 и T2 подвергали скринингу с помощью диагностической ПЦР: на наличие маркера *gfp* – с парой праймеров eGFP\_FW 5'-ССТГААГТТКАТСТГСАССАС-3' и eGFP\_RV 5'АСТССАГСАГСАТГТГАТ-3'; на ген *nptII* – с парой NPT\_FW 5'-ГТГГАГААГГСТАТТССГГСА-3' и NPT\_RV 5'-ССАКАТГАТАТТССГГААГ-3' соответственно. Использовали следующий протокол амплификации: 94 °С – 4 мин, затем 30 циклов амплификации (94 °С – 60 с, 64 °С – 60 с, 72 °С – 60 с) и последняя стадия синтеза при 72 °С в течение 4 мин. ДНК плазмиды pA3011 служила положительным контролем, а геномная ДНК, выделенная из растений рапса дикого типа, – отрицательным. Для определения возможной контаминации T0 растений агробактериями использовали диагностическую ПЦР с парой праймеров для *virD2*: *virD2F* – 5'-ГААССААГАССТТСАГСА-3' и *virD2R* – 5'-АТССАГСАТАТГССГТГАС-3', следуя следующему протоколу амплификации: 94 °С – 4 мин, затем 35 циклов амплификации (94 °С – 60 с, 55 °С – 60 с, 72 °С – 30 с), последняя стадия – синтез при 72 °С в течение 4 мин.

Аmplифицированные фрагменты разделяли в 0.8 % неденатурирующем агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

В качестве дополнительного доказательства трансгенности растений выявляли флуоресценцию белка GFP в органах растений-кандидатов путем освещения тканей растений голубым светом (440–480 нм) с использованием микроскопов AxioPhot или AxioImager (Zeiss, Германия). Пример свечения GFP в трансгенных растениях показан на рис. 2, б.

**Статистический анализ сегрегации.** Пять идентичных экспериментов с выборкой из по меньшей мере 24 эксплантов для каждого эксперимента были проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с использованием статистической программы SPSS v. 9. Для оценки разницы между трансгенным и нетрансформированным растением выполнен *t*-тест Стьюдента. Результаты считали статистически достоверными при  $p \leq 0.05$ .

Частоту трансформации определяли как отношение количества трансгенных *gfp*<sup>+</sup> побегов к общему количеству образовавшихся побегов. Экспериментальные данные были обработаны в программе Microsoft Excel. Критерий  $\chi^2$  рассчитывали по методу Смиряева и Кильчевского (2007).

## Результаты

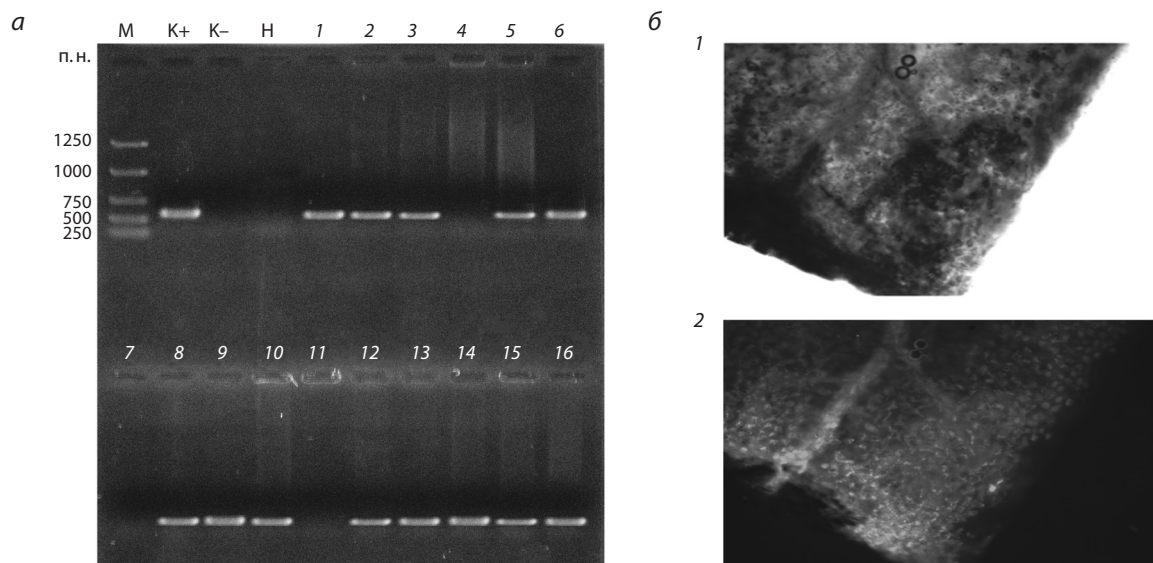
### Поиск оптимальных условий для регенерации побегов на эксплантах рапса

Если содержание сахарозы в среде не оптимизировано, побеги, образующиеся в процессе регенерации, могут витрифицироваться (гипергидратироваться) (Qin et al., 2006). Следует отметить, что в наших экспериментах по трансформации рапса регенерированные растения формировались на эксплантах двух типов, морфологически отличных друг от друга. На семядольных эксплантах образовывались преимущественно хорошо дифференцированные невитрифицированные побеги, тогда как на листовых эксплантах большинство появившихся побегов и зачатков были гипергидратированными, а среди невитрифицированных побегов не было трансгенных. Чтобы минимизировать витрификацию, мы проверили корреляцию содержания сахарозы в среде со степенью гипергидратации регенерантов с использованием листовых эксплантов сорта Вестар. Уменьшив концентрацию сахарозы в среде до 0.7 %, нам удалось значительно снизить степень витрификации регенерированных побегов (табл. 1). Такая среда для морфогенеза была использована во всех последующих экспериментах.

### Наследование маркерных генов, интегрированных в геном рапса

В более ранних исследованиях по трансформации эксплантов семядолей рапса различными генетическими конструкциями (Gomaa et al., 2012; Raldugina et al., 2018) мы показали, что в потомстве самоопыляющихся трансгенных растений сегрегация трансгенов и генов-маркеров часто не подчиняется законам наследования Менделя. Среди потомков самоопыляющихся растений преобладали дикие, а не трансгенные растения. В некоторых случаях





**Рис. 2.** Скрининг растений-кандидатов, полученных путем агробактериальной трансформации, на присутствие маркера *gfp*.  
*а* – диагностическая ПЦР для определения присутствия маркера *gfp* в геномах растений-кандидатов. Тотальную ДНК выделяли из растительного материала и проводили ПЦР в объеме 20 мкл (см. Материалы и методы). Затем 10 мкл алиquotы образцов наносили на 1 % неденатурирующий агарозный гель, содержащий бромид этидия. М – маркер молекулярной массы; К+ – ПЦР с ДНК плазмиды рА3011 (положительный контроль); К– – ПЦР с тотальной ДНК рапса дикого типа (отрицательный контроль); Н – ПЦР с использованием воды вместо ДНК-матрицы (контроль на контаминацию); 1–16 – ПЦР с тотальной ДНК, полученной из растений-кандидатов.  
*б* – флуоресценция белка GFP в клетках мезофилла листа трансформированного растения рапса. Лист трансгенного растения: 1 – в проходящем свете; 2 – в ультрафиолетовом свете, клетки мезофилла видны как светящиеся точки.

**Таблица 1.** Зависимость степени витрификации регенерированных побегов рапса сорта Вестар от концентрации сахарозы в среде

Концентрация сахарозы, %	Частота образования дифференцированных побегов, %	Доля среди дифференцированных побегов, %	
		витрифицированные	трансгенные (частота трансформации)
1.0	7.6 ± 0.3	3.7 ± 0.7	0
0.7	8.7 ± 0.3	1.4 ± 0.4	66.67 ± 19.7

Примечание. Данные представлены как М ± SD, где М – средняя величина, SD – стандартное отклонение.

целевой ген вообще не наследовался. Мы предположили, что эти линии растений на самом деле были химерными. Вероятно, отчасти это происходило по причине того, что нижняя часть химерного побега Т0 была под более сильным селективным давлением, чем апикальная часть, которая располагалась дальше от среды, а также росла позже, когда антибиотик уже мог частично разложиться. Таким образом, нетрансформированные клетки выживали и участвовали в образовании растений поколения Т0.

В дальнейшем мы проанализировали наследование маркерного гена в нескольких последующих за Т0 поколениях. Для этой цели были выбран ген *gfp* в качестве маркера, так как наблюдение за люминесценцией белка GFP должно было бы позволить нам следить за образованием побегов-регенерантов на ранних стадиях. Однако надежных данных с явным доказательством присутствия химеры в сформированных первичных структурах не

было получено (Hoang, Raldugina, 2012), поскольку нам не удавалось отличить трансгенные клетки от нетрансформированных. Свечение наблюдалось в разных частях растений, независимо от генотипа и/или типа экспланта (см. рис. 2, б). Поэтому мы не применяли данный подход в настоящей работе для изучения химерной природы трансгенных растений и факторов, которые могут быть вовлечены в формирование химер. Дальнейшее изучение трансформированных растений проводили с использованием только диагностической ПЦР (см. Материалы и методы). Результаты скрининга растений-кандидатов на наличие маркера *gfp* показаны на рис. 2, а. Полученные методом ПЦР данные подтверждали путем выявления флуоресценции белка GFP в органах растений-кандидатов (см. рис. 2, б).

Кроме того, исходные регенеранты-трансформанты Т0 тестировали с помощью ПЦР на контаминацию агробактериями, как описано в разделе «Материалы и методы». При этом ни одно растение не оказалось контаминированным (результаты не представлены).

#### Наследование маркера *gfp* в Т0 регенерантах

Несколько линий GFP-экспрессирующих растений поколения Т0, полученных на эксплантах обоих сортов, были посажены в почву. Все растения были фертильными и после самоопыления образовали жизнеспособные семена. Собранные семена проращивали в асептических условиях и затем подвергали скринингу на наличие гена-маркера *gfp*.

Чтобы выяснить, какие типы клеток – трансформированные или нетрансгенные, были вовлечены в формирование генеративных органов растений поколения Т0,

**Таблица 2.** Распределение трансгенных и нетрансгенных семян в стручках, образовавшихся на цветоносах трансформированных растений рапса поколения T0

Трансгенная линия	Число трансгенных и нетрансгенных семян ( $gfp^+/gfp^-$ ) и доля трансгенных семян, %				
	Номер стручка				
	1	2	3	4	5
ПС-1	2/8 20	7/1 87.5	7/3 70	3/6 33	НФ –
ПС-2	0/7 0	0/10 0	2/5 28.5	0/8 0	3/3 50
ВС-3	8/2 80	6/1 85.7	4/3 57.1	НФ –	НФ –
ПЛ-4	0/9 0	0/8 0	0/8 0	0/10 0	НФ –
ПЛ-5	0/10 0	0/10 0	0/5 0	0/10 0	НФ –
ВЛ-6	0/10 0	0/8 0	0/8 0	НФ –	НФ –

Примечание. Среда для проращивания семян содержала 0,5х МС и 0,5 % сахарозы. П – сорт Подмосковный; В – сорт Вестар; С – семядольные экспланты; Л – листовые экспланты. Прочерк – семена не всхожие, НФ – семена не сформировались.

мы проверили наследование маркера *gfp* в стручках, сформированных на центральном цветоносе растений каждой из шести отобранных линий. На наличие *gfp* были проанализированы только четыре-пять нижних стручков, собранных с центральных частей цветоноса, поскольку в условиях фитотрона жизнеспособные семена формировались исключительно в этих стручках, а не в расположенных выше. Выяснилось, что *gfp* наследуется случайным образом по всему цветоносу, его присутствие в геноме проростков не зависит от местоположения стручка. Маркер *gfp* был обнаружен лишь в потомстве растений, полученных на эксплантах семядолей (табл. 2). Все семена, собранные на растениях, происходящих из листовых эксплантов, оказались нетрансгенными. Таким образом, в образовании гамет растений поколения T0, образовавшихся на эксплантах семядолей, участвовали оба типа клеток.

#### Наследование маркера *gfp* у растений, размножаемых черенками

Способность растений рапса размножаться вегетативно с помощью стеблевых черенков широко используется для клонирования индивидуальных растений. Мы изучали, зависит ли наследование маркера *gfp* от числа черенкований (см. рис. 1, б). Семена растений T0 дезинфицировали и затем проращивали *in vitro*. Проростки, экспрессирующие GFP, высаживали на корнеобразующую среду. После образования двух междоузлий побеги черенковали, снова укореняли, а растения, образованные из пазушной почки нижнего междоузлия, высаживали в почву (см. рис. 1, б, черенки а). Растения, сформированные из апикальных почек, снова черенковали; после укоренения верхних че-

ренков (б) их также высаживали в почву. Семена, собранные с этих растений, снова высевали, а проростки проверяли на наличие маркера *gfp*.

Статистический анализ данных сегрегации *gfp* с использованием критерия  $\chi^2$  показал, что для черенков а, полученных из трех независимых линий сорта Вестар (В-2, В-3, В-4), наследование *gfp* соответствовало закону Менделя для наследования моногенного признака (табл. 3). Однако для верхних черенков б случайная сегрегация маркера *gfp* наблюдалась на растениях следующего поколения. Только в В-5, где растение, сформированное из нижнего черенка, к сожалению, погибло, сегрегация по Менделю наблюдалась в потомстве растения, выращенного из верхнего черенка.

Для растений сорта Подмосковный сегрегация маркерного гена была совершенно случайной, и его наследования по Менделю никогда не наблюдалось. Однако на каждом растении этого сорта всегда созревало некоторое количество семян, содержащих *gfp*.

Таким образом, растения-потомки, полученные путем самоопыления исходных трансформантов T0, неожиданно для нас тоже оказались, скорее всего, химерными.

#### Наследование маркера *gfp* у растений поколений T1 и T2

Интеграция трансгенных конструкций в один менделевский локус, независимо от количества копий, часто (но не всегда) наблюдается у трансформантов, продуцируемых *Agrobacterium*-опосредованной трансформацией. Исходя из предположения, что трансформанты T0 и клоны T0, полученные из нижних и верхних черенков, содержат вставку маркера *gfp* только в одном локусе, в поколении T1 следует ожидать три класса растений в соответствии с их генотипом.

Чтобы обогатить трансгенные популяции рапса индивидуумами, содержащими маркер *gfp*, для получения потомства T1 можно взять только растения, гомозиготные по маркеру *gfp*. Такие генотипы могут быть идентифицированы путем физического картирования локуса интеграции вставки маркера с последующим отбором гомозигот методом ПЦР-анализа. Альтернативно гомозиготность маркера *gfp* может быть определена с помощью анализа его сегрегации. Сегрегация маркера *gfp* в соотношении 4:0 в следующем поколении будет указывать, что родительские растения были  $gfp^+/gfp^+$  гомозиготами. Однако оба эти подхода трудоемки и требуют много времени, поэтому мы предложили упрощенный метод отбора для обогащения популяций потомков T0 *gfp*-позитивными растениями независимо от генотипа. Хотя трансгенные гетерозиготы при расщеплении в последующих поколениях и будут давать нетрансгенных потомков, но в смысле экспрессии трансгена в популяции данного поколения на практике часто не так важно, являются ли трансгенные растения гетеро- или гомозиготными, главное, чтобы в них имела место вышеупомянутая экспрессия.

Для обогащения трансгенных популяций рапса растениями, содержащими маркер *gfp*, как гами-, так и гомозиготными, мы выбраковывали *gfp*-негативные семена в потомстве T1 и T2. Три линии трансформированных растений сорта Вестар и одну линию сорта Подмосковный

**Таблица 3.** Сегрегация маркера *gfp* у трансгенных растений рапса поколения Т1, полученных из семядольных эксплантов

Трансгенная линия	Черенок	Количество растений потомства Т0			Н <sub>f</sub>	Н <sub>0</sub>	$\chi^2_{\text{theor}}$
		общее	трансгенных ( <i>gfp</i> <sup>+</sup> ) и их доля, %	нетрансгенных ( <i>gfp</i> <sup>-</sup> )			
В-1	a	20	4 (20)	16	0.8 : 3.2	3 : 1	>3.84
	b	21	0	21	0 : 4	3 : 1	НП
В-2	a	24	18 (75)	6	3 : 1	3 : 1	0
	b	42	6 (14.3)	36	0.6 : 3.4	3 : 1	>3.84
В-3	a	18	15 (83.3)	3	3.3 : 0.7 15 : 3	3 : 1 15 : 1	0.67 >3.84
	b	33	16 (48.5)	17	1.9 : 2.1	3 : 1	>3.84
В-4	a	20	16 (80)	4	3.2 : 0.8 15 : 3.75	3 : 1 15 : 1	0.27 >3.84
	b	37	14 (37.8)	23	1.5 : 2.5	3 : 1	>3.84
В-5	a	Растение погибло					
	b	31	24 (77.4)	7	3.1 : 0.9	3 : 1	0.10
В-6	a	Растение погибло					
	b	18	0	18	0 : 4	3 : 1	НП
П-7	a	47	7 (14.9)	40	0.6 : 3.4	3 : 1	>3.84
	b	Растение погибло					
П-8	a	37	19 (51.3)	18	18	2 : 2	3 : 1
	b	40	17 (42.5)	23	23	1.7 : 2.3	3 : 1
П-9	a	39	5 (12.8)	34	34	0.5 : 3.5	3 : 1
	b	30	11 (36.7)	21	21	1.5 : 2.5	3 : 1

Примечание. Стандартное значение  $\chi^2_{\text{theor}} = 3.84$  ( $p \leq 0.05$ ). Н<sub>0</sub> и Н<sub>f</sub> – теоретическая и фактическая сегрегация соответственно; В – Вестар; П – Подмосковский; а и b – нижний и верхний черенки соответственно; НП – неприменимо.

**Таблица 4.** Доли (%) *gfp*<sup>+</sup> растений в трех последовательных поколениях трансформированных растений

Трансгенная линия	Т1	Т2	Т3
В-3b <i>gfp</i> <sup>+</sup> / <i>gfp</i> <sup>-</sup>	16/17	16/5	17/1
Трансгенные семена, %	48.5	76.2	94.4
В-4b <i>gfp</i> <sup>+</sup> / <i>gfp</i> <sup>-</sup>	14/23	17/4	16/2
Трансгенные семена, %	37.8	80.9	88.9
В-5b <i>gfp</i> <sup>+</sup> / <i>gfp</i> <sup>-</sup>	24/7	10/11	12/6
Трансгенные семена, %	77.4	47.6	66.7
П-8b <i>gfp</i> <sup>+</sup> / <i>gfp</i> <sup>-</sup>	17/23	16/5	14/2
Трансгенные семена, %	45.5	76.2	87.5

Примечание. Проанализированы растения, происходящие из верхних черенков (b), поскольку некоторые растения, происходящие из нижних черенков, не выжили после пересадки в почву. В – Вестар, П – Подмосковский.

выращивали из верхних черенков (нижние черенки не использовали, так как некоторые из них погибли) (табл. 4).

Семена, полученные методом самоопыления, затем проращивали и проверяли на наличие маркера *gfp*. Проростки с *gfp* брали для черенкования, когда образовывалось одно междоузлие. В этом случае верхние черенки (b) трансгенных растений Т2 и Т3 высаживали в землю.

Результаты ПЦР-анализа показали, что процентное содержание *gfp*-негативных семян в общем количестве семян, продуцируемых растениями поколений Т2 и Т3, уменьшилось, хотя абсолютное количество трансгенных семян для каждого тестируемого растения осталось примерно на одном уровне.

## Обсуждение

### Влияние сахарозы на степень витрификации побегов-регенерантов

Образование витрифицированных побегов у многих видов растений зависит от содержания сахарозы в питательной среде (Sharma, Thorpe, 1989; Qin et al., 2006). В этом исследовании мы показали, что уменьшение концентрации сахарозы в среде для регенерации до 0.7 % приводило к снижению степени витрификации побегов рапса (см. табл. 1). Это соответствует результатам, описанным в работе (Yu et al., 2011) для регенерации гипокотильных сегментов проростков брокколи.

### Наследование маркера *gfp* у растений рапса поколения Т0

Анализ распределения трансгенных и нетрансгенных семян на цветоносах каждого растения Т0 семядольного происхождения показал, что во время роста кистей и формирования стручков распределение маркера *gfp* было

совершенно случайным, не зависело от местоположения стручка (см. табл. 2). Случайный характер наследования позволяет предполагать, что эти растения, вероятно, были химерными. Возможно, такое распределение обусловлено образованием гамет из трансгенных и нетрансформированных клеток. Многие исследователи, изучавшие наследование трансгенов у разных видов растений, предполагают, что искажение сегрегации может отражать стерильность одного типа гамет. Aragão с коллегами (1996) объяснили сегрегацию в соотношении 1 : 1, наблюдаемую у потомства трансгенных растений сои, нежизнеспособностью трансгенной пыльцы. Другие исследователи предположили, что отсутствие ожидаемой сегрегации в потомстве, происходящем от скрещивания трансгенных и нетрансформированных растений кукурузы, может быть связано с нежизнеспособностью пыльцы в трансгенных растениях, вызванной неудачной интеграцией трансгена (Walters et al., 1992). Неканоническая сегрегация также может быть объяснена химерной природой трансгенных растений, в которых часть гамет образована из нетрансформированных клеток. Ниеі с соавторами (1994) отмечают необычную сегрегацию гена-маркера *gus* в потомстве трансформантов риса, поскольку популяция растений T0 состояла исключительно из химерных растений.

Меристематические образования на эксплантах, образующиеся во время морфогенеза, состоят из корпуса и оболочки, причем последняя содержит несколько слоев, обозначаемых, начиная с внешнего слоя, как L1, L2, L3 и т. д. (Tooke, Battey, 2003). Каждый слой меристемы отвечает за развитие определенных растительных тканей и органов. Например, слой L2 обеспечивает формирование пыльцы и семян (растительные цветочные органы) (Irish, 1991). По-видимому, трансформированные клетки присутствуют преимущественно во внешнем слое L1 (Tooke, Battey, 2003). Мы предположили, что регенеранты, образованные на семядольных эксплантах, происходили в основном из слоя L2 с участием слоев L1 и L3. На листовых эксплантах формирование побегов, вероятно, шло исключительно из клеток слоя L3, где трансформированные клетки не обнаруживаются.

Чтобы подтвердить это предположение, мы проанализировали сегрегацию маркера *gfp* в потомстве исходных трансформантов. Почти для всех растений были выявлены существенные отклонения от менделевского соотношения сегрегации 3 : 1 (один локус интеграции *gfp*) (см. табл. 3, черенки а). Статистическая оценка данных о сегрегации гена *gfp* в популяции T0 растений рапса, размноженных черенкованием, была выполнена с использованием критерия  $\chi^2$ , учитывая, что во время агробактериальной трансформации маркер *gfp* интегрировался в геном рапса только в одном локусе. Следует отметить, что некоторые линии, например В-3а и В-4а, на которых вызревало не менее 80 % *gfp*-содержащих семян, могли иметь два или даже больше локусов интеграции маркерного гена в одной или в разных хромосомах (см. табл. 3, полужирные цифры). Это предположение, однако, не меняет сделанного ранее заключения, касающегося химерной природы растений T0, поскольку ни одно из растений не продуцировало *gfp*<sup>+</sup> семена с долей около 95 %, что соответствовало бы сегрегации с соотношением 15 : 1 для дигенного признака.

Следовательно, линии В-3а и В-4а, наверное, тоже были химерными. И по-видимому, большинство оригинальных трансформантов были химерными. Таким образом, ткани их половых органов могли происходить одновременно из трансформированных и нетрансформированных клеток, образуя химерную меристему, где нетрансгенные клетки, вероятно, делились быстрее, чем трансгенные. Мы предположили, что при низком селективном давлении при росте побегов в какой-то момент в побегах начали преобладать нетрансформированные клетки.

Впоследствии мы проверили эту гипотезу, срезая побеги, выросшие непосредственно на экспланте (растения T0, см. рис. 1, б), и выращивая полученные из них растения для образования семян. Обнаружено, что тип сегрегации маркера зависит от конкретного побега-регенеранта, взятого для выращивания взрослого растения, которое позже образовывало семена.

### Сегрегация маркера *gfp*<sup>+</sup> у потомства растений, полученных черенкованием

Статистическая оценка данных сегрегации маркера *gfp* показала (см. табл. 3), что у некоторых растений, полученных из нижних черенков (черенки а, см. рис. 1, б, линии В-2, В-3 и В-4), наблюдалась сегрегация в соотношении 3 : 1. В то же время у растений, происходивших из верхней части побега этого же растения (черенки б), маркер распределялся случайным образом. Таким образом, у большинства растений T1 наследование *gfp* зависело от расположения черенка, подтверждая, что они были химерными. Следовательно, отбор оригинальных побегов, срезаемых непосредственно с экспланта, несмотря на положительный результат их тестирования на маркер *gfp* без предварительных раундов дополнительного вегетативного размножения черенками, может привести к отбору химерных трансформантов, а в следующих поколениях – к повышению доли нетрансгенных растений в популяции.

Описанный выше подход позволил нам идентифицировать предполагаемые химеры, которые должны быть каким-то образом исключены из популяции трансгенных растений. Некоторые исследователи, например Chen (2011), чтобы избавиться от химер среди трансформантов *Lesquerella fendleri*, рекомендуют проводить несколько раундов последовательных регенераций на эксплантах полученных трансформантов, каждый раз выбирая побеги, экспрессирующие маркерный ген *gus*. Используя этот подход, автору удалось снизить долю химерных побегов с 80–90 до 2.2 % без увеличения концентрации селективного антибиотика, который сильно ингибировал морфогенез при добавлении в высоких концентрациях в среду регенерации.

Аналогичный подход, включающий последовательные субкультивирования листовых эксплантов, вырезанных из химерных трансгенных растений, рекомендован для производства трансгенных растений табака без маркера (Li et al., 2009). С помощью этой процедуры исследователям удалось снизить долю химерных растений в трансгенной популяции с 60–80 до 4–8 %.

Перечисленные подходы применяются, когда растения-трансформанты необходимо размножить вегетативно,



например черенкованием. В случае размножения семенами, например самоопылением, следующие поколения растений, казалось бы, должны быть «очищены» от химерности. Однако, к нашему удивлению, T1 растения, полученные путем самоопыления исходных трансформантов, тоже оказались химерными. Наиболее очевидное объяснение данного феномена – нестабильность маркера *gfp* в геноме трансформантов. Но «генетическое восстановление» – механизм менделевского наследования внегеномной информации, впервые обнаруженный у *Arabidopsis thaliana*, также может иметь место в нашем случае (Lolle et al., 2005). Было показано, что несколько независимых мутантных штаммов арабидопсиса продуцировали явно нормальное потомство с высокой частотой (до нескольких процентов), что выше, чем можно было бы ожидать, если бы речь шла о случайных обратных мутациях. Lolle с коллегами (Lolle et al., 2005) предположили, что это происходит из-за точной реверсии исходной ДНК по механизму, включающему управляемое этой матрицей восстановление исходной предковой ДНК, которая ранее была передана «на хранение» в так называемый кэш РНК. Феномен, называемый гипотезой «кэш РНК», означает, что организмы могут иногда восстанавливать свою ДНК до предковой на основе матрицы «кэш РНК», унаследованных от прошлых поколений (Lolle et al., 2005). Гипотеза кэширования РНК оспаривалась рядом авторов (Comai, Cartwright, 2005; Mercier et al., 2008; Miyagawa et al., 2013). Однако недавно было показано наличие РНК-кэша участков генома и даже полноразмерных хромосом у некоторых организмов (Byeon, Kovalchuk, 2016; Lindblad et al., 2017). Возможно, в нашем случае данный механизм работает только для части клеток, что и приводит к появлению химер.

### Наследование маркера *gfp* у трансформантов рапса поколений T1 и T2

Определение количества трансгенных и нетрансгенных проростков из семян, образовавшихся на растениях поколений T1 и T2, полученных из верхних черенков (b) первичных трансформантов, показало, что с каждым последующим поколением доля *gfp*<sup>-</sup> семян уменьшалась (см. табл. 4, рис. 1, б). При этом общее количество семян тоже уменьшалось, но в меньшей степени. Поскольку клетки дикого типа участвуют в формировании пула гамет в химерных растениях T1, в потомстве T0 наблюдается более высокая доля растений дикого типа по сравнению с потомством T1. Сегрегация 3:1 отмечалась для большинства линий растений T1, скорее всего, потому, что в этих линиях произошла интеграция маркера *gfp* только в одном локусе генома. Что касается увеличения доли *gfp*<sup>+</sup> растений в потомстве T2 по сравнению с их родителями T1, то объяснение этому, вероятно, следует искать в несоблюдении условий, необходимых для реализации закона Менделя для сегрегации моногенного признака. Для большинства организмов, размножающихся половым путем, случаи, когда законы Менделя могут строго объяснять все типы наследования, относительно редки. Часто модели наследования являются более сложными (Schacherer, 2016). Также возможно, что несоблюдение закона сегрегации моногенных признаков в нашем случае

связано с выращиванием растений в условиях фитотрона, а не в естественной среде (влияние эпигенетических факторов и РНК-кэширования?). Однако изучение этих феноменов выходит за рамки настоящего исследования.

### Заключение

В данном исследовании мы показали, что большинство регенерировавших в наших опытах трансгенных растений рапса являются химерами. К сожалению, нам не удалось выяснить, какие факторы определяют образование химерных трансгенных растений. Однако удалось продемонстрировать, что некоторые факторы могут быть связаны с появлением химерных растений во время трансформации. Это генотип растения, тип экспланта, используемого для трансформации, а также питательные среды для трансформации и регенерации. Мы также обнаружили, что химерность по каким-то причинам может передаваться в последующие поколения.

Согласно сообщениям других групп исследователей, в процессе создания трансгенных растений в некоторых случаях возникают и химерные растения. Как правило, их отбраковывают, оставляя только те регенеранты, в которых наблюдается менделевская сегрегация, и обычно только одного конкретного трансгена. Кроме того, наследование этих трансгенов в растениях, размножающихся с помощью черенкования, обычно не изучается. Весь регенерированный побег трансформированного растения высаживают в почву, затем выделяют суммарную ДНК из листового материала и проверяют ПЦР-анализом на трансгенность. Мы же, напротив, сначала размножали растения путем черенкования, затем сажали полученные черенки в почву и только потом изучали сегрегацию маркера *gfp*; и этот раунд отбора должен был повторяться по меньшей мере два-три раза. Используемый нами упрощенный подход позволил значительно увеличить долю растений, содержащих маркер *gfp*, в популяциях потомков трансформированных растений рапса.

### Список литературы / References

- Смирязев А.В., Кильчевский А.В. Генетика популяций и количественных признаков. М.: КолосС, 2007.
- [Smiryayev A.V., Kilchevsky A.V. Genetics of Populations and Quantitative Traits. Moscow: KolosS Publ., 2007. (in Russian)]
- Aragão F.J.L., Barros L.M.G., Brasileiro A.C.M., Ribeiro S.G., Smith F.D., Sanford J.C., Faria J.C., Rech E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93:142-150. DOI 10.1007/BF00225739.
- Byeon B., Kovalchuk I. Non-coding RNAs match the deleted genomic regions in humans. *Sci. Rep.* 2016;6:37452. DOI 10.1038/srep37452.
- Chen G.Q. Effective reduction of chimeric tissue in transgenics for the stable genetic transformation of *Lesquerella fendleri*. *HortScience.* 2011;46:86-90. DOI 10.21273/HORTSCI.46.1.86.
- Comai L., Cartwright R.A. A toxic mutator and selection alternative to the non-Mendelian RNA cache hypothesis for *hothead* reversion. *Plant Cell.* 2005;17:2856-2858. DOI 10.1105/tpc.105.036293.
- Costa M.G.C., Otoni W.C., Moore G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 2002;21:365-373. DOI 10.1007/s00299-002-0533-1.
- Danilova S.A., Kusnetsov V.V., Dolgikh Yu.I. A novel efficient method for maize genetic transformation: usage of agrobacterial monolayer.

- Russ. J. Plant Physiol.* 2009;56:258-263. DOI 10.1134/S1021443709020150.
- Domínguez A., Cervera M., Pérez R.M., Romero J., Fagoaga C., Cubero J., López M.M., Juárez J.A., Navarro L., Peña L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol. Breed.* 2004;14:171-183. DOI 10.1023/B:MOLB.0000038005.73265.61.
- Faize M., Faize L., Burgos L. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnol.* 2010;10:53. DOI 10.1186/1472-6750-10-53.
- Flachowsky H., Riedel M., Reim S., Hanke V. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electron. J. Biotechnol.* 2008;11(1):26-40. DOI 10.4067/S0717-34582008000100003.
- Fulton T.M., Chunwongse J., Tanksley S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1995;13:207-209. DOI 10.1007/BF02670897.
- Gomaa A.M., Raldugina G.N., Burmistrova N.A., Radionov N.V., Kuznetsov V.I.V. Response of transgenic rape plants bearing the *OsMyb4* gene from rice encoding a trans-factor to low above-zero temperature. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(1):105-114. DOI 10.1134/S1021443711060070.
- Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th edn. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 1994;6:271-282. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1994.6020271.x.
- Hoang T.G., Raldugina G.N. Regeneration of transgenic plants expressing the *gfp* gene from rape cotyledonary and leaf explants: effects of the genotype and ABA. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(3):406-412. DOI 10.1134/S1021443712030089.
- Irish V.F. Cell lineage in plant development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1991;1:169-173. DOI 10.1016/s0959-437x(05)80065-6.
- Li B., Xie C., Qiu H. Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Rep.* 2009;28:373-386. DOI 10.1007/s00299-008-0640-8.
- Lindblad K.A., Bracht J.R., Williams A.E., Landweber L.F. Thousands of RNA-cached copies of whole chromosomes are present in the ciliate *Oxytricha* during development. *RNA.* 2017;23(8):1200-1208. DOI 10.1261/ma.058511.116.
- Lolle S.J., Victor J.L., Young J.M., Pruitt R.E. Genome wide non-Mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature.* 2005;434:505-509. DOI 10.1038/nature03380.
- Malyschenko S.I., Tyul'kina L.G., Zvereva S.D., Raldugina G.N. Transgenic *Brassica campestris* plants expressing the *gfp* gene. *Russ. J. Plant Physiol.* 2003;50(2):276-281. DOI 10.1023/A:1022997803459.
- Mercier R., Jolivet S., Vignard J., Durand S., Drouaud J., Pelletier G., Nogué F. Outcrossing as an explanation of the apparent unconventional genetic behavior of *Arabidopsis thaliana* *hth* mutants. *Genetics.* 2008;180:2295-2297. DOI 10.1534/genetics.108.095208.
- Miyagawa Y., Ogawa J., Iwata Y., Koizumi N., Mishiba K.-I. An attempt to detect siRNA-mediated genomic DNA modification by artificially induced mismatch siRNA in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 2013; 8(11):e81326. DOI 10.1371/journal.pone.0081326.
- Popelka J.C., Stephanie G., Moore A., Molvig L., Higgins T.J.V. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Rep.* 2006;25: 304-312. DOI 10.1007/s00299-005-0053-x.
- Qin Y., Gao L.H., Pulli S., Guo Y.D. Shoot differentiation, regeneration of cauliflower and analysis of somaclonal variation by RAPD. *Hereditas.* 2006;143:91-98. DOI 10.1111/j.2006.0018-0661.01944.x.
- Rakosy-Tican E., Aurori C.M., Dijkstra C., Thieme R., Aurori A., Davey M.R. The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Rep.* 2007;26:661-671. DOI 10.1007/s00299-006-0273-8.
- Raldugina G.N., Maree M., Mattana M., Shumkova G., Mapelli S., Kholodova V.P., Karpichev I.V., Kuznetsov V.I.V. Expression of rice *OsMyb4* transcription factor improves tolerance to copper or zinc in canola plants. *Biol. Plant.* 2018;62:511-520. DOI 10.1007/s10535-018-0800-9.
- Sarmah B.K., Moore A., Tate W., Molvig L., Morton R.L., Rees D.P., Higgins T.J.V. Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Mol. Breed.* 2004;14(1):73-82. DOI 10.1023/b:molb.0000037996.01494.12.
- Schacherer J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *C. R. Biologies.* 2016;339(7-8):284-288. DOI 10.1016/j.crv.2016.04.006.
- Schmülling T., Schell J. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Mol. Biol.* 1993;21:705-708. DOI 10.1007/BF00014554.
- Sharma K.K., Thorpe T.A. *In vitro* regeneration of shoot buds and plantlets from seedling root segments of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1989;18:129-141. DOI 10.1007/BF00033471.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962;59:223-239. DOI 10.1002/jcp.1030590302.
- Tizaoui K., Kchouk M.E. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genet. Mol. Biol.* 2012;35:640-649. DOI 10.1590/S1415-47572012000400015.
- Tooke F., Battey N. Models of shoot apical meristem function. *New Phytol.* 2003;159:37-52. DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00803.x.
- Walters D.A., Vetsch C.S., Potts D.E., Lundquist R.C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 1992;18:189-200. DOI 10.1007/BF00034948.
- Yu U., Zhao Y.-Q., Zhao B., Ren S., Guo Y.-D. Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of *in vitro* regeneration in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Can. J. Plant Sci.* 2011;91:159-165. DOI 10.1139/CJPS10034.
- Zhu X.Y., Zhao M., Ma S., Ge Y.M., Zhang M.F., Chen L.P. Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep.* 2007;26:1727-1732. DOI 10.1007/s00299-007-0398-4.
- Zvereva S.D., Romanov G.A. Reporter genes for plant genetic engineering: characteristics and detection. *Russ. J. Plant Physiol.* 2000; 47:424-432. Record Number: 20001614176.

#### ORCID ID

G.N. Raldugina orcid.org/0000-0002-3349-8461  
T.G. Hoang orcid.org/0000-0001-6891-0121

**Благодарности.** Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, государственный номер регистрации госзадания АААА-А19-119081990032-1. Авторы выражают благодарность д-ру Петра Иванову за предоставленную плазмиду pA3011, д-ру Юлии Долгих за полезные обсуждения во время подготовки рукописи, Екатерине Платоновой и Ольге Шамоной за помощь в подготовке рисунков.

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

Поступила в редакцию 16.09.2020. После доработки 23.01.2021. Принята к публикации 27.01.2021.

# A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy

N.P. Malakhova<sup>1,2</sup>✉, Y.A. Skiba<sup>1,2,3</sup>, G.A. Iskakova<sup>1,2</sup>, D.A. Naizabayeva<sup>1,3</sup>, B.K. Tezekbaeva<sup>1,2</sup>, G.A. Ismagulova<sup>1,2,3</sup>, E.R. Maltseva<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>3</sup> Almaty Branch of National Center for Biotechnology in the Central Reference Laboratory, Almaty, Kazakhstan

✉ tasha\_malakhova@mail.ru

**Abstract.** The method of biological ballistics (biolistic transformation, genetic bombardment) of plants is one of the most modern methods used for direct gene transfer into plant cells. The main advantages of this method include the ability to simultaneously incorporate several target genes into the plant genome, carry out transfer without unnecessary agrobacterial parts and plasmid DNA sequences, and the short time needed to produce transgenic cells. For different plant objects, the efficiency of obtaining transgenic plants by the ballistic method varies from 1 to 3 %. For potato plants, the transformation efficiency is quite low at the moment and the selection of optimal conditions for biolistics is one of the pressing issues of practical biotechnology. This article presents a successful experience of introducing two genes of interest into two potato varieties using the biolistic approach. The results of biolistic transformation experiments are presented for two types of explants: potato internodes and calli of the varieties Aksor and Nevskiy. Of the 862 explants used for transformation, 56 regenerated plants were obtained. PCR screening of transformants revealed one plant with the insertion of the chitinase gene, one with the insertion of the endo- $\beta$ -1,3-glucanase gene, and co-transformation by both genes was confirmed in four regenerants. The average transformation efficiency for potato explants was 0.7 %. A high number of regenerants (56) as opposed to a low number of transformants (6) reflects an attempt to increase the number of regenerants by using a lower concentration of the selective agent (kanamycin). Although this approach requires more effort, it can be used to produce potato lines with integrated genes of interest for further use in crop breeding. The lines of potato obtained in the current study by introducing two genes associated with the plant response to fungal pathogens will be further assessed for their resistance to fungal diseases and, if successful, will be used in potato crop breeding.

Key words: biolistic transformation; potato; explant; internodes; calli; biotechnology.

**For citation:** Malakhova N.P., Skiba Y.A., Iskakova G.A., Naizabayeva D.A., Tezekbaeva B.K., Ismagulova G.A., Maltseva E.R. A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):157-163. DOI 10.18699/VJ21.019

## Положительный опыт применения биобаллистического подхода к картофелю сортов Аксор и Невский

Н.П. Малахова<sup>1,2</sup>✉, Ю.А. Скиба<sup>1,2,3</sup>, Г.А. Искакова<sup>1,2</sup>, Д.А. Найзабаева<sup>1,3</sup>, Б.К. Тезекбаева<sup>1,2</sup>, Г.А. Исмагулова<sup>1,2,3</sup>, Э.Р. Мальцева<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Институт биологии и биотехнологии растений Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

<sup>3</sup> Филиал Национального центра биотехнологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

✉ tasha\_malakhova@mail.ru

**Аннотация.** Метод биобаллистической трансформации растений – один из наиболее современных способов, используемых для прямого переноса генов в клетки растений. К главным преимуществам этого метода относятся возможность одновременно встраивать в геном растений несколько целевых генов, проводить перенос без лишних агробактериальных участков и последовательностей плазмидной ДНК, а также короткие сроки получения трансгенных клеток. В среднем для разных объектов эффективность получения трансгенных растений баллистическим методом варьирует от 1 до 3 %. Для растений картофеля на сегодняшний момент эффективность трансформации довольно низкая, и подбор оптимальных условий проведения биобаллистики является одним из актуальных вопросов практической биотехнологии. В данной статье представлен положительный опыт внедрения двух генов интереса в два сорта картофеля с использованием подходов биобаллистики. Представлены результаты экспериментов по биобаллистической трансформации двух видов эксплантов – междоузлий и каллусов картофеля сортов Аксор и Невский. Из 862 эксплантов,



подвергнутых трансформации, получено 56 растений-регенерантов. В результате скрининга трансформантов методом ПЦР выявлено одно растение со вставкой гена хитиназы, одно со вставкой гена эндо- $\beta$ -1,3-глюканазы и в четырех регенерантах подтверждена котрансформация обоими генами. Средняя эффективность трансформации эксплантов картофеля составила 0.7 %. Большое число растений-регенерантов (56) по отношению к числу трансформантов (6) отражает попытку увеличить количество регенерантов использованием низких концентраций селективного агента (антибиотика канамицина). Хотя этот подход требует заметных усилий, он может применяться для получения линий картофеля со вставкой генов интереса для их дальнейшего использования в селекции. Линии картофеля, полученные в данном исследовании после внедрения двух генов, связанных с устойчивостью растений к грибным патогенам, будут в дальнейшем оцениваться на устойчивость к грибным заболеваниям и в случае успешного прохождения испытаний будут включены в селекционный отбор.

Ключевые слова: биобаллистическая трансформация; картофель; эксплант; междоузлия; каллусы; биотехнология.

## Introduction

Modern biotechnological studies dedicated to the transformation of potatoes use a number of approaches based on both direct gene transfer and agrobacteria. The agrobacterial approach has traditionally been used to transform potato leaves, internodes, and tubers. This is due to the good susceptibility of potato plants to agrobacteria, and this method serves best when it is necessary to transfer one gene to the genome of the host plant. If the goal of research is the introduction of several genes into the genome at once, with their coordinated integration and expression, then the method of choice will be the biolistic transformation (Romano et al., 2001; Craig et al., 2005).

It is known that the effectiveness of biolistic transformation depends on a large number of factors, including the number of embryogenic cells, their regenerative ability, the number of DNA-coated particles, and the amount of DNA that is bound to the particles (Rivera et al., 2012). However, in case of potatoes the transformation success also largely depends on the genotype of the plant (Jo et al., 2014).

Despite the fact that the method of biolistic transformation has been used for about 20 years and has become routine for some crops (Taylor, Fauquet, 2002), it is still rarely used for potatoes. The first work on the bombardment of potatoes was published in 2001 (Romano et al., 2001), but since then the number of such works has not exceeded a dozen. The sizes of introduced sequences (Ercolano et al., 2004), the comparison with PEG-mediated transformation of protoplasts (Craig et al., 2005) and even the possibility of conducting bombardment with agrobacterial cells carrying three genes of interest were studied (Nguyen et al., 2001).

According to available literature, the efficiency of potato transformation largely depends on the explants for bombardment: for leaves, it is 0.02 plants per transformed explant; this index is higher for micro-tuber slices (0.1 plants per transformed explant), and the maximum result is achieved when using internodes (0.77 plants per transformed explant) (Romano et al., 2001).

However, to date, there are not enough comparable data in the literature on the effectiveness of transformation using the bombardment method depending on the type of explants. The explant type mostly used in the studies where transformation efficiency was indicated in numbers was potato leaves. For example, Craig et al. (2005) indicate 0.5 transformation events per leaf as efficiency, and Nguyen et al. (2001) confirm these numbers, indicating that the transformation efficiency was

similar to Craig's data. The only comparable data available in the literature are the data by Romano et al. (2001).

In addition, all works that somehow describe the effectiveness of transformation state that it depends on the genotype, with a special mention of "low frequency of the appearance of regenerants selected using kanamycin" (Ercolano et al., 2004). The experiments performed by Jo and colleagues (Jo et al., 2014) even show that marker-free transformation is more prone to the characteristics of the variety compared to marker-mediated transformation. The authors suggest that this may be due to the variety-specific features of antibiotic tolerance, which gives transformed cells different opportunities for shoot development.

Although the interest in biolistic transformation for its use in potato breeding increases, more studies on the application of method are needed to establish the most suitable explant type and fine-tune the procedures for both bombardment and post-bombardment stages.

The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the biolistic transformation of potatoes depending on the plant explant type.

## Materials and methods

The object of study was potato of two varieties – Aksor and Nevskiy. Aksor is a potato variety of Kazakhstan's breed, characterized by relative heat resistance, drought resistance, and disease resistance ([http://www.kartofel.org/cultivars/reg\\_cult/aksor.pdf](http://www.kartofel.org/cultivars/reg_cult/aksor.pdf)). Nevskiy is a potato variety of Russian selection, medium early, high-yielding, poorly resistant to fusarium infection (<http://www.kartofel.org/katalog/katalog1.pdf>).

**Preparing plant explants for transformation.** Explant type 1. The internodes of test plants (21–28 days old), grown on the medium for test tube plants, were longitudinally cut into segments and directly exposed to OSS osmotic medium with cut side up (composition of the medium is provided below in the corresponding section) 24 hours before the bombardment (Sanford et al., 1993).

Explant type 2. A two-week callus was obtained from potato plants cultivated on the medium for test tube plants, cut along internodes and put with cut side up on callus-inducing medium. Resulting callus was transferred to osmotic medium and simultaneously embryogenic callus was selected with the control of a stereoscopic microscope (Sambrook et al., 1989).

**Genetic constructs for potato transformation.** The full-size genes – class I chitinase and potato endo- $\beta$ -1,3-gluca-



**Table 1.** The composition of the media used in the study

Parameter	Test tube plants' Medium	Callus-inducing Medium	Osmotic Medium (OSS)	Selection Medium	Regeneration Medium
Murashige–Skoog Basal Medium, g/l	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Murashige–Skoog vitamins, ml/l	1	1	1	1	1
Sucrose, g/l	30	30	30	30	30
Agar, g/l	8	8	8	8	8
2,4-D, mg/l	–	2	2	2	–
Mannitol, g/l	–	–	36.43	–	–
Zeatin, mg/l	–	0.5	–	0.5	0.5
Kanamycin, mg/l	–	–	–	20	20
Gibberellic acid, mg/l	–	–	–	–	2

nase – were cloned from the potato variety Aksor induced by *Fusarium solani* (Chirkin et al., 2016). The genes were excised from pUC57 vector by *Bam*HI and *Sac*I sites and independently cloned to pBI121 vector containing the selective kanamycin resistance gene, resulting in two separate genetic constructs. Minimal expression unit (MEU) was excised from the vector with *Eco*RI and *Bg*II restriction endonucleases.

**Biolistic transformation of potato embryogenic callus and internodes.** The biolistic transformation of the potatoes was carried out on PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) device at vacuum pressure of 91.4–94.8 kPa, using gold particles bound to DNA according to the manufacturer’s instructions. For each experiment, 100 ng of elution-purified MEU was used. Microparticles (1 μm) of gold (Bio-Rad) coated with DNA according to the binding procedure (Sanford et al., 1993) were used. Four to seven shots were fired for each design, using both 900 and 1100 psi discs.

**Nutrient media.** The composition of the nutrient media used in the study is provided in Table 1. All the media are based on Murashige–Skoog medium (Murashige, Skoog, 1962).

**Cultivation of plant tissue after transformation.** After the bombardment, the plant material was left on osmotic media for two days, then the transformed calli were planted on Selection Medium containing antibiotic kanamycin as a selective agent. Selection took from 45 to 65 days with exposition to the light to register points of growth, detected by the presence of chlorophyll-bearing cells at 10–20× magnification. The selected growth points were passaged to regeneration medium. Regenerants were first planted in Petri dishes, and then, as they grew, into Magenta boxes. Resulting individual plants were passaged to test tubes plants’ medium.

**Analysis of the presence of the target gene insert in regenerated plants.** All regenerated plants were analyzed

for the presence of the target gene insert. The analysis of the insert was carried out by a polymerase chain reaction using primers selected for the introduced genetic design. For analysis of the presence of the glucanase gene insert in potato plants, the following primers were used: Ch\_S\_F (CCACG TCTTCAAAGCAAGTGG); Gl\_S\_R (TGAATGTTGGTG GCAACAAGTAAT).

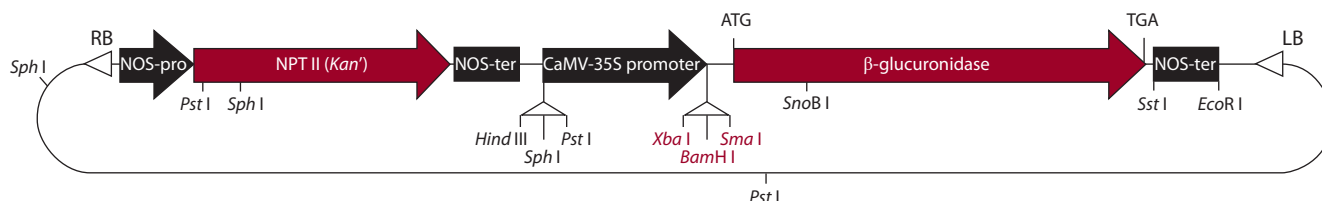
The primer design for the chitinase gene insert was the following: Ch\_S\_F (CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG); Ch\_S\_R (CATTTGTATTACCACACCAGCCG).

DNA for analysis was isolated using Sigma EXTRACT-N-AMP-RED PLANT PCR kit. Two microliters of the resulting DNA were used for PCR along with 2 ul HotTaq ×10 buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 10 pmol of each primer and 1 unit of HotTaq DNA polymerase. The regime for the amplification of both genes was the following: initial denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles (94 °C – 30 sec; 55 °C – 30 sec; 72 °C – 40 sec) and 72 °C – 5 minutes.

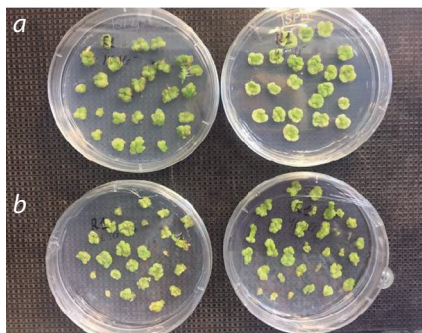
Visualization of the PCR products was carried out in 1.5 % ethidium bromide-stained agarose gel in TAE buffer and processed by gel documentation system (Bio-Rad).

## Results

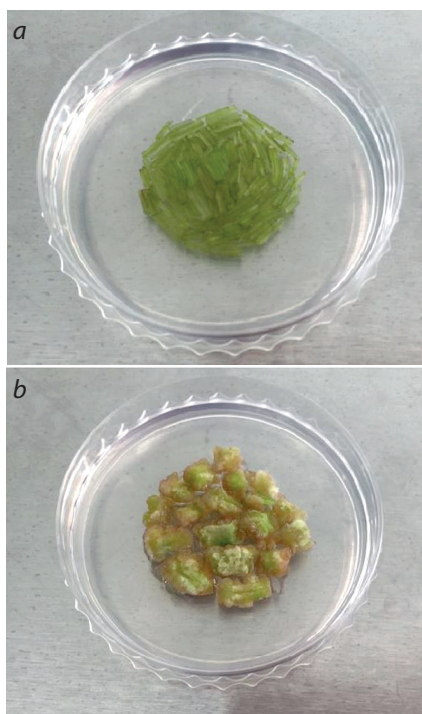
For the biolistic transformation, we used two potato varieties (Aksor and Nevskiy) introduced in Kazakhstan and the genetic constructs based on the pBI121 vector (Fig. 1) containing selective kanamycin resistance gene and two target genes – class I chitinase gene and potato endo-β-1,3-glucanase gene – cloned from the potato variety Aksor induced by *Fusarium solani* infection (Chirkin et al., 2016). These genes were part of the previous research of plants resistance to fungal diseases, with the idea that their constant expression might increase plant resistance to fungal diseases.



**Fig. 1.** Scheme of pBI121 vector.



**Fig. 2.** Embryogenic callus of potato on a nutrient medium for the callus induction: *a* – calli of Aksor potato; *b* – calli of Nevskiy potato.



**Fig. 3.** Potato explant on an osmotic biolistic medium: *a* – fresh internodes; *b* – calli derived from internodes.

The genes were introduced into the vector instead of the second selective marker, the  $\beta$ -glucuronidase gene, under the control of CaMV-35S promoter to ensure constant expression of the genes, allowing the study of their importance in the plant's immune response and the development of potato plants with enhanced resistance to fungal diseases. An independent construct was created for each gene; the presence of the selective gene in both constructs allowed selecting plants with both genes at once, as well as with individually introduced genes.

To transform potato cells with two target genes at once, we performed a biolistic transformation, in which the co-transformation efficiency is quite high and, according to the available literature (Romano et al., 2001), is up to 85 % when using two constructs simultaneously.

The regenerative ability of potatoes is lost quite quickly during callus formation and cultivation, so, when choosing the optimal tissue for biolistic experiments, we were primarily guided by the presence of the regenerative ability of the callus cultures for a long period necessary for the biolistics itself and subsequent regeneration and selection on a nutrient medium.

A few studies dedicated to potato biolistic transformation use leaves of 4–5-week-old seedlings as explant material. However, our preliminary experiments have shown insufficient regeneration efficiency of this type of explant on the Aksor and Nevskiy varieties. It should be noted that explants obtained from internodes have high regeneration potential, and therefore have been successfully used in a number of studies on agrobacterial transformation to improve the efficiency of the process (Kisgyörgy et al., 2008; Mielby et al., 2012).

Our preliminary biolistic experiments showed higher effectiveness of internodes as explant in comparison with leaves and apical meristems. In this regard, to study the effectiveness of the potato biolistic transformation depending on the type of plant explant, we selected two types of explant – internodes and 2–3-week calli obtained from potato internodes.

It should be noted that the two potato varieties selected as the starting material – Aksor and Nevskiy – differed in behavior in cell culture. During the cultivation of internodes on a callus-inducing nutrient medium (Fig. 2), the embryogenic calli of Aksor potatoes were large, uniform, while the calli of Nevskiy potato did not reach large sizes and began to turn yellow and die relatively quickly.

Both types of explants – fresh potato internodes and a 2–3-weeks-old callus obtained from potato internodes (Fig. 3) – were used for the biolistic experiment.

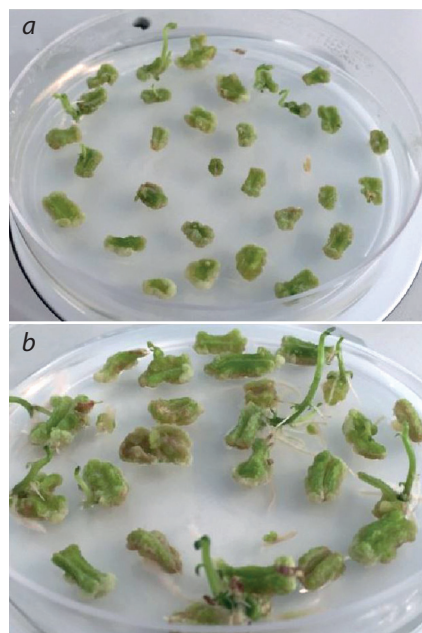
This approach was supposed to offset the difference in callus formation of explants taken in the experiment. This was especially important for calli of the Nevskiy variety as they showed insufficient callus formation from the original plant material, according to the results of the visual assessment of their ability to start callus formation *in vitro*.

A total of 5 series of transformation experiments was conducted, each containing 10 plates, with a total number of explants used – 862, of which 475 explants were obtained from the Aksor variety, and the remaining 387 – from the Nevskiy variety. In the presence of the selective agent, cells carrying the antibiotic resistance gene survived, while non-transformed cells died. Kanamycin, an antibiotic widely used in the potato transformation studies, was used as a selective agent at a concentration of 20 mg/l. By the end of the selection stage, during which callus was induced in the fresh internodes used for ballistics, the two types of explants were almost equal in shape and size.

After subculturing the explants on the selection medium for 2 months, the plates were visually analyzed for the presence of the developing plantlets (points of growth), which were transferred to regeneration medium. Only calli with visible signs of regeneration were selected, as in Figure 4, *a*, which shows the explants to be transferred to regeneration medium (see Fig. 4, *b*) to stimulate the regenerative abilities of the material by zeatin and gibberellic acid. The regenerant plants were grown and subcultured on test tube plants' medium for further study and propagation.

In general, the explants' regenerative ability was sufficient, but not all visible seedlings reached the stage of separation from the main callus into separate magenta boxes or subsequent transfer to separate tubes. After separation from the main callus, some regenerants acted differently in the second round of selection. As shown in Figure 5, one of the plants (right) is tolerant to the presence of kanamycin, while the other (left) did not go through the selection stage and was rejected.

As a result of the selection, potato regenerant plants presumably carrying an insert of target chitinase and glucanase genes were obtained. The number of potato regenerant plants obtained after the transformation of various types of explants (internode and callus) was different for the two varieties. A total of 56 regenerants was

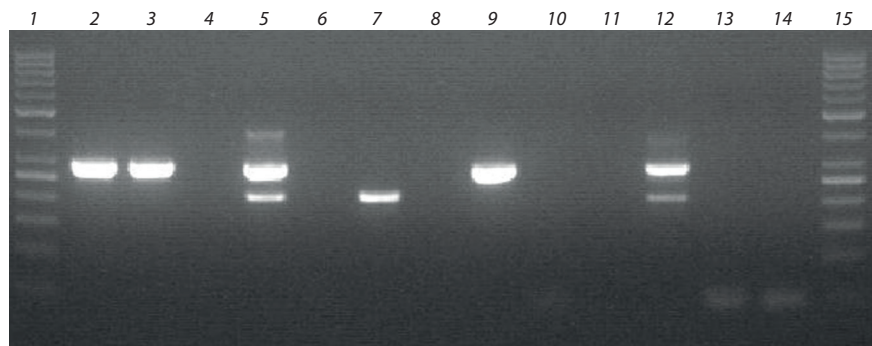


**Fig. 4.** Potato explants after biolistic transformation: *a* – potato explants after exposure to selective medium; *b* – potato explants at the regeneration stage.



**Fig. 5.** Regenerant plants on selective medium in the second stage of selection.

obtained from the 862 explants taken in the experiment, with the largest number of regenerants from the internodes of the Nevskiy variety. The survival of regenerated plants from the Aksor callus tissue was 7.4, and that of the Nevskiy variety was 4.8 (Table 2).



**Fig. 6.** Electrophoretic analysis of potato regenerated plants for the presence of chitinase and glucanase gene inserts.

Lane 1 and 15 – molecular weight marker (50 bp), lane 12 – positive control, lanes 13, 14 – negative controls, lanes 2–11 – test samples: 2, 3 and 9 – Aksor line carrying chitinase gene (DNA extracted from three plants of one line), 5 – Nevskiy line with chitinase and glucanase genes, 7 – Nevskiy line with glucanase insert, 4, 6, 8 – Aksor lines with no inserts, 10, 11 – Nevskiy lines with no inserts.

The screening of plants was performed after co-transformation. The resulting regenerated potato plants of both varieties were propagated microclonally *in vitro*. For each of the 56 transformed plants (lines), 10 test tube plants were obtained, which were used to perform polymerase chain reaction (PCR) for the presence of the target gene insert. Part of the leaf was cut from the plants for DNA isolation, and subsequently used for PCR with insert-specific primers.

The analysis of potato regenerants was carried out by PCR with specific primers. Since the introduced genes were also originally isolated from potatoes, the primers were designed in a special way: the forward sequence of the primer was annealing to the promoter part of the construct, and the reverse – with chitinase and glucanase genes, respectively, leading to two reaction products of 290 bp (chitinase gene) and 210 bp (glucanase gene).

Of the 56 potato regenerant plants, one plant carried an insert of the chitinase gene (Aksor variety, explant type – fresh internodes), one carried an insert of the glucanase gene (Nevskiy variety, fresh internodes), and four more were characterized by the presence of two genes (two belonged to Aksor variety, fresh internodes, one to Aksor variety, callus, and one to Nevskiy variety, callus). An example of the PCR confirmation results of the target genes' insertion is given in Figure 6.

Thus, the data of PCR analysis show that out of 862 explants of potato internodes and calli, only six plants were successfully transformed as the result of biolistic transformation; these plants carry either one or both inserts of the target chitinase and glucanase genes. Transformation efficiency was assessed by the number of viable regenerated plants relative to the number of explants subjected to biolistics (Table 3).

As seen from the data presented in Table 3, the average transformation efficiency for both varieties of potatoes was 0.7%. At the same time, the maximum transformation efficiency was achieved using fresh internodes of the Aksor variety (0.96%), and the minimum – with fresh internodes of the Nevskiy variety. It should be noted

**Table 2.** The number of potato regenerants on Selection Medium

Variety	Explant	Number of explants	Number of regenerants
Aksor	Internodes	312	17
	Callus	163	12
Nevskiy	Internodes	242	20
	Callus	145	7
Total		862	56



**Table 3.** The transformation efficiency of potato varieties Aksor and Nevskiy

Variety	Explant	Number of explants	Number of transformants	Efficiency of transformation, %
Aksor	Internodes	312	3	0.96
	Callus	163	1	0.61
Nevskiy	Internodes	242	1	0.41
	Callus	145	1	0.69
Total		862	6	0.70

that in experiments with Aksor potatoes, the minimum level of biolistics efficiency on calli taken as explants (0.61 %) slightly differs from the maximum value of transformation efficiency for the Nevskiy variety on internodes – 0.41 %, which indicates the difference in characteristics for each varieties of potatoes.

In experiments on the co-transformation of potatoes 4 out of 6 regenerant plants were co-transformed, which is 66.7 %. These results confirm the data of other authors on the high degree of joint integration of two separate genes of interest (Romano et al., 2001).

## Discussion

This study was aimed to compare the effectiveness of the biolistic transformation using different explant types and depending on the potato genotype. At the same time, the low number of transformed plants does not let us draw solid conclusions. It is doubtless that for the biolistic transformation it is necessary to consider the individual characteristics of the potato variety and experimentally select a specific explant type. Moreover, even with a low number of transformants we can state that fresh internodes are best suited for transforming the Aksor variety, while embryogenic callus should be selected for the Nevskiy variety. This finding will be used in future works dedicated to biolistic transformation for potato crop breeding.

The average transformation efficiency was not very high (0.7 %), which corresponds with the findings of other authors. At the same time, it seems that some transformed embryogenic callus might be lost at the selection and regeneration stages, so adaptation of these procedures will help raise the efficiency index. One of the attempts to do so was done in the current work – we reflected on the concern of other authors that selection with kanamycin adversely influences the regenerants' appearance and took the lower limit of the selective agent's concentration – kanamycin was used at 20 mg/l, whereas in some sources up to 100 mg/l is recommended. This explains the high number of regenerants as opposed to the number of transformants. The decision on kanamycin's concentration was taken after the preliminary experiments on stable transformation (data not shown), in which no regenerants were obtained after the selection stage, while the experiments on transient transformation showed sufficient number of transformed cells (data not shown). Thus, further research is needed for the post-bombardment stage to make the transformation event more successful. Although kanamycin is one of the most used antibiotics for potato transformation, other selective agents should be explored, including such options as herbicide resis-

tance agents, which are also a valuable trait for crop breeding and will help in agricultural crop production.

The high co-transformation efficiency justifies the use of this method for introduction of several genes of interest in one shot. Further studies should be dedicated to introducing more than two genes at once for the evaluation of this approach's efficiency. Combined, the protocol of adapted selective/regeneration stage and biolistic technique with more than two genes of interest at once will provide potato crop breeding with valuable efficient and time-saving methods.

## Conclusion

Despite the fact that agrobacterial transformation remains the most used method of introducing new genes into potato, the biolistic transformation method has certain advantages depending on the goals of the transformation. For example, with the help of bombardment, several genes can be introduced at once, and this can be done both as a single cassette and as co-transformation, the efficiency of which is quite high. This study showed high co-transformation efficiency of two independent genetic constructs, and will serve as a basis for further studies dedicated to introduction of more independent genetic constructs at once. Considering the insufficient number of published works on stable biolistic transformation of potatoes, we believe that data obtained in this study will make a certain contribution to the development of biolistic transformation technology of potatoes.

At the same time, the lines produced in the course of this work will be used to evaluate their resistance to fungal diseases, and, if successful, can be used in potato crop breeding for increased resistance to fungal diseases.

## References

- Chirkin A.P., Zhidkeeva R.E., Ismagulova G.A. Cloning and analysis of basic class I chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes from potato induced by *Fusarium solani* infection. *Izvestiya Natsyonalnoy Akademii Nauk Respubliki Kazakhstan = News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series Biol. Med.* 2016; 4(316):92-97. (in Russian)
- Craig W., Gargano D., Scotti N., Nguyen T.T., Lao N.T., Kavanagh T.A., Dix P.J., Cardi T. Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2005;24(10):603-611. DOI 10.1007/s00299-005-0018-0.
- Ercolano M.R., Ballvora A., Paal J., Steinbiss H.H., Salamini F., Gebhardt C. Functional complementation analysis in potato via biolistic transformation with BAC large DNA fragments. *Mol. Breed.* 2004; 13(1):15-22. DOI 10.1023/B:MOLB.0000012326.01128.5d.
- Jo K.-R., Kim C.-J., Kim S.-J., Kim T.-Y., Bergervoet M., Jongma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Development of



- late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnol.* 2014;14(1):50. DOI 10.1186/1472-6750-14-50.
- Kisgyörgy B.N., Tamás C., Rákszegi M., Sági L., Láng L., Bedô Z. Regeneration ability of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos after bombardment with a particle gun. *Acta Biol. Szeged.* 2008;52(1): 127-130.
- Mielby H., Sandoe P., Lassen J. The role of scientific knowledge in shaping public attitudes to GM technologies. *Public Underst. Sci.* Publ. online 2012. Publ. 2013;22(2):155-168. DOI 10.1177/0963662511430577.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15(3): 473-497.
- Nguyen T.T., Dix P.J., Nugent G.D. Transformation of potato via *Agrobacterium* coated microparticle bombardment. *Biol. Plant.* 2001; 54(1):141-144.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. Physical methods for genetic plant transformation. *Phys. Life Rev.* 2012;9(3): 308-345. DOI 10.1016/j.plrev.2012.06.002.
- Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 2001;20(3):198-204. DOI 10.1007/s002990000314.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor laboratory, 1989.
- Sanford B.J.C., Smith F.D., Russel J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. Enzymol.* 1993;217: 483-509.
- Taylor N.J., Fauquet C.M. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(12):963-977. DOI 10.1089/104454902762053891.

---

#### ORCID ID

N.P. Malakhova orcid.org/0000-0001-5312-9674  
G.A. Iskakova orcid.org/0000-0002-1989-9031  
D.A. Naizabayeva orcid.org/0000-0002-0606-4289  
B.K. Tezekbaeva orcid.org/0000-0003-2313-9737  
G.A. Ismagulova orcid.org/0000-0002-2735-4939  
E.R. Maltseva orcid.org/0000-0001-9198-695X

**Acknowledgements.** This work was carried out as part of research project AR05136045 "Obtaining new wheat and potato lines based on a set of innovative approaches of genetic engineering and cell technology" of Subprogram 102 "Grant funding for research" in the priority area "Life and health sciences", and as part of research on the project "Development of biotechnology for producing potato forms with improved signs of resistance to late blight on the basis of cisgenic bio-ballistic transformation" in the framework of BR05236574 "Use of adaptive plant mechanisms in the development of modern technologies for producing crops resistant to stress factors" (O.0798).

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

Received June 11, 2020. Revised January 6, 2021. Accepted January 7, 2021.

## Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу

Т.С. Фролова<sup>1,2</sup>✉, В.А. Черенко<sup>1,2</sup>, О.И. Сеницына<sup>1,2</sup>, А.В. Кочетов<sup>1,2</sup>

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

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

✉ frolova@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Оомицет *Phytophthora infestans* Mont. de Bary – основной патоген сельскохозяйственных культур семейства Пасленовые, особенно картофеля (*Solanum tuberosum*). С учетом того, что картофель – четвертая культура в мире по масштабам выращивания, ежегодные потери от фитофтороза огромны. Исследования базовых механизмов взаимодействия между картофелем и возбудителем фитофтороза не только расширяют фундаментальные знания в этой области, но и открывают новые возможности для влияния на эти взаимодействия с целью повышения резистентности к патогену. Взаимодействие картофеля и возбудителя фитофтороза можно рассматривать с генетической точки зрения, причем интересны как ответ картофеля на процесс колонизации со стороны *P. infestans*, так и изменение активности генов у фитофторы при заражении растения. Можно исследовать этот процесс через изменение профиля вторичных метаболитов хозяина и патогена. Помимо фундаментальных исследований в этой области, не меньшее значение имеют и прикладные работы в виде создания новых препаратов для защиты картофеля. Представленный обзор кратко описывает основные этапы исследований устойчивости картофеля к фитофторозу, начиная с самых первых работ. Большое внимание уделяется ключевым моментам по изменению профиля вторичных метаболитов (фитоалексинов). Отдельный раздел посвящен описанию как качественных, так количественных признаков устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза: их вкладу в общую резистентность, картированию и возможности регуляции. Оба вида признаков важны для селекции картофеля: качественная устойчивость за счет *R*-генов быстро преодолевается патогеном, в то время как пирамидирование локусов количественных признаков способствует созданию высокоустойчивых сортов. Новейшие подходы молекулярной биологии дают возможность изучать и транскрипционные профили, что позволяет посмотреть на взаимодействие картофеля и возбудителя фитофтороза. Показано, что процесс колонизации картофеля отражается не только на активности различных генов и профиле вторичных метаболитов, выявлены также белки-маркеры ответа на заражение со стороны картофеля – это патоген-зависимые белки и пластидная углекислая ангидраза. Маркерами заражения от *P. infestans* были белки грибной целлюлозо-синтазы и гаусторий-специфический мембранный белок. В данном обзоре приведена информация по наиболее актуальным комплексным исследованиям генетических механизмов устойчивости картофеля к фитофторозу. Ключевые слова: *Phytophthora infestans*; *Solanum tuberosum*; фитофтороз; резистентность; *R*-гены; локусы количественных признаков; вторичные метаболиты.

**Для цитирования:** Фролова Т.С., Черенко В.А., Сеницына О.И., Кочетов А.В. Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):164-170. DOI 10.18699/VJ21.020

## Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis

T.S. Frolova<sup>1,2</sup>✉, V.A. Cherenko<sup>1,2</sup>, O.I. Sinityna<sup>1,2</sup>, A.V. Kochetov<sup>1,2</sup>

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

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

✉ frolova@bionet.nsc.ru

**Abstract.** *Phytophthora infestans* Mont. de Bary is the main oomycete pathogen of cultivated crops in the family Solanaceae, especially potato (*Solanum tuberosum*). Because potato is the fourth most cultivated crop worldwide, its annual losses from late blight are tremendous. Studies of the basic mechanisms of interaction between potato and the late blight pathogen not only expand the fundamental knowledge in this area, but also open up new possibilities for regulating these interactions in order to increase resistance to the pathogen. The interaction of potato and the late blight pathogen can be considered from a genetic point of view, and it is interesting to consider both the response of the potato to the colonization process by *P. infestans* and the change in gene activity in late blight during plant infection. We can also investigate this process by changing the profile of secondary metabolites of the host and the pathogen. In addition to fundamental work in this area, applied work in the form of the development of new preparations for protecting potatoes is of no less importance. This review briefly describes the main stages of studies of potato resistance to late blight, starting almost from the first works. Much attention is paid to key works on changing the profile of secondary metabolites phytoalexins. A separate section is devoted to the description of both qualitative and quantitative characteristics of potato resistance to the late blight pathogen: their contribution to overall resistance, gene mapping, and

regulation capabilities. Both types of traits are important for potato breeding: quantitative resistance due to *R*-genes is quickly overcome by the pathogen, while quantitative trait loci make it possible to create varieties with almost absolute resistance due to the pyramid of effective genes. The latest approaches in molecular biology make it possible to study translational profiles, which makes it possible to look at the interaction of potatoes and the late blight pathogen at a different angle. It has been shown that the process of potato colonization affects not only the activity of various genes and the profile of secondary metabolites: proteins-markers of the response to infection from potatoes have also been identified: they are pathogen-bound proteins and plastid carbonic anhydrase. On the part of *P. infestans*, fungal cellulose synthase proteins and haustorium-specific membrane protein were markers of infection. Thus, the review contains information on the most relevant complex studies of the genetic mechanisms of potato resistance to late blight.

Key words: *Phytophthora infestans*; *Solanum tuberosum*; late blight; resistance; *R*-genes; quantitative trait loci; secondary metabolites.

**For citation:** Frolova T.S., Cherenko V.A., Sinitsyna O.I., Kochetov A.V. Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):164-170. DOI 10.18699/VJ21.020 (in Russian)

## Введение

Картофель, или паслен клубненосный (*Solanum tuberosum* L.), был одомашнен около 7000–10000 лет назад на территории современного Южного Перу. В Европу картофель был завезен испанцами относительно недавно, во второй половине XVI в. С тех пор он стал одной из основных сельскохозяйственных культур, занимая по масштабам выращивания четвертое место после кукурузы, пшеницы и ржи. В связи с большими объемами возделывания весьма существенными являются потери урожая из-за различных патогенов, основной из которых – возбудитель фитофтороза (*Phytophthora infestans*), способного полностью уничтожить растения спустя несколько дней после появления первых симптомов заражения. Поэтому изучение механизмов взаимодействия картофеля и возбудителя фитофтороза на молекулярном и генетическом уровнях очень важны для создания новых подходов для повышения резистентности картофеля.

Первые труды, посвященные взаимодействию *S. tuberosum* и *P. infestans*, относятся к концу 1960-х гг. (Ingram, Robertson, 1965; Ingram, 1967; Robertson et al., 1968). В работах проводили сравнение восприимчивого (Majestic) и устойчивого (Orion) к возбудителю фитофтороза сортов картофеля. Ранее было показано, что гены устойчивости (*R*-гены) экспрессируются только во фрагментах ткани толщиной более 10 клеток (Tomiyama et al., 1958), поэтому исследование осуществляли на клеточных культурах и тканевых агрегатах. Было сделано два ключевых вывода: 1) в тканях обоих сортов содержатся вещества, стимулирующие рост возбудителя фитофтороза, т. е. они являются нормальными метаболитами живых тканей, а не образуются в ответ на заражение; 2) тканевые агрегаты сорта Orion тормозили развитие возбудителя фитофтороза, но после заморозки и, как следствие, разрушения тканей это свойство пропадало. Таким образом, был сделан вывод, что резистентность – это свойство живых тканей, способных реагировать на патоген (Ingram, Robertson, 1965). В дальнейшем было установлено, что картофель сорта Orion может быстро развивать постинфекционную токсичность, тормозящую рост зародышевых трубок *P. infestans*, тем самым предотвращая инфицирование. Ключевая роль в развитии этого ответа отводится *R*-гену (Ingram, 1967).

Соединения, обуславливающие устойчивость растений к патогенам, ранее были названы фитоалексинами (Müller, Behr, 1949). В предыдущих исследованиях высказывалось

предположение, что именно они нарабатываются в тканях в ответ на инфицирование, что и приводит к ингибированию патогенов. Позднее была опубликована статья, свидетельствующая о накоплении фенольных соединений в токсичных для фитофторы фракциях (Robertson et al., 1968): салициловой, *n*-гидроксibenзойной и ванилиновой кислот. Авторы высказывают предположение, что система устойчивости, основанная на *R*-гене, может быть связана с постинфекционной индукцией синтеза фитоалексинов. Примерно в это же время были описаны фитоалексины сесквитерпеноидной структуры: ришитин, любимин, фитуберин и солаветивон, выделенные из зараженных клубней картофеля (Katsui et al., 1968; Kuć, 1982; Kuć, Rush, 1985).

Спустя почти 20 лет было издано подробное исследование временного накопления ришитина как наиболее показательного маркера иммунного ответа в клубнях резистентных и восприимчивых сортов в ответ на заражение *P. infestans* (Rohwer et al., 1987). Обнаружено, что ришитин и некоторые его структурно родственные производные (любимин) быстро накапливались в клубнях при несовместимых взаимодействиях картофеля и фитофторы и достаточно медленно – у совместимых, в листьях подобный ответ отсутствовал. Сделан вывод, что сесквитерпены могут быть полезны в развитии иммунного ответа, но не являются обязательными компонентами устойчивости.

Интересная работа была проведена по приданию устойчивости картофеля к *P. infestans* через создание соматических и половых гибридов культивируемого *S. tuberosum* с диким подвидом *S. circaeifolium* Bitter, устойчивость которого к возбудителю фитофтороза – весьма привлекательный признак для включения в генофонд культурного картофеля. Путем слияния клеток были получены тетраплоидные гибридные каллусы (Mattheij et al., 1992), а растения из них обладали полной устойчивостью к *P. infestans*. Исследователи сравнили содержание гликоалкалоидов у родительских растений и гибридов и обнаружили повышенное содержание томатыдин гликозида, позаимствованное гибридом от дикого *S. circaeifolium*. Кроме того, был обнаружен новый гликозид демиссидин, не найденный ни у одного из родителей. Отмечается фертильность полученных женских растений и возможность их скрещивания с культивируемым *S. tuberosum* для закрепления приобретенной устойчивости. Этой же группой исследователей были созданы половые гибриды

*S. tuberosum* и *S. circaefolium* (Louwes et al., 1992). Среди гибридов наблюдались преимущественно триплоидные растения (83 %), несущие двойной геном *S. circaefolium*, что делает их более устойчивыми к патогену и, как следствие, более перспективными для использования в селекции. Половые гибриды также обладали повышенным содержанием томатидин гликозида и демиссидин гликозидом, не обнаруженным у родительских растений.

## Картирование признаков устойчивости в геноме *S. tuberosum*

### Качественные признаки, обусловленные R-генами

В начале XXI в. развитие компьютерных технологий и статистических методов дало возможность проводить более масштабный анализ групп сцепления, выявлять локусы с генами количественных признаков и строить для них карты сцепления. Были созданы карты сцепления для диплоидного картофеля, согласно которым локусы качественной устойчивости к возбудителю фитофтороза располагаются практически в каждой хромосоме, а на хромосомах III, IV, V и VI были сцеплены с поздней спелостью (Gebhardt, Valkonen, 2001; Simko, 2002). Позднее подобные результаты были получены и для тетраплоидного картофеля (Bradshaw et al., 2004) при скрещивании устойчивого (Stirling) и восприимчивого сортов. Среди множества групп сцепления обнаружен перспективный локус в хромосоме IV, который не сцеплен с поздней спелостью клубней. У устойчивого родительского растения R-ген, переданный потомству, был картирован в хромосоме XI.

Несмотря на обилие работ, посвященных картированию R-генов в геноме картофеля (Ballvora et al., 2002; Van Der Vossen et al., 2003; Park et al., 2005; Restrepo et al., 2005; Bradshaw et al., 2006a, b; Solomon-Blackburn et al., 2007; Brugmans et al., 2008; Tan et al., 2008; Rauscher et al., 2010), следует отметить, что устойчивость к возбудителю фитофтороза сортов картофеля на основании R-генов сохраняется на протяжении 5–10 лет, после чего сорт становится восприимчивым к новым расам *P. infestans* (Stewart et al., 2003). Распознавание патогена R-геном довольно быстро нивелируется мутациями в соответствующем гене авирулентности *P. infestans*, что позволяет патогену успешно проникать и колонизировать растение-хозяина при совместимом взаимодействии (Poland et al., 2009).

Биоинформатические методы были использованы и для изучения механизмов восприимчивости. Показано, что карбоангидраза – фермент, обратимо конвертирующий диоксид углерода в бикарбонат, может играть большую роль во время несовместимых взаимодействий между патогеном и хозяином (Restrepo et al., 2005). С помощью ДНК-микрочипов было исследовано временное изменение экспрессии R-генов: в первые часы после заражения (6–12 ч) в целом наблюдалась индукция экспрессии, но спустя некоторое время (48–72 ч) большая часть генов подверглась репрессии. Интересным выглядит подавление жасмонатного пути при восприимчивых взаимодействиях. Однако при заражении в основном подавляются гены, связанные с фотосинтезом: так, наиболее выраженное подавление обнаружено для пластидной карбоангидразы,

которая обладает антиоксидантной активностью и способностью связывать салициловую кислоту (Slaymaker et al., 2002). В первые 12 ч наблюдалось существенное усиление экспрессии карбоангидразы при несовместимых взаимодействиях, тогда как через 24 или 48 ч ее следы едва обнаруживались, что позволяло однозначно отличить устойчивые формы. Значительная роль салициловой кислоты именно в раннем ответе *S. tuberosum* на инфицирование была продемонстрирована с помощью трансгенных NahG растений, которые не способны накапливать салициловую кислоту, их восприимчивость к *P. infestans* была гораздо выше, чем у дикой формы. Однако предварительная обработка растений препаратом салициловой кислоты практически уравнивала вероятность заражения (Halim et al., 2007).

Помимо единичных доминантных R-генов устойчивости, отвечающих за распознавание соответствующего гена авирулентности *P. infestans* и запускающих защитный ответ, проявляющийся в локальной гибели клеток (реакция сверхчувствительности) и тем самым останавливающий рост патогенных микроорганизмов, у растений существует группа генов с другим механизмом защиты – гены множественной устойчивости. Исследована экспрессия четырех генов-транспортеров у картофеля, транскрипция которых регулировалась различными препаратами (Ruocco et al., 2011). Среди них были выявлены и те, экспрессия которых существенно возрастает при заражении *P. infestans*, – гены *StPDR1* и *StPDR2* экспрессировались активнее в 13 и 37 раз соответственно спустя 18 ч после заражения. Авторы полагают, что все исследованные ими гены (*StPDR1–4*) являются частью более сложного системного ответа растения на биотические и абиотические факторы.

### Локусы количественных признаков у *S. tuberosum*

Масштабная попытка картирования локусов количественных признаков у картофеля была предпринята в 2018 г. (Santa et al., 2018). Исследователи снова выбрали в качестве объекта тетраплоидный геном картофеля, отмечая его высокую важность для селекции и при этом существенные затруднения в силу высокой гетерозиготности у автотетраплоидного картофеля. Ученым удалось обнаружить два новых QTL на хромосомах III и VIII. Отмечается, что один из аллелей первого локуса может опосредовать в среднем более высокую степень тяжести заболевания. Этот локус также включает транскрипционный фактор Arf2, связанный со старением листьев, вызванный окислительным стрессом у *Arabidopsis* и передачей сигналов гиббереллина и брассиностероидных путей при взаимодействии растения с патогеном (Vert et al., 2008; Lim et al., 2010; Koch et al., 2016). Аллель, определяющий в среднем более низкую степень тяжести заболевания, содержал QTL хромосомы VIII. Этот маркер связан с геном, который кодирует фактор транскрипции спираль-петля-спираль (bHLH) JAF13, участвующий в биосинтезе флавоноидов у *Petunia × hybrida* (Quattrocchio et al., 2006).

Были получены трансгенные растения со сверхэкспрессией гена редуктазы D-галактуроновой кислоты и повышенным уровнем L-аскорбата (Chung et al., 2019). После заражения размер некротических пятен у трансгенных растений был меньше, чем в контрольной груп-



пе, при этом обнаружено увеличение экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной активности. В результате выявлено снижение активных форм кислорода (АФК) в клетках, что может объяснять меньший размер некротического пятна за счет уменьшения ответа реакции сверхчувствительности, индуцируемого АФК. В целом отмечалась большая устойчивость трансгенных растений к возбудителю фитофтороза, однако полной устойчивости не наблюдалось. L-аскорбат снизил содержание абсцизовой кислоты и увеличил содержание гибберелиновой кислоты. Но при этом установлена существенная потеря в урожайности картофеля, которая все же превышала урожай от зараженного.

### Транскриптомный анализ для совместимых и несовместимых взаимодействий *P. infestans* и *S. tuberosum*

В 2012 г. впервые выполнен транскриптомный анализ для совместимых и несовместимых взаимодействий *P. infestans* и *S. tuberosum* (Guetvai et al., 2012). Исследовано пять изогенных линий, которые различались только наличием и отсутствием *R*-гена (*RI*), с целью исключить влияние генетического фона на транскриптом. Однако оказалось, что изменения транскриптома между растениями одной линии отличаются больше, чем средние транскриптомы линий между собой, что указывает на значительное влияние как индивидуальных физиологических параметров, так и факторов окружающей среды в процессе защитной реакции. Одним из них может быть движение во времени и пространстве защитных сигналов от места первоначального физического контакта между зооспорами *P. infestans* и клетками-хозяевами и соседними клетками. Анализ DeepSAGE позволил выявить некоторые интересные аспекты общей структуры транскриптома. Две трети (68 %) унитаров были экспрессированы на низких уровнях (< 10 CPM) в ткани листьев, из которых одна треть (36 %) не соответствовала ни одному из известных транскриптов картофеля, что может быть объяснено немодельным объектом и немногочисленными данными о транскриптоме *S. tuberosum*. С другой стороны, только 3 % унитаров показали среднюю экспрессию выше 100 CPM, но составили 32 % от общего транскриптома. Из очень частых транскриптов только 14 % были не известны. Нужно отметить следующие транскрипты из этого исследования:

1. Наиболее частый тег (StET008016) соответствует унигену *TC208859*, аннотированному как белок клеточной стенки – экспрессия этого гена составляла 4 % всех транскриптов в тканях листьев. Белки этого семейства выполняют функцию каркаса в качестве агглютинирующих агентов для отложения компонентов клеточной стенки (Mangeon et al., 2010). Обнаружено также их участие в защитной реакции растений против бактерий и грибов (Park et al., 2000; Fu et al., 2007).
2. Через один день после инокуляции транскрипт StET009643, соответствующий гену трансальдолазы ToTAL2 (*TC196885*), специфически и временно повышался во время несовместимых взаимодействий. Трансальдолазы (EC 2.2.1.2) катализируют образование одного из предшественников шикимовой кислоты, который участвует в образовании фенилпропаноидов,

алкалоидов и растительных гормонов ауксина и салициловой кислоты – важного компонента системы защиты растения.

3. Через три дня после инфицирования транскрипт StET010841, соответствующий гену фибриллина 8 (*TC207935*), был строго и специфически репрессирован. Растительные фибриллины представляют собой структурные липид-ассоциированные белки, расположенные в тилакоидных мембранах, которые, по-видимому, играют роль в реакциях биотического и абиотического стресса, роста и развития и в гормональной сигнализации.
4. Снижается уровень транскриптов карбоангидразы, что может быть использовано для повышения устойчивости к *P. infestans* (унигены *TC209461*, *TC218724* или *TC221870* аннотированы как карбоангидразы).

В работе показано, что изменения транскрипции во время инфекции в совместимых взаимодействиях были более выраженными, чем в несовместимых. Число последовательностей-мишеней, однако, было одинаковым: 240 и 220 для несовместимых и совместимых взаимодействий соответственно. В целом транскриптомы несовместимых и совместимых взаимодействий показали больше различий, чем общности. Несовместимое взаимодействие приводит к запрограммированной гибели небольшого числа клеток в месте первичного контакта с патогеном. Транскриптом этих клеток может претерпеть значительные изменения, тогда как отобранные соседние ткани остаются относительно нетронутыми. Наблюдаемые изменения могут быть причинами или следствиями сигналов системной приобретенной резистентности.

Таким образом, через некоторое время интерес к *R*-гену как перспективным для селекции кандидатам существенно уменьшился, устойчивость за счет них достаточно быстро сводилась к нулю новыми расами возбудителя фитофтороза. Вместо поиска основного гена исследователи перешли к мнению, что резистентность более перспективно рассматривать как полигенный и, как следствие, количественный признак. Поэтому вектор исследований изменился на поиск новых генов-кандидатов и их картирования для эффективного сочетания аллелей повышенной резистентности в улучшенных сортах. Постулируется, что для преодоления полигенной устойчивости картофеля требуется большее число мутаций в генах авирулентности возбудителя.

При использовании SNP-маркеров были выявлены следующие гены: гены липоксигеназы (жасмонатный путь), 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктаза (мевалонатный путь) и цитохром р450 (терпеновый биосинтез) (Mosquera et al., 2016).

С учетом предыдущих исследований (Pajeroska-Mukhtar et al., 2009; Odeny et al., 2010; Mukhtar et al., 2015) суммарно выявлено 10 наиболее подходящих локусов для применения в качестве диагностических маркеров в селекционных программах. Эти гены кодируют ферменты, функционирующие в жасмонатном и оксипиноновом путях (*StAOS2*, *Plox1*), в биосинтезе липидов (*BCCP*, биотинкарбокисильный белок-носитель) и вторичных терпеновых метаболитов (*HMGCR*, *CYP71D11*). Есть гены с неизвестной функцией (*StGP28*) или функцией распозна-

вания патогенов (*Rpi-vnt1*) и транскрипционной регуляции (*TEF1*, *C3HL-TF*, *RBP50*). Их важность как генов-кандидатов для придания устойчивости в селекции важна для (1) непосредственного участия в контроле количественной устойчивости к возбудителю фитофтороза, которая не изменяется при поздней зрелости растений, (2) дальнейшей функциональной характеристики и (3) подтверждения диагностической способности в различных селекционных популяциях и средах.

Изопрен синтезируется в растениях двумя путями: ацетат/мевалонатным и дезоксисилозафосфат/метилэритритфосфатным. Ген-участник резистентности 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфат синтазы 1 (*StDXS1*) был обнаружен во втором пути (Henriquez et al., 2016). Его экспрессия изменяется в ответ на заражение и коррелирует с накоплением 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфат синтазы – фермента, катализирующего начальную стадию 2-С-метил-Д-эритрит-4-фосфатного пути (*DOXP-MEP*), участвующего в биосинтезе изопреноидов, необходимых для мембран хлоропластов. Изопреноиды также нужны для синтеза каротиноидов и хлорофилла, абсцизовой и гибберелиновой кислот, содержание которых, соответственно, увеличивается при увеличении экспрессии *StDXS1*.

Еще одна временная динамика при заражении была получена для гена *StPOTHR1* с использованием трансгенных растений, где целевой ген был выключен за счет РНК интерференции (Chen et al., 2018). Белковый продукт гена *StPOTHR1* локализуется на плазматической мембране клеток и существенно уменьшает степень колонизации, причем его сверхэкспрессия усиливает резистентность, экспрессироваться этот ген начинает после заражения в устойчивых сортах.

### Исследование посттрансляционных модификаций (SUMO) в процессе заражения картофеля возбудителем фитофтороза

Сумоилирование – один из типов посттрансляционной модификации белков в клетке, реализуемой за счет небольшого (~100 аминокислотных остатков) белка SUMO (small ubiquitin-related modifier), способного ковалентно присоединяться к мишени, подобно убиквитинилированию, однако не приводящему к деградации субстрата.

Инвазивные растительные патогены развили возможность модифицировать метаболизм своего хозяина, стимулируя метаболические процессы, которые способствуют росту патогена (Colignon et al., 2017). Действительно, было обнаружено, что во время процесса заражения содержание большинства известных конъюгатов SUMO *S. tuberosum* значительно изменяется, некоторые уменьшаются, но многие существенно увеличиваются. Выявлены белки-маркеры ответа на заражение со стороны картофеля – это патоген-связанные белки (PR1) и вышеупомянутая пластидная карбоангидраза (CA). Маркерами от *P. infestans* заражения были белки грибной целлюлозо-синтазы (CesA3) (Grenville-Briggs et al., 2008) и гаусторий-специфический мембранный белок (PiHmp1) (Avrova et al., 2008). Синтез белка PR1 стимулируется салициловой кислотой, способность поддерживать его в высокой концентрации после заражения отличает резистентные растения (Eschen-Lippold et al., 2012). Роль СА все еще остается

неясной, однако разница в уровне СА также позволяет различить устойчивые и не устойчивые к возбудителю фитофтороза сорта (Restrepo et al., 2005). Гены белковых маркеров *P. infestans* сначала активно экспрессировались как в устойчивых, так и в неустойчивых сортах, но при несовместимом взаимодействии их активность начинала снижаться через 24 ч после заражения. Таким образом, получены доказательства, что в восприимчивых сортах картофеля патогену удается ингибировать защитные механизмы растения и успешно инфицировать растения, в то время как в устойчивых сортах такое явление не наблюдалось.

### Заключение

В настоящее время генетических исследований защитных реакций со стороны картофеля существенно больше, чем вирулентности со стороны *P. infestans*, и основная их часть направлена на поиск и картирование локусов количественных признаков, отвечающих за резистентность. На заре исследований наибольший интерес вызывали *R*-гены, одного аллеля которых часто было достаточно для устойчивости к возбудителю фитофтороза. Таким образом, резистентность рассматривалась преимущественно как качественный признак. Позже выяснилось, что созданные сорта невыгодны с экономической точки зрения – *P. infestans* легко преодолевает моногенную устойчивость за счет особенностей строения своего генома. Это обстоятельство заставило пересмотреть взгляды и перейти к оценке резистентности как к признаку количественному, поэтому встал вопрос о поиске локусов количественных признаков, которые могут быть перспективны для селекции. В процессе исследования установлено, что у культурного картофеля основные локусы, дающие резистентность, часто сцеплены с негативными для продуктивности растений качествами, например с поздней зрелостью клубней. Поэтому поиск новых локусов по-прежнему остается актуальной задачей.

Несмотря на большой прогресс в понимании механизмов устойчивости и способности предсказывать вспышки фитофтороза, пандемические вспышки с колоссальным уроном все еще случаются в разных странах (Fry et al., 2013; Chowdappa et al., 2015), что свидетельствует о недостаточности полученных знаний для эффективной защиты сельскохозяйственных растений и необходимости новых исследований в этом направлении.

### Список литературы / References

- Avrova A.O., Boevink P.C., Young V., Grenville-Briggs L.J., van West P., Birch P.R., Whisson S.C. A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cell Microbiol.* 2008;10(11):2271-2284. DOI 10.1111/j.1462-5822.2008.01206.x.
- Ballvora A., Ercolano M.R., Weiss J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 2002; 30(3):361-371. DOI 10.1046/j.1365-313x.2001.01292.x.
- Bradshaw J.E., Bryan G.J., Lees A.K., McLean K., Solomon-Blackburn R.M. Mapping the *R10* and *R11* genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) *R*-gene differentials of Black. *Theor. Appl. Genet.* 2006a; 112(4):744-751. DOI 10.1007/s00122-005-0179-9.

- Bradshaw J.E., Hackett C.A., Lowe R., McLean K., Stewart H.E., Tierney L., Vilaro M.D., Bryan G.J. Detection of a quantitative trait locus for both foliage and tuber resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] on chromosome 4 of a dihaploid potato clone (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 2006b;113(5):943-951. DOI 10.1007/s00122-006-0353-8.
- Bradshaw J.E., Pande B., Bryan G.J., Hackett C.A., McLean K., Stewart H.E., Waugh R. Interval mapping of quantitative trait loci for resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], height and maturity in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Genetics.* 2004;168(2):983-995. DOI 10.1534/genetics.104.030056.
- Brugmans B., Wouters D., van Os H., Hutten R., van der Linden G., Visser R.G., van Eck H.J., van der Vossen E.A. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117(8):1379-1388. DOI 10.1007/s00122-008-0871-7.
- Chen Q., Tian Z., Jiang R., Zheng X., Xie C., Liu J. *StPOTHR1*, a NDR1/HIN1-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;496(4):1155-1161. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.01.162.
- Chowdappa P., Nirmal Kumar B.J., Madhura S., Mohan Kumar S.P., Myers K.L., Fry W.E., Cooke D.E.L. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathol.* 2015;64:191-199. DOI 10.1111/ppa.12228.
- Chung I.M., Venkidasamy B., Upadhyaya C.P., Packiaraj G., Rajakumar G., Thiruvengadam M. Alleviation of *Phytophthora infestans* mediated necrotic stress in the transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) with enhanced ascorbic acid accumulation. *Plants (Basel).* 2019;8(10):365. DOI 10.3390/plants8100365.
- Colignon B., Dieu M., Demazy C., Delaive E., Muhovski Y., Raes M., Mauro S. Proteomic Study of SUMOylation during *Solanum tuberosum*-*Phytophthora infestans* interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2017;30(11):855-865. DOI 10.1094/MPMI-05-17-0104-R.
- Eschen-Lippold L., Landgraf R., Smolka U., Schulze S., Heilmann M., Heilmann I., Hause G., Rosahl S. Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression. *New Phytol.* 2012;193(4):985-996. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.04024.x.
- Fry W.E., McGrath M.T., Seaman A., Zitter T.A., McLeod A., Danies G., Small I.M., Myers K., Everts K., Gevens A.J., Gugino B.K., Johnson S.B., Judelson H., Ristaino J., Roberts P., Secor G., Seebold K.J., Snover-Clift K., Wyenandt A., Grünwald N.J., Smart C.D. The 2009 late blight pandemic in the eastern United States – causes and results. *Plant Dis.* 2013;97(3):296-306. DOI 10.1094/PDIS-08-12-0791-FE.
- Fu Z.Q., Guo M., Jeong B.R., Tian F., Elthon T.E., Cerny R.L., Staiger D., Alfano J.R. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature.* 2007;447(7142):284-288. DOI 10.1038/nature05737.
- Gebhardt C., Valkonen J.P. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001;39:79-102. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.79.
- Grenville-Briggs L.J., Anderson V.L., Fugelstad J., Avrova A.O., Bouzenzana J., Williams A., Wawra S., Whisson S.C., Birch P.R., Bulone V., van West P. Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. *Plant Cell.* 2008;20(3):720-738. DOI 10.1105/tpc.107.052043.
- Gyertvai G., Sønderkær M., Göbel U., Basekow R., Ballvora A., Imhoff M., Kersten B., Nielsen K.L., Gebhardt C. The transcriptome of compatible and incompatible interactions of potato (*Solanum tuberosum*) with *Phytophthora infestans* revealed by DeepSAGE analysis. *PLoS One.* 2012;7(2):e31526. DOI 10.1371/journal.pone.0031526.
- Halim V.A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2007;20(11):1346-1352. DOI 10.1094/MPMI-20-11-1346.
- Henriquez M.A., Soliman A., Li G., Hannoufa A., Ayele B.T., Daayf F. Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (*Solanum tuberosum*) 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 1 (StDXS1) in response to *Phytophthora infestans*. *Plant Sci.* 2016;243:71-83. DOI 10.1016/j.plantsci.2015.12.001.
- Ingram D.S. The expression of *R*-gene resistance to *Phytophthora infestans* in tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *J. Gen. Microbiol.* 1967;49(1):99-108. DOI 10.1099/00221287-49-1-99.
- Ingram D.S., Robertson N.F. Interaction between *Phytophthora infestans* and tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *J. Gen. Microbiol.* 1965;40(3):431-437. DOI 10.1099/00221287-40-3-431.
- Katsui N., Murai A., Takasugi M., Imaizumi K., Masamune T., Tomiyama K. The structure of rishitin, a new antifungal compound from diseased potato tubers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1968;1:43-44. DOI 10.1039/C19680000043.
- Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdelatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog.* 2016;12(10). DOI 10.1371/journal.ppat.1005901.
- Kuč J. Phytoalexins from the Solanaceae. In: Bailey J.A., Mansfield J.W. (Eds.). *Phytoalexins*. Blackie; Glasgow; London, 1982; 81-105.
- Kuč J., Rush J.S. Phytoalexins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;236(2):455-472. DOI 10.1016/0003-9861(85)90648-4.
- Lim P.O., Lee I.C., Kim H.J., Ryu J.S., Woo H.R., Nam H.G. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.* 2010;61(5):1419-1430. DOI 10.1093/jxb/erq010.
- Louwes K.M., Hoekstra R., Mattheij W.M. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaeifolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens: 2. Sexual hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1992;84(3-4):362-370. DOI 10.1007/BF00229495.
- Mangeon A., Junqueira R.M., Sachetto-Martins G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav.* 2010;5(2):99-104. DOI 10.4161/psb.5.2.10336.
- Mattheij W.M., Eijlander R., de Koning J.R., Louwes K.M. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaeifolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens: 1. Somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1992;83(4):459-466. DOI 10.1007/BF00226534.
- Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M., Muktar M.S., Paulo M.J., Steinemann S., Li J., Draffehn A., Hofmann A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Walkemeier B., Gebhardt C. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156254. DOI 10.1371/journal.pone.0156254.
- Muktar M.S., Lübeck J., Strahwald J., Gebhardt C. Selection and validation of potato candidate genes for maturity corrected resistance to *Phytophthora infestans* based on differential expression combined with SNP association and linkage mapping. *Front Genet.* 2015;6:294. DOI 10.3389/fgene.2015.00294.
- Müller K.O., Behr L. Mechanism of *Phytophthora*-resistance of potatoes. *Nature.* 1949;163(4143):498-499. DOI 10.1038/163498a0.
- Odeny D.A., Stich B., Gebhardt C. Physical organization of mixed protease inhibitor gene clusters, coordinated expression and association



- with resistance to late blight at the *StKI* locus on potato chromosome III. *Plant Cell Environ.* 2010;33(12):2149-2161. DOI 10.1111/j.1365-3040.2010.02213.x.
- Pajeroska-Mukhtar K., Stich B., Achenbach U., Ballvora A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Ilarionova E., Bellin D., Walkemeier B., Basekow R., Kersten B., Gebhardt C. Single nucleotide polymorphisms in the allene oxide synthase 2 gene are associated with field resistance to late blight in populations of tetraploid potato cultivars. *Genetics.* 2009;181(3):1115-1127. DOI 10.1534/genetics.108.094268.
- Park C.J., Park C.B., Hong S.S., Lee H.S., Lee S.Y., Kim S.C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Mol. Biol.* 2000;44(2):187-197. DOI 10.1023/a:1006431320677.
- Park T.H., Vleeshouwers V.G., Huigen D.J., van der Vossen E.A., van Eck H.J., Visser R.G. Characterization and high-resolution mapping of a late blight resistance locus similar to *R2* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(3):591-597. DOI 10.1007/s00122-005-2050-4.
- Poland J.A., Balint-Kurti P.J., Wisser R.J., Pratt R.C., Nelson R.J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* 2009;14(1):21-29. DOI 10.1016/j.tplants.2008.10.006.
- Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell.* 2006;18(5):1274-1291. DOI 10.1105/tpc.105.034041.
- Rauscher G., Simko I., Mayton H., Bonierbale M., Smart C.D., Grünwald N.J., Greenland A., Fry W.E. Quantitative resistance to late blight from *Solanum berthaultii* cosegregates with *R(Pi-ber)*: insights in stability through isolates and environment. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(8):1553-1567. DOI 10.1007/s00122-010-1410-x.
- Restrepo S., Myers K.L., del Pozo O., Martin G.B., Hart A.L., Buell C.R., Fry W.E., Smart C.D. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005;18(9):913-922. DOI 10.1094/MPMI-18-0913.
- Robertson N.F., Friend J., Aveyard M., Brown J., Huffee M., Homans A.L. The accumulation of phenolic acids in tissue culture pathogen combinations of *Solanum tuberosum* and *Phytophthora infestans*. *J. Gen. Microbiol.* 1968;54(2):261-268. DOI 10.1099/00221287-54-2-261.
- Rohwer F., Fritzeimer K.H., Scheel D., Hahlbrock K. Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*: Accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins. *Planta.* 1987;170(4):556-561. DOI 10.1007/BF00402991.
- Ruocco M., Ambrosino P., Lanzuise S., Woo S.L., Lorito M., Scala F. Four potato (*Solanum tuberosum*) ABCG transporters and their expression in response to abiotic factors and *Phytophthora infestans* infection. *J. Plant Physiol.* 2011;168(18):2225-2233. DOI 10.1016/j.jplph.2011.07.008.
- Santa J.D., Berdugo-Cely J., Cely-Pardo L., Soto-Suárez M., Mosquera T., Galeano M.C.H. QTL analysis reveals quantitative resistant loci for *Phytophthora infestans* and *Tecia solanivora* in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *PLoS One.* 2018;13(7). DOI 10.1371/journal.pone.0199716.
- Simko I. Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species. *Am. J. Pot. Res.* 2002;79:125-132. DOI 10.1007/BF02881521.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., Klessig D.F. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99(18):11640-11645. DOI 10.1073/pnas.182427699.
- Solomon-Blackburn R.M., Stewart H.E., Bradshaw J.E. Distinguishing major-gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(1):141-149. DOI 10.1007/s00122-007-0550-0.
- Stewart H.E., Bradshaw J.E., Pand B. The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathology.* 2003;52(2):193-198. DOI 10.1046/j.1365-3059.2003.00811.x.
- Tan M.Y., Hutten R.C., Celis C., Park T.H., Niks R.E., Visser R.G., van Eck H.J. The *R(Pi-mcd1)* locus from *Solanum microdontum* involved in resistance to *Phytophthora infestans*, causing a delay in infection, maps on potato chromosome 4 in a cluster of NBS-LRR genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008;21(7):909-918. DOI 10.1094/MPMI-21-7-0909.
- Tomiyama K., Takakuwa M., Takase N. The metabolic activity in healthy tissue neighbouring the infected cells in relation to resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de By in potatoes. *Phytopathol. Z.* 1958;31:237-250.
- Van der Vossen E., Sikkema A., Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 2003;36(6):867-882. DOI 10.1046/j.1365-313x.2003.01934.x.
- Vert G., Walcher C.L., Chory J., Nemhauser J.L. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(28):9829-9834. DOI 10.1073/pnas.0803996105.

#### ORCID ID

T.S. Frolova orcid.org/0000-0002-4400-0665  
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-00067).

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


Поступила в редакцию 03.08.2020. После доработки 10.11.2020. Принята к публикации 23.12.2020.



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Проблемы и возможности изучения пивоваренных признаков ячменя с использованием молекулярно-генетических подходов

Н.В. Трубачеева , Л.А. Першина

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия  
 [natas@bionet.nsc.ru](mailto:natas@bionet.nsc.ru)


**Аннотация.** Около одной трети урожая выращиваемого в мире ячменя используется для переработки в солод для обеспечения нужд пивоваренной промышленности. В связи с этим изучение генетической основы пивоваренных признаков и селекция пивоваренных сортов ячменя, адаптивных к условиям их произрастания, актуальны как во всем мире, так и в Российской Федерации, где преобладают выращивание и использование зарубежных солодовых сортов ячменя. К основным параметрам качества солода (искусственно пророщенного и высушенного зерна ячменя) относятся: экстрактивность, диастатическая сила, индекс Кольбаха, вязкость, содержание в зерне белка,  $\beta$ -глюкана, свободного аминного азота и растворимого белка. Большинство этих компонентов находится под контролем локусов количественных признаков (quantitative trait loci, QTL) и подвержено влиянию условий среды, что осложняет их изучение и точную локализацию. Кроме того, фенотипическая оценка пивоваренных признаков – трудоемкий и дорогостоящий процесс. В настоящее время известно более 200 QTL, связанных с пивоваренными параметрами, выявленных с привлечением двуродительских картирующих популяций. Молекулярные маркеры широко применяются как для картирования QTL-локусов, ответственных за пивоваренные качества, так и для выполнения работ по маркер-опосредованной селекции (МОС), что в комбинации с традиционными селекционными подходами дает возможность создавать эффективные стратегии, направленные на ускорение процесса получения новых перспективных генотипов. Тем не менее МОС пивоваренных признаков сталкивается с рядом трудностей, таких как невысокая точность локализации QTL-локусов, их неэффективность при переносе в другую генотипическую среду, сцепленность с нежелательными признаками, что обуславливает необходимость валидации QTL и сцепленных с ними молекулярных маркеров. В обзоре приведены результаты работ по использованию МОС для улучшения пивоваренных качеств ячменя, а также рассматриваются исследования по поиску ассоциаций между генотипом и фенотипом, выполненные с помощью ПГАА-анализа (полногеномный поиск ассоциаций) на основе последних достижений в области высокопроизводительного генотипирования (diversity array technology, DArT и single-nucleotide polymorphism, SNP маркеры).

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare*; пивоваренный ячмень; QTL; маркер-опосредованная селекция, полногеномный поиск ассоциаций.

**Для цитирования:** Трубачеева Н.В., Першина Л.А. Проблемы и возможности изучения пивоваренных признаков ячменя с использованием молекулярно-генетических подходов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2): 171-177. DOI 10.18699/VJ21.021

## Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches

N.V. Trubacheeva , L.A. Pershina

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kurchatov Genomics Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia  
 [natas@bionet.nsc.ru](mailto:natas@bionet.nsc.ru)

**Abstract.** About one-third of the world's barley crop is used for malt production to meet the needs of the brewing industry. In this regard, the study of the genetic basis of malting quality traits and the breeding of malting barley varieties that are adaptive to their growing conditions are relevant throughout the world, particularly in the Russian Federation, where the cultivation and use of foreign malting varieties of barley prevails. The main parameters of malting quality (artificially germinated and dried barley grains) are malt extract, diastatic power, Kolbach index, viscosity, grain protein, wort  $\beta$ -glucan, free amino nitrogen, and soluble protein content. Most of these components are under the control of quantitative trait loci (QTLs) and are affected by environmental conditions, which complicates their study and precise localization. In addition, the phenotypic assessment of malting quality traits requires elaborate, expensive phenotypic analyses. Currently, there are more than 200 QTLs associated with malting parameters, which were identified using biparental mapping populations. Molecular markers are widely used both for mapping QTL loci responsible for malting quality traits and for performing marker-assisted selection (MAS), which, in combination with conventional breeding, makes it possible to create effective

strategies aimed at accelerating the process of obtaining new promising genotypes. Nevertheless, the MAS of malting quality traits faces a series of difficulties, such as the low accuracy of localization of QTLs, their ineffectiveness when transferred to another genetic background, and linkage with undesirable traits, which makes it necessary to validate QTLs and the molecular markers linked to them. This review presents the results of studies that used MAS to improve the malting quality of barley, and it also considers studies that searched for associations between genotype and phenotype, carried out using GWAS (genome-wide association study) approaches based on the latest achievements of high-throughput genotyping (diversity array technology (DArT) and single-nucleotide polymorphism markers (SNPs)).

Key words: *Hordeum vulgare*; malting barley; QTL; marker-assisted selection; genome-wide association studies.

**For citation:** Trubacheeva N.V., Pershina L.A. Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):171-177. DOI 10.18699/VJ21.021

## Введение

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) занимает четвертое место в мире по производству зерна после пшеницы, риса и кукурузы и используется для производства кормов, продуктов питания, а около 30 % зерна – для промышленной переработки в солод, большая часть которого применяется для пивоварения (Newton et al., 2011; Bond et al., 2015; <http://www.fao.org/faostat/ru/>).

Солод – это частично пророщенное зерно, у которого в процессе прорастания происходит образование гидролитических ферментов, расщепляющих крахмал в сбраживаемые сахара. Количество и состав появившихся при соложении ингредиентов (низкомолекулярных сахаров, аминокислот, жирных кислот, и ферментов) влияют на качество солода (Bamforth, 2009). Качество солода в основном определяется оптимальными значениями его экстрактивности (суммы растворенных веществ, которые при затирании переходят в раствор, определяемый при измерении его относительной плотности); диастатической силы (способность ферментов гидролизовать крахмал до простых сахаров); вязкости, отражающей растворимость и скорость фильтрации солодового суслеа; содержания  $\beta$ -глюкана в сусле; индекса Кольбаха, выражающего растворимость солодового белка в пивном сусле; содержания свободного аминокислота, растворимого белка и белка в зерне (Меледина и др., 2013; Cu et al., 2016). При этом необходимо, чтобы зерно было подходящего пивоваренного сорта, обладало высокой прорастающей способностью и энергией, чувствительностью к водопоглощению, не имело примесей, не содержало микробных или химических загрязнителей (Stanca et al., 2016).

Актуальным является направление селекции, ориентированное на получение сортов ячменя с высокими пивоваренными качествами и повышенной урожайностью (Li et al., 2009; Николаев и др., 2017). Соблюдение баланса между этими двумя параметрами – одна из серьезных проблем, поскольку высокая урожайность, часто зависящая от применения азотных удобрений, ассоциирована с высоким содержанием белка и  $\beta$ -глюкана, что нежелательно для получения высококачественного солода (Chen et al., 2006). С точки зрения селекции не существует единого стандарта ячменя, который универсально подходил бы для описания пивоваренного сорта. В свое время указывалось, что для пивоварения во всем мире использовали двурядные сорта ячменя, кроме США и Мексики, где предпочитали шестирядные сорта (Riggs, Kirby, 1978). Лучшие пивоваренные сорта – яровые, однако из-за обеднения генетического разнообразия среди них (Laidò et

al., 2009; Меледина и др., 2013), а также изменения климата возрос интерес к озимым сортам, в связи с чем пивоваренные ассоциации Европы и США включили их в ряд рекомендованных сортов (<http://www.ukmalt.com/press-release-update-november-2019>; <https://ambainc.org/amba-publications/recommended-malting-barley-varieties/>).

По производству ячменя и занятым под этой культурой площадям первое место в мире занимает Российская Федерация (Сортовые ресурсы..., 2010; <http://www.fao.org/faostat/ru/>). Однако особого развития селекция пивоваренного ячменя в России не получила, в результате чего 80–90 % солода производят или из импортируемого сырья, или при выращивании солодовых сортов зарубежной селекции (Гончаров, Мордовин, 2019). Селекция и возделывание российских сортов пивоваренного ячменя ведутся как в европейской части страны, так и в Западной Сибири и на Алтае (Сурин и др., 2014; Аниськов и др., 2016; Николаев и др., 2017; Мусалитин и др., 2019). Ввиду жестких стандартов со стороны пивоваренной промышленности и различий климатических условий в регионах Российской Федерации создание собственной сырьевой базы пивоваренного ячменя сталкивается с существенными трудностями (Сурин и др., 2014; Мусалитин и др., 2019). Как правило, импортные сорта обладают хорошими технологическими характеристиками, отвечающими требованиям современного пивоваренного производства, однако при выращивании их в российских регионах показатели произведенного из них солода и пива чаще всего не достигают заявленных характеристик (Аниськов и др., 2016; Николаев и др., 2017). Поэтому получение конкурентоспособных отечественных сортов пивоваренного ячменя, сочетающих в себе адаптивность к условиям выращивания с оптимальными технологическими параметрами, является актуальной задачей.

Пивоваренные качества ячменя относятся к сложным количественным признакам и имеют полигенный контроль (Fox et al., 2003), в связи с чем изучение их с применением традиционных методов анализа затруднено. Привлечение молекулярных маркеров позволяет значительно расширить возможности по хромосомной локализации генов и локусов количественных признаков (QTL – quantitative trait loci), детерминирующих признаки качества солода, и обеспечить селекционный процесс эффективным инструментом для ускоренного и направленного отбора растений (маркер-опосредованная селекция) (Han et al., 1997).

В этом обзоре рассматриваются и обсуждаются основные проблемы, связанные с молекулярно-генетическим картированием пивоваренных признаков, и результаты ис-

пользования современных технологий высокопроизводительного генотипирования для прикладных исследований по созданию селекционного материала с улучшенными пивоваренными свойствами.

### Особенности генетического контроля пивоваренных признаков

Фенотип, определяющий пивоваренное качество ячменя, представляет собой результат взаимодействия большого количества параметров, каждый из которых имеет сложную генетическую основу (Molina-Cano et al., 1997; Fox et al., 2003). Большинство из них относятся к количественным признакам с относительно низким уровнем наследуемости, которые контролируются множеством генов (Fox et al., 2003). Например, значения наследуемости для экстрактивности, оцениваемые в  $F_2$  и  $F_3$  с помощью различных методов и в разных популяциях, варьировали от 8 до 70 %, а наследуемость активности  $\alpha$ -амилазы у растений  $F_2$  и  $F_3$  варьировала от 37 до 65 % и от 39 до 74 % соответственно (Foster et al., 1967). Кроме того, проявление количественных признаков зачастую зависит от условий выращивания, таких как состав почвы, температура, полив и применение удобрений (Qi et al., 2005), взаимодействие генотип  $\times$  среда (Coles et al., 1991), методов проведения лабораторного анализа (Cullis et al., 2003) и сложных взаимоотношений между компонентами, определяющими признаки качества солода. Все эти аспекты обуславливают сложности для точной локализации QTL, контролирующих пивоваренные качества.

В некоторых исследованиях QTL для определенных пивоваренных качеств были обнаружены в различных районах генома, что связано с влиянием разных генотипов, задействованных в скрещивании популяций, и/или влиянием взаимодействий генотип  $\times$  среда. Например, QTL, контролирующие содержание солодового экстракта, были идентифицированы на хромосомах 1Н и 2Н в популяциях, полученных от двух североамериканских сортов (Marquez-Cedillo et al., 2000), и на хромосомах 1Н и 5Н в популяциях из австралийских и канадских сортов (Collins et al., 2003). Даже при одной и той же популяции (Blenheim  $\times$  E224/3) QTL-локусы для солодового экстракта на хромосоме 2Н разные исследователи обнаружили в разном количестве и на разных позициях (Thomas et al., 1996; Powell et al., 1997). Поэтому возникает необходимость валидации QTL с использованием разных картирующих популяций, выращенных в различающихся условиях, для возможности оценки взаимодействия QTL со средой (Panozzo et al., 2007; Elía et al., 2010).

Тем не менее QTL-анализ на основе двуродительских картирующих популяций получил широкое распространение для идентификации и локализации QTL-локусов (Marquez-Cedillo et al., 2000; Collins et al., 2003; Edney, Mather, 2004; Emebiri et al., 2005; Panozzo et al., 2007; Rae et al., 2007). Гены или QTL, контролирующие пивоваренные признаки, были идентифицированы на всех семи хромосомах ячменя, но большинство из них выявлены на хромосомах 1Н, 4Н, 5Н и 7Н (Schmalenbach, Pillen, 2009; Wang et al., 2015). Значительная часть исследований, посвященных изучению QTL, ответственных за пивоваренные качества, выполнена на основе данных

генотипирования, полученных с применением различных молекулярных маркеров (Han et al., 1997; Mather et al., 1997; Coventry et al., 2003; Panozzo et al., 2007; Rae et al., 2007; Schmalenbach, Pillen, 2009; Szűcs et al., 2009; Castro et al., 2013). Кроме того, база маркеров ячменя значительно расширилась с развитием методов детекции однонуклеотидного полиморфизма (SNP, single-nucleotide polymorphism) на основе технологии Illumina GoldenGate, что обеспечило возможность доступа к тысячам аллелей и привело к созданию высоконасыщенной консенсусной карты ячменя с 2943 локусами SNP (Close et al., 2009). Информация об этих SNP была скомбинирована с другими генетическими маркерами, такими как RFLP, AFLP, SSR и DArT, в объединенной базе пивоваренных QTL ячменя (Szűcs et al., 2009). Была составлена карта, насчитывающая 154 QTL, ассоциированных с 18 пивоваренными признаками, локализованных на всех хромосомах ячменя.

Известно не менее 268 пивоваренных QTL/генов, найденных в более чем 20 картирующих популяциях (Hayes et al., 2000; Zale et al., 2000; Fang et al., 2019). Однако результаты этих исследований сложно применять напрямую в селекции по многим причинам. Например, большинство картирующих популяций не включают генотипы, используемые для получения новых сортов; QTL могут быть специфичны для определенной популяции; желательные для пивоваренного качества аллели могут быть зафиксированы только в конкретных генотипах; некоторые QTL могут иметь низкую точность локализации из-за малого размера картирующих популяций (Sneller et al., 2009). Особая проблема для селекции – то, что QTL, идентифицированные в картирующих популяциях, могут не сегрегировать в селекционных популяциях, как, например, QTL для пивоваренных качеств на хромосомах 4Н и 7Н ячменя (Condon et al., 2008). Вследствие этого подчеркивается, что использование для картирования местных селекционных линий может быть более эффективным для выявления QTL, адекватных конкретным условиям выращивания и целям селекции (Pozniak et al., 2012).

### Использование маркер-ориентированной селекции для улучшения пивоваренных качеств

Маркер-ориентированная селекция (МОС) ячменя представляет особый интерес в плане получения генотипов с хорошими пивоваренными свойствами, так как фенотипическая оценка качества солода с задействованием лабораторного оборудования – дорогостоящий процесс, требует больших объемов зерна. Эти признаки находятся под влиянием взаимодействия генотипа со средой. Молекулярные маркеры для оценки пивоваренных качеств могут обеспечить быстрый отбор растений на ранних этапах селекционных исследований и изучение популяций большого размера, тем самым увеличивая вероятность обнаружения желаемых генетических комбинаций (Igarua et al., 2000).

Для количественных признаков, к которым относятся пивоваренные, МОС имеет два основных ограничения. Во-первых, по сравнению с моногенными признаками, количественные признаки характеризуются низкой наследуемостью, что влечет за собой менее точную оценку



их генетической локализации. В результате возникает необходимость отбора большого фрагмента хромосомы, что сопряжено с переносом многих потенциально нежелательных генов. Во-вторых, многие из аллелей QTL трудно обнаружить при переносе в другую генотипическую среду (Rae et al., 2007). Большинство исследований по картированию QTL, отвечающих за качество солода, были основаны на скрещивании родителей, контрастных по пивоваренным качествам, например, пивоваренный сорт × кормовой сорт, что идет вразрез с общепринятой практикой селекции пивоваренного ячменя, в которой обычно не используют кормовые генотипы. В связи с этим локусы количественных признаков, ответственные за пивоваренные качества, перед использованием в МОС должны быть проверены в селекционных программах. Кроме того, некоторые из идентифицированных QTL нельзя применять для МОС, поскольку они ассоциированы не только с целевыми, но и с нежелательными признаками. Так, один из таких QTL обнаружен на длинном плече хромосомы 3Н и ассоциирован не только с увеличением силы диастаза, но и с повышением вязкости сула (Panozzo et al., 2007).

Одним из успешных примеров улучшения пивоваренных качеств с использованием МОС служат работы, связанные с ферментом β-амилазой, которая в основном определяет силу диастаза (Zhang et al., 2007). Локус *Bmy1* на хромосоме 4Н контролирует активность β-амилазы, соотношение свободного/связанного фермента и термостабильность, а его аллели – различные изоферментные типы. Были разработаны ПЦР-маркеры, позволяющие проводить отбор различных аллелей β-амилазы, что дает возможность использовать эти маркеры в МОС в зависимости от потребностей пивоварения (Erkkilä, 1999). Например, в случае необходимости высокой диастатической силы и ферментативной активности нужно проводить отбор аллелей *Sd2-H* и *Sd3*. С помощью молекулярных маркеров и дигаплоидной технологии был осуществлен перенос аллеля *Bmy1-Sd3* от *Hordeum spontaneum* L. в два коммерческих сорта культурного ячменя. В результате активность β-амилазы и диастатическая сила у этих сортов увеличились в среднем на 30 % (Li et al., 2004). Использование CAPS-маркера позволило перенести аллель *Sd3* термостабильной β-амилазы от дикорастущего ячменя *H. spontaneum* в коммерческий сорт Gairdner и получить элитные линии с высокими пивоваренными качествами (Xu et al., 2018). Описание маркеров, использованных в работах, посвященных МОС пивоваренных признаков ячменя, приведено в Приложении<sup>1</sup>.

Культурный ячмень содержит две изоформы фермента липоксигеназы, которая окисляет ненасыщенные жирные кислоты в соответствующие гидроксипероксиды. Одна из изоформ – LOX1 – способствует синтезу веществ, ухудшающих вкусовую стабильность пива (Hirota et al., 2006). Установлено, что этот признак кодируется локусом на хромосоме 4Н, а отсутствие данного белка вызвано однонуклеотидной мутацией. Применение CAPS-маркера для отбора мутантов, лишенных изофермента LOX1, позволило создать новые селекционные линии за три года, хотя обычно для этого требуется около десяти лет. Обнаружено,

что в пиве, приготовленном с использованием ячменя, не имеющего LOX1 (null-Lox сорта), содержание веществ, вызывающих застарелый вкус из-за окисления, было снижено на 75 % по сравнению с пивом, приготовленным из обычного ячменного солода (Hirota et al., 2005). Один из показателей качества пива – стабильность пивной пены, которая зависит от совместного действия различных белков, изо-альфа-кислот, полисахаридов и ионов металлов, содержащихся в пиве. Для отбора гаплотипов белков Z4 и Z7, ассоциированных с качеством пивной пены, были разработаны CAPS-маркеры и показана их эффективность при анализе 23 сортов пивоваренного ячменя (Iimure et al., 2011).

Представлена возможность использования МОС для отбора популяций с улучшенными пивоваренными качествами (Coventry et al., 2003). Например, было выявлено, что линии, несущие аллель, сцепленный с SSR-маркером EVmac501 на хромосоме 1Н, характеризуются повышенными, по сравнению с другими линиями, значениями диастатической силы, β- и α-амилазы. Кроме того, этот маркерный локус ассоциирован с повышенным содержанием солодового экстракта, поэтому рассматривается как перспективный для применения в МОС (Collins et al., 2003). Использование МОС для отбора растений, несущих целевые пивоваренные признаки, позволило создать перспективные селекционные линии при скрещивании кормового ячменя сорта Keel с тремя сортами-донорами, имевшими высокие показатели пивоваренного качества (Vassos et al., 2004). F. Nan с коллегами (1997) провели сравнение эффективности селекции пивоваренных качеств с помощью фенотипического подхода и маркер-ассоциированной селекции с применением молекулярных маркеров, фланкирующих районы генома QTL1 и QTL2, ответственные за процент солодового экстракта, активность α-амилазы, силу диастаза и содержание β-глюкана в солоде. Установлено, что для QTL1 подход, основанный на комбинации МОС и оценки фенотипа, более эффективен, чем просто отбор по фенотипу, сопряженный с трудоемкими и дорогостоящими методами оценки компонентов солода. Процесс отбора желаемых генотипов может быть значительно облегчен с помощью ПЦР-маркеров, в связи с чем ряд RFLP-маркеров для пивоваренных QTL был конвертирован в ПЦР-маркеры (Lee, Penner, 1997).

Известны также другие примеры использования МОС для работы с QTL, ассоциированными с пивоваренными признаками. Так, с помощью молекулярных маркеров была подтверждена локализация на хромосоме 5Н двух QTL, влияющих на пивоваренные качества. В дальнейшем отбор генотипов, несущих аллели от пивоваренного сорта Harrington, позволил получить дигаплоидные линии с улучшенными пивоваренными характеристиками, такими как низкое значение β-глюкана и содержание белка в зерне, высокая сила диастаза и солодового экстракта (Igartua et al., 2000). Применение ПЦР-маркеров к району QTL на хромосоме 5Н, влияющему на активность α-амилазы, дало возможность интрогрессировать этот признак от сорта пивоваренного ячменя Mogex в кормовой ячмень Labelle (Ayoub et al., 2003). Это исследование показало, что МОС можно успешно привлекать для работы с QTL в популяциях, где только один из родителей (сорт

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:  
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx4.pdf>



Могех) использован для первоначальной идентификации и картирования QTL. Посредством SSR-маркеров была осуществлена интрогрессия QTL-районов, ответственных за содержание белка, показатели солодового экстракта и вязкости, от озимого сорта пивоваренного ячменя Nuge в дигаметоидную популяцию, полученную от скрещивания Nuge с яровым сортом Tremois (Laidò et al., 2009). Были созданы SSR-маркеры, фланкирующие QTL-локусы на хромосомах 2Н, 6Н и 7Н, имеющие значительный эффект на содержание белка, которые, по мнению авторов, могут быть полезными при создании сортов с высоким содержанием белка (Fan et al., 2017). В работе с популяциями, полученными при скрещивании элитных пивоваренных сортов ячменя, было проведено картирование QTL-локусов, ответственных за пивоваренные качества, и определены два SSR-маркера, перспективных для использования в МОС (Panozzo et al., 2007).

### Полногеномный анализ ассоциаций как перспектива развития молекулярной селекции пивоваренных качеств

С появлением более экономичных высокопроизводительных платформ генотипирования, таких как Diversity Array Technology (DArT) (Wenzl et al., 2004) и Illumina's GoldenGate Assay (Close et al., 2009), и усовершенствованием методов статистического анализа и компьютерных программ полногеномный анализ ассоциаций – ПГАА (genome-wide association studies, GWAS) – стал многообещающей альтернативой традиционному QTL-анализу двуродительских популяций для обнаружения и точного картирования локусов количественных признаков. К преимуществам этого метода относятся более широкий охват генетического разнообразия популяции, т. е. одновременного изучения большого числа аллелей, высокая разрешающая способность картирования, вплоть до установления полиморфизма единичного нуклеотида, и сокращение времени исследования из-за отсутствия необходимости создавать картирующую популяцию (Rafalski, 2010).

Для эффективного применения имеющихся технологий рядом исследователей при выполнении ПГАА были использованы сведения, полученные в ходе длительных селекционных испытаний, что существенно снижает стоимость генетических исследований. Например, были скомбинированы данные по пивоваренным качествам из 97 селекционных испытаний, проведенных на 1862 линиях, с результатами применения 3072 SNP-маркеров для ассоциативного картирования. Выявлено, что этот подход обеспечивает повышенную точность для идентификации QTL, связанных с пивоваренными качествами, по сравнению с предыдущими исследованиями по картированию (Mohammadi et al., 2014). Кроме того, метод ПГАА позволяет идентифицировать гораздо большее количество молекулярных маркеров по сравнению с традиционным QTL-картированием (Cai et al., 2013). В другом исследовании были использованы данные о фенотипических проявлениях 18 пивоваренных признаков, накопленные за 25 лет для 174 европейских сортов ячменя, при изучении ПГАА с применением DArT-маркеров.

Помимо подтверждения уже известных QTL на хромосомах 1Н, 2Н и 5Н, были обнаружены новые ассоциации,

например маркеры, сцепленные с индексом пивоваренного качества и вязкости (Matthies et al., 2014). Коллекция из 91 элитной линии ячменя была проанализирована с помощью ПГАА с целью поиска DArT-маркеров, ассоциированных с семью пивоваренными качествами, определено 19 предполагаемых маркерных экспрессирующихся последовательностей, ответственных за ассоциации маркер-признак (Beattie et al., 2010). Изучение коллекции из 224 яровых генотипов ячменя с использованием 1536 SNP позволило обнаружить 57 новых QTL, ответственных за хозяйственно ценные признаки, в том числе содержание крахмала и белка в зерне (Pasam et al., 2012). Таким образом, установленные в рассмотренных исследованиях ассоциации между генотипом и фенотипом могут быть полезными для отбора родительских генотипов, несущих желаемые аллели, с целью моделирования будущих селекционных исследований, хотя полученные результаты нуждаются в валидации в полевых условиях.

### Заклучение

Пивоваренное качество ячменя – результат сложного взаимодействия различных компонентов, контролируемых множеством генов. В связи с этим отбор по фенотипическим признакам является трудоемким и дорогостоящим процессом. Маркер-опосредованная селекция пивоваренных признаков представляет собой эффективную альтернативу или дополнение к традиционному подходу, однако требует детальной информации о генетической структуре генов/QTL, отвечающих за целевые признаки. Анализ QTL широко используется для хромосомной локализации хозяйственно ценных признаков и выявления молекулярных маркеров. К настоящему времени идентифицировано большое число QTL, контролирующих пивоваренные признаки, а применение ассоциированных с ними молекулярных маркеров и современных достижений, полученных в области высокоразрешающего генотипирования, дает возможность проводить эффективный отбор желаемых генотипов для селекции сортов ячменя с высокими пивоваренными качествами.

### Список литературы / References

- Анисков Н.И., Николаев П.Н., Поползухин П.В., Сафонова И.В., Братцева Л.И. Новый среднеспелый сорт ярового пивоваренного ячменя Омский 100. *Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та*. 2016; 4(138):14-19.
- [Anis'kov N.I., Nikolaev P.N., Popolzukhin P.V., Safonova I.V., Bratseva L.I. A new middle-ripening spring malting barley variety Omskiy 100. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2016; 4(138):14-19. (in Russian)]
- Гончаров С.В., Мордовин А.Н. Пивоваренный ячмень – драйвер интенсификации. В: Биологизация земледелия: перспективы и реальные возможности: Сб. статей междунар. науч.-практ. конф. Воронеж, 2019;116-125.
- [Goncharov S.V., Mordovin A.N. Malting barley is a driver of intensification. In: *Biologization of Agriculture: Prospects and Real Opportunities*. Voronezh, 2019;116-125. (in Russian)]
- Меледина Т.В., Прохорчик И.П., Кузнецова Л.И. Биохимические процессы при производстве солода: Уч. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013.
- [Meledina T.V., Prokhorchik I.P., Kuznetsova L.I. *Biochemical Processes in Malt Production*. St. Petersburg, 2013. (in Russian)]

- Мусалитин Г.М., Борадулина В.А., Кузикеев Ж.В. Ячмень в Алтайском крае и итоги селекции. *Вестн. Бурят. гос. с.-х. акад. им. В.П. Филиппова*. 2019;2(55):29-34.  
[Musalitin G.M., Boradulina V.A., Kuzikeev Zh.V. Barley in the Altai region and the results of breeding. *Vestnik Buryatskoy Gosudarstvennoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii im. V.R. Filippova = Bulletin of the Filippov Buryat State Agricultural Academy*. 2019; 2(55):29-34. (in Russian)]
- Николаев П.Н., Поползухин П.В., Аниськов Н.И., Юсова О.А., Сафонова И.В. Агробиологическая характеристика пивоваренного сорта ярового ячменя Омский 100. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):90-99. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-90-99.  
[Nikolaev P.N., Popoluzhkin P.V., Aniskov N.I., Yusova O.A., Safonova I.V. Agrobiological characteristics of the malting spring barley cultivar Omskiy 100. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selekcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2017;178(4):90-99. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-90-99. (in Russian)]
- Сортовые ресурсы зернофуражных культур Нечерноземной зоны России (каталог). Екатеринбург: ГНУ Уральский НИИСХ, 2010. [Varietal Resources of Grain Fodder Crops in the Nonchernozem Zone of Russia (Catalog). Yekaterinburg: GNU Ural Research Institute of Agriculture Publ., 2010. (in Russian)]
- Сурин Н.А., Зобова Н.В., Ляхова Н.Е. Генетический потенциал и селекционная значимость ячменя в Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(2):378-386.  
[Surin N.A., Zobova N.V., Lyahova N.E. The genetic potential of barley in Siberia and its importance for breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(2):378-386. (in Russian)]
- Ayoub M., Armstrong E., Bridger G., Fortin M.G., Mather D.E. Marker-based selection in barley for a QTL region affecting alpha amylase activity of malt. *Crop Sci*. 2003;43:556-561.
- Bamforth C.W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J. Cereal Sci*. 2009;50:353-357. DOI 10.1016/j.jcs.2009.03.001.
- Beattie A.D., Edney M.J., Scoles G.J., Rosnagel B.G. Association mapping of malting quality data from western Canadian two-row barley cooperative trials. *Crop Sci*. 2010;50(5):1649. DOI 10.2135/cropsci2009.06.0334.
- Bond J., Capelhart T., Allen E., Kim G. Boutique Brews, Barley, and the Balance Sheet: Changes in Malt Barley Industrial Use Require an Updated Forecasting Approach. Washington, DC: Economic Research Division, United States Department of Agriculture, 2015:18-23.
- Cai S., Yu G., Chen X., Huang Y.C., Jiang X.G., Zhang G.P., Jin X. Grain protein content variation and its association analysis in barley. *BMC Plant Biol*. 2013;13(35). DOI 10.1186/1471-2229-13-35.
- Castro A., Cammarota L., Gomez B., Gutierrez L., Hayes P.M., Locatelli A., Motta L., Pieroni S. Genome-wide association mapping of malting quality traits in relevant barley germplasm in Uruguay. In: Zhang G., Li C., Liu X. (Eds.). *Advances in Barley Sciences*. New York: Springer, 2013;37-46. DOI 10.1007/978-94-007-4682-4\_3.
- Chen J., Dai F., Wei K., Zhang G. Relationship between malt qualities and  $\beta$ -amylase activity and protein content as affected by timing of nitrogen fertilizer application. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2006;7: 79-84. DOI 10.1631/jzus.2006.B0079.
- Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L., Druka A., Stein N., Svensson J.T., Wanamaker S., Bozdag S., Roose M.L., Moscou M.J., Chao S., Varshney R.K., Szucs P., Sato K., Hayes P.M., Matthews D.E., Kleinhofs A., Muehlbauer G.J., DeYoung J., Marshall D.F., Madishetty K., Fenton R.D., Condamine P., Graner A., Waugh R. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics*. 2009; 10:582. DOI 10.1186/1471-2164-10-582.
- Coles G.D., Jamieson P.D., Haslemore R.M. Effect of moisture stress on malting quality in triumph barley. *J. Cereal Sci*. 1991;14:161-177. DOI 10.1016/S0733-5210.
- Collins H.M., Panozzo J.F., Logue S.J., Jefferies S.P., Barr A.R. Mapping and validation of chromosome regions associated with high malt extract in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Aust. J. Agric. Res*. 2003;54:1223-1240. DOI 10.1071/AR02201.
- Condon F., Gustus C., Rasmusson D., Smith K. Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. *Crop Sci*. 2008;48:1027-1036. DOI 10.2135/cropsci2007.07.0415.
- Coventry S.J., Collins H.M., Barr A.R., Jefferies S.P., Chalmers K.J., Logue S.J., Langridge P. Use of putative QTLs and structural genes in marker assisted selection for diastatic power in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Aust. J. Agric. Res*. 2003;54:1241-1250. DOI 10.1071/AR02193.
- Cu S.T., March T.J., Stewart S., Degner S., Coventry S., Box A., Stewart D., Skadhauge B., Burton R.A., Fincher G.B., Eglinton J. Genetic analysis of grain and malt quality in an elite barley population. *Mol. Breed*. 2016;36:129. DOI 10.1007/s11032-016-0554-z.
- Cullis B.R., Smith A.B., Panozzo J.F., Lim P. Barley malting quality: are we selecting the best? *Aust. J. Agric. Res*. 2003;54:1261-1275. DOI 10.1071/AR02195.
- Edney M.J., Mather D.E. Quantitative trait loci affecting germination traits and malt friability in a two-rowed by six rowed barley cross. *J. Cereal Sci*. 2004;39:283-290. DOI 10.1016/j.jcs.2003.10.008.
- Elía M., Swanston J.S., Moralejo M., Casas A., Pérez-Vendrell A.M., Ciudad F.J., Thomas W.T.B., Smith P.L., Ullrich S.E., Molina-Cano J.-L. A model of the genetic differences in malting quality between European and north American barley cultivars based on a QTL study of the cross Triumph  $\times$  Morex. *Plant Breed*. 2010;129: 280-290. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01694.x.
- Emebiri L.C., Moody D.B., Horsley R., Panozzo J., Read B.J. The genetic control of grain protein content variation in a doubled haploid population derived from a cross between Australian and north American two-rowed barley lines. *J. Cereal Sci*. 2005;41:107-114. DOI 10.1016/j.jcs.2004.08.012.
- Erkkilä M.J. Intron III-specific markers for screening of  $\beta$ -amylase alleles in barley cultivars. *Plant Mol. Biol. Rep*. 1999;17:139-147. DOI 10.1023/A:1007595821379.
- Fan C., Zhai H., Wang H., Yue Y., Zhang M., Li J., Wen S., Guo G., Zeng Y., Ni Z., You M. Identification of QTLs controlling grain protein concentration using a high-density SNP and SSR linkage map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol*. 2017;17(1):122. DOI 10.1186/s12870-017-1067-6.
- Fang Y., Zhang X., Xue D. Genetic analysis and molecular breeding applications of malting quality QTLs in barley. *Front. Genet*. 2019; 10:352. DOI 10.3389/fgene.2019.00352.
- Foster A.E., Peterson G.A., Banasik O.J. Heritability of factors affecting malting quality of barley. *Crop Sci*. 1967;7:611-613. DOI 10.2135/cropsci1967.0011183X000700060016x.
- Fox G.P., Panozzo J.F., Li C.D., Lance R.C.M., Inkerman P.A., Henry R.J. Molecular basis of barley quality. *Aust. J. Agric. Res*. 2003; 54:1081-1101. <https://doi.org/10.1071/AR02237>.
- Han F., Romagosa I., Ullrich S., Jones B., Hayes P., Wesenberg D. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Mol. Breed*. 1997;3:427-437. DOI 10.1023/A:1009608312385.
- Hayes P., Castro A., Marquez-Cedillo L., Corey A., Henson C., Jones B., Kling J., Mather D., Matus I., Rossi C. A summary of published barley. *QTL Reports*. 2000. <http://www.barleyworld.org/northamericanbarley/qtlsummary.php>.
- Hirota N., Kaneko T., Kuroda H., Kaneda H., Takashio M., Ito K., Takeda K. Characterization of lipoxigenase-1 null mutants in barley. *Theor. Appl. Genet*. 2005;111(8):1580-1584. DOI 10.1007/s00122-005-0088-y.
- Hirota N., Kuroda H., Takoi K., Kaneko T., Kaneda H., Yoshida I., Takashio M., Ito K., Takeda K. Brewing performance of malted lipoxigenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer. *Cereal Chem*. 2006;83(3):250-254. DOI 10.1094/CC-83-0250.
- Igartua E., Edney M., Rosnagel B.G., Spaner D., Legge W.G., Scoles G.J., Eckstein P.E., Penner G.A., Tinker N.A., Briggs K.G., Falk D.E., Mather D.E. Marker-based selection of QTL affecting grain and malt quality in two-row barley. *Crop Sci*. 2000;40:1426-1433. DOI 10.2135/cropsci2000.4051426x.

- Imure T., Kihara M., Ichikawa S., Ito K., Takeda K., Sato K. Development of DNA markers associated with beer foam stability for barley breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:199-210. DOI 10.1007/s00122-010-1436-0.
- Laidò G., Barabaschi D., Tondelli A., Gianinetti A., Stanca A.M., Li Destri Nicosia O., NDi F., Francia E., Pecchioni N. QTL alleles from a winter feed type can improve malting quality in barley. *Plant Breed.* 2009;128:598-605. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01636.x.
- Lee S.J., Penner G.A. The conversion of RFLP markers to allele specific amplicons linked to QTLs governing malting quality in barley. *Mol. Breed.* 1997;3:457-462. DOI 10.1023/A:1009660921822.
- Li C.D., Cakir M., Lance R. Genetic improvement of malting quality through conventional breeding and marker-assisted selection. In: Zhang G., Li C. (Eds.). *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality. Advanced Topics in Science and Technology in China.* Berlin; Heidelberg: Springer, 2009.
- Li C.D., Lance R., Tarr A., Broughton S., Harasymow S., Appels R., Jones M. Improvement of barley malting quality using a gene from *Hordeum spontaneum*. In: VI Int. Barley Genet. Symp. Brno, Czech Republic, 2004.
- Marquez-Cedillo L.A., Hayes P.M., Jones B.L., Kleinhofs A., Legge W.G., Rossnagel B.G., Sato K., Ullrich S.E., Wesenberg D.M. QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite north American cultivars representing different germplasm groups. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:173-184. DOI 10.1007/s001220051466.
- Mather D.E., Tinker N.A., LaBerge D.E., Edney M., Jones B.L., Rossnagel B.G., Legge W., Briggs K.G., Irvine R.G., Falk D.E., Kasha K.J. Regions of the genome that affect grain and malt quality in a north American two-row barley cross. *Crop Sci.* 1997;37:544-554. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700020039x.
- Matthies I.E., Malosetti M., Röder M.S., van Eeuwijk F. Genome-wide association mapping for kernel and malting quality traits using historical European barley records. *PLoS One.* 2014;9(11):e110046. DOI 10.1371/journal.pone.0110046.
- Mohammadi M., Endelman J.B., Nair S.S., Chao S., Jones S.S., Muehlbauer G.J., Ullrich S.E., Baik B.J., Wise M.L., Smith K.P. Association mapping of grain hardness, polyphenol oxidase, total phenolics, amylose content, and  $\beta$ -glucan in US barley breeding germplasm. *Mol. Breed.* 2014;34:1229-1243. DOI 10.1007/s11032-014-0112-5.
- Molina-Cano J., Francesch M., Perez-Vendrell A.M., Ramo T., Voltas J., Brufau J. Genetic and environmental variation in malting and feed quality of barley. *J. Cereal Sci.* 1997;25:37-47. DOI 10.1007/s00122-015-2481-5.
- Newton A.C., Flavell A.J., George T.S., Leat P., Mullholland B., Ramsay L., Revoredo-Giha C., Russell J., Steffenson B.J., Swanston J.S., William T.B., Waugh R., Waugh T., White P.J., Bingham I.J. Crops that feed the world 4 barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Secur.* 2011;3:141-178. DOI 10.1007/s12571-011-0126-3.
- Panozzo J.F., Eckermann P., Mather D.E., Moody D.B., Black C.K., Collins H.M., Barr A.R., Lim P.O., Cullis B.R. QTL analysis of malting quality traits in two barley populations. *Aust. J. Agric. Res.* 2007;58(9):858-866. DOI 10.1071/AR06203.
- Paris M., Jones M.G.K., Eglinton J.K. Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley  $\beta$ -amylase alleles. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2002;20:149-159. DOI 10.1007/BF02799430.
- Pasam R.K., Sharma R., Malosetti M., Van Eeuwijk F.A., Hasevener G., Kilian B., Graner A. Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. *BMC Plant Biol.* 2012;12(1):16. DOI 10.1186/1471-2229-12-16.
- Powell W., Thomas W.T.B., Baird E., Lawrence P., Booth A., Harrower B., McNicol J.W., Waugh R. Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity.* 1997;79:48-59. DOI 10.1038/hdy.1997.122.
- Pozniak C.J., Clarke J.M., Clarke F.R. Potential for detection of marker-trait associations in durum wheat using unbalanced, historical phenotypic dataset. *Mol. Breed.* 2012;30:1537-1550. DOI 10.1007/s11032-012-9737-4.
- Rae S.J., Macaulay M., Ramsay L., Leigh F., Matthews D., O'Sullivan D.M., Donini P., Morris P.C., Powell W., Marshall D.F., Waugh R., Thomas W.T.B. Molecular barley breeding. *Euphytica.* 2007;158:295-303. DOI 10.1007/s10681-006-9166-8.
- Rafalski J.A. Association genetics in crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010;13:1-7. DOI 10.1016/j.pbi.2009.12.004.
- Riggs T.J., Kirby E.J.M. Developmental consequences of two-row and six-row ear type in spring barley. *J. Agric. Sci.* 1978;91:199-205.
- Qi J.C., Chen J.X., Wang J.M., Wu F.B., Cao L.P., Zhang G.P. Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2005;6(11):1069-1075. DOI 10.1631/jzus.2005.B1069.
- Schmalenbach I., Pillen K. Detection and verification of malting quality QTLs using wild barley introgression lines. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:1411-1427. DOI 10.1007/s00122-009-0991-8.
- Sneller C.H., Mather D.E., Crepeux S. Analytical approaches and population types for finding and utilizing QTL in complex plant populations. *Crop Sci.* 2009;49:363-380. DOI 10.2135/cropsci2008.07.0420.
- Stanca A.M., Gianinetti A., Rizza F., Terzi V. Barley: an overview of a versatile cereal grain with many food and feed uses. In: Wrigley C.W., Corke H., Seetharaman K., Faubion J. (Eds.). *Encyclopedia of Food Grains.* 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2016:147-152.
- Szűcs P., Blake V.C., Bhat P.R., Close T.J., Cuesta-Marcos A., Muehlbauer G.J., Ramsay L.V., Waugh R., Hayes P.M. An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *Plant Genome.* 2009;2:134-140. DOI 10.3835/plantgenome2008.01.0005.
- Thomas W.T.B., Powell W., Swanston J.S., Ellis R.P., Chalmers K.J., Barua U.M., Jack P., Lea V., Forster B.P., Waugh R., Smith D.B. Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. *Crop Sci.* 1996;36:265-273. DOI 10.2135/cropsci1996.0011183X003600020009x.
- Vassos E.J., Barr A.R., Eglinton J.K. Genetic conversion of feed barley varieties to malting types. In: *Proceedings of the 9th International Barley Genetics Symposium.* Czech, 20-26 June, 2004.
- Wang J., Yang J., Zhang Q., Zhu J., Jia Q., Hua W., Shang Y., Li C., Zhou M. Mapping a major QTL for malt extract of barley from a cross between TX9425  $\times$  Naso Nijo. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128:943-952. DOI 10.1007/s00122-015-2481-5.
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. Diversity arrays technology (DART) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101:9915-9920. DOI 10.1073/pnas.0401076101.
- Xu Y., Zhang X., Harasymow S., Westcott S., Zhang W., Li C. Molecular marker-assisted backcrossing breeding: an example to transfer a thermostable  $\beta$ -amylase gene from wild barley. *Mol. Breed.* 2018;38:63-72. DOI 10.1007/s11032-018-0828-8.
- Zale J., Clancy J., Ullrich S., Jones B., Hayes P. Summary of barley malting quality QTLs mapped in various populations. *Barley Genet. Newsl.* 2000;30:44-54.
- Zhang W.S., Li X., Liu J.B. Genetic variation of Bmy1 alleles in barley (*Hordeum vulgare* L.) investigated by CAPS analysis. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1039-1050. DOI 10.1007/s00122-006-0497-6.

#### ORCID ID

N.V. Trubacheeva orcid.org/0000-0002-6701-6811  
L.A. Pershina orcid.org/0000-0002-9941-2026

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России «Курчатовский центр геномных исследований мирового уровня» № 075-15-2019-1662.

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

Поступила в редакцию 03.08.2020. После доработки 24.09.2020. Принята к публикации 26.10.2020.



## Антоцианы как компоненты функционального питания

Р.С. Юдина<sup>1</sup>✉, Е.И. Гордеева<sup>1</sup>, О.Ю. Шоева<sup>1</sup>, М.А. Тихонова<sup>1, 2</sup>, Е.К. Хлесткина<sup>1, 3</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

✉ yurs@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Среди встречающихся в природе пигментов антоцианы являются, пожалуй, одной из наиболее изученных групп. Начиная с первых исследований о физико-химических свойствах антоцианов, проведенных еще в XVII в. британским естествоиспытателем Р. Бойлем, наука об этих уникальных соединениях сделала огромный шаг вперед. На сегодняшний день достаточно хорошо исследованы структура и функции антоцианов в растительных клетках, а путь их биосинтеза – один из самых полно охарактеризованных путей биосинтеза вторичных метаболитов как на биохимическом, так и на генетическом уровне. Наряду с этими фундаментальными достижениями, мы начинаем осознавать потенциал антоцианов как соединений промышленного значения, как пигментов самих по себе, а также в качестве компонентов функционального питания, способствующих предупреждению и снижению риска развития хронических заболеваний. Долгое время биологическая активность антоцианов была недооценена, в частности, из-за данных об их низкой биодоступности. Однако в ходе исследований было показано, что в организме человека и животных эти соединения активно метаболизируются и биодоступность, оцененная с учетом их метаболитов, превышала 12 %. Экспериментально подтверждено, что антоцианы обладают антиоксидантными, противовоспалительными, гипогликемическими, антимутагенными, антидиабетическими, противораковыми, нейропротекторными свойствами, а также полезны для здоровья глаз. Однако проведенные исследования не всегда могут объяснить молекулярные механизмы действия антоцианов в организме человека. По некоторым данным, наблюдаемые эффекты объясняются действием не антоцианов, а их метаболитов, которые, благодаря своей повышенной биодоступности, могут быть более биологически активными, чем исходные соединения. Высказывается также предположение о положительном эффекте на здоровье человека всего комплекса полифенольных соединений, поступающего в организм в составе растительной пищи. В представленном обзоре суммированы результаты основных направлений исследований антоцианов в качестве компонентов функционального питания. Отдельное внимание уделено результатам генетических исследований синтеза пигментов, данные которых приобретают особую важность в связи с актуализацией селекционных программ, направленных на повышение содержания антоцианов у культурных растений. Ключевые слова: растения; пигменты; вторичные метаболиты; флавоноиды; антоцианы; регуляторные гены; структурные гены; антиоксиданты; биологическая активность.

**Для цитирования:** Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022

## Anthocyanins as functional food components

R.S. Yudina<sup>1</sup>✉, E.I. Gordeeva<sup>1</sup>, O.Yu. Shoeva<sup>1</sup>, M.A. Tikhonova<sup>1, 2</sup>, E.K. Khlestkina<sup>1, 3</sup>

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

<sup>2</sup> Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Novosibirsk, Russia

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

✉ yurs@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Among the natural pigments, anthocyanins are assumed to represent one of the most studied groups. Starting with the first studies on the physicochemical properties of anthocyanins carried out in the 17th century by British naturalist Robert Boyle, the science about these unique compounds has progressed substantially. To date, the structure and functions of anthocyanins in plant cells have been well studied, and the pathway of their biosynthesis is one of the most fully characterized pathways of secondary metabolite biosynthesis at both the biochemical and genetic levels. Along with these fundamental achievements, we are beginning to realize the potential of anthocyanins as compounds of industrial importance, as pigments themselves, as well as components of functional food that contribute to the prevention and reduction of risk of chronic diseases. For a long time, the biological activity of anthocyanins has been underestimated, in particular, due to the data on their low bioavailability. However, studies showed that in humans and animals, these compounds are actively metabolized and the bioavailability, estimated taking into account their metabolites, exceeded 12 %. It has been experimentally shown that anthocyanins have antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, antimutagenic, antidiabetic, anti-cancer, neuroprotective properties, and they are



beneficial for eye health. However, the studies conducted cannot always explain the molecular mechanism of action of anthocyanins in the human body. According to some reports, the observed effects are not due to the action of anthocyanins themselves, but to their metabolites, which can be more biologically active because of their increased bioavailability. Other data ascribe the positive effect on human health not to individual anthocyanins, but to the whole complex of polyphenolic compounds consumed. The review summarizes the results of the studies of anthocyanins as components of functional food. Special attention is paid to genetic control of the pigment synthesis. These data are of particular importance in respect to the initiated breeding programs aimed at increasing the content of anthocyanins in cultural plants.

Key words: plants; pigments; secondary metabolites; flavonoids; anthocyanins; regulatory genes; structural genes; antioxidants; biological activity.

**For citation:** Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022 (in Russian)

## Введение

В последние годы в науке о питании появилось новое направление – функциональное питание. Его концепция возникла в Японии в 1980–1990-х гг. и базируется на употреблении в пищу так называемых функциональных продуктов питания (Фотев и др., 2018). Согласно определению, функциональными называют пищевые продукты, содержащие физиологически активные, ценные и безопасные для здоровья ингредиенты с известными физико-химическими характеристиками, для которых выявлены и научно обоснованы полезные для сохранения и улучшения здоровья свойства (ГОСТ Р 52349-2005). К таким веществам относятся растворимые и нерастворимые пищевые волокна, витамины, минеральные вещества, жиры и вещества, сопутствующие жирам, полисахариды, вторичные растительные соединения, про- и пребиотики.

В качестве компонентов функционального питания активно исследуются различные биологически активные соединения, среди которых антоцианы привлекают особое внимание (Calderaro et al., 2020). Эти соединения являются водорастворимыми пигментами, окраска которых, в зависимости от структуры и pH среды, может варьировать от красного и пурпурного до синего цвета. Антоцианы широко представлены в группе покрытосеменных растений и встречаются у некоторых представителей голозерных, тогда как в других таксонах они отсутствуют (Rauscher, 2006). Окрашивая генеративные органы и плоды, антоцианы участвуют в привлечении опылителей и распространителей семян, в вегетативных органах они задействованы в адаптивных реакциях к условиям окружающей среды (Nadier, Gould, 2008).

К настоящему времени появились убедительные, научно-обоснованные данные о пользе антоцианов для животных и человека, помимо их важной роли в жизни растений. Ингибирование антоцианами различных форм рака, метаболических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний было задокументировано как на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, так и в клинических и эпидемиологических исследованиях (Тараховский и др., 2013; Li et al., 2017). Ранее предполагалось, что только антиоксидантные свойства антоцианов ответственны за их укрепляющие здоровье эффекты. Однако было показано, что они способны взаимодействовать с регуляторными белками, а также с компонентами сигнальных путей и, таким образом, модулировать физиологические процессы, протекающие в организме человека (Li et al., 2017).

Основные источники антоцианов – темноокрашенные плоды, среди которых ягоды бузины, рябины черноплодной, граната и черники – лидеры по содержанию этих соединений (Ramos et al., 2014). В последнее время в качестве источников антоцианов стали рассматривать более экзотические в этом плане культуры, такие как злаки и картофель, зерно и клубни которых также способны накапливать антоциановые соединения (Паууавула et al., 2013; Zhu, 2018). Несмотря на то что и в зерне, и в клубнях антоцианов содержится меньше, чем в ягодах, они также являются привлекательными источниками этих соединений, поскольку характеризуются более длительным хранением, доступностью и повседневным употреблением в пищу, по сравнению с сезонными ягодами и фруктами. Исследования потребительских характеристик изделий, приготовленных из зерна пшеницы, содержащего антоцианы, показали, что они не уступают, а по некоторым параметрам даже превосходят контрольные изделия, не содержащие антоцианы (Bartl et al., 2015; Pasqualone et al., 2015; Хлесткина и др., 2017; Ma et al., 2018).

В связи с большим потенциалом антоцианов в качестве компонентов функционального питания сегодня становятся востребованными знания об их генетическом контроле, которые находят свое применение в селекционных программах, направленных на создание новых сортов культурных растений с повышенным содержанием этих ценных для здоровья человека соединений.

В настоящем обзоре представлены данные о синтезе антоцианов у растений и его генетическом контроле, особое внимание уделено исследованиям антоцианов в качестве функциональных компонентов продуктов питания, в частности их биодоступности и механизмам позитивного действия в организме человека.

## Химическая структура и разнообразие антоцианов

Антоцианы относятся к флавоноидным соединениям, входящим в группу полифенолов. В их структуре выделяют углеводный остаток и неуглеводное основание – агликон. Все флавоноиды, включая антоцианы, имеют общий 15-углеродный скелет C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, который состоит из двух ароматических колец А и В, соединенных C<sub>3</sub>-фрагментом (рис. 1). Степень окисления С-кольца определяет класс флавоноидов, к которому относится искомое соединение. У антоцианов С-кольцо имеет две двойные связи и несет положительный заряд (ион флавилия).

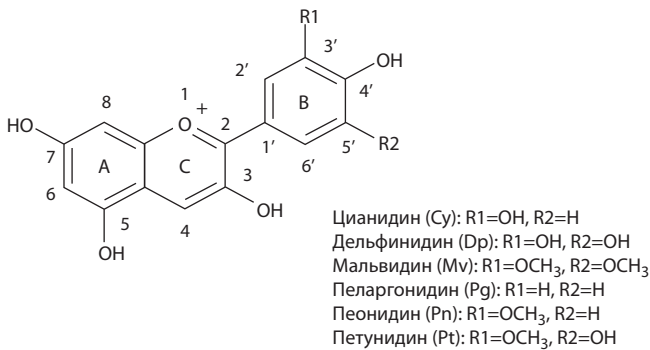


Рис. 1. Базовая структура антоцианов.

Все разнообразие антоцианов, которых, по данным 2006 г., было выявлено около 600 индивидуальных соединений, обуславливают 25 различных агликонов, при этом 90 % идентифицированных антоцианов являются производными только шести из них: цианидина (Cy), дельфинидина (Dp), мальвидина (Mv), пеларгонидина (Pg), пеонидина (Pn) и петунидина (Pt) (Andersen, Jordheim, 2006).

При общем строении C<sub>15</sub>-углеродного скелета в классе антоцианов индивидуальные соединения выделяют на основе наличия, положения и характера модификаций основного скелета. Все антоциановые соединения представляют собой гликозиды, полученные в результате присоединения сахаров к агликонам, среди которых наиболее частыми являются глюкоза (Glu) и рамноза (Rha), а также встречаются галактоза (Gal), арабиноза (Ara), ксилоза (Xyl), рутиноза (Rut), могут попадаться дисахариды и очень редко – трисахариды. Помимо гликозилирования, антоцианы могут подвергаться ацилированию с помощью ароматических или алифатических ацильных остатков, наиболее распространенными из которых являются *n*-кумаровая, кофейная и феруловая кислоты. Антоциановые соединения также могут подвергаться метилированию и метоксилированию, а благодаря наличию реакционноспособных гидроксильных групп они легко вступают в реакции алкилирования, образуя эфиры (Запрометов, 1974).

### Биосинтез антоцианов и его генетическая регуляция

Многообразие флавоноидных соединений, включая антоцианы, образуется в результате общего фенилпропаноидного и флавоноидного путей биосинтеза, активность которых зависит от двух групп генов – структурных, кодирующих ферменты биосинтеза, и регуляторных, кодирующих транскрипционные факторы, которые тканеспецифически регулируют экспрессию структурных генов и определяют, таким образом, паттерны распределения пигментов.

### Биосинтез антоцианов

Биосинтез всех флавоноидных соединений начинается с фенилаланина. Фенилаланин-аммиак-лиаза PAL, циннамат-4-гидроксилаза CHH, 4-кумарат:КоА-лигаза 4CL, действуя поочередно, преобразуют фенилаланин в 4-кумарил-КоА. Последующая конденсация одной молекулы

4-кумарил-КоА и трех молекул малонил-КоА с помощью халконсинтазы CHS приводит к образованию тетрагидроксихалкона и тригидроксихалкона, которые являются предшественниками различных классов флавоноидов и изофлавоноидов соответственно. Под действием халконфлаванонизомеразы CHI тетрагидроксихалкон превращается в нарингенин. Последний служит субстратом для ферментов, осуществляющих реакции гидроксирования С-кольца в положении С3, либо В-кольца в положении С3'. Так, нарингенин с помощью фермента флаванон-3-гидроксилазы F3H преобразуется в дигидрокемпферол ДНК, а с помощью флавоноид-3'-гидроксилазы F3'H – в эриодиктиол.

Гидроксирование ДНК с помощью F3'H или флавоноид-3'5'-гидроксилазы F3'5'H приводит к образованию дигидрокверцетина DHQ или дигидромирицетина DHM соответственно. Полученные дигидрофлавонолы DHK, DHQ и DHM восстанавливаются дигидрофлавонол-4-редуктазой, DFR до соответствующих флаван-3,4-диолов лейкопеларгонидина, лейкоцианидинина, лейкодельфинидина, которые преобразуются до 3-ОН-антоцианидинов пеларгонидина, цианидина и дельфинидина с помощью фермента антоцианидинсинтазы ANS. Последующие этапы биосинтеза антоцианов относятся к реакциям конечных модификаций, необходимых для их стабилизации и хранения. В этой стадии биосинтеза принимают участие ферменты, относящиеся к классам *O*-метилтрансфераз OMT, гликозилтрансфераз GT и ацилтрансфераз AT. Антоциановые соединения синтезируются на цитоплазматической поверхности эндоплазматического ретикулума, а затем транспортируются и хранятся в вакуолях (Winkel-Shirley, 2001).

### Регуляция биосинтеза антоцианов

В регуляции биосинтеза антоцианов принимают участие транскрипционные факторы, принадлежащие к семействам MYB, bHLH и WD40, которые для выполнения регуляторных функций объединяются в MYB-bHLH-WD40 (MBW) комплексы (Hichri et al., 2011). Их регуляция может быть светозависимой и светонезависимой. Светозависимая регуляция инициируется фоторецепторами при действии света различной длины волны. Центральное место в передаче сигналов от фоторецепторов к синтезу антоцианов занимает регуляторный фактор ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) (Bulgakov et al., 2017), который напрямую может связываться с промотором гена *PAP1*, кодирующего транскрипционный фактор MYB (Shin et al., 2013). Другой важный участник светозависимой регуляции – убиквитинлигаза COP1, мишенями которой служат регуляторные факторы, вовлеченные в биосинтез антоцианов (например, PAP1 и PAP2) (Bulgakov et al., 2017).

У некоторых видов растений синтез антоцианов осуществляется в подземных органах, например в клубнях картофеля, что исключает его светозависимую регуляцию. Хотя точный механизм светонезависимой регуляции неизвестен, существует предположение, что он реализуется посредством сахарозы. Так, в промоторной области гена *ANI*, кодирующего MYB-подобный транскрипционный фактор, регулирующий синтез антоцианов в клубнях картофеля, у сортов с фиолетовой окраской клубней было

выявлено шесть SURE (sucrose responsive elements) элементов, тогда как у сортов с белой и желтой окраской клубней этот ген содержал один SURE. Предположительно, сахароза активирует экспрессию гена *AN1*, который, в свою очередь, активирует экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов, а также генов, кодирующих ферменты гидролиза сахарозы, такие как синтаза сахарозы и инвертаза. Гидролитические ферменты расщепляют сахарозу, приводя к снижению ее уровня в клетке с высвобождением гексоз, продукты распада которых служат предшественниками для синтеза фенолпропаноидов (Rayuavula et al., 2013).

Фенотипическое изменение окраски у растений часто обусловлено мутациями именно в регуляторных генах, которые рассматриваются, таким образом, как наиболее эффективные мишени для селекции и биотехнологии. К примеру, накопление антоцианов в мякоти яблока происходит благодаря усиленной активации гена *MdMYB10*, в промоторе которого присутствуют пять 23-нуклеотидных повторов (Espley, 2009). Сходным образом накопление большого количества антоцианов в мякоти кровавого апельсина обусловлено инсерцией *Copia*-подобного ретротранспозона, приводящей к усилению экспрессии близлежащего гена *Ruby*, кодирующего транскрипционный фактор MYB, регулирующий синтез антоцианов (Butelli et al., 2012). У мягкой пшеницы выявлено шесть 261-нуклеотидных тандемных повторов в промоторе доминантного аллеля bHLH-кодирующего гена *Pp3/TaPpb1*, активирующего экспрессию структурных генов синтеза антоцианов в перикарпе зерновки, тогда как лишь один такой повтор был обнаружен в рецессивном аллеле у неокрашенных сортов (Shoeva et al., 2014; Jiang et al., 2018). Тандемная дупликация двух первых экзонов, первого интрона и части второго интрона, а также инсерция фрагмента длиной около 11 тыс. нуклеотидов обнаружены в промоторе bHLH-кодирующего гена *Kala4* у черnozерных сортов риса, но у белозерных сортов такой дупликации не выявлено (Oikawa et al., 2015).

Помимо мутаций в промоторных районах регуляторных генов, были описаны мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. Так, у ячменя идентифицирован ген *HvMyc2*, контролирующий синтез антоцианов в алейроновом слое зерновки ячменя, рецессивные аллели которого имеют однонуклеотидную инсерцию в кодирующей части гена (Strygina et al., 2017). Мутации в генах, кодирующих WD40, менее распространены, поскольку эти гены имеют плейотропные функции, которые не ограничиваются лишь синтезом антоцианов (Zhang, Schrader, 2017).

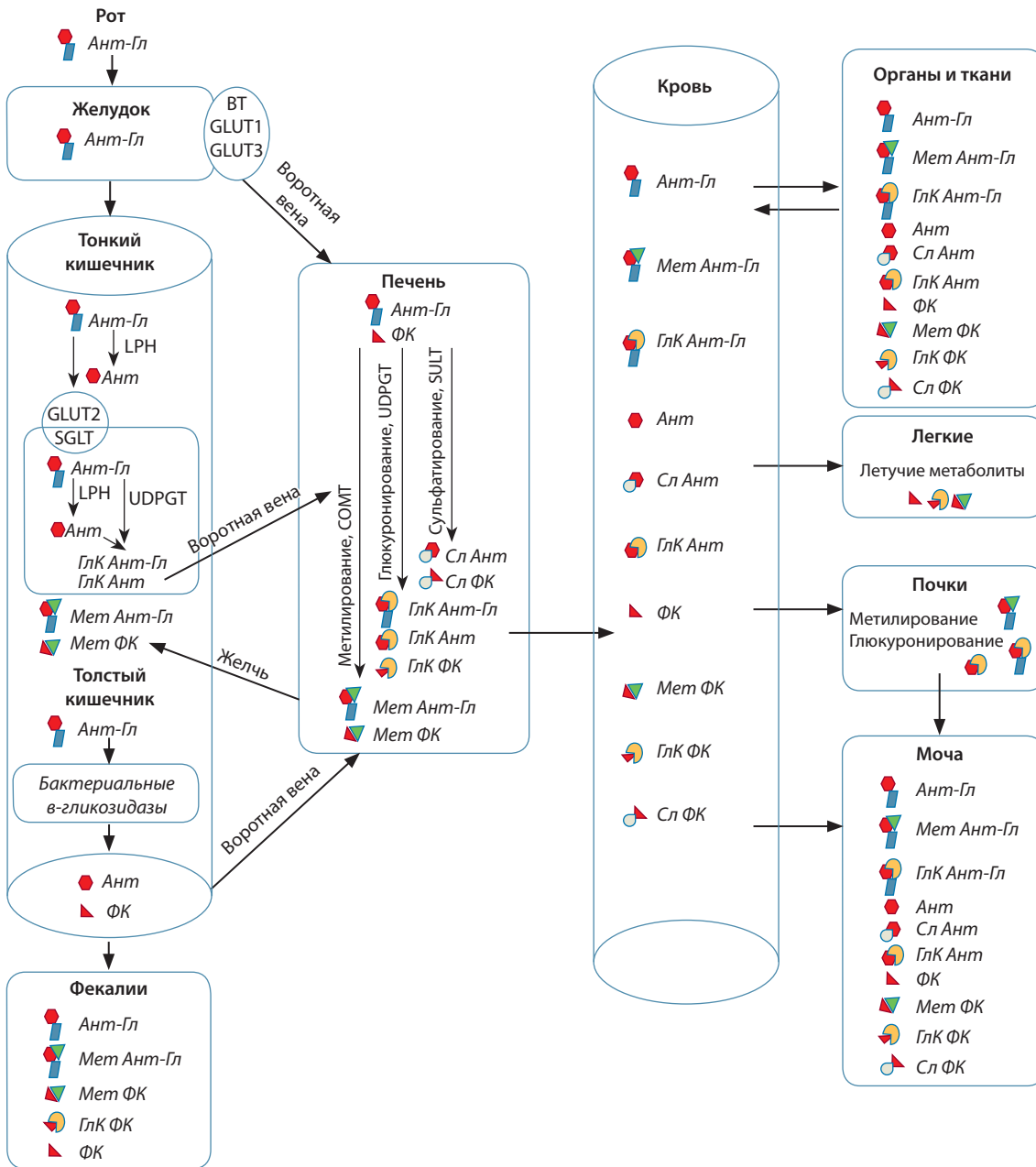
Таким образом, на сегодняшний день достаточно полно охарактеризованы метаболический путь биосинтеза антоцианов, а также его регуляция. Установлено, что качественный состав антоциановых пигментов определяют ферменты биосинтеза, в то время как распределение пигментов в тканях растений, а также его количество контролируются регуляторными генами. Именно с выявлением триггерных регуляторных генов и их картированием на хромосомах связаны современные постгеномные методы селекции культурных растений с повышенным содержанием антоцианов в зерне.

## Биодоступность антоцианов и их метаболизм в организме человека

Долгое время роль антоцианов в функциональном питании была недооценена, в частности, из-за данных об их низкой биодоступности, которая определяется как отношение части вещества, достигающего системной циркуляции, органов и тканей, к общему количеству потребляемого вещества. По некоторым оценкам, лишь 0.4 % исходного количества употребленных в пищу антоцианов детектировано в плазме крови животных и человека (Manach et al., 2005). Такие низкие концентрации антоцианов не могли объяснить физиологические эффекты, наблюдаемые после их употребления. Усовершенствование методов детекции позволило оценить биодоступность антоцианов с учетом их метаболитов и продуктов взаимодействия. С использованием радиоактивно меченного цианидин-3-гликозида C3G было показано, что не менее 12.38 % метаболитов антоцианов выводится из организма человека в составе мочи и выдыхаемого воздуха, что намного выше биодоступности, оцененной только по содержанию исходных соединений в плазме крови (Czank et al., 2013). Исследование образцов крови и продуктов выделения после однократного употребления 500 мг C3G выявило присутствие в них как интактного соединения, так и его катаболизированных производных, среди которых наиболее представленными были глюкуроныды протокатехиновой кислоты и цианидина, их метилированные производные, феруловая, гиппуровая, фенилуксусная и фенилпропионовая кислоты (Czank et al., 2013).

У животных, которых кормили антоцианами, эти соединения были обнаружены практически во всех органах, в том числе в тканях головного мозга, что указывает на их активную абсорбцию и способность преодолевать гематоэнцефалический барьер (Celli et al., 2017; Sandoval-Ramirez et al., 2018). Важно отметить, что при краткосрочном употреблении антоцианов в тканях животных преобладают их исходные формы, а при долгосрочном – метаболиты, что связывают с деятельностью кишечной микробиоты (Sandoval-Ramirez et al., 2018).

Метаболизм антоцианов начинается в ротовой полости, где ряд их частично расщепляется гликозидазами бактериальной микрофлоры до соответствующих агликонов (Kamonpatana et al., 2012) (рис. 2). В желудке происходит первоначальная абсорбция гликолизированных антоцианов через желудочную стенку в кровяное русло воротной вены. Именно абсорбцией из желудка объясняют быстрое повышение концентрации антоцианов в плазме крови сразу после их приема. В транспортировке антоцианов через стенку желудка задействованы билин-транслоказы и переносчики глюкозы GLUT1 и GLUT3 (Oliveira et al., 2019). По воротной вене антоцианы попадают в печень и распределяются по гепатоцитам, где они подвергаются глюкуронированию, метилированию и сульфатированию, которые осуществляются ферментами уридин-5-дифосфоглюкуронозил-трансферазой UDPGT, катехол-*O*-метилтрансферазой COMT и сульфотрансферазой SULT соответственно (Celli et al., 2017). В печени часть антоцианов и продуктов их деградации попадает в желчь и секретируется обратно в просвет кишечника через желчный проток (энтерогепатическая ре-



**Рис. 2.** Схема абсорбции и метаболизма антоцианов в организме человека.

*Ант* – антоциановый агликон; *Ант-Гл* – гликозид антоциана; *ГлК Ант* – глюкуронидированный агликон антоциана; *ГлК Ант-Гл* – глюкуронидированный гликозид антоциана; *ГлК ФК* – глюкуронидированная фенольная кислота; *Мет Ант-Гл* – метилированный гликозид антоциана; *Мет ФК* – метилированная фенольная кислота; *Сл Ант* – сульфатированный агликон антоциана; *Сл ФК* – сульфатированная кислота; *ФК* – фенольная кислота; *BT* – билитранслоказа; *COMT* – катехол-*O*-метилтрансферазы; *GLUT* – транспортеры глюкозы; *LPH* – лактозо-флоризин гидролаза; *SULT* – сульфотрансфераза; *UDPGT* – уридин-5-дифосфоглюкуронозил-трансферазы. По (McGhie, Walton, 2007; Celli et al., 2017).

циркуляция), тогда как другая часть попадает в общий кровоток.

Кроме вышеописанного специфического контура циркуляции, неабсорбированные в желудке антоцианы поступают в кишечник. Тонкий кишечник является вторым участком желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в котором происходит активная абсорбция антоцианов в виде интактных гликозидов либо образующихся под действием гидролаз их агликонов. В клетках энтероцитов каемчатого эпителия кишечника антоцианы, как и другие фла-

воноиды, могут подвергаться гидролизу под действием лактазо-флоризин гидролазы *LPH* (Day et al., 2000). Хотя транспортеры антоцианов в клетки кишечника до сих пор точно не установлены, предполагается, что в этом процессе участвуют переносчики глюкозы *GLUT2* (Faria et al., 2009) и натрий-зависимый переносчик глюкозы *SGLT1* (Zou et al., 2014). В энтероцитах антоцианы и их агликоны глюкуронируются. Перед тем как попасть в кровяное русло, эти вещества по воротной вене доставляются в печень, где они метилируются и сульфати-



руются соответствующими трансферазами. Антоцианы, не абсорбированные в тонком кишечнике, попадают в толстый кишечник, где они подвергаются расщеплению микробиотой, в результате чего образуются фенольные кислоты и гидроксициннаматы, которые, в свою очередь, могут всасываться эпителием, попадать в кровяное русло и в дальнейшем экскретироваться в мочу (Fang, 2014). Антоцианы и другие флавоноиды не могут быть полностью разрушены микробиотой толстого кишечника, что объясняет присутствие некоторого количества интактных антоцианов в содержимом фекальных выделений (He et al., 2005).

Таким образом, показано, что в организме человека антоцианы активно метаболизируются. Поскольку концентрация и профиль соединений, присутствующих в плазме крови, являются ключевыми для их возможного физиологического воздействия на целевые мишени, существует предположение, что продукты разложения антоцианов в ЖКТ и их конъюгированные метаболиты могут быть более биологически активными, чем исходные антоциановые соединения, вероятно, благодаря своей повышенной биодоступности.

### Роль антоцианов в лечении и профилактике заболеваний

Антоцианы представляют собой общепризнанную догму в народной медицине во всем мире. Антоцианы из различных видов гибискуса исторически использовались в средствах от дисфункции печени и гипертонии, эти соединения из черники имеют давнюю историю применения при микробных инфекциях, диарее и других нарушениях здоровья (Smith et al., 2000; Wang et al., 2000). Именно полифенольными соединениями и их регулярным употреблением в составе красных вин удалось разрешить известный французский парадокс, заключающийся в низкой частоте возникновения ишемической болезни сердца у французов, несмотря на высокий уровень жира в их диете (Renaud, de Lorgeril, 1992). К настоящему времени установлено, что антоцианы характеризуются широким спектром биологического действия в организме человека (Приложение)<sup>1</sup>. Их полезные для здоровья эффекты частично обусловлены антиоксидантными свойствами, а также способностью влиять на регуляторные белки и компоненты сигнальных путей и таким образом модулировать физиологические процессы, протекающие в организме человека.

### Антоцианы как антиоксиданты

Наверное, самое известное и активно обсуждаемое свойство антоцианов – их антиоксидантная активность, которая не уступает, а по ряду оценок даже выше, чем у таких общепринятых антиоксидантов, как  $\alpha$ -токоферол (Wang et al., 1997), тролокс и катехин (Kähkönen, Heinonen, 2003). Антиоксидантные свойства антоцианов обусловлены их структурными особенностями: числом гидроксильных групп, наличием катехинового фрагмента в В-кольце и иона оксония в С-кольце, паттерном гидроксильирования, метилирования, ацилирования и гликозилирования (Yang

et al., 2011). Среди антоциановых агликонов наибольшую антиоксидантную активность проявляют Dp и Cy, за которыми в порядке уменьшения следуют Mv, Pn, Pg и Pt (Lucioli, 2012).

В организме человека антиоксидантные свойства антоцианов реализуются с помощью их прямого взаимодействия со свободными радикалами (Fukumoto, Mazza, 2000) либо опосредованно через модулирование антиоксидантной защитной системы организма (Shih et al., 2007; Steffen et al., 2008; Toufeksian et al., 2008).

### Антоцианы для здоровья глаз

Благоприятное влияние антоцианов на улучшение зрения было впервые задокументировано во время Второй мировой войны, когда летчики Королевских военно-воздушных сил Британии для повышения остроты зрения в темное время суток употребляли джем из черники (Ghosh, Konishi, 2007). В клинических испытаниях было показано, что употребление антоцианов действительно способствует улучшению дневного, сумеречного и ночного зрения. Однако воздействие антоцианов на зрительные функции наблюдалось не во всех экспериментах, а зависело от принимаемой дозы, ее состава и продолжительности (Nakaishi et al., 2000; Lee et al., 2005).

Одним из механизмов, объясняющих положительное действие антоцианов на зрение, является их способность восстанавливать зрительный пигмент родопсин. При этом было установлено, что гликозид и рутинозид Cy ускоряли регенерацию родопсина, а производные Dp не оказывали никакого воздействия (Matsumoto et al., 2003). В исследовании *in vitro* было выявлено, что антоцианы также способны ингибировать фотоокисление бисретинола A2E – хромофора липофусциновых гранул, который накапливается с возрастом в эпителиальных клетках сетчатки и может приводить к нарушению целостности их мембран (Jang et al., 2005). Поскольку гибель светочувствительных клеток сетчатки глаза рассматривается как основная причина развития возрастной макулодистрофии, полученные результаты позволяют предположить, что антоцианы могут служить эффективным профилактическим средством этого дегенеративного заболевания.

### Антоцианы для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний

Результаты проведенных исследований указывают на то, что антоцианы помогают предотвратить и частично восстановить нарушения в организме, приводящие к сердечно-сосудистым заболеваниям – группе болезней сердца и кровеносных сосудов, являющихся основной причиной смертности во всем мире (Wallace et al., 2016). В частности, показано, что регулярное употребление антоцианов в пищу снижает концентрацию в плазме липопротеинов низкой плотности, агрегацию тромбоцитов, вероятность развития артериальной гипертензии и эндотелиальной дисфункции (Erlund et al., 2008; Zhu et al., 2014). Благодаря ингибированию ангиотензинпревращающего фермента, активирующего гормон ангиотензин, ответственный за сужение сосудов, антоцианы способствуют снижению артериального давления (Parichatikanond et al., 2012). Помимо этого, антоцианы повышают активность эндотели-

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx5.pdf>

альной синтазы оксида азота eNOS и увеличивают, таким образом, высвобождение оксида азота NO, обладающего вазодилатирующими, противотромбозными, антиатерогенными и антипролиферативными свойствами (Xu et al., 2004; Horie et al., 2019).

Благотворное влияние антоцианов на сердечно-сосудистую систему обусловлено также их противовоспалительными и антиагрегатными свойствами. Как противовоспалительные агенты, антоцианы могут подавлять экспрессию генов цитокинов, кодирующих медиаторы воспаления, среди которых ключевое место занимает сигнальный путь ядерного фактора NF-κB (Karlsen et al., 2010). Антоцианы также способны ингибировать экспрессию гена, кодирующего циклооксигеназу-2 COX-2, участвующую в синтезе простагландинов, обладающих противовоспалительной активностью (Hou et al., 2005).

Употребление антоцианов – эффективная профилактика атеросклероза, обусловленного сужением сосудов и снижением кровотока за счет отложения холестерина и некоторых фракций липопротеидов в просвете сосудов (Mauray et al., 2012). Они проявляют свои антиатерогенные свойства благодаря супрессирующему влиянию на образование тромбоцитарных белков хемокинов, участвующих в привлечении циркулирующих лейкоцитов и клеток-предшественников к месту повреждения эндотелия (Song et al., 2014).

Приведенные примеры представляют собой лишь малую часть полученных к настоящему времени данных о благотворном влиянии антоцианов на состояние сердечно-сосудистой системы. На сегодняшний день эта группа соединений рассматривается в качестве эффективных профилактических средств против сердечно-сосудистых патологий.

#### **Антоцианы для профилактики нейродегенеративных заболеваний**

Богатые антоцианами фрукты могут оказывать положительное влияние на изменение направления старения нейронов и поведения (Joseph et al., 1999). Проведено рандомизированное контролируемое клиническое исследование, в котором люди старшей возрастной группы (70+) с деменцией получали богатый антоцианами вишневый сок (200 мл/день) или контрольный сок с низким содержанием антоцианов. У группы, регулярно получавшей антоцианы, наблюдалось улучшение показателей беглости речи, кратковременной и долговременной памяти (Kent et al., 2017). Было отмечено положительное влияние богатых антоцианами экстрактов шелковицы на индукцию антиоксидантных ферментов и коррекцию когнитивных нарушений у мышей с ускоренным старением и нейродегенерацией альцгеймероподобного типа (Shih et al., 2010). Нейропротекторные эффекты антоцианов могут быть связаны с ослаблением нейротоксичности, индуцируемой перекисью водорода, амилоидом-бета, D-галактозой и ишемией (Tarozzi et al., 2010; Min et al., 2011; Rehman et al., 2017). Показана польза богатого антоцианами зерна пшеницы для когнитивных функций взрослых мышей (Tenditnik et al., 2017). На клеточных моделях болезни Паркинсона выявлено, что экстракты, богатые антоцианами и проантоцианидинами, проявляют нейропротекторную

активность против повреждения нейронов нейротоксином ротеноном (Strathearn et al., 2014).

Основными механизмами, с помощью которых антоцианы влияют на функции мозга, служат их способности защищать нейроны от повреждений, индуцированных нейротоксинами и воспалением, активировать синаптическую передачу и улучшать мозговое кровообращение, а также препятствовать высвобождению факторов индукции апоптоза (Spencer, 2010).

#### **Антиканцерогенные свойства антоцианов**

Антиканцерогенные свойства антоцианов продемонстрированы на клеточных моделях различного типа рака, на экспериментальных животных, а также в ходе клинических наблюдений (Hou, 2003; Smeriglio et al., 2016). Так, снижение жизнеспособности клеток рака гортани, рака желудка и рака молочной железы наблюдалось при обработке их экстрактом из плодов пурумы бразильской (Li et al., 2017). Частота возникновения индуцированных канцерогенами колоректальных аденом и карцином была заметно ниже у крыс, которых кормили фиолетовой кукурузой с высоким уровнем антоцианов по сравнению с группой крыс, в диете которых эти соединения отсутствовали (Hagiwara et al., 2001).

В ходе клинических наблюдений было установлено, что антоцианы из различных источников способны ингибировать инициацию и прогрессирование рака молочной железы, простаты, печени, толстого и тонкого кишечника, крови, шейки матки, легких, фибросаркомы и метастатической меланомы (Hou, 2003; Smeriglio et al., 2016; Li et al., 2017). При этом следует отметить, что индивидуальные соединения и их композиции проявляют разную антиканцерогенную активность, которая зависит как от типа агликона антоциана, паттерна его гликозилирования, метилирования и ацилирования, так и от комбинации индивидуальных соединений (Smeriglio et al., 2016; Li et al., 2017). Антиканцерогенные свойства антоцианов обусловлены их способностью прерывать клеточный цикл, индуцировать апоптоз, блокировать образование новых сосудов (антиангиогенные свойства), ингибировать окислительное повреждение ДНК, активировать ферменты детоксификации, а также способностью ингибировать циклооксигеназу COX-2 и модулировать иммунный ответ, в том числе через микробиоту (Smeriglio et al., 2016). Перечисленные механизмы могут быть реализованы совместно, что усиливает антиканцерогенные свойства.

#### **Антоцианы для профилактики метаболических нарушений**

В качестве функциональных компонентов питания антоцианы могут быть использованы для предотвращения ожирения, лечения неалкогольной жировой болезни печени и диабета 2-го типа. Исследования на людях и на экспериментальных животных позволили объяснить молекулярные механизмы, с помощью которых они регулируют жировой и углеводный обмен и снижают резистентность к инсулину (Ghosh, Konishi, 2007; Li et al., 2017).

Употребление антоцианов обуславливает снижение уровня глюкозы в крови как за счет снижения экспрессии генов, кодирующих транспортные белки натрия и

глюкозы, GLUT2 и SGLT1 соответственно, в кишечнике, ингибирования кишечной  $\alpha$ -глюкозидазы (Adisakwattana et al., 2011) и панкреатической  $\alpha$ -амилазы (Sui et al., 2016), так и за счет способности гликозированных антоцианов использовать транспортный механизм глюкозы в эпителиальных клетках желудка, таких как переносчики глюкозы GLUT1 и GLUT3 (Liu et al., 2014; Oliveira et al., 2019). Антоцианы также способны снизить резистентность к инсулину, повышая экспрессию регулируемого инсулином гена белка-транспортера глюкозы GLUT4 путем активации и фосфорилирования альфа-субъединицы АМФ-активируемой протеинкиназы АМФК $\alpha$  в белой жировой ткани, скелетных мышцах и печени, стимулирующей поглощение глюкозы и секрецию инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, в то же время ингибируя выработку избытка глюкозы в печени (Tsuda et al., 2004; Takikawa et al., 2010).

Антоцианы оказывают защитное действие на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы, уменьшая митохондриальную продукцию активных форм кислорода (Zhang et al., 2010; Sun et al., 2012). Они могут модулировать антиоксидантную защиту, активируя антиокислительные ферменты и способствуя синтезу восстановленного глутатиона (GSH) в печени. Так, потребление антоцианов восстанавливает уровень глутатионпероксидазы 3, который значительно снижается при приеме пищи с высоким содержанием жира (Tsuda, 2016).

При чрезмерном накоплении жировой ткани нарушаются процессы кровоснабжения жировых клеток адипоцитов, появляются очаги некроза и инфильтрация жировой ткани макрофагами, что приводит к избыточному образованию провоспалительных цитокинов и повышению уровня циркулирующих свободных жирных кислот, ведущих к системному воспалению (Tsuda, 2016). Антоцианы улучшают метаболизм жирных кислот и триглицеридов за счет повышения активности липопротеинлипазы в скелетных мышцах (Lefevre et al., 2008). Они также подавляют прирост массы тела, восстанавливают нарушенную функцию печени и значительно увеличивают концентрацию гормона адипонектина, вырабатываемого жировыми клетками, путем активации АМФК, в то же время снижая уровни инсулина и лептина (Takikawa et al., 2010; Wu et al., 2013). Снижая секрецию лептина, вырабатываемого жировой тканью, антоцианы модулируют активность нейропептида Y и рецептора GABA<sub>B1</sub> в гипоталамусе, сигнализирующих об энергетическом состоянии тела и контролирующих потребление пищи (Badshah et al., 2013). Другой механизм уменьшения гипергликемии и улучшения чувствительности к инсулину связан с подавлением антоцианами экспрессии ретинол-связывающего белка 4 (Sasaki et al., 2007). Кроме того, антоцианы регулируют FoxO1-опосредованную транскрипцию адипоцитарной триглицеридной липазы и, таким образом, ингибируют липолиз, индуцированный высоким содержанием глюкозы в адипоцитах, что позволяет предположить их потенциальное терапевтическое применение при гиперлипидемии, связанной с диабетом (Guo et al., 2012).

Действие антоцианов на неалкогольную жировую болезнь печени и диабетическую нефропатию также включает снижение накопления липидов и улучшение липидного

профиля в печени, ослабление инсулин-резистентности, повышение уровня PPAR $\alpha$ , снижение воспаления и окислительного стресса (Takayama et al., 2009; Guo et al., 2012; Qin et al., 2018; Sangsefidi et al., 2019).

#### **Противомикробные свойства антоцианов**

Антоцианы влияют на микробиоту кишечника. Они способны ингибировать рост патогенных микроорганизмов, таких как *Enterococcus* spp. и *Clostridium perfringens*, а также проявляют пребиотические эффекты, ускоряя рост *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. (Hidalgo et al., 2012). Показано, что экстракты антоцианов повышают проницаемость мембран бактерий, вызывающих пищевые отравления, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* и *Vibrio parahaemolyticus*. В результате повышенной проницаемости из клеток бактерий происходит утечка белков, нуклеиновых кислот и метаболитов. Помимо этого, антоцианы могут проникать в клетки бактерий и снижать активность ферментов основного метаболизма, таких как щелочная фосфатаза, аденозинтрифосфатаза, а также супероксиддисмутаза, нарушая, таким образом, работу бактериальной клетки (Sun et al., 2018).

#### **Биологическая значимость природных комплексов, содержащих антоцианы**

Как отмечают токсикологи, биологи и практикующие врачи, действие природных соединений ослабляется, когда биологически активные смеси (экстракты) разделяются на очищенные компоненты и вводятся отдельно (Liu, 2003; Lila, Raskin, 2005). Так, было определено, что фитохимические составляющие американской клюквы, хотя и индивидуально эффективные против канцерогенеза человека, обеспечили максимальную защиту только при совместном применении в натуральных смесях (Seeram et al., 2004). В этом исследовании были предложены потенциальные синергетические антипролиферативные эффекты от смесей антоцианов, проантоцианидинов и гликозидов флавонолов. В других исследованиях комбинации двух полифенольных соединений из винограда (ресвератрол и кверцетин) продемонстрировали синергетическую способность индуцировать апоптоз (активацию каспазы-3) в клеточной линии карциномы поджелудочной железы человека (Mouria et al., 2002). Аналогично, смешанный полифенольный экстракт из красного вина показал более сильное ингибирование синтеза ДНК в клетках орального плоскоклеточного рака, чем отдельные соединения, даже когда концентрации индивидуально вводимого кверцетина или ресвератрола были выше, чем концентрации в смешанном экстракте (Elattar, Virji, 1999).

Признанные потенцирующие взаимодействия между компонентами в природном фитохимическом комплексе оказывают сильную поддержку сторонникам «употребления всей (функциональной) пищи», не полагаясь только на однокомпонентные экстракты или вытяжки из пищевых продуктов, которые продаются в форме биологически активных добавок (БАД). В последнем случае потеря взаимодействующих фитохимикатов на этапе разработки продукта может привести к значительному снижению эффективности экстракта. В литературе хорошо задокумен-



тировано, что флавоноиды обладают широким спектром биологических свойств (см. Приложение), которые могут объяснять терапевтическое действие смеси взаимодействующих флавоноидов посредством нескольких путей вмешательства одновременно.

Таким образом, в настоящее время представляют огромный интерес не только сами антоциановые пигменты и их польза для здоровья, но и созданные природой растительные продукты, содержащие смеси этих соединений, долгое время применявшиеся в народной медицине без тщательного изучения и научного подтверждения их достоинств.

## Заключение

В представленном обзоре суммированы результаты основных направлений исследований антоцианов в качестве компонентов функционального питания. Потенциальные эффекты, способствующие укреплению здоровья, многогранны. Выявленные положительные эффекты подтверждены экспериментальными исследованиями и клиническими испытаниями. Все эти данные свидетельствуют о том, что регулярное употребление в пищу цветных съедобных плодов, обогащенных антоцианами, и продуктов их переработки способствует улучшению здоровья и качества жизни людей. Отдельное внимание уделено результатам исследований генетического контроля синтеза этих пигментов у растений. Характеристика путей биосинтеза антоцианов различных видов растений и его генетическая регуляция обеспечивают ценный ресурс, позволяющий создавать новые организмы с повышенными функциональными качествами для улучшения питания животных и человека.

## Список литературы / References

ГОСТ Р 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением № 1). Дата введения: 2006-07-01.  
[State Standard R 52349-2005. Foodstuffs. Functional Foods. Terms and Definitions. 2006. (in Russian)]

Запроматов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высш. шк., 1974.  
[Zaprometov M.N. Fundamentals of the Biochemistry of Phenolic Compounds. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1974. (in Russian)]

Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушкино, 2013.  
[Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. Flavonoids: Biochemistry, Biophysics, Medicine. Pushino, 2013. (in Russian)]

Фотев Ю.В., Пивоваров В.Ф., Артемьева А.М., Куликов И.М., Гончарова Ю.К., Сысо А.И., Гончаров Н.П. Концепция создания Российской национальной системы функциональных продуктов питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(7): 776-783. DOI 10.18699/VJ18.421.  
[Fotev Yu.V., Pivovarov V.F., Artemyeva A.M., Kulikov I.M., Goncharova Y.K., Syso A.I., Goncharov N.P. Concept of producing of the Russian national system of functional food. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(7):776-783. DOI 10.18699/VJ18.421. (in Russian)]

Хлесткина Е.К., Усенко Н.И., Гордеева Е.И., Стабровская О.И., Шарфунова И.Б., Отмахова Ю.С. Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов: оценка продукции для обоснования значимости направления. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(5):545-553. DOI 10.18699/VJ17.25-o.

[Khlestkina E.K., Usenko N.I., Gordeeva E.I., Stabrovskaya O.I., Sharfunova I.B., Otmakhova Y.S. Evaluation of wheat products with high flavonoid content: justification of importance of marker-assisted development and production of flavonoid-rich wheat cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(5):545-553. DOI 10.18699/VJ17.25-o. (in Russian)]

Adisakwattana S., Yibchok-Anun S., Charoenlertkul P., Wongsasiripat N. Cyanidin-3-rutinoside alleviates postprandial hyperglycemia and its synergism with acarbose by inhibition of intestinal alpha-glucosidase. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011;49:36-41. DOI 10.3164/jcfn.10-116.

Andersen O.M., Jordheim M. The anthocyanins. In: Andersen O.M., Markham K.R. (Eds.). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006;452-471.

Badshah H., Ullah I., Kim S.E., Kim T.H., Lee H.Y., Kim M. Anthocyanins attenuate body weight gain via modulating neuropeptide Y and GABAB1 receptor in rats hypothalamus. *Neuropeptides*. 2013; 47:347-353. DOI 10.1016/j.npep.2013.06.001.

Bartl P., Albrecht A., Skrt M., Tremlová B., Ošťádalová M., Šmejkal K., Vovk I., Poklar U.N. Anthocyanins in purple and blue wheat grains and in resulting bread: quantity, composition, and thermal stability. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2015;66(5):514-519. DOI 10.3109/09637486.2015.1056108.

Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Tsitsiashvili G.S. Critical analysis of protein signaling networks involved in the regulation of plant secondary metabolism: Focus on anthocyanins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017;37(6):685-700. DOI 10.3109/07388551.2016.1141391.

Butelli E., Licciardello C., Zhang Y., Liu J., Mackay S., Bailey P., Martin C. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell*. 2012;24(3): 1242-1255. DOI 10.1105/tpc.111.095232.

Calderaro A., Barreca D., Bellocco E., Smeriglio A., Trombetta D., Laganà G. Colored phytonutrients: role and applications in the functional foods of anthocyanins. In: Nabavi S.M., Sutar I., Barreca D., Khan H. (Eds.). *Phytonutrients in Food: From Traditional to Rational Usage*. Woodhead Publ., 2020;177-195. DOI 10.1016/B978-0-12-815354-3.00011-3.

Celli G.B., Ghanem A., Brooks M.S. A theoretical physiologically based pharmacokinetic approach for modeling the fate of anthocyanins *in vivo*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57(15):3197-3207. DOI 10.1080/10408398.2015.1104290.

Czank C., Cassidy A., Zhang Q., Morrison D.J., Preston T., Kroon P.A., Botting N.P., Kay C.D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A (13)C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;97:995-1003. DOI 10.3945/ajcn.112.049247.

Day A., Canada F., Diaz J., Kroon P., Mclauchlan R., Faulds C., Plumb G.W., Morgan M.R., Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000;468:166-170. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01211-4.

Elattar T.M., Virji A.S. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1999;19(6B):5407-5414.

Erlund I., Koli R., Alfthan G., Marniemi J. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;87(2):323-331. DOI 10.1093/ajcn/87.2.323.

Espley R.V. Regulation of anthocyanin accumulation in apple by the transcription factor MdMYB10. Thesis PhD (Biological Sciences), University of Auckland, 2009. <http://hdl.handle.net/2292/5170>

Fang J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* 2014;46: 508-520. DOI 10.3109/03602532.2014.978080.

Faria A., Pestana D., Azevedo J., Martel F., de Freitas V., Azevedo I., Mateus N., Calhau C. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells – putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53:1430-1437. DOI 10.1002/mnfr.200900007.



- Fukumoto L.R., Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48(8):3597-3604. DOI 10.1021/jf000220w.
- Ghosh D., Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2007;16(2):200-208.
- Guo H., Guo J., Jiang X., Li Z., Ling W. Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a typical anthocyanin, exhibits antilipolytic effects in 3T3-L1 adipocytes during hyperglycemia: Involvement of FoxO1-mediated transcription of adipose triglyceride lipase. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50(9):3040-3047. DOI 10.1016/j.fct.2012.06.015.
- Hagiwara A., Miyashita K., Nakanishi T., Sano M., Tamano S., Kadota T., Koda T., Nakamura M., Imaida K., Ito N., Shirai T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 2001;171:17-25. DOI 10.1016/S0304-3835(01)00510-9.
- Hatier J.H.B., Gould K.S. Anthocyanin function in vegetative organs. In: Winefield C., Davies K., Gould K. (Eds.). *Anthocyanins*. New York: Springer, 2008;1-19. DOI 10.1007/978-0-387-77335-3\_1.
- He J., Magnuson B.A., Giusti M.M. Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents: impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:2859-2866. DOI 10.1021/jf0479923.
- Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 2011;62(8):2465-2483. DOI 10.1093/jxb/erq442.
- Hidalgo M., Oruna-Concha M.J., Kolida S., Walton G.E., Kallithraka S., Spencer J.P., de Pascual-Teresa S. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J. Agri. Food Chem.* 2012;60(15):3882-3890. DOI 10.1021/jf3002153.
- Horie K., Nanashima N., Maeda H. Phytoestrogenic effects of blackcurrant anthocyanins increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in human endothelial cells and ovariectomized rats. *Molecules.* 2019;24(7):1259. DOI 10.3390/molecules24071259.
- Hou D.X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr. Mol. Med.* 2003;3(2):149-159. DOI 10.2174/1566524033361555.
- Hou D.X., Yanagita T., Uto T., Masuzaki S., Fujii M. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem. Pharmacol.* 2005;70(3):417-425. DOI 10.1016/j.bcp.2005.05.003.
- Jang Y.P., Zhou J., Nakanishi K., Sparrow J.R. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment cells. *Photochem. Photobiol.* 2005;81:529-536. DOI 10.1562/2004-12-14-RA-402.
- Jiang W., Liu T., Nan W., Jeewani D.C., Niu Y., Li C., Wang Y., Shi X., Wang C., Wang J., Li Y., Gao X., Wang Z. Two transcription factors *TaPpml* and *TaPpbl* co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat. *J. Exp. Bot.* 2018;69(10):2555-2567. DOI 10.1093/jxb/ery101.
- Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Denisova N.A., Bielinski D., Martin A., McEwen J.J., Bickford P.C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J. Neurosci.* 1999;19(18):8114-8121. DOI 10.1523/JNEUROSCI.19-18-08114.1999.
- Kamonpatana K., Giusti M.M., Chitchumroonchokchai C., Moreno-Cruz M., Riedel K.M., Kumar P., Failla M.L. Susceptibility of anthocyanins to *ex vivo* degradation in human saliva. *Food Chem.* 2012;135:738-747. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.04.110.
- Karlsen A., Paur I., Bøhn S.K., Sakhi A.K., Borge G.I., Serafini M., Erlund I., Laake P., Tonstad S., Blomhoff R. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- $\kappa$ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur. J. Nutr.* 2010;49(6):345-355. DOI 10.1007/s00394-010-0092-0.
- Kähkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(3):628-633. DOI 10.1021/jf025551i.
- Kent K., Charlton K., Roodenrys S., Batterham M., Potter J., Traynor V., Gilbert H., Morgan O., Richards R. Consumption of anthocyanin-rich cherry juice for 12 weeks improves memory and cognition in older adults with mild-to-moderate dementia. *Eur. J. Nutr.* 2017;56:333-341. DOI 10.1007/s00394-015-1083-y.
- Lee J., Lee H.K., Kim C.Y., Hong Y.J., Choe C.M., You T.W., Seong G.J. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. *Br. J. Nutr.* 2005;93:895-899. DOI 10.1079/bjn20051438.
- Lefevre M., Wiles J.E., Zhang X., Howard L.R., Gupta S., Smith A.A., Ju Z.Y., DeLany J. Gene expression microarray analysis of the effects of grape anthocyanins in mice: a test of a hypothesis-generating paradigm. *Metabolism.* 2008;57:S52-S57. DOI 10.1016/j.metabol.2008.03.005.
- Li D., Wang P., Luo Y., Zhao M., Chen F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: update from recent decade. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57(8):1729-1741. DOI 10.1080/10408398.2015.1030064.
- Lila M.A., Raskin I. Health-related interactions of phytochemicals. *J. Food Sci.* 2005;70(1):R20-R27. DOI 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09054.x.
- Liu R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003;78(3):517S-520S. DOI 10.1093/ajcn/78.3.517S.
- Liu Y., Li D., Zhang Y., Sun R., Xia M. Anthocyanin increases adiponectin secretion and protects against diabetes-related endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014;306(8):E975-E988. DOI 10.1152/ajpendo.00699.2013.
- Lucioli S. Anthocyanins: mechanism of action and therapeutic efficacy. In: Capasso A. (Ed.). *Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy*. Research Signpost, Kerala, India, 2012;27-57.
- Ma D., Zhang J., Li Y., Wang C. Quality of noodles made from colour-grained wheat. *Czech. J. Food Sci.* 2018;36:314-320. DOI 10.17221/130/2017-CJFS.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:230S-242S. DOI 10.1093/ajcn/81.1.243S.
- Matsumoto H., Nakamura Y., Tachibanaki S., Kawamura S., Hirayama M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(12):3560-3563. DOI 10.1021/jf034132y.
- Mauray A., Felgines C., Morand C., Mazur A., Scalbert A., Milenkovic D. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2012;22:72-80. DOI 10.1016/j.numecd.2010.04.011.
- McGhie T.K., Walton M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007;51:702-713. DOI 10.1002/mnfr.200700092.
- Min J., Yu S.W., Baek S.H., Nair K.M., Bae O.N., Bhatt A., Majid A. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 2011;500(3):157-161. DOI 10.1016/j.neulet.2011.05.048.
- Mouria M., Gukovskaya A., Jung Y., Buechler P., Hines O., Reber H., Pandol S. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer.* 2002;98(5):761-769. DOI 10.1002/ijc.10202.
- Nakaishi H., Matsumoto H., Tominaga S., Hirayama M. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern. Med. Rev.* 2000;5(6):553-562.

- Oikawa T., Maeda H., Oguchi T., Yamaguchi T., Tanabe N., Ebana K., Yano M., Ebitani T., Izawa T. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. *Plant Cell*. 2015;27:2401-2414. DOI 10.1105/tpc.15.00310.
- Oliveira H., Roma-Rodrigues C., Santos A., Veigas B., Brás N., Faria A., Calhau C., de Freitas V., Baptista P.V., Mateus N., Fernandes A.R., Fernandes I. GLUT1 and GLUT3 involvement in anthocyanin gastric transport-Nanobased targeted approach. *Sci. Rep.* 2019;9(1):1-14. DOI 10.1038/s41598-018-37283-2.
- Parichatikanond W., Pinthong D., Mangmool S. Blockade of the renin-angiotensin system with delphinidin, cyanin, and quercetin. *Planta Med.* 2012;78:1626-1632. DOI 10.1055/s-0032-1315198.
- Pasqualone A., Bianco A.M., Paradiso V.M., Summo C., Gabarcorta G., Caponio F., Blanco A. Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chem.* 2015;180:64-70. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.02.025.
- Payyavula R.S., Singh R.K., Navarre D.A. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism. *J. Exp. Bot.* 2013;64(16):5115-5131. DOI 10.1093/jxb/ert303.
- Qin Y., Zhai Q., Li Y., Cao M., Xu Y., Zhao K., Wang T. Cyanidin-3-O-glucoside ameliorates diabetic nephropathy through regulation of glutathione pool. *Biomed. Pharmacother.* 2018;103:1223-1230. DOI 10.1016/j.biopha.2018.04.137.
- Ramos P.R., Herrera R., Moya-Leyn M.-A. Anthocyanins: food sources and benefits to consumer's health. In: Warner L.M. (Ed.). *Handbook of Anthocyanins: Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits* (Biochemistry Research Trends). Hauppauge; New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014.
- Rausher M.D. The evolution of flavonoids and their genes. In: Grote-wold E. (Ed.). *The Science of Flavonoids*. New York: Springer, 2006;175-211. DOI 10.1007/978-0-387-28822-2\_7.
- Rehman S.U., Shah S.A., Ali T., Chung J.I., Kim M.O. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Mol. Neurobiol.* 2017;54(1):255-271. DOI 10.1007/s12035-015-9604-5.
- Renaud S., de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523-1526.
- Sandoval-Ramírez B.A., Catalán Ú., Fernández-Castillejo S., Rubio L., Macià A., Solà R. Anthocyanin tissue bioavailability in animals: possible implications for human health. A systematic review. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66(44):11531-11543. DOI 10.1021/acs.jafc.8b04014.
- Sangsefidí Z.S., Hosseinzadeh M., Ranjbar A.M., Akhondi-Meybodi M., Fallahzadeh H., Mozaffari-Khosravi H. The effect of total anthocyanin-base standardized (*Cornus mas* L.) fruit extract on liver function, tumor necrosis factor  $\alpha$ , malondialdehyde, and adiponectin in patients with non-alcoholic fatty liver: a study protocol for a double-blind randomized clinical trial. *Nutr. J.* 2019;18(1):39. DOI 10.1186/s12937-019-0465-z.
- Sasaki R., Nishimura N., Hoshino H., Isa Y., Kadowaki M., Ichi T., Horio F. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem. Pharmacol.* 2007;74(11):1619-1627. DOI 10.1016/j.bcp.2007.08.008.
- Seeram N.P., Adams L.S., Hardy M.L., Heber D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agri. Food Chem.* 2004;52(9):2512-2517. DOI 10.1021/jf0352778.
- Shih P.H., Chan Y.C., Liao J.W., Wang M.F., Yen G.C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 2010;21(7):598-605. DOI 10.1016/j.jnutbio.2009.03.008.
- Shih P.H., Yeh C.T., Yen G.C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55(23):9427-9435. DOI 10.1021/jf071933i.
- Shin D.H., Choi M.G., Kim K., Bang G., Cho M., Choi S.-B., Choi G., Park Y.-I. HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 2013;587:1543-1547. DOI 10.1016/j.febslet.2013.03.037.
- Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp. *Molecules*. 2014;19(12):20266-20279. DOI 10.3390/molecules191220266.
- Smeriglio A., Barreca D., Bellocco E., Trombetta D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytother. Res.* 2016;30(8):1265-1286. DOI 10.1002/ptr.5642.
- Smith M., Marley K., Seigler D., Singletary K., Meline B. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *J. Food Sci.* 2000;65:352-356. DOI 10.1111/j.1365-2621.2000.tb16006.x.
- Song F.L., Zhu Y.N., Shi Z.Y., Tian J.J., Deng X.J., Ren J., Andrews M.C., Ni H.Y., Ling W.H., Yang Y. Plant food anthocyanins inhibit platelet granule secretion in hypercholesterolaemia: involving the signaling pathway of PI3K-Akt. *Thromb. Haemost.* 2014;112:981-991. DOI 10.1160/TH13-12-1002.
- Spencer J.P.E. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British J. Nutr.* 2010;104:S40-S47. DOI 10.1017/S0007114510003934.
- Steffen Y., Gruber C., Schewe T., Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;469:209-219. DOI 10.1016/j.abb.2007.10.012.
- Strathearn K.E., Yousef G.G., Grace M.H., Roy S.L., Tambe M.A., Ferruzzi M.G., Rochet J.C. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014;1555:60-77. DOI 10.1016/j.brainres.2014.01.047.
- Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):184. DOI 10.1186/s12870-017-1122-3.
- Sui X., Zhang Y., Zhou W. *In vitro* and *in silico* studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *J. Funct. Foods*. 2016;21:50-57. DOI 10.1016/j.jff.2015.11.042.
- Sun C.D., Zhang B., Zhang J.K., Xu C.J., Wu Y.L., Li X., Chen K.S. Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic  $\beta$  cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Med. Food*. 2012;15(3):288-298. DOI 10.1089/jmf.2011.1806.
- Sun X.-H., Zhou T.-T., Wei C.-H., Lan W.-Q., Zhao Y., Pan Y.-J., Wu V.C.H. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*. 2018;94:155-161. DOI 10.1016/j.foodcont.2018.07.012.
- Takayama F., Nakamoto K., Kawasaki H., Mankura M., Egashira T., Ueki K., Mori A. Beneficial effects of *Vitis coignetiae* Pulliat leaves on nonalcoholic steatohepatitis in a rat model. *Acta Med. Okayama*. 2009;63(2):105-111. DOI 10.18926/AMO/31835.
- Takikawa M., Inoue S., Horio F., Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Nutr.* 2010;140:527-533. DOI 10.3945/jn.109.118216.
- Tarozzi A., Morroni F., Merlicco A., Bolondi C., Teti G., Falconi M., Hrelia P. Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. *Neurosci. Lett.* 2010;473(2):72-76. DOI 10.1016/j.neulet.2010.02.006.
- Tenditnik M.V., Tikhonova M.A., Pavlov K.S., Amstislavskaya T.G., Khlestkina E.K. Evaluating the neuroprotective potential of wheat grain with high anthocyanin content in correction of behavioral deficits induced by amyloid-beta neurotoxicity in mice. In: Belyaev conference: A triumphant event in commemoration of the centenary of the birth of Academician Dmitri Belyaev (August 7-10, 2017, Novosibirsk, Russia): Abstracts. Novosibirsk, 2017.

- Toufeksian M., Lorget M.D., Nagy N. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J. Nutr.* 2008;138:747-752. DOI 10.1093/jn/138.4.747.
- Tsuda T. Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants.* 2016;5(2):13. DOI 10.3390/antiox5020013.
- Tsuda T., Ueno Y., Aoki H., Koda T., Horio F., Takahashi N., Kawada T., Osawa T. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;316:149-157. DOI 10.1016/j.bbrc.2004.02.031.
- Wallace T.C., Slavin M., Frankenfeld C.L. Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients.* 2016; 8(1):32-45. DOI 10.3390/nu8010032.
- Wang C.J., Wang J.M., Lin W.L., Chu C.Y., Chou F.P., Tseng T.H. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2000; 38(5):411-416. DOI 10.1016/S0278-6915(00)00011-9.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 1997;45(2):304-309. DOI 10.1021/jf960421t.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 2001;126(2):485-493. DOI 10.1104/pp.126.2.485.
- Wu T., Qi X., Liu Y., Guo J., Zhu R., Chen W., Yu T. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Food Chem.* 2013;141(1):482-487. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.03.046.
- Xu J.W., Ikeda K., Yamori Y. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension.* 2004;44:217-222. DOI 10.1161/01.HYP.0000135868.38343.c6.
- Yang M., Koo S.I., Song W.O., Chun O.K. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Curr. Med. Chem.* 2011;18(2):291-300. DOI 10.2174/092986711794088380.
- Zhang B., Kang M., Xie Q., Xu B., Sun C., Chen K., Wu Y. Anthocyanins from Chinese bayberry extract protect  $\beta$  cells from oxidative stress-mediated injury via HO-1 upregulation. *J. Agric. Food Chem.* 2010;59(2):537-545. DOI 10.1021/jf1035405.
- Zhang B., Schrader A. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-dependent regulation of flavonoid biosynthesis. *Plants.* 2017;6(4):65. DOI 10.3390/plants6040065.
- Zhu F. Anthocyanins in cereals: composition and health effects. *Food Res. Int.* 2018;109:232-249. DOI 10.1016/j.foodres.2018.04.015.
- Zhu Y., Huang X., Zhang Y., Wang Y., Liu Y., Sun R., Xia M. Anthocyanin supplementation improves HDL-associated paraoxonase 1 activity and enhances cholesterol efflux capacity in subjects with hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99(2):561-569. DOI 10.1210/jc.2013-2845.
- Zou T.-B., Feng D., Song G., Li H.-W., Tang H.-W., Ling W.-H. The role of sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 in the absorption of cyanidin-3-O-beta-glucoside in Caco-2 cells. *Nutrients.* 2014;6(10):4165-4177. DOI 10.3390/nu6104165.

#### ORCID ID

R.S. Yudina orcid.org/0000-0001-7345-3594  
E.I. Gordeeva orcid.org/0000-0003-3166-7409  
O.Yu. Shoeva orcid.org/0000-0001-5289-8631  
M.A. Tikhonova orcid.org/0000-0002-4265-8981  
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-14-00086.

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


Поступила в редакцию 30.09.2020. После доработки 17.11.2020. Принята к публикации 18.11.2020.

## Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота

Н.С. Юдин<sup>1</sup>, А.А. Юрченко<sup>1</sup>, Д.М. Ларкин<sup>1, 2</sup> 

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

<sup>2</sup> Королевский ветеринарный колледж, Лондонский университет, Лондон, Великобритания

 dmlarkin@gmail.com

**Аннотация.** Изменения, происходящие в окружающей среде, заставляют популяции организмов адаптироваться к новым условиям либо за счет фенотипической пластичности, либо за счет генетических или эпигенетических изменений. Следы отбора, такие как специфические изменения частот аллелей и гаплотипов, снижение или повышение генетического разнообразия, помогают выявить изменения генома крупного рогатого скота в ответ на искусственный и естественный отбор, а также локусы и варианты, непосредственно влияющие на адаптивные и экономически важные признаки. Достижения генетики и биотехнологии дают возможность быстрого переноса уникальных генетических вариантов, возникших у местных пород крупного рогатого скота в процессе адаптации к локальной среде обитания, в геномы интернациональных высокопроизводительных пород с целью сохранения их выдающихся свойств в новых условиях обитания. Возможно и использование методов геномной селекции для повышения частот адаптивных аллелей у интернациональных пород. В обзоре рассмотрены недавние работы по истории происхождения и эволюции турано-монгольских пород крупного рогатого скота, адаптации турано-монгольского скота к экстремальным условиям среды. Сделано обобщение имеющихся сведений о потенциальных генах-кандидатах адаптации в геномах турано-монгольских пород, включая гены устойчивости к холоду, гены иммунного ответа и гены адаптации к высокогорью. Авторы приходят к выводу, что имеющиеся данные литературы не позволяют отдать предпочтение одному из двух возможных сценариев происхождения турано-монгольских пород – в результате доместикиции дикого тура на территории Восточной Азии или вследствие миграции тауринной протопопуляции из Ближнего Востока. Турано-монгольским породам свойственна высокая адаптация к экстремальным климатическим условиям (холод, жара и недостаток кислорода в горах) и паразитам (гнус, клещи, бактериальные и вирусные инфекции). В результате высокопроизводительного генотипирования и секвенирования геномов и транскриптомов представителей этих пород в последнее время были выявлены перспективные гены-кандидаты и генетические варианты, участвующие в адаптации к факторам внешней среды.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; *Bos taurus*; *Bos indicus*; турано-монгольский скот; адаптация; геном; следы отбора; холод; иммунитет; высокогорье.


**Для цитирования:** Юдин Н.С., Юрченко А.А., Ларкин Д.М. Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023

## Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds

N.S. Yudin<sup>1</sup>, A.A. Yurchenko<sup>1</sup>, D.M. Larkin<sup>1, 2</sup> 

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

<sup>2</sup> The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

 dmlarkin@gmail.com

**Abstract.** Changes in the environment force populations of organisms to adapt to new conditions, either through phenotypic plasticity or through genetic or epigenetic changes. Signatures of selection, such as specific changes in the frequency of alleles and haplotypes, as well as the reduction or increase in genetic diversity, help to identify changes in the cattle genome in response to natural and artificial selection, as well as loci and genetic variants directly affecting adaptive and economically important traits. Advances in genetics and biotechnology enable a rapid transfer of unique genetic variants that have originated in local cattle breeds in the process of adaptation to local environments into the genomes of cosmopolitan high-performance breeds, in order to preserve their outstanding performance in new environments. It is also possible to use genomic selection approach to increase the frequency of already present adaptive alleles in cosmopolitan breeds. The review examines recent work on the origin and



evolution of Turano-Mongolian cattle breeds, adaptation of Turano-Mongolian cattle to extreme environments, and summarizes available information on potential candidate genes for climate adaptation of Turano-Mongolian breeds, including cold resistance genes, immune response genes, and high-altitude adaptation genes. The authors conclude that the current literature data do not provide preference to one of the two possible scenarios of Turano-Mongolian breed origins: as a result of the domestication of a wild aurochs at East Asia or as a result of the migration of taurine proto-population from the Middle East. Turano-Mongolian breeds show a high degree of adaptation to extreme climatic conditions (cold, heat, lack of oxygen in the highlands) and parasites (mosquitoes, ticks, bacterial and viral infections). As a result of high-density genotyping and sequencing of genomes and transcriptomes, prospective candidate genes and genetic variants involved in adaptation to environmental factors have recently been identified. Key words: cattle; *Bos taurus*; *Bos indicus*; Turano-Mongolian cattle; adaptation; genome; selection signatures; cold; immunity; highlands.

**For citation:** Yudin N.S., Yurchenko A.A., Larkin D.M. Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023 (in Russian)

## Введение

Локальные породы крупного рогатого скота (КРС) могут обладать ценными генетическими вариантами для проведения селекции и создания новых пород в ответ на возникающие вызовы животноводству, включая изменение климата, появившиеся или возрождающиеся угрозы заболеваний, инновации в области диетологии и изменившиеся запросы рынка (Kantanen et al., 2015). Достижения генетики и биотехнологии дают возможность быстрого переноса уникальных генетических вариантов, возникших у местных пород КРС в процессе адаптации к локальной среде обитания, в геномы коммерческих интернациональных высокопроизводительных пород с целью сохранения их выдающихся свойств в новых условиях обитания (Stranden et al., 2019). Для повышения частот адаптивных аллелей у коммерческих пород возможно и использование методов геномной селекции. Однако для успешного применения этих технологий недостаточно знать гены, вовлеченные в адаптацию или устойчивость к болезням; надо знать, какие именно генетические варианты вносят вклад в требуемый признак. То есть необходимо изучать геномы КРС на нуклеотидном уровне и при этом учитывать исторические взаимоотношения между породами и условия их формирования для того, чтобы отличить функционально важные генетические варианты от результатов генетического дрейфа и прохождения «бутылочного горлышка».

Целью настоящего обзора являлся анализ современного состояния проблемы происхождения и эволюции турано-монгольских пород КРС, а также обобщение имеющихся сведений о потенциальных генах-кандидатах, которые вносят вклад в адаптацию этих пород к экстремальным условиям внешней среды.

## Методы

Поиск и отбор литературы были выполнены в соответствии с общепринятыми критериями, предъявляемыми к систематическим обзорам (Pautasso, 2013). Предварительно нами был составлен список турано-монгольских пород КРС (Приложение 1)<sup>1</sup> (Porter et al., 2016; Лазебная и др., 2018). Далее мы провели систематический поиск литературы, опубликованной в базах данных PubMed, Scopus, Web of Science и Google Scholar с января 2010 г.

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:  
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx6.pdf>

(начало широкого применения методов массового параллельного секвенирования) до января 2020 г. с использованием следующих поисковых запросов: «[Название породы] AND Cattle AND Whole genome genotyping», «[Название породы] AND Cattle AND Whole genome sequencing», «[Название породы] AND Cattle AND Transcriptome sequencing», «[Название породы] AND Cattle AND Selection signatures». Критериями для включения публикации в обзор служили: исследование хотя бы одной турано-монгольской породы либо ее гибрида с другими породами; описание секвенирования, полногеномного генотипирования или транскриптома генома турано-монгольской породы; результаты поиска следов позитивного отбора в геноме либо идентификация полиморфизма по числу копий ДНК (CNV).

## Адаптация турано-монгольских пород к экстремальным условиям среды

Турано-монгольский скот – группа пород КРС, которые разводят преимущественно в Азии (см. Прил. 1) (Моисеева и др., 2006; Porter et al., 2016). По морфологии турано-монгольский скот отличается от европейских тауринных пород, особенно по форме черепа и рогов (Felius et al., 2011). Череп имеет клиновидную форму, узкую корону и углубление на лобной кости. Рога направлены вверх, а не вперед, как у большинства тауринных пород.

Многие породы турано-монгольского КРС проявляют большую выносливость и устойчивость к отрицательным температурам в результате адаптации к суровому азиатскому климату. В частности, породы азиатских степей способны выдерживать годовые колебания температуры от –50 до +35 °С (Моисеева и др., 2006). Особую адаптацию демонстрирует самая северная порода КРС в мире – якутский скот, центр разведения которого находится вблизи Северного полюса холода. Ряд морфологических признаков, таких как толстая зимняя шерсть, маленькие, покрытые мехом вымя и мошонка, эффективная терморегуляция и замедленный метаболизм при низких температурах, приводят к чрезвычайной устойчивости якутского скота к экстремальному холоду (Dmitriev, Ernst, 1989; Tapio et al., 2010). Для турано-монгольских пород характерны физическая выносливость, минимальное участие человека в их содержании, круглогодичное пребывание на свободном выпасе и сохранение жизнеспособности при низкокалорийной и скудной кормовой

базе в отдельные периоды года, устойчивость к гнусу, способность переваривать грубые корма и находить их под снежным покровом (Лазебная и др., 2018). Также якутский скот, вероятно, обладает устойчивостью к туберкулезу, лейкозу и бруцеллезу (Dmitriev, Ernst, 1989).

Китайский турано-монгольский скот издавна использовался в качестве тягловой силы и ценится за свою устойчивость к паразитам, толерантность к факторам окружающей среды и физическую выносливость (Huai et al., 1993). Считается, что южный китайский скот устойчив к сырости, жаре и клещам. Северный скот, с более толстой кожей и густым волосатым покровом, устойчив к холоду и клещам. Кроме того, высокогорная тибетская порода КРС хорошо адаптирована к холоду и недостатку кислорода в высокогорных районах (Wu D.D. et al., 2018). По сравнению с чистым тауринным скотом, например голштинским, южно-китайская смешанная индицинно-тауринная порода Yunnan humped имеет высокую резистентность к тейлериозу, туберкулезу и клещам (Chen Y. et al., 2019).

### Происхождение и эволюция турано-монгольских пород

Генетическая обособленность некоторых турано-монгольских пород КРС, включая якутскую, калмыцкую и монгольскую, была показана с использованием полилокусных ISSR-маркеров (Генджиева, Сулимова, 2012), а также микросателлитных ДНК-маркеров (Li M.H. et al., 2007; Svishcheva et al., 2020). Например, якутская порода выделялась в отдельный кластер при анализе 48 европейских пород по 19 микросателлитным маркерам (Li M.H., Kantanen, 2010). Другими авторами также была выявлена высокая обособленность якутского скота по сравнению с девятью другими породами КРС по данным полногеномного генотипирования. При этом калмыцкая порода оказалась родственной сербской породе буша (Iso-Touru et al., 2016), что соответствует полученным ранее этой группой данным по генетическому разнообразию мтДНК, Y-хромосомы и микросателлитных ДНК-маркеров у этих пород (Kantanen et al., 2009; Li M.H., Kantanen, 2010). Согласно результатам полногеномного анализа однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) девяти российских пород и 45 пород Евразии, якутская и калмыцкая породы формировали отдельный отдаленный кластер на дендрограмме только российских пород, построенной по алгоритму «сеть соседей» (Neighbor-Net) (Sermuyagin et al., 2018), а на дендрограмме всех евразийских пород входили в кластер пород турано-монгольского корня.

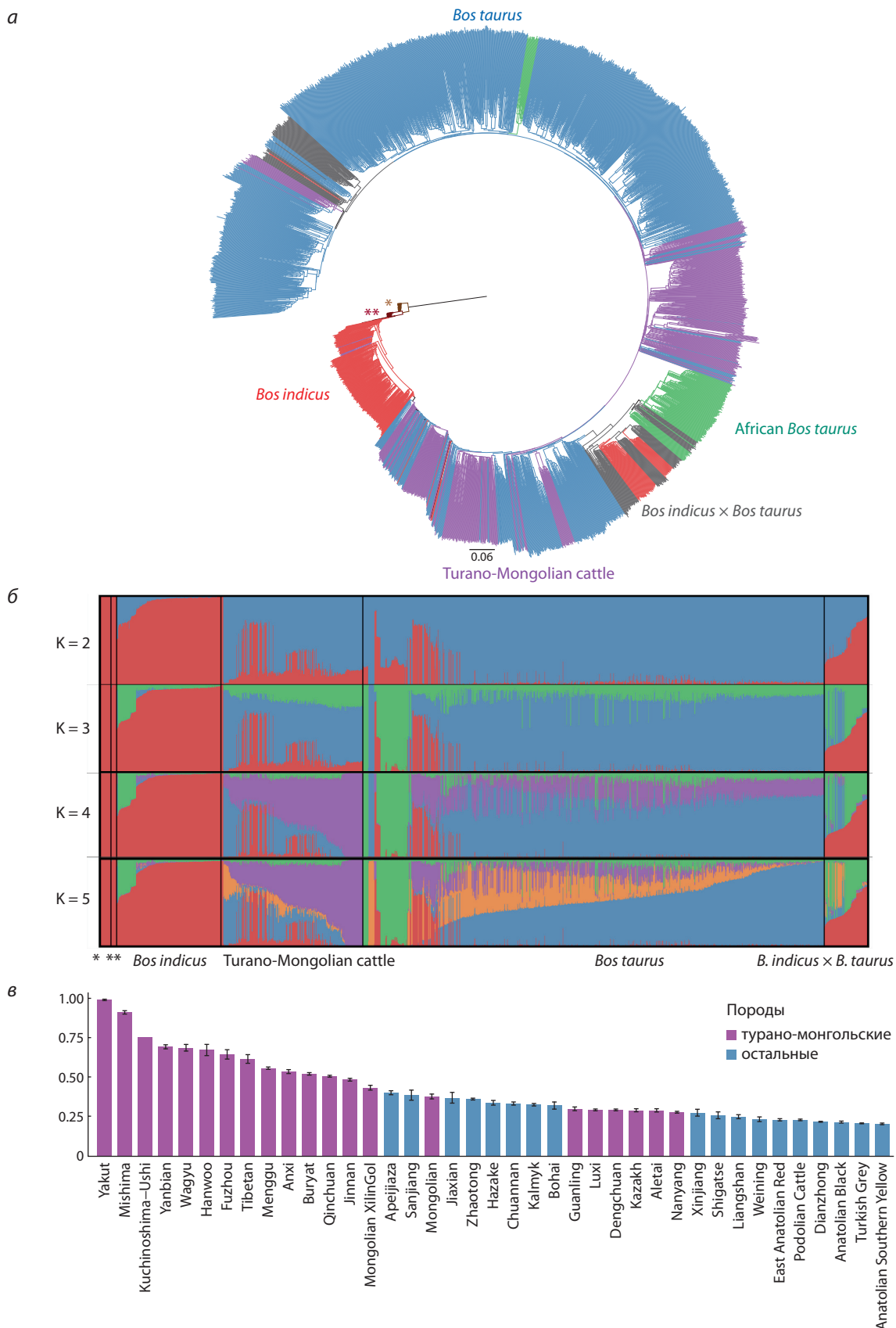
Вполне вероятно, что многие турано-монгольские породы в доисторические и исторические времена скрещивались с зебу (*Bos indicus*) (Peilieu, 1984; Huai et al., 1993; Kantanen et al., 2009), бантенгом (*Bos javanicus*) (Chen N. et al., 2018b; Zhang W. et al., 2018) и яком (*Bos grunniens*) (Xia et al., 2019). Исследования структуры популяций турано-монгольского скота в Китае по мтДНК показывают, что гаплогруппы *Bos taurus* более распространены в Северном Китае, гаплогруппы *Bos indicus* – в Южном, а породы КРС в Центральном Китае демонстрируют промежуточные частоты мтДНК зебу (Lai et al., 2006). При изучении ДНК Y-хромосомы в популяциях китайского КРС получена аналогичная географическая картина: гаплогруппа

*Bos taurus* Y2 преобладает на севере, а гаплогруппа *Bos indicus* Y3 – на юге Китая (Lu et al., 2017). В настоящее время многие турано-монгольские породы практически исчезли, другие для повышения продуктивности были разбавлены вливанием крови импортных тауринных пород и часто находятся под угрозой дальнейшей гибридизации (Peilieu, 1984; Huai et al., 1993; Kantanen et al., 2009; Gotoh et al., 2018). И только несколько турано-монгольских пород разводятся «в чистоте», например, в 2010 г. численность якутского скота составляла около 1200 животных (Tario et al., 2010).

Чтобы оценить степень генетического родства и чистопородность современных турано-монгольских пород, мы собрали коллекцию опубликованных генотипов ОНП различных пород скота (Iso-Touru et al., 2016; Gao et al., 2017; Yurchenko et al., 2018b; Zhang Y. et al., 2020), насчитывающую 2676 животных из 198 пород (включая 513 животных из 23 турано-монгольских пород, Приложение 2).

После объединения и фильтрации всех файлов с генотипической информацией мы получили 18250 высококачественных ОНП для дальнейших исследований. С использованием программы rapidNJ для индивидуальных особей (Simonsen et al., 2010) была построена дендрограмма на основе метода ближайшего соседства. Большинство животных группировалось в соответствии со своими породами, формируя отдельные кластеры, относящиеся к *Bos indicus*, *Bos taurus* и африканским тауринам (см. рисунок, а). Породы турано-монгольского происхождения компактно группировались в стволе тауриновой клады, что, вероятно, отражает их древнее общее происхождение. Кластеризация животных методом ADMIXTURE (Alexander, Lange, 2011) позволила выявить при четырех-пяти кластерах отдельную предковую компоненту, выделяющую турано-монгольские породы (см. рисунок, б, фиолетовый цвет). Эта компонента почти полностью определяла якутскую породу и присутствовала в значительном количестве в остальных турано-монгольских животных (см. рисунок, в), особенно в китайских, японских и корейских породах. Ближайшей к якутской по фракции турано-монгольского скота (>90 %) породой оказалась японская порода мишима, которая никогда не смешивалась с европейскими тауринами и разводится изолированно в чистоте на острове Мишима в Японии (см. Прил. 1). В остальных породах фракция турано-монгольского скота была ниже 75 %. Таким образом, несмотря на активное смешение с коммерческими породами, древний предковый генетический компонент турано-монгольского скота все еще присутствует во многих разводимых в Азии породах.

Большинство исследователей считают, что КРС произошел от вымершего дикого тура (*Bos primigenius*) в ходе двух независимых событий доместикизации: одно из них случилось на Ближнем Востоке около 8000–10000 лет до н. э. и привело к возникновению безгорбого тауринного скота (*Bos taurus*), другое – в Южной Азии примерно в 6000–8000 лет до н. э., в результате чего появился горбатый индицинный скот зебу (*Bos indicus*) (Bradley, Magee, 2006; Bollongino et al., 2012). Однако Ларсон и Бюргер (Larson, Burger, 2013) отмечают, что характер ветвления филогенетических деревьев мтДНК и Y-хромосомной



Чистопородность и генетическое родство современных турано-монгольских пород.

*а* – дендрограмма на основе 18250 однонуклеотидных полиморфизмов, построенная методом ближайшего соседства. Дендрограмма укоренена на яка *Bos grunniens* (\*) и бантенга *Bos javanicus* (\*\*). Фиолетовый цвет – турано-монгольский скот, синий – тауринские породы, красный – индийский скот, зеленый – африканские породы, серый – гибридный тауринский и индийский скот; *б* – кластеризация образцов методом ADMIXTURE для двух-пяти кластеров на основе предковых частот аллелей; *в* – пропорция фиолетового кластера из *K* = 5 (по методу ADMIXTURE) в различных породах скота.



ДНК, на котором основана гипотеза о существовании двух центров доместикиации, тоже мог сформироваться в результате целого ряда сценариев, включая географическую изоляцию популяций, генетический дрейф или гибридизацию. По мнению этих авторов, необходимы дополнительные генетические сведения, прежде чем мы сможем исключить возможность того, что индицинный скот произошел в результате гибридизации предков тауринного скота с морфологически различающимися популяциями диких туров в Южной Азии.

Текущие данные по мтДНК свидетельствуют о том, что европейский домашний скот произошел от ближневосточных разновидностей *Bos taurus* (Bradley, Magee, 2006). Происхождение африканских *Bos taurus* все еще обсуждается (Bradley, Magee, 2006), но тесная связь гаплогруппы Т1 с гаплогруппами Т2 и Т3 позволяет думать, что она также возникла на Ближнем Востоке (Achilli et al., 2008). Ранее было установлено, что геном якутской породы содержит гаплогруппу Т, а именно ее уникальный вариант Т4, который характерен только для турано-монгольских пород (Kantanen et al., 2009). Наличие Т4 митохондриальной гаплогруппы у вагу, ханву (Mannen et al., 2004) и якутского скота (Kantanen et al., 2009) позволило предположить, что все турано-монгольские породы могут являться потомками тауринного скота, независимо доместицированного в Азии (Mannen et al., 2004; Lai et al., 2006). Однако более поздние исследования показывают, что гаплогруппа Т4, вероятно, произошла от гаплогруппы Т3 (Achilli et al., 2009).

Недавно нами было проведено полногеномное генотипирование представителей 18 пород КРС, разводимых в России, и осуществлено их сравнение с ранее генотипированными 135 мировыми породами КРС (Yurchenko et al., 2018b). Полученные результаты анализа филогении и общих гаплотипов выявили близкое родство бурятской и особенно якутской пород с другими азиатскими турано-монгольскими породами (вагу, ханву, монгольский скот), что может означать их раннее отделение от остальной части тауринного генофонда и, возможно, независимую доместикиацию в Азии. Zhang H. с коллегами (Zhang H. et al., 2013), проанализировав найденную в Северо-Восточном Китае в районе Харбина нижнюю челюсть КРС, датированную 10600 годами до н.э., предположили, что древние люди могли экспериментировать с содержанием диких животных в неволе. Сравнение между мтДНК из нижней челюсти и митогеномами современных видов КРС показало, что древняя мтДНК принадлежит к новой и уникальной гаплогруппе типа С. Тем не менее ряд авторов считает, что такие утверждения преждевременны (Lu et al., 2017). По их мнению, найденная челюсть принадлежит ныне вымершей восточноазиатской форме *Bos primigenius*, которая не внесла генетического вклада в возникший позднее домашний скот.

Таким образом, существуют два возможных сценария доместикиации турано-монгольского скота: 1) домашний скот был независимо одомашнен коренным населением в Восточной Азии от диких туров (*Bos primigenius*); 2) тауринный домашний скот был одомашнен на Ближнем Востоке и затем завезен в Восточную Азию, а наблюдаемые различия являются результатом локальной адаптации

и/или гибридизации. Существующих зооархеологических и генетических данных недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод о доместикиации турано-монгольских пород на территории современного Китая.

### Гены-кандидаты адаптации в геномах турано-монгольских пород

Далее мы сосредоточимся на анализе потенциальных генов-кандидатов, участвующих в формировании генетической адаптации к экстремальным условиям среды у турано-монгольских пород КРС, в том числе по данным полногеномного секвенирования (см. таблицу). По сравнению с данными полногеномного генотипирования ОНП, результаты полногеномного секвенирования дают большую статистическую мощность при выявлении следов отбора и лучшее разрешение для локализации потенциальных генов-кандидатов и генетических вариантов, непосредственно влияющих на адаптацию, поскольку они не привязаны к аллелям, размещенным на чипах, которые нередко представлены только в популяциях, использованных для создания чипа (Boitard et al., 2016).

#### Гены устойчивости к холоду

Полногеномное генотипирование (более 100 тысяч ОНП) позволило выявить уникальные следы отбора в геноме якутской породы, которые могут быть непосредственно связаны с адаптацией к холодному климату. Представляет интерес обнаружение следов селекции в районе гена *RETREG1* (Yurchenko, 2018a). У человека белок RETREG1 участвует в восприятии нейронами сигналов боли и холода (Islam et al., 2018). Мутации в этом гене у людей вызывают наследственную невропатию, сопровождающуюся неспособностью ощущать боль и температуру окружающей среды (Kurth et al., 2009). Рибосомальный ген *RPL7* в районе селекции у якутской породы показывает различную экспрессию у устойчивых и чувствительных к замораживанию лягушек (Wu S. et al., 2008). Следы селекции были зафиксированы у якутского скота также в районе гена *HDAC3*, белок которого стимулирует термогенез в бурой жировой ткани путем активации энхансеров, и гена *TNKS*, участвующего в энергообмене и формировании жировой ткани у мышей (Yeh et al., 2009).

Данные полногеномного секвенирования животных якутской породы позволили выявить в ее геноме 1442 гена, которые содержали более пяти несинонимичных ОНП (Weldenegodguad et al., 2019). Были найдены следы отбора в ряде генов (*DNAJC9*, *SOC33*, *TRPC7*, *SLC8A1*, *GLP1R*, *PKLR* и *TCF7L2*), которые, вероятно, связаны с адаптацией к холоду у коренного населения Сибири (Cardona et al., 2014). Причем ген *SLC8A1*, белковый продукт которого участвует в ответе клетки на окислительный стресс, вероятно, подвергался отбору не только у якутского скота и коренного населения Сибири, но также у местных якутских лошадей (Librado et al., 2015). Хронический холодовой стресс увеличивал экспрессию мРНК гена *SOC33* в гипоталамусе и периферических мононуклеарных клетках крови у крыс и хорьков (Reynolds et al., 2017). Три гена (*PFKM*, *ADAM17* и *SIRPA*), подвергавшихся селекции у якутского скота, оказались ассоциированы с устойчивостью к заболеваниям (Weldenegodguad et al., 2019). Так,



## Гены-кандидаты адаптации в геномах турано-монгольских пород

Породы	Метод	Число животных	Гены-кандидаты	Литературный источник
Гены устойчивости к холоду				
Якутская	Генотипирование на чипах GGP HD150K	26	<i>RETREG1, RPL7, HDAC3, TNKS</i>	Yurchenko et al., 2018a
	Полногеномное секвенирование	5	<i>DNAJC9, SOCS3, TRPC7, SLC8A1, GLP1R, PKLR, TCF7L2, PFKM, ADAM17, SIRPA</i>	Weldenegodguad et al., 2019
Yanbian	Полногеномное секвенирование	9	<i>CD36, FGF5</i>	Shen et al., 2020
Гены иммунного ответа				
Якутская	Генотипирования на чипах BovineSNP50 (Illumina)	40	<i>CSK, GZMB, PML, SEMA7A</i>	Iso-Touru et al., 2016
Калмыцкая	Генотипирования на чипах BovineSNP50 (Illumina)	22	<i>IL10, IL19, IL20, PIGR, FCAMR, IL24</i>	Iso-Touru et al., 2016
Якутская	Секвенирование транскриптома лейкоцитов	3	<i>CCL@, CHST@, CXCR@, GAS@, GZM@, IGFBP@, NCR@</i>	Pokharel et al., 2019
Ханву	Полногеномное секвенирование	12	<i>RCN2</i>	Lee T. et al., 2013
	Генотипирование на чипах BovineHD (Illumina)	217	<i>CD14, CD28, RFX5, TNFAIP8L2, TMEM173, IL17D, TGFB1, NFKBIA</i>	Porto-Neto et al., 2014
Bayu, Leiqiong, Nanyang, Luxi, Yunnan, Qinchuan, Yanbian	Полногеномное секвенирование	57	<i>BOLA-DQA2, AUH, CXCL14, IL1RL2, EPB42, A2M, BLA-DQB, HSPA9, IFNA16, IL15, IL2, PROCR, SP3, VAMP7, TLR4, EGLN2, SOX5, CD59, GPR50, TAS2R16, NFIB, FZD10, KIF2B, ROBO1</i>	Mei et al., 2019
Yunnan humped	Секвенирование транскриптома печени и селезенки	5	<i>C1QB, CD55, MASP2, C4BPA, MAVS, NOD2, CD46, C2, SERPING1, SERPINE1, TIRAP, TLR2, TLR6</i>	Chen Y. et al., 2019
Bayu × Fuzhou	Генотипирование на чипах BovineHD (Illumina)	364	<i>TLR9, TAFA1, GPX8, IL5, PRDM9, GRIK2</i>	Wang Z. et al., 2019
Гены адаптации к высокогорью				
Тибетская	Полногеномное секвенирование	20	<i>EGLN1, EGLN2, HIF3a</i>	Wu D.D. et al., 2018
		9	<i>COP55, IL1A, IL1B, MMP3, EGLN1, RYR2, SDHD</i>	Chen N. et al., 2018a
	Генотипирование на чипах BovineHD (Illumina)	15	<i>LETM1, TXNRD2, STUB1</i>	Zhang Y. et al., 2020

белок ADAM17 регулирует восприятие болевых стимулов, в том числе и холода (Quarta et al., 2019).

Сравнительный анализ данных полногеномного секвенирования китайской турано-монгольской породы Yanbian и африканской тауринной породы N'Dama показал наличие у животных обеих пород следов отбора в гене *CD36* (Shen et al., 2020). Белок CD36 играет важную роль в мембранном транспорте жирных кислот в сердце, скелетной мускулатуре и жировой ткани (Glatz et al., 2010). Экспрессия CD36 увеличивается при холодовом воздействии, что повышает поглощение бурой жировой тканью триглицерид-богатых липопротеинов (Bartelt et al., 2011). У голодающих мышей, нокаутных по гену *CD36*, вскоре после воздействия холода температура тела резко снижалась, причем эта гипотермия сопровождалась заметным снижением как уровня глюкозы в крови, так и запасов триацилглицеринов в бурой жировой ткани и гликогена в скелетной мускулатуре (Putri et al., 2015). Известно, что у животных породы Yanbian экспрессия гена *CD36* положительно коррелирует с содержанием внутримышечного жира (мраморностью) (Jeong et al., 2012). По-видимому, именно обширные запасы жира способствуют резистент-

ности к холоду у животных. Эти же авторы выявили достоверный сигнал в гене *FGF5* по данным поиска районов отбора у породы Yanbian (Shen et al., 2020). Белок FGF5 регулирует рост волосяного фолликула и длину волоса у кошки, собаки и человека (Higgins et al., 2014). Порода Yanbian характеризуется длинным и густым волосяным покровом, который помогает ей адаптироваться к зимним температурам до  $-37^{\circ}\text{C}$ .

## Гены иммунного ответа

Одна из первых работ по поиску следов селекции у двух турано-монгольских пород – якутской и калмыцкой – была выполнена путем генотипирования ОНП маркеров на чипе Illumina BovineSNP50 (Iso-Touru et al., 2016). У калмыцкой породы и четырех других пород авторы нашли следы селекции в районе 4116037–4616037 п. н. на хромосоме 16, который содержит шесть генов иммунной системы (*IL10, IL19, IL20, PIGR, FCAMR* и *IL24*). У турано-монгольской якутской и тауриновой серой украинской породы следы селекции были выявлены на хромосоме 21 в районе 33802673–35302673 п. н., который содержит четыре гена иммунной системы (*CSK, GZMB, PML* и *SEMA7A*).

Секвенирование транскриптома крови показало, что у животных якутской породы по сравнению с голштинской повышена экспрессия 89 генов (Pokharel et al., 2019). К числу семейств, в которых повышена экспрессия двух и более генов, относятся хемокины (*CCL4*, *CCL5*), углеводные сульфотрансферазы (*CHST1*, *CHST12*), хемокиновые рецепторы (*CX3CR1*, *CXCR6*), блокирующие рост специфические белки (*GAS6*, *GAS7*), гранзимы (*GZMB*, *GZMM*, *GZMH*), белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (*IGFBP4*, *IGFBP7*), а также рецепторы естественной цитотоксичности (*NCR1*, *NCR3*). Так, у якутского скота авторы выявили повышение экспрессии четырех транскриптов гранзимов и перфорина. Гранзимы являются сериновыми протеазами, которые используются цитотоксическими лимфоцитами для уничтожения злокачественных и зараженных вирусом клеток. Гранзимы транспортируются в цитоплазму клетки-мишени перфорином 1 (PRF1), после чего они расщепляют специфические белки и запускают апоптоз (Johnson et al., 2003). Полученные данные свидетельствуют о наличии очень сильной опосредованной гранзимами иммунной реакции у якутского скота.

Полногеномное секвенирование представителей породы ханву позволило выявить протяженный район гомозиготности вблизи гена *RCN2* (Lee T. et al., 2013). По мнению авторов, именно отбор по гену *RCN2* привел к формированию у ханву устойчивости к вирусу папилломы КРС. Другие авторы использовали данные полногеномного секвенирования для поиска породоспецифических генов у ханву путем анализа прочтений, которые не выровнялись на референсный геном (Caetano-Anolles et al., 2018). Оказалось, что значительное число белковых доменов этих генов ассоциировано с функцией иммуноглобулинов и они потенциально могут взаимодействовать с доменами других белков иммунной системы.

Генотипирование животных породы ханву примерно по 680 тысячам ОНП позволило найти следы отбора в локусах, содержащих целый ряд генов иммунной системы, например *CD14*, *CD28*, *RFX5*, *TNFAIP8L2*, *TMEM173*, *IL17D*, *TGFB1* и *NFKB1A* (Porto-Neto et al., 2014). Белок, кодируемый геном *CD14*, является поверхностным антигеном, который экспрессируется преимущественно на моноцитах/макрофагах и участвует в формировании врожденного иммунитета на бактериальные липополисахариды (Tsukamoto et al., 2018). Рецептор *CD28* связывается с токсинами стафилококков и стрептококков и запускает выделение цитокинов и Т-клеточный иммунный ответ (Kaempfer et al., 2013). Интерлейкин-17D (*IL17D*) стимулирует инфильтрацию нейтрофилов, естественных киллеров и моноцитов в ответ на инфекцию цитомегаловируса у мышей (Seelige et al., 2018). Транскрипционный фактор *RFX5* опосредует экспрессию генов *MHC-II* и, таким образом, играет значительную роль в адаптивном иммунном ответе (Garvie et al., 2007). Белок *TNFAIP8L2* считается репрессором врожденного и адаптивного иммунитета и участвует в поддержании иммунного гомеостаза (Niture et al., 2019). Белок *STING*, кодируемый геном *TMEM173*, входит в состав белкового комплекса, который распознает нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий в цитозоле и активирует транскрипцию интерферонов первого типа

(Motwani et al., 2019). Экспрессия мРНК *NFKB1A* в линии клеток почки свиньи изменялась при инфицировании вирусом ящура (Zhang T. et al., 2018).

Анализ регионов с вариацией по числу копий ДНК (CNV) по данным полногеномного секвенирования животных, представляющих шесть аборигенных китайских пород скота (Leiqiong, Nanyang, Luxi, Yunnan, Qinchuan, Yanbian) и две интернациональные специализированные мясные породы (вагу, красный ангус), позволил выявить 11486 CNV регионов, покрывающих 52.04 млн п. н. (1.96 %) от референсного генома (Mei et al., 2019). У китайского скота авторами были идентифицированы многочисленные локализованные в CNV регионах гены, которые связаны с иммунным ответом. Так, ген *BOLA-DQA2* может быть критическим фактором в резистентности к маститу у молочного скота (Hou et al., 2012). CNV в этом гене ассоциирована с иммунным ответом у яка (Zhang X. et al., 2016). Сообщалось, что гены *AUH*, *CXCL14*, *IL1RL2* и *EPB42* влияют на толерантность к паразитам у различных пород скота (Mustafa et al., 2018). Ряд генов, в том числе *A2M*, *BLA-DQB*, *HSPA9*, *IFNA16*, *IL15*, *IL2*, *PROCR*, *SP3*, *VAMP7* и *TLR4*, связаны, по данным многочисленных исследований, с иммунным ответом (Mei et al., 2016; Randhawa et al., 2016). Несколько генов иммунной системы активируются в ответ на внешнее воздействие, например *EGLN2* (Wu D.D. et al., 2018), *SOX5* (Liu, Bickhart, 2012), *CD59* (Chan et al., 2010), *GPR50*, *TAS2R16* (Gautier et al., 2016), *NFIB* (Zhao et al., 2017), а также *FZD10*, *KIF2B* и *ROBO1* (Ai et al., 2015).

Сравнение путем секвенирования РНК дифференциально экспрессирующихся генов в печени и селезенке показало, что экспрессия некоторых генов, связанных с иммунной функцией (*CIQB*, *CD55*, *MASP2*, *C4BPA*, *MAVS*, *NOD2* и *CD46*), была повышена у животных породы Yunnan humped по сравнению с голштинами, в то время как экспрессия других генов (*C2*, *SERPING1*, *SERPINE1*, *TIRAP*, *TLR2* и *TLR6*) была понижена (Chen Y. et al., 2019). Ген *CIQB* кодирует В-цепь компонента комплемента 1q, участвуя в формировании врожденного иммунитета, а также считается одним из хабов реакции организма на инфицирование *Mycobacterium tuberculosis* (Sambarey et al., 2017). Ген *CD46* кодирует белок, который является компонентом системы комплемента и может служить в качестве рецептора для вируса кори, герпес-вируса человека 6-го типа и бактерии *Neisseria* (Yamamoto et al., 2013). Другой белок комплемента, *CD55*, ассоциирован с малярией и аутоиммунными заболеваниями (Dho et al., 2018). Компонент комплемента *C2* участвует в очищении тканей от апоптотических клеток, и генетические варианты этого гена ассоциированы с красной волчанкой (Chen H.H. et al., 2015). Ген *MASP2* кодирует белок, который относится к семейству сериновых пептидаз S1. В исследовании (Kasaptoentalib et al., 2017) мыши с нокаутом по этому гену чаще гибли, по сравнению с контролем, при пневмококковом менингите. Белок *C4BPA* входит в состав мультимерного белка *C4BP*, контролирующего активацию комплемента по классическому пути. *C4BP* связывается некоторыми патогенами, в частности *Streptococcus pyogenes*, что обеспечивает этим бактериям выживание в организме хозяина (Ermer, Blom, 2016). Белок *MAVS* необходим для активи-

вазии транскрипционных факторов, которые регулируют экспрессию бета-интерферона и, таким образом, запускают реакции противовирусного иммунитета (Belgnaoui et al., 2011). Ген *NOD2* экспрессируется преимущественно в лейкоцитах. Его белковый продукт участвует в иммунном ответе на бактериальные липополисахариды путем распознавания мурамилдипептида и активации белка NFκB (Kuss-Duerkop, Keestra-Gounder, 2020). У человека ОНП маркеры в гене *SERPINE1* ассоциированы с повышенной смертностью от сепсиса (Shi et al., 2015). Толл-подобный рецептор TLR6 образует гетеродимерный комплекс с TLR2, который распознаёт целый ряд патоген-связанных молекулярных структур. ОНП маркеры в генах *TLR2* и *TLR6* ассоциированы с чувствительностью КРС к *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, а также к туберкулезу и филляриозу у человека (Mukherjee et al., 2019).

Генотипирование на чипах высокой плотности гибридов вагу с породой Fuzhou позволило идентифицировать следы отбора в ряде генов (*TLR9*, *TAF1*, *GPX8*, *IL5*, *PRDM9* и *GRIK2*), ассоциированных с иммунной функцией (Wang Z. et al., 2019). Внутриклеточный толл-подобный рецептор TLR9 обычно распознает патогены, проникающие внутрь клетки (Mukherjee et al., 2019). ОНП маркеры в гене *TLR9* у человека ассоциированы с иммунным ответом при туберкулезе (Bharti et al., 2014). Ген *TAF1* кодирует небольшой, сходный с гемокинами белок, который экспрессируется преимущественно в определенных областях мозга и функционирует в качестве регулятора иммунных и нервных клеток (нейрокина) (Tom Tang et al., 2004). Цитокин IL5 является фактором роста и дифференцировки В-клеток и эозинофилов (Takatsu, 2011).

### Гены адаптации к высокогорью

Как полагают, як обитает на Тибетском плато на протяжении миллионов лет и за это время приобрел многочисленные адаптации к условиям высокогорья, например увеличенный размер легких и сердца. В отличие от яка, домашний тауринный скот появился на Тибетском плато вместе с людьми всего несколько тысяч лет назад. Быстрой адаптации тибетского скота к условиям высокогорья, вероятно, способствовала интрогрессия генов сигнального пути ответа на гипоксию (например, *EGLN1*, *EGLN2* и *HIF3a*) (Wu D.D. et al., 2018). Эти же авторы показали, что тибетский скот, имеющий гаплотип *EGLN1* от яка, тоже имеет сниженную концентрацию гемоглобина и число эритроцитов в крови, что расценивается как адаптивный признак.

Другая группа исследователей на основании данных полногеномного секвенирования установила, что в среднем 1.22 % генома тибетского скота произошли в результате интрогрессии от яка примерно две тысячи лет назад (Chen N. et al., 2018a). Анализ списка интродуцированных генов выявил достоверное обогащение тремя терминами геновой онтологии: сенсорное восприятие запаха (GO:0007608), трансмембранный транспорт L-орнитина (GO:1903352), а также процессинг антигена и презентация пептидных или полисахаридных антигенов с помощью белков главного комплекса гистосовместимости класса II (GO:0002504). Поиск по базе данных KEGG показал, что наибольшая группа интродуцированных

генов была вовлечена в реакцию «трансплантат против хозяина». В геноме тибетского скота в районах интрогрессии было найдено несколько генов, которые могли участвовать в адаптации к гипоксии. К ним относятся гены метаболического пути индуцируемого гипоксией фактора – *COPS5*, *IL1A*, *IL1B*, *MMP3* и *EGLN1*, которые неоднократно были идентифицированы в качестве мишеней для отбора на адаптацию к высокогорью у жителей Анд, Тибета и у яка (Bigham et al., 2010; Qiu et al., 2012). Два гена, *RYR2* и *SDHD*, участвуют в регуляции гомеостаза кальция, который опосредует реакцию на гипоксию (Wang M.S. et al., 2015).

Сравнительный анализ районов CNV у высокогорного тибетского скота и равнинного монгольского (Menggu) по данным полногеномного генотипирования на биочипе Illumina BovineHD Genotyping BeadChip позволил идентифицировать три потенциальных гена-кандидата (*LETM1*, *TXNRD2* и *STUB1*) адаптации к гипоксии (Zhang Y. et al., 2020). Ген *LETM1* кодирует белок, встроенный во внутреннюю мембрану митохондрий, который играет существенную роль в поддержании нормальной морфологии этих органелл и жизнеспособности клеток (Li Y. et al., 2019). Опосредованная аденовирусом сверхэкспрессия гена *LETM1* может приводить к снижению выработки АТФ, потребления кислорода и массы митохондрий, а также к некротической гибели клеток HeLa (Piao et al., 2009). В геноме тибетского скота было выявлено пониженное число копий гена *LETM1*, что может способствовать адаптации этих животных к гипоксии путем сохранения нормальной морфологии и жизнедеятельности митохондрий. Ген *TXNRD2* кодирует митохондриальную тиоредоксин-редуктазу типа 2. У мышей со специфическим нокаутом этого гена в сердце наблюдаются дегенерация митохондрий и стабилизация фактора HIF-1 альфа (Kiermayer et al., 2015). Белок *STUB1* представляет собой E3 убиквитинлигазу и играет существенную роль в убиквитинировании и деградации фактора HIF-1 альфа (Ferreira et al., 2013).

### Закключение

Проведенный нами анализ литературы позволяет сделать следующие выводы:

- турано-монгольским породам свойственна высокая адаптация к экстремальным климатическим условиям и паразитам, обусловленная селекцией в районах генов иммунного ответа и терморегуляции;
- несмотря на активное смешение с коммерческими породами, древний предковый генетический компонент турано-монгольского скота все еще присутствует во многих разводимых в Азии породах КРС, а якутский скот остался, по-видимому, единственным чистокровным носителем этой компоненты;
- имеющиеся в настоящее время данные литературы не позволяют отдать предпочтение одному из двух возможных сценариев происхождения турано-монгольских пород – в результате доместикиции дикого тура на территории Восточной Азии или вследствие миграции тауринной протопопуляции из Ближнего Востока;
- в результате высокопроизводительного генотипирования и секвенирования геномов и транскриптомов представителей турано-монгольских пород в последнее



время были найдены перспективные гены-кандидаты, участвующие в адаптации к факторам внешней среды. Дальнейшие исследования в этой области должны быть направлены на: 1) накопление генетических и палеогенетических данных, которые позволят сделать окончательный вывод о происхождении турано-монгольской группы пород; 2) создание референсного турано-монгольского генома и его независимой аннотации для детального сравнения турано-монгольских пород, поскольку значительные отличия от существующего референсного генома (геррефорда) могут приводить к невыявлению генетических различий, характерных только для турано-монгольских пород в сильно дивергированных участках их геномов; 3) определение роли высокочастотных замен, характерных для турано-монгольских пород, и их введение в селекционно-племенную работу коммерческих пород путем генного редактирования.

## Список литературы / References

- Генджиева О.Б., Сулимова Г.Е. Анализ взаимоотношений между породами крупного рогатого скота турано-монгольской группы на основе ДНК-полиморфизма. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2012;2:14-16.
- [Gendzhieva O.B., Sulimova G.E. The analysis of mutual relations between breeds of horned cattle of the Turano-Mongolian group on the basis of DNA polymorphism. *Aktual'nyye Voprosy Veterinarnoy Biologii = Actual Questions of Veterinary Biology*. 2012;2:14-16. (in Russian)]
- Дунин И.М., Данкверт А.Г. (ред.). Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в Российской Федерации. М.: ВНИИплем, 2013.
- [Dunin I.M., Dankvert A.G. (Eds.) Breeds and Types of Farm Animals in the Russian Federation. Moscow: All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2013. (in Russian)]
- Лазебная И.В., Перчун А.В., Лхасаранов Б.Б., Лазебный О.Е., Столповский Ю.А. Генетическая изменчивость бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота, оцененная на основе анализа полиморфизма генов *GHI*, *GHR* и *PRL*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417.
- [Lazebnaya I.V., Perchun A.V., Lhasaranov B.B., Lazebny O.E., Stolpovskiy Yu.A. Analysis of *GHI*, *GHR* and *PRL* gene polymorphisms for estimation of the genetic diversity of Buryat and Altai cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417.]
- Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А., Сулимова Г.Е., Каштанов С.Н. Генофонды сельскохозяйственных животных. Генетические ресурсы животноводства России. М.: Наука, 2006.
- [Moiseeva I.G., Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. Gene Pools of Farm Animals. Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)]
- Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A., Malusà A., Pala M., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Ajmone-Marsan P., Liotta L., Semino O., Bandelt H.J., Ferretti L., Torroni A. The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One*. 2009; 4(6):e5753. DOI 10.1371/journal.pone.0005753.
- Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Uboldi C., Colli L., Al-Zaehry N., Accetturo M., Pala M., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Battaglia V., Fornarino S., Kalamati J., Houshmand M., Negrini R., Semino O., Richards M., Macaulay V., Ferretti L., Bandelt H.J., Ajmone-Marsan P., Torroni A. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Curr. Biol*. 2008;18(4):R157-158. DOI 10.1016/j.cub.2008.01.019.
- Ai H., Fang X., Yang B., Huang Z., Chen H., Mao L., Zhang F., Zhang L., Cui L., He W., Yang J., Yao X., Zhou L., Han L., Li J., Sun S., Xie X., Lai B., Su Y., Lu Y., Yang H., Huang T., Deng W., Nielsen R., Ren J., Huang L. Adaptation and possible ancient interspecies introgression in pigs identified by whole-genome sequencing. *Nat. Genet*. 2015;47(3):217-225. DOI 10.1038/ng.3199.
- Alexander D.H., Lange K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12:246. DOI 10.1186/1471-2105-12-246.
- Bartelt A., Bruns O.T., Reimer R., Hohenberg H., Ittrich H., Peldschus K., Kaul M.G., Tromsdorf U.I., Weller H., Waurisch C., Eychmüller A., Gordts P.L., Rinninger F., Bruegelmann K., Freund B., Nielsen P., Merkel M., Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med*. 2011;17(2):200-205. DOI 10.1038/nm.2297.
- Belgnaoui S.M., Paz S., Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr. Opin. Immunol*. 2011;23(5):564-572. DOI 10.1016/j.coi.2011.08.001.
- Bharti D., Kumar A., Mahla R.S., Kumar S., Ingle H., Shankar H., Joshi B., Raut A.A., Kumar H. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Immunogenetics*. 2014; 66(12):675-681. DOI 10.1007/s00251-014-0806-1.
- Bigham A., Bauchet M., Pinto D., Mao X., Akey J.M., Mei R., Scherer S.W., Julian C.G., Wilson M.J., López Herráez D., Brutsaert T., Parra E.J., Moore L.G., Shriver M.D. Identifying signatures of natural selection in Tibetan and Andean populations using dense genome scan data. *PLoS Genet*. 2010;6(9):e1001116. DOI 10.1371/journal.pgen.1001116.
- Boitard S., Boussaha M., Capitan A., Rocha D., Servin B. Uncovering adaptation from sequence data: lessons from genome resequencing of four cattle breeds. *Genetics*. 2016;203(1):433-450. DOI 10.1534/genetics.115.181594.
- Bollongino R., Burger J., Powell A., Mashkour M., Vigne J.D., Thomas M.G. Modern taurine cattle descended from small number of near-eastern founders. *Mol. Biol. Evol*. 2012;29(9):2101-2104. DOI 10.1093/molbev/mss092.
- Bradley D.G., Magee D.A. Genetics and the origins of domestic cattle. In: Zeder M.A., Bradley D.G., Emshwiller E., Smith B.D. (Eds.). *Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms*. Berkeley: Univ. of California Press, 2006;317-328.
- Caetano-Anolles K., Kim K., Kwak W., Sung S., Kim H., Choi B.H., Lim D. Genome sequencing and protein domain annotations of Korean Hanwoo cattle identify Hanwoo-specific immunity-related and other novel genes. *BMC Genet*. 2018;19(1):37. DOI 10.1186/s12863-018-0623-x.
- Cai X., Chen H., Wang S., Xue K., Lei C. Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. *Genet. Sel. Evol*. 2006;38(5):525-534.
- Cardona A., Pagani L., Antao T., Lawson D.J., Eichstaedt C.A., Yngvadottir B., Shwe M.T., Wee J., Romero I.G., Raj S., Metspalu M., Villesms R., Willerslev E., Tyler-Smith C., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Kivisild T. Genome-wide analysis of cold adaptation in indigenous Siberian populations. *PLoS One*. 2014;9(5):e98076. DOI 10.1371/journal.pone.0098076.
- Chan E.K., Nagaraj S.H., Reverter A. The evolution of tropical adaptation: comparing taurine and zebu cattle. *Anim. Genet*. 2010;41(5): 467-477. DOI 10.1111/j.1365-2052.2010.02053.x.
- Chen H.H., Tsai L.J., Lee K.R., Chen Y.M., Hung W.T., Chen D.Y. Genetic association of complement component 2 polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2015;86(2): 122-133. DOI 10.1111/tan.12602.
- Chen N., Cai Y., Chen Q., Li R., Wang K., Huang Y., Hu S., Huang S., Zhang H., Zheng Z., Song W., Ma Z., Ma Y., Dang R., Zhang Z., Xu L., Jia Y., Liu S., Yue X., Deng W., Zhang X., Sun Z., Lan X., Han J., Chen H., Bradley D.G., Jiang Y., Lei C. Whole-genome resequencing reveals world-wide ancestry and adaptive introgression events of domesticated cattle in East Asia. *Nat. Commun*. 2018a; 9(1):2337. DOI 10.1038/s41467-018-04737-0.
- Chen N., Huang J., Zulfiqar A., Li R., Xi Y., Zhang M., Dang R., Lan X., Chen H., Ma Y., Lei C. Population structure and ancestry of



- Qinchuan cattle. *Anim. Genet.* 2018b;49(3):246-248. DOI 10.1111/age.12658.
- Chen Y., Zeng B., Shi P., Xiao H., Chen S. Comparative analysis of the liver and spleen transcriptomes between Holstein and Yunnan humped cattle. *Animals (Basel)*. 2019;9(8):527. DOI 10.3390/ani9080527.
- Choy Y.H., Seo J.H., Park B., Lee S., Choi J., Jung K., Kong H. Studies on genetic diversity and phylogenetic relationships of Chikso (Korea native brindlee cattle) using the microsatellite marker. *J. Life Sci.* 2015;25:624-630. DOI 10.5352/JLS.2015.25.6.624.
- Decker J.E., McKay S.D., Rolf M.M., Kim J., Molina Alcalá A., Sonstegard T.S., Hanotte O., Götherström A., Seabury C.M., Praharani L., Babar M.E., Correia de Almeida Regitano L., Yildiz M.A., Heaton M.P., Liu W.S., Lei C.Z., Reecy J.M., Saif-Ur-Rehman M., Schnabel R.D., Taylor J.F. Worldwide patterns of ancestry, divergence, and admixture in domesticated cattle. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004254. DOI 10.1371/journal.pgen.1004254.
- Dho S.H., Lim J.C., Kim L.K. Beyond the role of CD55 as a complement component. *Immune Netw.* 2018;18(1):e11. DOI 10.4110/in.2018.18.e11.
- Dmitriev N.G., Ernst L.K. (Eds.). *Animal Genetics Resources of the USSR. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1989.* Available at <http://www.fao.org/3/ah759e/ah759e00.htm>. Retrieved at October 2, 2019.
- Ermert D., Blom A.M. C4b-binding protein: the good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol. Lett.* 2016;169:82-92. DOI 10.1016/j.imlet.2015.11.014.
- Felius M., Koolmees P.A., Theunissen B., European Cattle Genetic Diversity Consortium, Lenstra J.A. On the breeds of cattle – historic and current classifications. *Diversity*. 2011;3:660-692. DOI 10.3390/d3040660.
- Ferreira J.V., Fôfo H., Bejarano E., Bento C.F., Ramalho J.S., Girão H., Pereira P. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2013;9(9):1349-1366. DOI 10.4161/auto.25190.
- Gao Y., Gautier M., Ding X., Zhang H., Wang Y., Wang X., Faruque M.O., Li J., Ye S., Gou X., Han J., Lenstra J.A., Zhang Y. Species composition and environmental adaptation of indigenous Chinese cattle. *Sci. Rep.* 2017;7(1):16196. DOI 10.1038/s41598-017-16438-7.
- Garvie C.W., Stagno J.R., Reid S., Singh A., Harrington E., Boss J.M. Characterization of the RFX complex and the RFX5(L66A) mutant: implications for the regulation of MHC class II gene expression. *Biochemistry*. 2007;46(6):1597-1611.
- Gautier M., Moazami-Goudarzi K., Levéziel H., Parinello H., Grohs C., Rialle S., Kowalczyk R., Flori L. Deciphering the wisent demographic and adaptive histories from individual whole-genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(11):2801-2814. DOI 10.1093/molbev/msw144.
- Glatz J.F., Luiken J.J., Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol. Rev.* 2010;90(1):367-417. DOI 10.1152/physrev.00003.2009.
- Gotoh T., Nishimura T., Kuchida K., Mannen H. The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects – a review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2018;31(7):933-950. DOI 10.5713/ajas.18.0333.
- Higgins C.A., Petukhova L., Harel S., Ho Y.Y., Drill E., Shapiro L., Wajid M., Christiano A.M. FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(29):10648-10653. DOI 10.1073/pnas.1402862111.
- Hou Q., Huang J., Ju Z., Li Q., Li L., Wang C., Sun T., Wang L., Hou M., Hang S., Zhong J. Identification of splice variants, targeted microRNAs and functional single nucleotide polymorphisms of the *BOLA-DQA2* gene in dairy cattle. *DNA Cell Biol.* 2012;31(5):739-744. DOI 10.1089/dna.2011.1402.
- Huai Q., Zhiyong J., Zhijie C. A survey of cattle production in China. *World Review Animal. FAO.* 1993;76:12-18.
- Islam F., Gopalan V., Lam A.K. *RETREG1 (FAM134B)*: a new player in human diseases: 15 years after the discovery in cancer. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(6):4479-4489. DOI 10.1002/jcp.26384.
- Iso-Touru T., Tapio M., Vilkki J., Kiseleva T., Ammosov I., Ivanova Z., Popov R., Ozerov M., Kantanen J. Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe. *Anim. Genet.* 2016;47(6):647-657. DOI 10.1111/age.12473.
- Jeong J., Kwon E.G., Im S.K., Seo K.S., Baik M. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers. *J. Anim. Sci.* 2012;90(6):2044-2053. DOI 10.2527/jas.2011-4753.
- Jo C., Cho S.H., Chang J., Nam K.C. Keys to production and processing of Hanwoo beef: a perspective of tradition and science. *Anim. Front.* 2012;2(4):32-38. DOI 10.2527/af.2012-0060.
- Johnson H., Scorrano L., Korsmeyer S.J., Ley T.J. Cell death induced by granzyme C. *Blood.* 2003;101(8):3093-3101.
- Kaempfer R., Arad G., Levy R., Hillman D., Nasie I., Rotfogel Z. CD28: direct and critical receptor for superantigen toxins. *Toxins (Basel)*. 2013;5(9):1531-1542. DOI 10.3390/toxins5091531.
- Kantanen J., Edwards C.J., Bradley D.G., Viinalass H., Thessler S., Ivanova Z., Kiselyova T., Cinkulov M., Popov R., Stojanović S., Ammosov I., Vilkki J. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity*. 2009;103(5):404-415. DOI 10.1038/hdy.2009.68.
- Kantanen J., Lovendahl P., Strandberg E., Eythorsdottir E., Li M.H., Kettunen-Præbel A., Berg P., Meuwissen T. Utilization of farm animal genetic resources in a changing agro-ecological environment in the Nordic countries. *Front. Genet.* 2015;6:52. DOI 10.3389/fgene.2015.00052.
- Kasanmoentalib E.S., Valls Seron M., Ferwerda B., Tanck M.W., Zwinderman A.H., Baas F., van der Ende A., Schwaeble W.J., Brouwer M.C., van de Beek D. Mannose-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J. Neuroinflammation.* 2017;14(1):2. DOI 10.1186/s12974-016-0770-9.
- Kawahara-Miki R., Tsuda K., Shiwa Y., Arai-Kichise Y., Matsumoto T., Kanesaki Y., Oda S., Ebihara S., Yajima S., Yoshikawa H., Kono T. Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle Kuchinoshima-Ushi. *BMC Genom.* 2011;12:103. DOI 10.1186/1471-2164-12-103.
- Kiermayer C., Northrup E., Schrewe A., Walch A., de Angelis M.H., Schoensiegel F., Zischka H., Prehn C., Adamski J., Bekeredjian R., Ivandic B., Kupatt C., Brielmeier M. Heart-specific knockout of the mitochondrial thioredoxin reductase (*Txnrd2*) induces metabolic and contractile dysfunction in the aging myocardium. *J. Am. Heart Assoc.* 2015;4(7):e002153. DOI 10.1161/JAHA.115.002153.
- Kurth I., Pamminer T., Hennings J.C., Soehendra D., Huebner A.K., Rothier A., Baets J., Senderek J., Topaloglu H., Farrell S.A., Nürnberg G., Nürnberg P., De Jonghe P., Gal A., Kaether C., Timmerman V., Hübner C.A. Mutations in *FAM134B*, encoding a newly identified Golgi protein, cause severe sensory and autonomic neuropathy. *Nat. Genet.* 2009;41(11):1179-1181. DOI 10.1038/ng.464.
- Kuss-Duerkop S.K., Keestra-Gounder A.M. NOD1 and NOD2 activation by diverse stimuli: a possible role for sensing pathogen-induced endoplasmic reticulum stress. *Infect. Immun.* 2020;88:e00898-19. DOI 10.1128/IAI.00898-19.
- Lai S.J., Liu Y.P., Liu Y.X., Li X.W., Yao Y.G. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2006;38(1):146-154.
- Larson G., Burger J. A population genetics view of animal domestication. *Trends Genet.* 2013;29(4):197-205. DOI 10.1016/j.tig.2013.01.003.
- Lee S.H., Park B.H., Sharma A., Dang C.G., Lee S.S., Choi T.J., Choy Y.H., Kim H.C., Jeon K.J., Kim S.D., Yeon S.H., Park S.B., Kang H.S. Hanwoo cattle: origin, domestication, breeding strategies and genomic selection. *J. Anim. Sci. Technol.* 2014;56:2. DOI 10.1186/2055-0391-56-2.

- Lee T., Cho S., Seo K.S., Chang J., Kim H., Yoon D. Genetic variants and signatures of selective sweep of Hanwoo population (Korean native cattle). *BMB Rep.* 2013;46(7):346-351.
- Li M.H., Kantanen J. Genetic structure of Eurasian cattle (*Bos taurus*) based on microsatellites: clarification for their breed classification. *Anim. Genet.* 2010;41(2):150-158. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01980.x.
- Li M.H., Tapio I., Vilkki J., Ivanova Z., Kiselyova T., Marzanov N., Cinkulov M., Stojanovic S., Ammosov I., Popov R., Kantanen J. The genetic structure of cattle populations (*Bos taurus*) in northern Eurasia and the neighbouring Near Eastern regions: implications for breeding strategies and conservation. *Mol. Ecol.* 2007;16(18):3839-3853.
- Li Y., Tran Q., Shrestha R., Piao L., Park S., Park J., Park J. LETM1 is required for mitochondrial homeostasis and cellular viability (review). *Mol. Med. Rep.* 2019;19(5):3367-3375. DOI 10.3892/mmr.2019.10041.
- Librado P., Der Sarkissian C., Ermini L., Schubert M., Jónsson H., Albrechtsen A., Fumagalli M., Yang M.A., Gamba C., Seguin-Orlando A., Mortensen C.D., Petersen B., Hoover C.A., Lorente-Galdos B., Nedoluzhko A., Boulygina E., Tsygankova S., Neuditschko M., Jagannathan V., Thèves C., Alfarhan A.H., Alquraishi S.A., Al-Rasheid K.A., Sicheritz-Ponten T., Popov R., Grigoriev S., Alekseev A.N., Rubin E.M., McCue M., Rieder S., Leeb T., Tikhonov A., Crubézy E., Slatkin M., Marques-Bonet T., Nielsen R., Willerslev E., Kantanen J., Prokhorchouk E., Orlando L. Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(50):E6889-E6897. DOI 10.1073/pnas.1513696112.
- Liu G.E., Bickhart D.M. Copy number variation in the cattle genome. *Funct. Integr. Genomics.* 2012;12(4):609-624. DOI 10.1007/s10142-012-0289-9.
- Lu P., Brunson K., Yuan J., Li Z. Zooarchaeological and genetic evidence for the origins of domestic cattle in ancient China. *Asian Perspect.* 2017;56:92-120. DOI 10.1353/asi.2017.0003.
- Mannen H., Kohno M., Nagata Y., Tsuji S., Bradley D.G., Yeo J.S., Nyamsamba D., Zagdsuren Y., Yokohama M., Nomura K., Amano T. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004; 32(2):539-544.
- Mei C., Junjvlicke Z., Raza S.H.A., Wang H., Cheng G., Zhao C., Zhu W., Zan L. Copy number variation detection in Chinese indigenous cattle by whole genome sequencing. *Genomics.* Available online 2019. Publ. 2020;112(1):831-836. DOI 10.1016/j.ygeno.2019.05.023.
- Mei C., Wang H., Zhu W., Wang H., Cheng G., Qu K., Guang X., Li A., Zhao C., Yang W., Wang C., Xin Y., Zan L. Whole-genome sequencing of the endangered bovine species Gayal (*Bos frontalis*) provides new insights into its genetic features. *Sci. Rep.* 2016;6:19787. DOI 10.1038/srep19787.
- Motwani M., Pesiridis S., Fitzgerald K.A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2019; 20(11):657-674. DOI 10.1038/s41576-019-0151-1.
- Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review. *Scand. J. Immunol.* 2019;90(1):e12771. DOI 10.1111/sji.12771.
- Mustafa H., Khan W., Kuthu Z., Eui-Soo K., Ajmal A., Javed K., Pasha T., Ali A., Javed M.T., Sonstegard T.S. Genome-wide survey of selection signatures in Pakistani cattle breeds. *Pak. Vet. J.* 2018;38(2):214-218. DOI 10.29261/pakvetj/2018.051.
- Niture S., Moore J., Kumar D. TNFAIP8: inflammation, immunity and human diseases. *J. Cell Immunol.* 2019;1(2):29-34.
- Pautasso M. Ten simple rules for writing a literature review. *PLoS Comput. Biol.* 2013;9(7):e1003149. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003149.
- Peilieu C. Livestock Breeds of China (FAO Animal Production and Health Paper 46). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1984. Available at <http://www.fao.org/3/x6549e/x6549e00.pdf>. Retrieved on April 10, 2020.
- Piao L., Li Y., Kim S.J., Byun H.S., Huang S.M., Hwang S.K., Yang K.J., Park K.A., Won M., Hong J., Hur G.M., Seok J.H., Shong M., Cho M.H., Brazil D.P., Hemmings B.A., Park J. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res.* 2009;69(8):3397-3404. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-3235.
- Pokharel K., Weldenegodguad M., Popov R., Honkatukia M., Huuki H., Lindeberg H., Peippo J., Reilas T., Zarovnyaev S., Kantanen J. Whole blood transcriptome analysis reveals footprints of cattle adaptation to sub-arctic conditions. *Anim. Genet.* 2019;50(3):217-227. DOI 10.1111/age.12783.
- Porter V., Alderson L., Hall S.J.G., Sponenberg D.P. (Eds.) *Mason's World Encyclopedia of Livestock Breeds and Breeding.* Wallingford, UK: CABI Publ., 2016.
- Porto-Neto L.R., Lee S.H., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Lee H.K., Gibson J.P., Gondro C. Genome-wide detection of signatures of selection in Korean Hanwoo cattle. *Anim. Genet.* 2014;45(2):180-190. DOI 10.1111/age.12119.
- Putri M., Syamsunarno M.R., Iso T., Yamaguchi A., Hanaoka H., Sunaga H., Koitabashi N., Matsui H., Yamazaki C., Kameo S., Tsushima Y., Yokoyama T., Koyama H., Abumrad N.A., Kurabayashi M. CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;457(4):520-525. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.12.124.
- Qiu Q., Zhang G., Ma T., Qian W., Wang J., Ye Z., Cao C., Hu Q., Kim J., Larkin D.M., Auvil L., Capitanu B., Ma J., Lewin H.A., Qian X., Lang Y., Zhou R., Wang L., Wang K., Xia J., Liao S., Pan S., Lu X., Hou H., Wang Y., Zang X., Yin Y., Ma H., Zhang J., Wang Z., Zhang Y., Zhang D., Yonezawa T., Hasegawa M., Zhong Y., Liu W., Zhang Y., Huang Z., Zhang S., Long R., Yang H., Wang J., Lenstra J.A., Cooper D.N., Wu Y., Wang J., Shi P., Wang J., Liu J. The yak genome and adaptation to life at high altitude. *Nat. Genet.* 2012; 44(8):946-949. DOI 10.1038/ng.2343.
- Quarta S., Mitrić M., Kalpachidou T., Mair N., Schiefermeier-Mach N., Andratsch M., Qi Y., Langeslag M., Malsch P., Rose-John S., Kress M. Impaired mechanical, heat, and cold nociception in a murine model of genetic TACE/ADAM17 knockdown. *FASEB J.* 2019; 33(3):4418-4431. DOI 10.1096/fj.201801901R.
- Randhawa I.A., Khatkar M.S., Thomson P.C., Raadsma H.W. A meta-analysis of selection signatures in cattle. *PLoS One.* 2016;11(4): e0153013. DOI 10.1371/journal.pone.0153013.
- Reynés B., Klein Hazebroek M., Garcia-Ruiz E., Keijer J., Oliver P., Palou A. Specific features of the hypothalamic leptin signaling response to cold exposure are reflected in peripheral blood mononuclear cells in rats and ferrets. *Front. Physiol.* 2017;8:581. DOI 10.3389/fphys.2017.00581.
- Sambarey A., Devaprasad A., Baloni P., Mishra M., Mohan A., Tyagi P., Singh A., Akshata J.S., Sultana R., Buggi S., Chandra N. Meta-analysis of host response networks identifies a common core in tuberculosis. *NPJ Syst. Biol. Appl.* 2017;3:4. DOI 10.1038/s41540-017-0005-4.
- Seelige R., Saddawi-Konefka R., Adams N.M., Picarda G., Sun J.C., Benedict C.A., Bui J.D. Interleukin-17D and Nrf2 mediate initial innate immune cell recruitment and restrict MCMV infection. *Sci. Rep.* 2018;8(1):13670. DOI 10.1038/s41598-018-32011-2.
- Sermiyagin A.A., Dotsev A.V., Gladyr E.A., Trasnov A.A., Denisova T.E., Kostyunina O.V., Reyher H., Wimmers K., Barbato M., Paronyan I.A., Plemiyashov K.V., Sölkner J., Popov R.G., Brem G., Zinovieva N.A. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2018;50(1):37. DOI 10.1186/s12711-018-0408-8.
- Shen J., Hanif Q., Cao Y., Yu Y., Lei C., Zhang G., Zhao Y. Whole genome scan and selection signatures for climate adaptation in Yanbian cattle. *Front. Genet.* 2020;11:94. DOI 10.3389/fgene.2020.00094.
- Shi Q., Mu X., Hong L., Zheng S. *SERPINE1* rs1799768 polymorphism contributes to sepsis risk and mortality. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2015;16(4):1218-1224. DOI 10.1177/1470320315614714.

- Simonsen M., Mailund T., Pedersen C.N. Inference of large phylogenies using neighbour-joining. In: International Joint Conference on Bio-medical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2010), Valencia, Spain, 20–23 January 2010. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010;334-344.
- Stranden I., Kantanen J., Russo I.M., Orozco-terWengel P., Bruford M.W., Climgen Consortium. Genomic selection strategies for breeding adaptation and production in dairy cattle under climate change. *Heredity (Edinb.)*. 2019;123(3):307-317. DOI 10.1038/s41437-019-0207-1.
- Sun W., Chen H., Lei C., Lei X., Zhang Y. Genetic variation in eight Chinese cattle breeds based on the analysis of microsatellite markers. *Genet. Sel. Evol.* 2008;40(6):6816-6892. DOI 10.1051/gse:2008027.
- Svishcheva G., Babayan O., Lkhasaranov B., Tsendsuren A., Abdurasulov A., Stolpovsky Y. Microsatellite diversity and phylogenetic relationships among East Eurasian *Bos taurus* breeds with an emphasis on rare and ancient local cattle. *Animals (Basel)*. 2020;10(9):1493. DOI 10.3390/ani10091493.
- Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2011;87(8):463-485. DOI 10.2183/pjab.87.463.
- Tapio I., Tapio M., Li M.H., Popov R., Ivanova Z., Kantanen J. Estimation of relatedness among non-pedigreed Yakutian cryo-bank bulls using molecular data: implications for conservation and breed management. *Genet. Sel. Evol.* 2010;42:28. DOI 10.1186/1297-9686-42-28.
- Tom Tang Y., Emtage P., Funk W.D., Hu T., Arterburn M., Park E.E., Rupp F. Tafa: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics*. 2004;83(4):727-734. DOI 10.1016/j.ygeno.2003.10.006.
- Tsuda K., Kawahara-Miki R., Sano S., Imai M., Noguchi T., Inayoshi Y., Kono T. Abundant sequence divergence in the native Japanese cattle Mishima-Ushi (*Bos taurus*) detected using whole-genome sequencing. *Genomics*. 2013;102(4):372-378. DOI 10.1016/j.ygeno.2013.08.002.
- Tsukamoto H., Takeuchi S., Kubota K., Kobayashi Y., Kozakai S., Ukai I., Shichiku A., Okubo M., Numasaki M., Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Nochi T., Watanabe K., Aso H., Tomioka Y. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKKε-IRF3 axis activation. *J. Biol. Chem.* 2018;293(26):10186-10201. DOI 10.1074/jbc.M117.796631.
- Wang M.S., Li Y., Peng M.S., Zhong L., Wang Z.J., Li Q.Y., Tu X.L., Dong Y., Zhu C.L., Wang L., Yang M.M., Wu S.F., Miao Y.W., Liu J.P., Irwin D.M., Wang W., Wu D.D., Zhang Y.P. Genomic analyses reveal potential independent adaptation to high altitude in Tibetan chickens. *Mol. Biol. Evol.* 2015;32(7):1880-1889. DOI 10.1093/molbev/msv071.
- Wang Z., Ma H., Xu L., Zhu B., Liu Y., Bordbar F., Chen Y., Zhang L., Gao X., Gao H., Zhang S., Xu L., Li J. Genome-wide scan identifies selection signatures in Chinese Wagyu cattle using a high-density SNP array. *Animals (Basel)*. 2019;9(6):pii:E296. DOI 10.3390/ani9060296.
- Weldenogdguad M., Popov R., Pokharel K., Ammosov I., Ming Y., Ivanova Z., Kantanen J. Whole-genome sequencing of three native cattle breeds originating from the northernmost cattle farming regions. *Front. Genet.* 2019;9:728. DOI 10.3389/fgene.2018.00728.
- Wu D.D., Ding X.D., Wang S., Wójcik J.M., Zhang Y., Tokarska M., Li Y., Wang M.S., Faruque O., Nielsen R., Zhang Q., Zhang Y.P. Pervasive introgression facilitated domestication and adaptation in the *Bos species complex*. *Nat. Ecol. Evol.* 2018;2(7):1139-1145. DOI 10.1038/s41559-018-0562-y.
- Wu S., De Croos J.N., Storey K.B. Cold acclimation-induced up-regulation of the ribosomal protein L7 gene in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Gene*. 2008;424(1-2):48-55. DOI 10.1016/j.gene.2008.07.023.
- Xia X., Qu K., Zhang G., Jia Y., Ma Z., Zhao X., Huang Y., Chen H., Huang B., Lei C. Comprehensive analysis of the mitochondrial DNA diversity in Chinese cattle. *Anim. Genet.* 2019;50(1):70-73. DOI 10.1111/age.12749.
- Xu Y., Jiang Y., Shi T., Cai H., Lan X., Zhao X., Plath M., Chen H. Whole-genome sequencing reveals mutational landscape underlying phenotypic differences between two widespread Chinese cattle breeds. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183921. DOI 10.1371/journal.pone.0183921.
- Yamamoto H., Fara A.F., Dasgupta P., Kemper C. CD46: the 'multi-tasker' of complement proteins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2013;45(12):2808-2820. DOI 10.1016/j.biocel.2013.09.016.
- Yeh T.Y., Beiswenger K.K., Li P., Bolin K.E., Lee R.M., Tsao T.S., Murphy A.N., Hevener A.L., Chi N.W. Hypermetabolism, hyperphagia, and reduced adiposity in tankyrase-deficient mice. *Diabetes*. 2009;58(11):2476-2485. DOI 10.2337/db08-1781.
- Yurchenko A.A., Daetwyler H.D., Yudin N., Schnabel R.D., Vander Jagt C.J., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Taylor J.F., Larkin D.M. Scans for signatures of selection in Russian cattle breed genomes reveal new candidate genes for environmental adaptation and acclimation. *Sci. Rep.* 2018a;8(1):12984. DOI 10.1038/s41598-018-31304-w.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyshev K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity (Edinb.)*. 2018b;120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.
- Zhang H., Pajmans J.L., Chang F., Wu X., Chen G., Lei C., Yang X., Wei Z., Bradley D.G., Orlando L., O'Connor T., Hofreiter M. Morphological and genetic evidence for early Holocene cattle management in northeastern China. *Nat. Commun.* 2013;4:2755. DOI 10.1038/ncomms3755.
- Zhang T., Chen H., Qi L., Zhang J., Wu R., Zhang Y., Sun Y. Transcript profiling identifies early response genes against FMDV infection in PK-15 cells. *Viruses*. 2018;10(7):364. DOI 10.3390/v10070364.
- Zhang W., Gao X., Zhang Y., Zhao Y., Zhang J., Jia Y., Zhu B., Xu L., Zhang L., Gao H., Li J., Chen Y. Genome-wide assessment of genetic diversity and population structure insights into admixture and introgression in Chinese indigenous cattle. *BMC Genet.* 2018;19:114. DOI 10.1186/s12863-018-0705-9.
- Zhang X., Wang K., Wang L., Yang Y., Ni Z., Xie X., Shao X., Han J., Wan D., Qiu Q. Genome-wide patterns of copy number variation in the Chinese yak genome. *BMC Genom.* 2016;17:379. DOI 10.1186/s12864-016-2702-6.
- Zhang Y., Hu Y., Wang X., Jiang Q., Zhao H., Wang J., Ju Z., Yang L., Gao Y., Wei X., Bai J., Zhou Y., Huang J. Population structure, and selection signatures underlying high-altitude adaptation inferred from genome-wide copy number variations in Chinese indigenous cattle. *Front. Genet.* 2020;10:1404. DOI 10.3389/fgene.2019.01404.
- Zhao Y.X., Yang J., Lv F.H., Hu X.J., Xie X.L., Zhang M., Li W.R., Liu M.J., Wang Y.T., Li J.Q., Liu Y.G., Ren Y.L., Wang F., Hehua E., Kantanen J., Arjen Lenstra J., Han J.L., Li M.H. Genomic reconstruction of the history of native sheep reveals the peopling patterns of nomads and the expansion of early pastoralism in East Asia. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34(9):2380-2395. DOI 10.1093/molbev/msx181.

#### ORCID ID

N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554  
D.M. Larkin orcid.org/0000-0001-7859-6201

**Благодарности.** Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-76-20026).

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


Поступила в редакцию 20.09.2020. После доработки 18.11.2020. Принята к публикации 20.11.2020.



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК

Н.В. Вдовина, И.Б. Юрьева 


Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия  
 arhsel@mail.ru


**Аннотация.** Мезенская лошадь (мезенка) – аборигенная порода России. Была выведена методом народной селекции в северных районах Архангельской области. Порода прекрасно приспособлена к условиям Крайнего Севера и обладает рядом ценных хозяйственно-биологических качеств. В настоящее время имеет ограниченный генофонд и разводится в чистоте только в Мезенском районе, где функционируют одна генофондно-племенная ферма и ряд базовых хозяйств, в которых осуществляется селекционно-племенная работа с породой. В связи с малочисленностью популяции мезенских лошадей проблема сохранения ее внутривидового разнообразия очень актуальна. Для определения уровня генетической изменчивости в породе проведен мониторинг ее аллелофонда. Сравнительный анализ генетической структуры породы выполнен по микросателлитам ДНК с периодичностью в 10 лет (2000, 2010 и 2020 гг.). В специализированных лабораториях были исследованы образцы волос 198 лошадей. Установлено, что порода обладает широким генетическим разнообразием по 17 локусам ядерной ДНК. В исследуемые годы аллелофонд популяции включал 128, 139 и 133 аллеля соответственно (при среднем значении 7.53, 8.18 и 7.82 аллеля на локус). Наиболее распространенными в породе являются аллели *AHT4O*, *AHT5N*, *ASB2K*, *ASB23S*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS1M*, *HMS2H*, *HMS3M*, *HMS7L*, *HTG4M*, *HTG6O*, *HTG7K*, *HTG7O*, *LEX3M*. С малой частотой (0.004–0.056) у мезенок было обнаружено 6 редких аллелей, которые не выявлены в популяциях лошадей отечественной селекции. Среднее значение уровня полиморфности (*Ae*) в породе по годам составляет 4.16, 4.21 и 4.06 соответственно. Наивысший его показатель приходится на локус *ASB17* (6.49–6.90–6.76), наименьший – на локусы *HTG6* (1.71–1.66–1.67) и *HMS7* (1.77–1.95–1.77). Незначительный дефицит гетерозиготных генотипов (*Fis* = 0.003) отмечен у мезенских лошадей в 2010 г. В 2000 и 2020 гг. наблюдаемая гетерозиготность (*Ho*) превышает величину ожидаемой (*He*), что указывает на отсутствие внутривидового инбридинга (*Fis* = –0.014 и –0.011 соответственно). Полученные результаты свидетельствуют об эффективности проводимых селекционных мероприятий по сохранению, совершенствованию и поддержанию генетического разнообразия в популяции.

Ключевые слова: мезенская порода лошадей; мониторинг; генетическое разнообразие; микросателлиты ДНК; аллелофонд; генотип.

**Для цитирования:** Вдовина Н.В., Юрьева И.Б. Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):202-207. DOI 10.18699/VJ21.024

## Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites

N.V. Vdovina, I.B. Yuryeva 

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia  
 arhsel@mail.ru

**Abstract.** Mezenskaya horse (Mezenka) is Russia's aboriginal breed. It is a domestic selection in the northern territories of Arkhangelsk region. The breed is perfectly adapted to the conditions of the Far North, and has a number of valuable economic and biological qualities. At present, it has a limited gene pool and is bred only in the Mezenskiy district, where one gene pool-breeding farm is operating and so is a number of basic farms, where selection and breeding activities take place with the breed. Due to a small population of Mezen horses, the challenge of preserving its intra-breed diversity is very urgent. To determine the degree of genetic variability in the Mezen population, the alleles-fond was monitored. A comparative analysis of the genetic structure of the breed was done on DNA microsatellites at time-intervals of 10 years (2000, 2010 and 2020). Crista samples of 198 horses were studied in specialized laboratories. It was established that the breed has wide genetic diversity in 17 loci of nuclear DNA. The population's alleles-fond includes from 128, 139, and 133 alleles respectively (with an average value of 7.53, 8.18, and 7.82 alleles per locus). The most common alleles are *AHT4O*, *AHT5N*, *ASB2K*, *ASB23S*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS1M*, *HMS2H*, *HMS3M*, *HMS7L*, *HTG4M*, *HTG6O*, *HTG7K*, *HTG7O* and *LEX3M*. Mezen horses revealed 6 rare, low-frequency (0.004–0.056) alleles not found in the horse populations of domestic selection. The average value of the polymorphic level (*Ae*) in the breed over the years is 4.16, 4.21 and 4.06, respectively. The highest polymorphism is found in locus *ASB17* (6.49–6.90–6.76);



the lowest, in locus *HTG6* (1.71–1.66–1.67) and *HMS7* (1.77–1.95–1.77). A slight deficit of heterozygous genotypes ( $F_{is} = 0.003$ ) was observed in Mezen horses in 2010. In 2000 and 2020, the observed heterozygosity ( $H_o$ ) exceeds the expected value ( $H_e$ ), which indicates the absence of intra-population inbreeding ( $F_{is} = -0.014$  and  $-0.011$ , respectively). The results obtained testify to the effectiveness of breeding activities carried out to preserve, improve and maintain genetic diversity in the population.

Key words: Mezenskaya breed of horses; monitoring; genetic diversity; microsatellite DNA; allele; genotype.

**For citation:** Vdovina N.V., Yuryeva I.B. Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):202-207. DOI 10.18699/VJ21.024

## Введение

В последнее время сохранению биологического разнообразия уделяется значительное внимание, поскольку «созидательная» деятельность человека поставила под угрозу исчезновения многие виды животных. Существенному сокращению подверглись местные породы, несущие в своем геноме ценные приспособительные качества к условиям той местности, где они формировались. Основными причинами сокращения и исчезновения аборигенных пород и популяций являются их неконкурентоспособность с современными заводскими и мировыми породами по продуктивности, а также их малая численность (Fewson, 1979; Simon, Schulte-Coerne, 1979; Lehane Leigh, 1981; Минчев, Джурбинева, 1983; Avon Laurent, 1983). Обеднение генетических ресурсов ведет к резким изменениям генофонда, и в первую очередь к сужению генетической изменчивости (Динамика..., 2004; Моисеева и др., 2006; Генджиева, Сулимова, 2009; Столповский, Захаров-Гезекус, 2017).

Изучение генетических особенностей ряда местных пород лошадей Российской Федерации показало, что на современном этапе своего развития они обладают высоким уровнем генетического разнообразия и имеют характерные для пород аллелофонды. Так, в генотипе лошадей якутской породы для 17 микросателлитных локусов ДНК было идентифицировано 145 аллелей при среднем значении 8.53 аллеля на локус (Калинкова и др., 2015). Значительным аллельным набором (135) обладает популяция кыргызских лошадей (Исакова и др., 2018). У башкирских лошадей в 14 локусах STR (short tandem repeat) было выявлено 130 аллелей, или 9.29 аллеля на локус (Калинкова и др., 2016). Высокими показателями генетического разнообразия отличается популяция забайкальских лошадей: при 116 аллелях в 14 сателлитных локусах ДНК уровень полиморфности ( $A_e$ ) породы составляет 5.29, а показатель наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) – 0.786 (Калашников и др., 2017а). Характерная особенность аборигенных пород лошадей – наличие в их генотипе редких и уникальных аллелей, которые не встречаются в заводских породах. Уникальные аллели были идентифицированы в бурятской, хакасской (Калашников и др., 2010), забайкальской (Калашников и др., 2017а), алтайской, башкирской, якутской (Khrabrova, 2015), тувинской (Чысыма и др., 2017) породах лошадей.

Одной из локальных пород лошадей России является мезенская. Ее историческая родина и ареал распространения – Мезенский район, расположенный на северо-востоке Архангельской области. Порода была выведена методом народной селекции и за период своего истори-

ческого формирования прекрасно адаптировалась к суровым природным условиям Крайнего Севера. Мезенская лошадь (мезенка) неприхотлива к условиям кормления и содержания, устойчива к заболеваниям, имеет хорошие нагульные качества и способность сохранять упитанность в течение зимы, обладает универсальной работоспособностью и умением ходить по глубокому снегу и вязкой почве. В XVII–XIX вв. лошади мезенской породы были широко распространены по всей Архангельской губернии. Механизация сельского хозяйства и прекращение государственного планирования коневодства со второй половины XX в. повлекли за собой сокращение в России поголовья аборигенных пород лошадей, в том числе мезенской. К началу 90-х гг. XX столетия порода сохранилась лишь в Мезенском районе.

На современном этапе популяция мезенских лошадей имеет ограниченный генофонд, замкнута и малочисленна (187 кобыл на 01.01.2020). Согласно классификации пород по степени риска, представленной в отчете ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) в 2015 г., она входит в категорию «критический статус» (при показателе количества самок менее 200 голов) (FAO, 2015).

Работа по восстановлению и сохранению генетического разнообразия мезенской лошади ведется с 1993 г. С 1994 г. в районе действует генофондно-племенная ферма, основной целью которой стало сохранение внутривидового разнообразия популяции. Производящий и маточный состав конфермы укомплектован представителями породы из различных населенных пунктов Мезенского района, обладающих определенным генетическим спектром. Один из этапов селекционной работы с породой – это обмен племенным материалом между хозяйствами, выращивающими мезенку, и выявление новых генетических ресурсов породы. Оценка генетической ситуации в популяции, проведенная ранее по полиморфным белкам и группам крови, показала наличие широкого внутривидового разнообразия (Храброва и др., 2005; Юрьева и др., 2005). Однако за последние двадцать лет количество хозяйств и лошадей в Мезенском районе существенно сократилось, в связи с чем племенная работа с породой ведется с использованием небольшого поголовья производителей и маток. Все это, в свою очередь, увеличивает вероятность инбридинга и может привести к утрате отдельных генов и снижению генетической изменчивости в породе.

Цель работы заключалась в проведении мониторинга генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитным локусам ДНК и определении генетического разнообразия популяции.

## Материалы и методы

Материалом для исследований служили генетические сертификаты с результатами тестирования по 17 локусам микросателлитной ДНК лошадей мезенской породы. В обработку были взяты данные по животным, входящим в состав породы на начало 2000 г. ( $n = 62$ ), 2010 г. ( $n = 163$ ) и 2020 г. ( $n = 143$ ). Генотипирование ДНК биологического материала лошадей проводили в лаборатории генетики ФГБНУ «ВНИИ коневодства» и в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы ООО «Гордиз» в период с 2007 по 2019 г. ДНК выделяли из волосных луков с использованием реагентов Diatom™ DNA Prep и ExtraGene™ DNA Prep (ООО «Лаборатория Изоген», Москва) и COrDIS SPRINT (ООО «Гордиз», Москва).

Аmplification выделенных образцов ДНК осуществляли методом ПЦР с использованием мультиплексных наборов для генотипирования лошадей фирм Stock Marks и COrDIS Reindeer в термоциклере 2720 Thermal Cycler по 17 микросателлитным локусам: *VHL20*, *HTG4*, *AHT4*, *HMS7*, *HTG6*, *AHT5*, *HMS6*, *ASB23*, *ASB2*, *HTG10*, *HTG7*, *HMS3*, *HMS2*, *ASB17*, *LEX3*, *HMS1*, *CA425* (van de Goor et al., 2010). Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР выполняли методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems). Идентификацию результатов проводили с использованием профиля контрольной ДНК и данных международных сравнительных испытаний (Horse Comparison Tests) (van de Goor et al., 2010).

Генетико-популяционный анализ проводили на основе «Метода оценки генетического разнообразия и степени генетического сходства лошадей местных и заводских пород» (Храброва и др., 2011). Были рассчитаны следующие показатели: частоты встречаемости аллелей и генотипов, уровень полиморфности (*Ae*), уровень ожидаемой (*He*) и наблюдаемой (*Ho*) гетерозиготности, индекс фиксации (*Fis*).

Статистический анализ выполняли на ПК PENTIUM-MMX-166 с использованием программного комплекса Excel 7.0.

## Результаты и обсуждение

Анализ генетической структуры мезенской породы лошадей по 17 микросателлитным локусам ДНК в динамике показал, что она характеризуется широким аллельным разнообразием. В 2000 г. у мезенок было выявлено 128 аллелей. Лошади, вошедшие в исследование, были рождены в шести населенных пунктах Мезенского района и несли в своем генотипе определенный аллельный набор. Увеличение численности исследуемых животных более чем в два раза и расширение ареала их происхождения до 11 поселений позволило выявить в 2010 г. в генотипе мезенских лошадей 139 аллелей. Новые аллельные варианты были идентифицированы с частотой встречаемости от 0.003 до 0.031. В 2020 г. у исследованных животных было идентифицировано 133 аллеля. Снижение количества аллелей за последнее десятилетие произошло за счет «потери» таких редких ( $p < 0.05$ ) в популяции вариантов, как *AHT4L* и *AHT4N*, *ASB23Q* и *ASB23R*, *CA425O*, *HMS2Y*, *HMS3N* и *HTG6P*. В то же время в 2020 г. было обнаружено

**Таблица 1.** Аллели, идентифицированные у лошадей мезенской породы ( $n = 165$ )

Локус	Аллели
<i>AHT4</i>	H, I, J, K, L*, N*, O, P*
<i>AHT5</i>	H*, I*, J, K, L*, M*, N, O, Q*
<i>ASB2</i>	B*, I*, K, M, N, O, P*, Q, U**
<i>ASB17</i>	F, G*, H*, I*, K, L*, M*, N, O, P, Q*, R, S*, T*, X**, Y*
<i>ASB23</i>	G*, I, J, K, L, N**, M, Q*, R*, S, U
<i>CA425</i>	I*, J, K*, L, M, N, O*
<i>HMS1</i>	I, J, K*, L, M, N*
<i>HMS2</i>	H, I, J, K, L, M*, O, R*, Y**
<i>HMS3</i>	I, M, N*, O*, P, Q*, R
<i>HMS6</i>	K, L, M, N, O, P
<i>HMS7</i>	J*, L, M, N, O, Q*
<i>HTG4</i>	K, L, M, N, O, P*, Q*
<i>HTG6</i>	G*, I, J, O, P*
<i>HTG7</i>	K, M, N, O
<i>HTG10</i>	I, K, L*, M, N*, O, P*, Q*, R, S, T*
<i>VHL20</i>	I, J*, M, N, O, P*, Q*, R, S
<i>LEX3</i>	F*, H*, I*, K*, L, M, N, O, P, R**, S**

\* Редкие для породы аллели, частота встречаемости менее 0.05.

\*\* Уникальные аллели.

2 новых аллеля (*HTG6G* и *HTG10T*), которые отсутствовали у животных двух предыдущих исследований (табл. 1).

В разрезе локусов минимальное число аллелей отмечено в локусах *HTG6* и *HTG7* (по 4 аллеля во все анализируемые годы), максимальное – в локусе *ASB17* (13 аллелей в 2000 г. и по 16 аллелей в 2010 и 2020 гг). Среднее число выявленных аллелей на один локус по годам составило 7.53, 8.18 и 7.82 соответственно.

Наиболее распространенными в породе являются аллели *AHT4O*, *AHT5N*, *ASB2K*, *ASB23S*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS1M*, *HMS2H*, *HMS3M*, *HMS3R*, *HTG4M*, *HTG7K*, *HTG7O*, *LEX3M*, *VHL20N*. Частота их встречаемости находится в пределах от 0.258 до 0.569. Более 70 % в структуре своих локусов занимают аллели *HMS7L* и *HTG6O*. Частота редких в популяции аллелей варьирует от 0.003 до 0.048. В генотипе мезенских лошадей обнаружено 6 уникальных аллелей, которые не были выявлены ранее у других отечественных пород лошадей и встречаются с малой частотой (от 0.003 до 0.041) (van de Goor et al., 2010). Во все анализируемые годы в аллелофонде мезенок присутствуют уникальные аллели *ASB17X* и *LEX3S*. В 2000 и 2010 гг. был диагностирован аллель *HMS2Y*, а в 2010 и 2020 гг. – аллели *ASB2U*, *ASB23N* и *LEX3R*.

Сравнительный анализ генетической структуры мезенских лошадей по периодам исследования выявил достоверные ( $p < 0.001$ ) различия в частотах встречаемости отдельных аллельных вариантов. В ряде локусов происходило появление новых аллелей, в результате чего частоты аллелей либо увеличивались, либо сокращались. Так, аллели *AHT5J*, *ASB17K*, *CA425I*, *CA425M*, *HMS1L*,

**Таблица 2.** Генетико-популяционные характеристики мезенской породы лошадей по 17 локусам микросателлитов ДНК в разные годы

Показатель	2000 г.	2010 г.	2020 г.
Исследованное поголовье ( <i>n</i> )	62	163	143
Уровень полиморфности ( <i>Ae</i> )	4.16	4.21	4.06
Наблюдаемая гетерозиготность ( <i>Ho</i> )	0.734	0.729	0.728
Ожидаемая гетерозиготность ( <i>He</i> )	0.724	0.731	0.720
Индекс фиксации ( <i>Fis</i> )	-0.014	0.003	-0.011

*HMS6K*, *HTG10O*, идентифицированные в 2000 г. с частотой 0.121–0.213, в 2010 г. были распространены в популяции в 1.2 раза реже, а в 2020 г. – в 1.5–2.2 раза. И наоборот, аллели *AHT5K*, *ASB2M*, *ASB17R*, *ASB23I*, *CA425L*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS3M*, *HTG10I* во втором и третьем исследованиях встречаются соответственно в 1.1–1.2 и 1.3–1.5 раза чаще в сравнении с первым. За двадцатилетний период значительно возросла частота типичных аллелей *HTG7O* (с 38.0 до 49.0 %) и *HMS3M* (с 27.5 до 38.7 %), а частота аллелей *HTG7K* и *LEX3M* снизилась на 9.6 и 13.6 % соответственно.

Достоверная разница ( $p < 0.05$ ) между исследуемыми группами отмечается и по количеству аллельных вариантов. В 2000 г. в 17 микросателлитных локусах ДНК у мезенских лошадей было протестировано 278 вариантов, число которых изменяется от шести (*HTG6*) до тридцати (*ASB17*). К 2010 г. количество генотипов увеличилось до 387. Число генотипов, выявленных в 2020 г., составило 345. При этом у обследованного поголовья отсутствовало 44 варианта, присутствующих животным 2000 г., но в то же время встречалось 111 новых. Наибольшие изменения в сторону увеличения за последние 20 лет отмечены в локусах *HTG10* (с 20 до 29), *ASB17* (с 30 до 46) и *LEX3* (с 8 до 27).

Проведенный генетико-популяционный анализ показал, что за счет широкого генетического разнообразия в популяции мезенских лошадей на протяжении всего анализируемого периода работы с породой сохраняется высокий уровень полиморфности, который характеризует число эффективно действующих аллелей (табл. 2).

Максимальное число эффективных аллелей (*Ae*) наблюдается по годам в высокополиморфном локусе *ASB17* (6.49, 6.90 и 6.76), где из всех генотипов на гомозиготные приходится от 11.3 до 16.7 %. В локусах *HTG6* и *HMS7* преобладают аллели O (0.742–0.754) и L (0.697–0.738) соответственно, что отразилось на низком показателе их полиморфности (1.66–1.95). Поскольку в данных локусах с частотой более 50 % доминируют гомозиготные генотипы *HTG6OO* и *HMS7LL*, уровень наблюдаемой гетерозиготности (*Ho*) в них невысок и составляет от 37.4 до 47.5 % соответственно. В остальных локусах уровень полиморфности в 2000 г. варьирует от 2.53 (*LEX3*) до 5.43 (*HMS6*), в 2010 г. – от 2.96 (*HTG7*) до 5.29 (*HMS6*), в 2020 г. – от 2.74 (*HTG7*) до 5.49 (*HMS2*), а наблюдаемая гетерозиготность находится в пределах от 57.1 до 88.7 %.

В целом в 2000 г. в популяции преобладали гетерозиготные генотипы. Об этом свидетельствует значение наблюдаемой гетерозиготности (0.734), превышающее

показатель теоретически ожидаемой (0.724), а также отрицательное значение индекса фиксации ( $Fis = -0.014$ ). Данный показатель указывает на наличие генетического баланса в породе и отсутствие внутривидового инбридинга. Незначительный дефицит гетерозигот ( $Fis = 0.003$ ) был отмечен у мезенских лошадей в 2010 г. В этом исследовании в локусах *ASB23* и *HTG7* фактическая гетерозиготность соответствует теоретически ожидаемому значению, а в ряде локусов (*HTG4*, *HMS7*, *HTG6*, *AHT5*, *ASB2*, *HMS3*, *ASB17*) ожидаемая гетерозиготность превышает наблюдаемую. К 2020 г. генетический баланс в популяции восстановился. Это подтверждают отрицательные значения индекса фиксации в большинстве локусов и в среднем по породе ( $Fis = -0.011$ ). Преобладание гетерозиготных генотипов говорит об эффективности проводимых селекционных мероприятий по сохранению и поддержанию генетического разнообразия в породе.

Выполненный в динамике молекулярно-генетический анализ аллелофонда мезенской породы лошадей по локусам микросателлитов ДНК показал, что она, как и другие местные породы лошадей, характеризуется высоким уровнем аллельного разнообразия в большинстве исследованных локусов и обладает широкой генетической изменчивостью. Популяция имеет свой оригинальный генетический профиль, отличный от ряда других локальных пород (алтайская, башкирская, бурятская, вятская, забайкальская, печорская, тувинская, хакасская, якутская) (Храброва и др., 2009; Калашников и др., 2010; Храброва, 2016; Блохина и др., 2018; Юрьева и др., 2018). Так, в генетической структуре мезенских лошадей не выявлены аллели *AHT4L* и *AHT4P*, *ASB17Q*, *HMS7K*, *HTG6G*, которые встречаются в генотипе забайкальских (Калашников и др., 2017а), калмыцких (Калашников и др., 2017б), якутских (Калинкова и др., 2015) и башкирских (Калинкова и др., 2016) лошадей. Редкие для мезенок аллели *AHT5M*, *HTG7M* и *HTG10L* ( $p < 0.05$ ) являются характерными для перечисленных популяций. В то же время распространенный в мезенской породе аллель *CA425L* (частота 0.214) обозначен как редкий у якутских лошадей и не выявлен у башкирок. Аллели *ASB23Q* и *HTG10T*, которые с малой частотой присутствуют в мезенской популяции, наблюдаются лишь в генетической структуре башкирских лошадей, а аллель *ASB17Y* – в якутской породе. Аллели *AHT5H*, *ASB17X*, *HMS2Y*, *HMS6J*, *LEX3R* и *LEX3S* среди анализируемых пород были выявлены только у мезенок.

В настоящее время в сельхозпредприятиях Мезенского района имеются жеребцы и кобылы с редкими аллельными вариантами микросателлитной ДНК. Некоторые из



них несут в своем генотипе от двух до пяти редких аллелей. Тиражирование данных аллелей через их носителей и выявление новых генетических ресурсов в районе позволит не только сохранить, но и расширить генетическое разнообразие в малочисленной популяции мезенских лошадей.

## Заключение

Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей показал, что за период исследования в ее аллелофонде отмечаются некоторые изменения по числу аллелей и их комбинаций, а также по частоте их встречаемости. В то же время порода имеет высокий уровень вариабельности аллелей и определенный генетический профиль по микросателлитам ДНК, что является важным фактором при сохранении генофонда малочисленной популяции.

## Список литературы / References

- Блохина Н.В., Готлиб Л.П., Орехова Т.И., Царёва М.А. Генотипирование и контроль происхождения лошадей локальных пород. В: Материалы II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Аборигенное коневодство России: история, современность, перспективы», 22 июня 2018 г. Архангельск, 2018;43-47. [Blokhina N., Gotlib L., Orekhova T., Tsareva M. Genotyping and identity control for local breed horses. In: Proceedings of the 2nd All-Russia Research-to-Practice Conf. with international participation "Indigenous Horse Breeding in Russia: History, Present, Prospects", 22 June 2018. Arkhangelsk, 2018;43-47. (in Russian)]
- Генджиева О.Б., Сулимова Г.Е. Изучение генетического разнообразия калмыцкого скота с использованием ISSR-фингерпринтинга. *Зоотехния*. 2009;3:4-5. [Gendjjeva O.B., Sulimova G.E. Study of the genetic diversity of Kalmyk cattle by ISSR fingerprinting. *Zootekhniya = Zootechnics*. 2009;3:4-5. (in Russian)]
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. Под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004. [Altukhov Y.P. (Ed.). Dynamics of Gene Pools in Populations Exposed to Anthropogenic Effects. Moscow: Nauka Publ., 2004. (in Russian)]
- Исакова Ж.Т., Токтосунов Б.И., Кипень В.Н., Калинкова Л.В., Талайбекова Э.Т., Алташева Н.М., Абдурасулов А.Х. Генетический портрет кыргызской лошади. *Коневодство и конный спорт*. 2018;1:21-23. [Isakova Zh.T., Toktosunov B.I., Kipen V.N., Kalinkova L.V., Talaibekova E.T., Altasheva N.M., Abdurasulov A.Kh. Genetic portrait of Kyrgyz horse. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports*. 2018;1:21-23. (in Russian)]
- Калашников В.В., Калинкова Л.В., Зайцев А.М., Брэм Г. Генетическая структура забайкальской породы лошадей. *Коневодство и конный спорт*. 2017а;4:22-23. [Kalashnikov V.V., Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Brem G. Genetic structure of the Zabaikalskaya horse breed. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports*. 2017a;4:22-23. (in Russian)]
- Калашников В.В., Калинкова Л.В., Зайцев А.М., Брэм Г. Изучение аллелофонда калмыцких лошадей с использованием микросателлитов ДНК. *Коневодство и конный спорт*. 2017б;5:20-21. [Kalashnikov V.V., Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Brem G. Study of genetic variation in Kalmyk horses using DNA microsatellite markers. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports*. 2017b;5:20-21. (in Russian)]
- Калашников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Калинкова Л.В., Зайцева М.А. Изучение полиморфизма сателлитной ДНК лошадей заводских и местных пород. *Докл. РАСХН*. 2010;6:48-50. [Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M., Kalinkova L.V., Zaitseva M.A. Study of satellite DNA polymorphism in horses of stud farm and local breeds. *Doklady RASKhN = Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2010;6:48-50. (in Russian)]
- Калинкова Л.В., Гавриличева И.С., Зайцев А.М., Зайцева М.А., Осипов В.Г., Иванов Р.В. Генетическая характеристика якутской лошади. *Коневодство и конный спорт*. 2015;1:22-23. [Kalinkova L.V., Gavrilicheva I.S., Zaitsev A.M., Zaitseva M.A., Osipov V.G., Ivanov R.V. Genetic characterization of Yakut horse. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports*. 2015;1:22-23. (in Russian)]
- Калинкова Л.В., Зайцев А.М., Брэм Г., Калашников В.В. Генетический портрет башкирской лошади. *Коневодство и конный спорт*. 2016;6:5-7. [Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Brem G., Kalashnikov V.V. Genetic portrait of Bashkir horse. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports*. 2016;6:5-7. (in Russian)]
- Минчев М., Джурбинева М. Проблемы при съхраняване на аборигените популяции в овцевъдството. В: Науч. тр. ВИСШ. Ин-т зоотехн. и вет. мед. Зоотехн. фак. Стара Загора, 1983;28:407-414. [Minchev M., Dzurbineva M. Problems with the preservation of the aboriginal sheep. In: Learn. Tr. HIGHER. Institute of Zootechnics and Veterinary Medicine Zootechnical Department. Stara Zagora, 1983;28:407-414. (in Bulgarian)]
- Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А., Сулимова Г.Е., Каштанов С.Н. Генофонды сельскохозяйственных животных. Генетические ресурсы животноводства России. М.: Наука, 2006. [Moiseeva I.G., Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. Gene Pools of Farm Animals. Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)]
- Столповский Ю.А., Захаров-Гезехус И.А. Проблема сохранения генофондов domestцированных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(4):477-486. DOI 10.18699/VJ17.266. [Stolpovskiy Yu., Zakharov-Gezekhus I. The problem of conservation of gene pools of domesticated animals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(4):477-486. DOI 10.18699/VJ17.266. (in Russian)]
- Храброва Л.А. Сравнительная характеристика аллелофонда местных пород лошадей по ДНК-маркерам. В: Материалы I Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Аборигенные породы лошадей: их роль и место в коневодстве Российской Федерации», 22 июня 2016 г. Ижевск, 2016;171-177. [Khrabrova L.A. Comparative analysis of the allele pool of local horse breeds by DNA markers. In: Proceedings of the 1st All-Russia Research-to-Practice Conf. with international participation "Aboriginal Horses Breeds: Role in Horse Breeding in the Russian Federation". Izhevsk, 2016;171-177. (in Russian)]
- Храброва Л.А., Зайцев А.М., Зайцева М.А. Метод оценки генетического разнообразия и степени генотипического сходства лошадей заводских и местных пород. Дивово, 2011. [Khrabrova L., Zaitsev A., Zaitseva M. Method of Genetic Diversity and Genotypic Concordance Evaluation in Horses of Stud Farm and Local Breeds. Divovo, 2011. (in Russian)]
- Храброва Л.А., Зайцев А.М., Юрьева И.Б., Вдовина Н.В. Методические рекомендации по ведению генетического мониторинга местных пород лошадей. Дивово, 2005. [Khrabrova L., Zaitsev A., Yuryeva I., Vdovina N. Guidelines for Genetic Monitoring of Local Breeds of Horses. Divovo, 2005. (in Russian)]
- Храброва Л.А., Калинкова Л.В., Заборских Е.Ю., Юрьева И.Б., Бобкова Н.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика местных пород лошадей России. В: Актуальные проблемы зоотехнии: Сб. науч. тр. М., 2009;92-95. [Khrabrova L., Kalinkova L., Zaborskih E., Yuryeva I., Bobkova N. Molecular characterization of local horse breeds in Russia. In: Topical Issues in Zootechnics. Moscow, 2009;92-95. (in Russian)]

- Чысыма Р.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Макарова Е.Ю., Фёдоров Ю.Н., Луду Б.М. Оценка генетического разнообразия в популяциях тувинских лошадей по локусам систем крови и микросателлитным ДНК. *С.-х. биология*. 2017;52(4):679-685. DOI 10.15389/agrobiology.2017.4.679rus.  
[Chysyma R.V., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M., Makarova E.Yu., Fedorov Yu.N., Ludu B.M. Genetic diversity in Tyva horses derived from polymorphism of blood systems and microsatellite DNA. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017; 52(4):679-685. DOI 10.15389/agrobiology.2017.4.679eng.]
- Юрьева И.Б., Вдовина Н.В., Доможиров В.К. Иммуногенетический контроль в популяции мезенской лошади. *Зоотехния*. 2005;8:8-10.  
[Yuryeva I., Vdovina N., Domozhirov V. Immunogenetic control in the Mezen horse population. *Zootekhnika = Zootechnics*. 2005;8: 8-10. (in Russian)]
- Юрьева И.Б., Свищёва Г.Р., Вдовина Н.В., Храброва Л.А., Столповский Ю.А. Генетическое разнообразие мезенской породы лошадей (*Eguus ferus caballus*) по микросателлитной ДНК. *Генетика*. 2018;54(13):64-69. DOI 10.1134/S0016675818130210.  
[Yuryeva I.B., Svishcheva G.R., Vdovina N.V., Khrabrova L.A., Stolpovsky Yu.A. Genetic diversity of the Mezenskaya horse breed (*Eguus ferus caballus*) revealed by microsatellite DNA. *Genetika = Genetics*. 2018;54(13):64-69. DOI 10.1134/S0016675818130210. (in Russian)]
- Avon Laurent. La conservation des ressources genetiques bovines en France: les causes d'amoindrissement. *Ethnozootchnil*. 1983;32: 144-185.
- FAO. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. B.D. Scherf, D. Pilling (Eds.). FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments, Rome, 2015. Available at <http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library/fao/State%20of%20the%20Worlds%20Aquatic%20Genetic%20Resources.pdf>
- Fewson D. Stellungnahme zur Bildung von Genreserver in der Tierzucht. *Zuchtungskunde*. 1979;51(5):329-331.
- Khrabrova L. Characterization of Genetic Horse Breeding Resource in Russia. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ., 2015.
- Lehane Leigh. Conserving animal genetic resources. *Rural Res*. 1981; 111:14-18.
- Simon D.I., Schulte-Coerne H. Verlust genetischer Alternativer in der Tierzucht – notwendige Konsequenzen. *Zuchtungskunde*. 1979; 51(5):332-342.
- van de Goor L.H.P., Panneman H., van Haeringen W.A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Anim. Genetics*. 2010;41(2):122-127. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x.

---

#### ORCID ID

N.V. Vdovina [orcid.org/0000-0002-7070-6098](https://orcid.org/0000-0002-7070-6098)

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме АААА-А19-119030590059-0.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследований сотрудникам ФГБНУ «ВНИИ коневодства», заместителю директора ФГБНУ «Институт общей генетики им. Н.В. Вавилова» РАН д.б.н. Ю.А. Столповскому, ведущему специалисту ООО «Гордиз» О.В. Бабаян.

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

Поступила в редакцию 21.07.2020. После доработки 28.12.2020. Принята к публикации 28.12.2020.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Дифференциальная экспрессия 10 генов, ассоциированных с агрессивным поведением, в гипоталамусе двух поколений крыс, селекционируемых по реакции на человека

Н.В. Климова, И.В. Чадаева , С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
 ichadaeva@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Индивидуальные особенности поведения у особей одного вида обусловлены взаимодействием генотипа и социального опыта. Как у любого типа поведения, фенотипическое проявление паттернов агрессивного поведения зависит от согласованной экспрессии целых ансамблей генов. Однако идентификация этих генов и комбинаций их взаимного влияния на экспрессию остается сложной задачей. С целью выявления наиболее значимых для осуществления агрессивных реакций генов нами на модельных животных – серых крысах, селекционируемых по реакции на человека (линии ручных и агрессивных крыс), была проведена оценка уровня экспрессии выбранных на основе литературных данных десяти генов (*Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc*, *Syn1*), которые ассоциированы с агрессивным поведением. Экспрессию генов оценивали методом ПЦР в реальном времени в образцах гипоталамуса ручных и агрессивных серых крыс двух разных поколений (88-е и 90-е). В результате проведенного анализа экспрессии генов в гипоталамусе крыс, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение, было обнаружено, что четыре из десяти исследуемых генов достоверно различаются по уровню экспрессии между крысами агрессивной и ручной линий 88-го и 90-го поколений разведения. Кроме того, показано, что экспрессия генов *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* не изменяется между двумя поколениями крыс одной и той же линии, но достоверно различается между линиями: у крыс ручной линии обоих поколений эти гены экспрессируются достоверно ниже по сравнению с агрессивной. Гены *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* являются наиболее перспективными для дальнейших исследований поведенческих особенностей крыс, селекционируемых по реакции на человека. Данный результат подтверждает полигенную детерминацию фенотипического проявления агрессивных реакций на примере модельных животных. Ключевые слова: агрессивное и ручное поведение; дифференциальная экспрессия генов; гипоталамус; крысы.

**Для цитирования:** Климова Н.В., Чадаева И.В., Шихевич С.Г., Кожемякина Р.В. Дифференциальная экспрессия 10 генов, ассоциированных с агрессивным поведением, в гипоталамусе двух поколений крыс, селекционируемых по реакции на человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):208-215. DOI 10.18699/VJ21.50-0

## Differential expression of 10 genes in the hypothalamus of two generations of rats selected for a reaction to humans

N.V. Klimova, I.V. Chadaeva , S.G. Shichevich, R.V. Kozhemyakina

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
 ichadaeva@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Individual behavioral differences are due to an interaction of the genotype and the environment. Phenotypic manifestation of aggressive behavior depends on the coordinated expression of gene ensembles. Nonetheless, the identification of these genes and of combinations of their mutual influence on expression remains a difficult task. Using animal models of aggressive behavior (gray rats that were selected for a reaction to humans; tame and aggressive rat strains), we evaluated the expression of 10 genes potentially associated with aggressiveness according to the literature: *Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc*, and *Syn1*. To identify the genes most important for the manifestation of aggressiveness, we analyzed the expression of these genes in two generations of rats: 88th and 90th. Assessment of gene expression levels was carried out by real-time PCR in the hypothalamus of tame and aggressive rats. This analysis confirmed that 4 out of the 10 genes differ in expression levels between aggressive rats and tame rats in both generations. Specifically, it was shown that the expression of the *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2* genes does not differ between the two generations (88th vs 90th) within each strain, but significantly differs between the strains: in the tame rats of both generations, the expression levels of these genes are significantly lower as compared to those in the aggressive rats. Therefore, these genes hold promise for further studies on behavioral characteristics. Thus, we confirmed polygenic causes of phenotypic manifestation of aggressive reactions. Key words: aggressive behavior; tame behavior; gene expression; hypothalamus; rats.

**For citation:** Klimova N.V., Chadaeva I.V., Shichevich S.G., Kozhemyakina R.V. Differential expression of 10 genes in the hypothalamus of two generations of rats selected for a reaction to humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):208-215. DOI 10.18699/VJ21.50-0



## Введение

Индивидуальные особенности поведения у особей одного вида обусловлены взаимодействием генотипа и социального опыта (Lindenfors, Tullberg, 2011; Anholt, Mackay, 2012; Кудрявцева и др., 2014; Маркель, 2016). При этом идентификация генов, ассоциированных с конкретным типом поведения, и комбинаций их взаимного влияния друг на друга является сложной задачей. Изучение агрессивного поведения и его генетической детерминации (т. е. регуляция агрессивных реакций) требует проведения экспериментов на модельных животных, контрастных по какому-либо из параметров агрессивности, с тем чтобы можно было адекватно оценить фенотипические проявления агрессивности в заданных и контролируемых исследователями условиях (VanOortmerssen, Bakker, 1981; Кудрявцева и др., 2014). Экспериментальные работы на модельных животных позволяют выявить гены-ортологи, ассоциированные с агрессивным поведением у разных видов, что необходимо для дальнейшего выявления эволюционных закономерностей в детерминации агрессивности генетическими факторами у животных.

Известно, что уровень агрессивности наследуется. Генетический контроль фенотипической вариации уровня агрессивности в популяциях животных был подтвержден экспериментально (VanOortmerssen, Bakker, 1981; Hudziak et al., 2003; Fairbanks et al., 2004; Saetre et al., 2006). Большая часть исследований посвящена изучению какого-либо одного конкретного гена, ассоциированного с агрессивным поведением. Например, работы по изучению дифференциальной экспрессии генов эстрогенового рецептора (Cushing, 2016), серотонинового рецептора (Науменко и др., 2009; Cervantes, Delville, 2009), дофаминавого рецептора (Golden et al., 2019), генов *Maoa* (Chu et al., 2017), *Bdnf* (Ilchibaeva et al., 2015), *Nos1* (Wultsch et al., 2007) и других уже хорошо известных генов, связанных с агрессивностью.

Однако множество обзорных работ по генетике агрессивного поведения можно резюмировать утверждением о полигенной детерминации агрессивного поведения животных, т. е. фенотипическое проявление агрессивных реакций особи контролируется одновременной экспрессией многих генов, целых ансамблей генов (Craig, Halton, 2009; Anholt, Mackay, 2012; Pavlov et al., 2012; Кудрявцева и др., 2014; Маркель, 2016; Hoopfer, 2016).

У крыс ручной и агрессивной линий были проведены исследования экспрессии групп генов в полушариях самцов и самок (Albert et al., 2012), что несколько затрудняет корректную интерпретацию результатов, поскольку известен эффект полового цикла на всю жизнедеятельность женского организма. В другой работе дифференциально экспрессирующиеся гены были выявлены у гибридных животных второго поколения, полученных в результате скрещивания ручных и агрессивных крыс (Heune et al., 2014). Безусловно, роль полушарий головного мозга в осуществлении высшей нервной деятельности ведущая. Однако поведение, в том числе агрессивное, контролируется в первую очередь гипоталамусом: известно, что электрическая стимуляция некоторых участков гипоталамуса приводит к проявлению агрессивного поведения (Kruk, 1991; Hrabovszky et al., 2005; Lin et al., 2011).

В нашей работе мы проанализировали уровни экспрессии 10 генов в гипоталамусе, которые, по данным литературы, ассоциированы с агрессивным поведением, на модельном объекте, проследив при этом стабильность экспрессии у двух поколений исследуемых животных. В качестве модельного объекта были использованы самцы двух аутбредных линий серых крыс, в одной из которых проводили селекцию на отсутствие (ручное поведение), а в другой – на усиление агрессивной реакции по отношению к человеку (агрессивное поведение) (Беляев, Бородин, 1985; Плюснина и др., 2007). В ответ на предъявление стимула – рука экспериментатора в толстой перчатке (тест «на перчатку» – glove test) – крысы ручной линии реагируют спокойно, подходят и обнюхивают, не совершая никаких агрессивных действий, а крысы агрессивной линии, напротив, реагируют очень бурно, сразу же нападая на раздражитель. Результаты исследований крыс ручной и агрессивной линий 60–70-х поколений разведения показали различия некоторых поведенческих реакций в тестах «открытое поле», водный тест Морриса, «крестообразный лабиринт», а также различия морфометрических показателей черепа и окраса шерсти (Плюснина и др., 2007; Кожемякина и др., 2016; Кожемякина, 2017).

Были проанализированы уровни экспрессии следующих 10 генов.

- 1, 2. Гены *Cacna1b* (calcium voltage-gated channel subunit alpha1B) и *Cacna2d3* (calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta3) кодируют субъединицы в составе высокопороговых кальциевых каналов, высвобождающих нейромедиаторы. Кальциевые каналы играют критическую роль в проявлении агрессивного поведения посредством синаптической передачи нейромедиаторов, ГАМК и серотонина (Kim C. et al., 2009).
3. *Drd2* (dopamine receptor D2) – ген дофаминавого рецептора D2, участвующего в процессах мотивации и обучения; изменения уровня экспрессии гена *Drd2* приводят к различного рода патологиям, в числе которых повышенная агрессивность (Miczek et al., 2002; Kim V. et al., 2015).
4. Ген *Egr1* (early growth response 1) кодирует белок, активирующий транскрипцию генов, участвующих в процессах деления и дифференцировки клеток. *Egr1* является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию нескольких генов, которые связаны с долговременной памятью (Knapska, Kaczmarek, 2004). Известно, что экспрессия *Egr1* увеличивается в ответ на стрессовые воздействия (Knapska, Kaczmarek, 2004; Hodges et al., 2014), и, кроме того, самцы мышей, нокаутные по этому гену, не демонстрируют агрессивного поведения в присутствии чужака (Topilko et al., 1998).
5. Ген *Gad2* (glutamate decarboxylase 2) кодирует глутаматдекарбоксилазу, которая катализирует преобразование глутамата в ГАМК (нейромедиатор, ингибирующий нервные импульсы), и таким образом ген *Gad2* вовлечен в контроль эмоционального состояния экспериментальных животных, регулируя социальное, в том числе агрессивное, поведение (Stork et al., 2000). В частности, показано, что нокаутные мыши по гену *Gad2* имеют сниженные показатели по агрессивному поведению.

6. Ген *Gria2* (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2) кодирует субъединицу глутаматного рецептора – важнейшего участника в процессах возбуждения центральной нервной системы (ЦНС). При блокировании этого рецептора у наивных мышей снижается агрессивность по сравнению с однопометниками, у которых глутаматные рецепторы нормально функционируют (Vekovischeva et al., 2004).
7. Ген *Mapk1* (mitogen-activated protein kinase 1) кодирует митоген-активируемую протеинкиназу, которая играет сложную роль в клеточных процессах (контроль транскрипции генов, метаболизм, пролиферация и др.) в нейронах ЦНС. Мыши, условно нокаутные по данному гену, демонстрировали повышенную агрессивность (Sato et al., 2011).
8. Ген *Nos1* (nitric oxide synthase 1) кодирует фермент (нейрональная синтаза оксида азота), который катализирует образование оксида азота и является важным участником нейротрансмиссии. Была выявлена роль гена *Nos1* в агрессивном поведении посредством взаимодействия синтазы оксида азота с переносчиком серотонина, что вызывает снижение поглощения серотонина (Nelson et al., 1995; Reif et al., 2009; Veroude et al., 2016) и приводит к снижению агрессивности (Kulikov et al., 2012).
9. *Pomc* (proopiomelanocortin) – это ген прогормона, проопиомеланокортина, который является предшественником адренокортикотропного гормона. Было показано, что меланокортин связан с агрессивным поведением (Værgøu et al., 2018). В частности, у агрессивных лисиц уровень экспрессии гена *Pomc* снижен по сравнению с ручными (Gulevich et al., 2004).
10. Ген *Syn1* (synapsin I) кодирует фосфопротеин, регулирующий на поверхности синаптических пузырьков процесс выброса нейромедиаторов в синапсах. В исследовании на крысах и мышах показано снижение уровня экспрессии гена *Syn1* при хроническом стрессе и ранней изоляции (Elizalde et al., 2010; Park et al., 2014), что обычно сопровождается изменением поведения в целом и агрессивности в частности.

## Материалы и методы

**Экспериментальные животные.** Количество экспериментальных животных было определено и эксперименты на животных были проведены в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами (Директива 2010/63/EU) и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, утвержденным Минздравом России (Приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 г.).

Работа выполнена на половозрелых самцах 88-го и 90-го поколения разведения двух аутбредных линий (ручная и агрессивная). В эксперимент было взято по три животных каждой линии 88-го поколения и по шесть животных – 90-го поколения. Чтобы исключить влияние фотопериода на физиологию и поведение экспериментальных животных, в работе были использованы крысы, рожденные в одно и то же время года. Согласно критерию отбора (реакция на человека в тесте «на перчатку») (Беляев, Бородин, 1985; Плюснина и др., 2007)), у селекцио-

нируемых агрессивных крыс агрессивно-оборонительная реакция соответствовала –3.5 балла. Для ручных крыс оценка поведения в тесте на перчатку соответствовала +3.5 балла, что является показателем высокой степени прирученности.

**Выделение суммарной РНК и ПЦР в реальном времени.** Образцы гипоталамуса были препарированы постмортально, собраны в жидком азоте и сохранены при температуре –70 °С до использования. Суммарную РНК из образцов головного мозга крыс выделяли с помощью TRIzol™ Reagent (Invitrogen, США). Количество выделенной РНК определяли с использованием флуориметра Invitrogen Qubit™ 2.0 (Invitrogen/Life Technologies, США). Очистку РНК выполняли с помощью парамагнитных частиц Agencourt RNAClean XP Kit (Beckman Coulter, США). Для удаления примесей геномной ДНК полученную суммарную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Качество суммарной РНК определяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Санта-Клара, США).

кДНК синтезирована с использованием набора реагентов фирмы «Синтол» (Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) подобраны с помощью PrimerBLAST (см. таблицу). ПЦР-РВ проведена для каждого образца в двух технических повторах на сенсорной системе CFX-96 (Bio-Rad, США) с набором EVA Green I («Синтол»), по инструкциям производителя. Эффективность амплификации для каждого праймера составляет 90–110 %. В качестве референсного использовали ген домашнего хозяйства *Rpl30*.

**Статистическая обработка результатов ПЦР-РВ.** Статистический анализ выполнен с использованием *t*-теста (критерий Стьюдента), а также факторного анализа (Multivariate Exploratory Techniques: Factor Analysis, Varimax, максимизация дисперсии) пакета StatSoft™ Toolsam USA Statistica 6.0. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия между группами животных считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## Результаты

В результате экспериментальной верификации методом ПЦР-РВ в гипоталамусе крыс 88-го поколения были выявлены гены, дифференциально экспрессирующиеся у животных агрессивной и ручной линий. Так, у агрессивных крыс по сравнению с ручными достоверно выше уровни экспрессии генов *Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1* и *Syn1* (*t*-тест,  $p < 0.05$ ) (рис. 1). Экспрессия генов *Nos1* и *Pomc* ручных и агрессивных крыс 88-го поколения селекции по реакции на человека достоверно не различается.

Уровни экспрессии генов *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* в гипоталамусе агрессивных крыс 90-го поколения были достоверно выше, чем у ручных того же поколения ( $p < 0.05$ ) (см. рис. 1). Достоверных различий в экспрессии генов *Cacna2d3*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc* и *Syn1* у этих же животных не установлено.

При анализе уровней мРНК в образцах гипоталамуса одних и тех же генов крыс 88-го и 90-го поколений обна-

Последовательности праймеров для ПЦР-РВ (5'→3')

Название гена	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Cacna1b</i>	CCCTGGTGGCATTTCGATTC	AGTTTAGGCAGCCGCTTGAT
<i>Cacna2d3</i>	TAAGCTGCGACGATGAGACTG	TGACAGCTCCTTCGACCTCA
<i>Drd2</i>	CTGGAAGCCTCGAGCAGC	TCTGCCTTCCAGATCGTCA
<i>Egr1</i>	AACAACCCTACGAGCACCTG	AAAGGGGTTCAGGCCACAAA
<i>Gad2</i>	GCTCATCGCATTACGTCAG	GGCACTACCAGGAAAGGAA
<i>Gria2</i>	GGACTACCGCAGAAGGAGTAG	AGGCCTTGTTTCATTGTTTAGT
<i>Mapk1</i>	CAGGTTGTTCCCAAACGCTG	GAGCCCTTGCTCGACCAAT
<i>Nos1</i>	ACCCGACCTCAGAGACAAC	AAGCTTCTCCTGTCGCGAA
<i>Pomc</i>	CATCATCAAGAACGCGCACAA	TAACTCTAAGAGGCTGGAGGTCA
<i>Syn1</i>	TGCCAATGGTGGATTCTCCG	CAGCCCAATGACCAAACCTGC
<i>Rpl30</i>	ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC	CAAAGCTGGACAGTTGTTGG

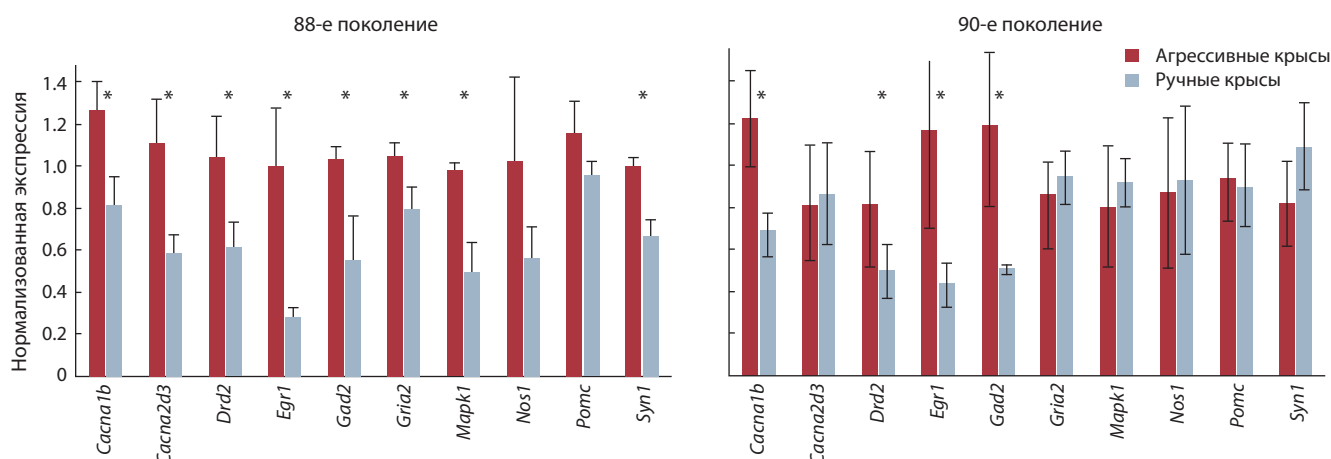
ружено, что экспрессия генов *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* у крыс ручной линии достоверно ниже по сравнению с агрессивной, независимо от поколения. Таким образом, эти гены перспективны для дальнейших исследований как определяющие поведенческий фенотип крыс в рамках проводимой селекции по реакции на человека.

Кроме того, по результатам факторного анализа объединенных данных по экспрессии генов у животных 88-го и 90-го поколений были выявлены только два достоверных фактора (рис. 2). Первый фактор достоверно коррелирует ( $p < 0.05$ ,  $t$ -тест Стьюдента) с экспрессией четырех генов (*Cacna1b*, коэффициент линейной корреляции  $r = 0.94$ ; *Drd2*,  $r = 0.77$ ; *Egr1*,  $r = 0.92$ ; *Gad2*,  $r = 0.85$ ) и объясняет ту долю изменчивости (32 %) экспериментальных данных, которая соответствует различию между агрессивными и ручными крысами. Второй фактор достоверно коррелирует с экспрессией трех других генов (*Cacna2d3*,  $r = 0.91$ ; *Gria2*,  $r = 0.92$ ; *Mapk1*,  $r = 0.93$ ) и указывает на внутригрупповую изменчивость (31 %), общую для агрессивных и ручных животных. Третий фактор объясняет 12 % изменчивости, но достоверной корреляции с экспрессией каких-либо анализируемых генов не обнаружено (данные не показаны).

**Обсуждение**

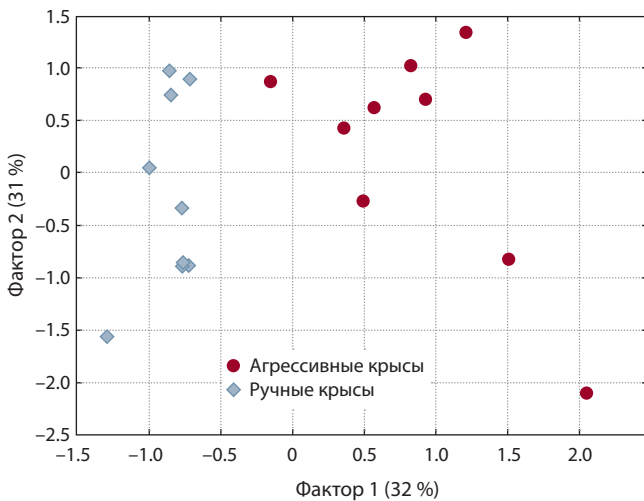
В результате анализа полученных нами с помощью ПЦР-РВ данных были выявлены четыре дифференциально экспрессирующихся гена (*Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*) из 10 исследованных генов у ручных и агрессивных крыс двух поколений (88-е и 90-е поколение крыс, селекционируемых по реакции на человека). Уровень мРНК этих генов не различается у крыс разных поколений в пределах каждой из линий.

Ген *Cacna1b* кодирует белок Cav2.2, который является субъединицей высокопороговых кальциевых каналов, контролирующей высвобождение нейромедиаторов из нейронов. Данная субъединица регулирует прохождение ионов кальция, определяя тем самым свойства канала. Ген *Cacna1b* экспрессируется на низком уровне в мозге (Castiglioni et al., 2006), но кодируемая им субъединица кальциевого канала играет важную роль в ответной реакции организма при авersive стимуляции (Bunda et al., 2019). Кальциевые каналы способствуют высвобождению медиаторов в возбуждающих синапсах, что приводит к подавлению исследовательского поведения, с одной стороны, и тревожного поведения, вызванного новизной (Bunda et al., 2019), с другой. Однако, как показано



**Рис. 1.** Уровень мРНК исследуемых генов в гипоталамусе ручных и агрессивных крыс 88-го и 90-го поколений разведения. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего; \*  $p < 0.05$  – значимость межлинейных различий.





**Рис. 2.** Достоверные факторы генетической изменчивости экспрессии исследуемых генов у агрессивных и ручных крыс, выявленные методом Varimax при стандартных параметрах пакета Statistica 6.0.

на 74-м поколении селекционируемых по реакции на человека крыс, исследовательское поведение ручных и агрессивных крыс в тесте «открытое поле» практически не различается (Кожемякина и др., 2016). Соответственно, повышенный уровень экспрессии гена *Cacnalb* у агрессивных крыс по сравнению с ручными, вероятно, связан с различиями тревожного поведения в условиях новизны, что подтверждается в работе (Кожемякина и др., 2016). В частности, у крыс, селекционируемых на повышенную агрессивность, достоверно выше суммарная за 5 минут поведенческого теста двигательная активность, которая отражает уровень тревожности животного.

Полученный нами результат вступает в некоторое противоречие с работой, проведенной на нокаутных мышах, где было показано, что при отсутствии субъединиц кальциевого канала уровень агрессивности экспериментальных животных значительно повышался (Kim C. et al., 2009). Данное противоречие можно объяснить тем, что функционирование кальциевых каналов не напрямую связано с агрессивными реакциями животного, а опосредованно – через высвобождение нейромедиаторов, что, в зависимости от действия нейромедиатора, и определяет поведенческие реакции животного. Например, серотонин, который, как показано в многочисленных исследованиях, влияет на агрессивность (Raleigh et al., 1991; Olivier, 2010); при этом данные о корреляции между уровнем серотонина и агрессией противоречивы (de Boer, Kooolhaas, 2005). Хроническое и устойчивое высвобождение серотонина положительно связано как с нормальной агрессией (территориальные конфликты или установление социальной иерархии) (Raleigh et al., 1991; Audero et al., 2013), так и с патофизиологической агрессией, характерной для психиатрических пациентов (Zamponi, 2016). Таким образом, наша работа дополняет мировые данные о связи экспрессии гена *Cacnalb*, кодирующего субъединицу кальциевого канала, с агрессивным поведением.

Экспрессия гена *Drd2* (дофаминовый рецептор D2) ассоциирована с агрессивным поведением, что было пока-

зано в исследованиях на крысах (VanErp, Miczek, 2000) и на людях (Qadeer et al., 2017). Поскольку дофамин (эндогенный лиганд-агонист рецептора D2), как и серотонин, участвует в регуляции агрессивного поведения, то изменение экспрессии гена *Drd2* приводит к различного рода патологиям, например к повышенной агрессивности (VanErp, Miczek, 2000; Miczek et al., 2002; Kim V. et al., 2015; Golden et al., 2019). В то же время агрессивное взаимодействие стимулирует дофаминергическую и серотонинергическую активности в лимбических областях мозга (Summers, Winberg, 2006). Иными словами, активация нейронов гипоталамуса, приводящая к высвобождению дофамина, может, в свою очередь, способствовать возбуждению тех нейронов гипоталамуса, которые управляют атакой (Yamaguchi, Lin, 2018). В рамках нашей работы эти данные литературы указывают на то, что повышенный уровень экспрессии гена *Drd2* у крыс агрессивной линии обоих поколений может быть действительно связан с фенотипическим проявлением агрессивных реакций на человека.

Третий дифференциально экспрессирующийся ген у крыс с наследственно закрепленной реакцией на человека, *Egr1*, кодирует белок – фактор транскрипции, участвующий в активации транскрипции генов, необходимых для митогенеза и дифференцировки клеток. Известно, что транскрипционный фактор *Egr1* регулирует экспрессию генов, контролирующих синаптическую пластичность, процессы обучения и памяти, что делает его важным объектом исследований, направленных на понимание согласованности нейронных ответов на различные стимулы (Knapaska, Kaczmarek, 2004). Показано, что после стрессового воздействия уровень экспрессии гена *Egr1* у крыс повышается в неокортикальных областях, в том числе в гипоталамусе (Watanabe et al., 1994; Cullinan et al., 1995).

Обнаруженный нами повышенный уровень экспрессии гена *Egr1* у агрессивных крыс по сравнению с ручными, по-видимому, можно объяснить той реакцией на раздражитель (в тесте «на перчатку» это рука человека), по которой проводили искусственный отбор и которая по сути своей является реакцией на стрессовое воздействие. Вероятно, у крыс агрессивной линии восприятие стимула на молекулярном уровне затрагивает механизмы генетического ответа на стресс, в отличие от крыс ручной линии, которые, как описано выше, совершенно спокойно реагируют не только на руку человека в тестовых условиях, но и вне теста на человека в целом. Дифференциальная экспрессия гена *Egr1* между животными с наследственно закрепленным агрессивным/неагрессивным поведением по отношению к человеку представляется, на наш взгляд, весьма интересным результатом, который может быть использован для дальнейших исследований.

*Gad2* – еще один ген, для которого нами была показана дифференциальная экспрессия у ручных и агрессивных крыс обоих поколений. Этот ген кодирует глутаматдекарбоксилазу (GAD), которая катализирует преобразование глутамата в ГАМК – нейромедиатор, ингибирующий нервные импульсы. Известно, что ГАМК контролирует агрессивное поведение (Takahashi, Miczek, 2014; Hansen et al., 2018). В более ранних исследованиях на мышах у агрессивных животных выявлен более низкий, по сравне-

нию с неагрессивными, уровень ГАМК из-за пониженной активности GAD в нескольких областях мозга (обонятельная луковица, стриатум и миндалина) (Simler et al., 1982; Clement et al., 1987; Guillot, Charouthier, 1998). Однако эти данные не подтвердились в работе на нокаутных по гену *Gad2* мышцах, у которых было пониженное содержание ГАМК в мозге в период постнатального развития, но у таких мутантных самцов наблюдалась пониженная агрессивность в тесте «резидент–интродер» (Stork et al., 2000). Результат воздействия ГАМК зависит от задействованной области мозга, типа рецепторов, а также от конкретного контекста ситуации, вызывающей агрессивное поведение (Takahashi, Miczek, 2014). В нашей работе повышенный уровень экспрессии гена *Gad2* у агрессивных крыс по сравнению с ручными, вероятнее всего, относится к ситуации, когда увеличение синтеза ГАМК в нейронах гипоталамуса обуславливает агрессивную реакцию животных в тесте «на перчатку», в соответствии с которым и вели искусственный отбор.

Кроме того, необходимо отметить, что результаты проведенного факторного анализа при объединении данных по экспрессии генов у животных 88-го и 90-го поколений позволяют заключить, что хотя искусственный отбор вели по двум векторам (от дикого типа на агрессивное поведение и от дикого типа на ручное поведение), экспрессия 10 исследованных генов связана с двумя факторами – различиями между ручными и агрессивными крысами (т.е. фактор «доместикация», поскольку отбор на ручное поведение представляет собой модель доместикации) и неким общим изменением, одинаковым для рассмотренных двух групп животных (возможно, так называемый эффект лабораторизации, нейтральный дрейф или нечто иное). При этом фактор доместикации объединяет животных обоих поколений, но четко разделяет их по поведенческому фенотипу – ручное и агрессивное поведение (см. рис. 2). Этот результат позволяет сделать вывод о том, что, действительно, повышенная экспрессия генов *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* определяет агрессивное поведение у селекционируемых крыс, в то время как пониженная – ручное.

Таким образом, гены *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, для которых нами показана дифференциальная экспрессия у обоих поколений (88-е и 90-е) крыс, селекционируемых по реакции на человека, являются перспективными для дальнейших исследований аспектов доместикации и агрессивного поведения животных. Проявление агрессивной и неагрессивной реакции по отношению к человеку у крыс 88-го и 90-го поколений искусственного отбора по данному признаку контролируют не один, а несколько генов. Причем белки этих генов различаются и по функциям, и по нейромедиаторным системам, с которыми они связаны.

## Заключение

В результате анализа экспрессии 10 генов в гипоталамусе крыс, селекционируемых по реакции на человека (ручное и агрессивное поведение), методом ПЦР-РВ показано, что четыре гена дифференциально экспрессируются у ручных и агрессивных крыс 88-го и 90-го поколений разведения. Получено подтверждение полигенной детерминации фенотипического проявления агрессивных реакций на при-

мере модельных животных. Выявлены гены, наиболее перспективные для дальнейших исследований поведенческих особенностей крыс, селекционируемых по реакции на человека.

## Список литературы / References

- Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции. В: Эволюционная генетика. Л., 1985;35-39.  
[Belyaev D.K., Borodin P.M. The influence of stress on variation and its role in evolution. In: Evolutionary Genetics. Leningrad, 1985;35-39. (in Russian)]
- Кожемякина Р.В. Приручение серой крысы. *Природа*. 2017;6:70-78.  
[Kozhemyakina R.V. Taming of grey rat. *Priroda = Nature*. 2017;6:70-78. (in Russian)]
- Кожемякина Р.В., Коношенко М.Ю., Сахаров Д.Г., Смагин Д.А., Маркель А.Л. Сравнительный анализ поведения в тесте открытого поля диких серых крыс (*Rattus norvegicus*) и серых крыс, прошедших длительный отбор на толерантное и агрессивное поведение. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*. 2016;66:92-102. DOI 10.7868/S0044467716010093.  
[Kozhemyakina R.V., Konoshenko M.Y., Sakharov D.G., Smagin D.A., Markel A.L. Comparative analysis of behavior in the open/field test in wild grey rats (*Rattus norvegicus*) and in grey rats subjected to prolonged selection for tame and aggressive behavior. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2016;66:92-102. DOI 10.7868/S0044467716010093. (in Russian)]
- Кудрявцева Н.Н., Маркель А.Л., Орлов Ю.Л. Агрессивное поведение: генетико-физиологические механизмы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/3):1133-1155.  
[Kudryavtseva N.N., Markel A.L., Orlov Yu.L. Aggressive behavior: genetic and physiological mechanisms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/3):1133-1155. (in Russian)]
- Маркель А.Л. Биосоциальные основы агрессивности и агрессивного поведения. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*. 2016;66(6):1-12. DOI 10.7868/S0044467716060071.  
[Markel A.L. Biosocial base of aggressiveness and aggressive behavior. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2016;66(6):1-12. DOI 10.7868/S0044467716060071. (in Russian)]
- Науменко В.С., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З., Попова Н.К. Экспрессия гена серотонинового транспортера и реакция рефлекторного вздрагивания у крыс с генетически детерминированной агрессивней, вызванной страхом. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2009;147(1):86-89.  
[Naumenko V.S., Kozhemjakina R.V., Plyusnina I.Z., Popova N.K. Expression of serotonin transporter gene and startle response in rats with genetically determined fear-induced aggression. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;147(1):81-83. DOI 10.1007/s10517-009-0441-2.]
- Плюснина И.З., Щепина О.А., Оскина И.Н., Трут Л.Н. Некоторые особенности обучения в водном тесте Морриса у крыс, отобранных по реакции на человека. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*. 2007;57(3):344-351.  
[Plyusnina I.S., Schepina O.A., Oskina I.N., Trut L.N. Some features of learning in the Morris water test in rats selected for responses to humans. *Neurosci. Behav. Physiol*. 2008;38(5):511-516.]
- Albert F.W., Somel M., Carneiro M., Aximu-Petri A., Halbwax M., Thalmann O., Blanco-Aguar J.A., Plyusnina I.Z., Trut L., Villafuerte R., Ferrand N., Kaiser S., Jensen P., Pääbo S. A comparison of brain gene expression levels in domesticated and wild animals. *PLoS Genet*. 2012;8(9):e1002962. DOI 10.1371/journal.pgen.1002962.

- Anholt R.R.H., Mackay T.F.C. Genetics of aggression. *Annu. Rev. Genet.* 2012;46:145-164. DOI 10.1146/annurev-genet-110711-155514.
- Audero E., Mlinar B., Baccini G., Skachokova Z.K., Corradetti R., Gross C. Suppression of serotonin neuron firing increases aggression in mice. *J. Neurosci.* 2013;33(20):8678-8688. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2067-12.2013.
- Bunda A., LaCarubba B., Bertolino M., Akiki M., Bath K., Lopez-Soto J., Lipscombe D., Andrade A. *Cacna1b* alternative splicing impacts excitatory neurotransmission and is linked to behavioral responses to aversive stimuli. *Mol. Brain.* 2019;12(1):81. DOI 10.1186/s13041-019-0500-1.
- Castiglioni A.J., Raingo J., Lipscombe D. Alternative splicing in the C-terminus of CaV2.2 controls expression and gating of N-type calcium channels. *J. Physiol.* 2006;576(Pt.1):119-134. DOI 10.1113/jphysiol.2006.115030.
- Cervantes M., Delville Y. Serotonin 5-HT1A and 5-HT3 receptors in an impulsive-aggressive phenotype. *Behav. Neurosci.* 2009;123(3):589-598. DOI 10.1037/a0015333.
- Chu Q., Liang T., Fu L., Li H., Zhou B. Behavioural genetic differences between Chinese and European pigs. *J. Genet.* 2017;96(4):707-715. DOI 10.1007/s12041-017-0826-3.
- Clement J., Simler S., Ciesielski L., Mandel P., Cabib S., Puglisi-Allegra S. Age-dependent changes of brain GABA levels, turnover rates and shock-induced aggressive behavior in inbred strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1987;26(1):83-88. DOI 10.1016/0091-3057(87)90538-7.
- Craig I.W., Halton K.E. Genetics of human aggressive behavior. *Hum. Genet.* 2009;126:101-113. DOI 10.1007/s00439-009-0695-9.
- Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H., Watson S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience.* 1995;64:477-505. DOI 10.1016/0306-4522(94)00355-9.
- Cushing B.S. Estrogen receptor alpha distribution and expression in the social neural network of monogamous and polygynous *Peromyscus*. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150373. DOI 10.1371/journal.pone.0150373.
- de Boer S.F., Koolhaas J.M. 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Europ. J. Pharmacol.* 2005;526:125-139. DOI 10.1016/j.ejphar.2005.09.065.
- Elizalde N., Pastor P.M., Garcia-Garcia A.L., Serres F., Venzala E., Huarte J., Ramirez M.J., Del Rio J., Sharp T., Tordera R.M. Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: chronic mild stress and decreased expression of *VGLUT1*. *J. Neurochem.* 2010;114:1302-1314. DOI 10.1111/j.1471-4159.2010.06854.x.
- Fairbanks L.A., Newman T.K., Bailey J.N., Jorgensen M.J., Breidenthal S.E., Ophoff R.A., Comuzzie A.G., Martin L.J., Rogers J. Genetic contributions to social impulsivity and aggressiveness in vervet monkeys. *Biol. Psychiatry.* 2004;55:642-647. DOI 10.1016/j.biopsych.2003.12.005.
- Golden S.A., Jin M., Heins C., Venniro M., Michaelides M., Shaham Y. Nucleus accumbens *Drd1*-expressing neurons control aggression self-administration and aggression seeking in mice. *J. Neurosci.* 2019;39(13):2482-2496. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2409-18.2019.
- Guillot P.V., Chapouthier G. Intermale aggression, GAD activity in the olfactory bulbs and Y chromosome effect in seven inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 1998;90(2):203-206. DOI 10.1016/S0166-4328(97)00110-1.
- Gulevich R.G., Oskina I.N., Shikhevich S.G., Fedorova E.V., Trut L.N. Effect of selection for behavior on pituitary-adrenal axis and proopiomelanocortin gene expression in silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Physiol. Behav.* 2004;82(2-3):513-518. DOI 10.1016/j.physbeh.2004.04.062.
- Hansen C.C., Ljung H., Brodtkorb E., Reimers A. Mechanisms underlying aggressive behavior induced by antiepileptic drugs: focus on topiramate, levetiracetam, and perampanel. *Behav. Neurol.* 2018; 2018:2064027. DOI 10.1155/2018/2064027.
- Heyne H.O., Lautenschlager S., Nelson R., Besnier F., Rotival M., Cagan A., Kozhemyakina R., Plyusnina I.Z., Trut L., Carlborg Ö., Petretto E., Kruglyak L., Pääbo S., Schöneberg T., Albert F.W. Genetic influences on brain gene expression in rats selected for tameness and aggression. *Genetics.* 2014;198:1277-1290. DOI 10.1534/genetics.114.168948.
- Hodges T.E., Green M.R., Simone J.J., McCormick C.M. Effects of social context on endocrine function and *Zif268* expression in response to an acute stressor in adolescent and adult rats. *Int. J. Develop. Neurosci.* 2014;35(1):25-34. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2014.03.001.
- Hoopfer E.D. Neural control of aggression in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016;38:109-118. DOI 10.1016/j.conb.2016.04.007.
- Hrabovszky E., Halasz J., Meelis W., Kruk M.R., Liposits Z., Haller J. Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience.* 2005;133:657-666. DOI 10.1016/j.neuroscience.2005.03.042.
- Hudziak J.J., van Beijsterveldt C.E.M., Bartels M., Rietveld M.J.H., Rettew D.C., Derks E.M., Boomsma D.I. Individual differences in aggression: genetic analyses by age, gender, and informant in 3-, 7-, and 10-year-old Dutch twins. *Behav. Genet.* 2003;33:575-589. DOI 10.1023/a:1025782918793.
- Ilchibaeva T.V., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Popova N.K., Naumenko V.S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav. Brain Res.* 2015;1(290):45-50. DOI 10.1016/j.bbr.2015.04.041.
- Kim C., Jeon D., Kim Y.-H., Lee C.J., Kim H., Shin H.-S. Deletion of N-type Ca<sup>2+</sup> channel Ca<sub>v</sub>2.2 results in hyperaggressive behaviors in mice. *J. Biol. Chem.* 2009;284(5):2738-2745. DOI 10.1074/jbc.M807179200.
- Kim V., Zhang-James Y., Fernandez-Castillo N., Bakker M., Cormand B., Faraone S.V. Genetics of aggressive behavior: an overview. *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2015;171B:3-43. DOI 10.1002/ajmg.b.32364.
- Knapkian E., Kaczmarek L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: *Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK*? *Prog. Neurobiol.* 2004;74(4):183-211. DOI 10.1016/j.pneurobio.2004.05.007.
- Kruk M.R. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991;15:527-538. DOI 10.1016/S0149-7634(05)80144-7.
- Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Terenina E., Mormède P., Popova N.K. A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism. *Behav. Brain Res.* 2012;233(1):113-119. DOI 10.1016/j.bbr.2012.04.031.
- Lin D., Boyle M.P., Dollar P., Lee H., Lein E.S., Perona P., Anderson D.J. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature.* 2011;470:221-226. DOI 10.1038/nature09736.
- Lindenfors P., Tullberg B.S. Evolutionary aspects of aggression: the importance of sexual selection. *Adv. Genet.* 2011;75:7-22. DOI 10.1016/B978-0-12-380858-5.00009-5.
- Miczek K.A., Fish E.W., de Bold J.F., de Almeida R.M. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and  $\gamma$ -aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology.* 2002;163:434-458. DOI 10.1007/s00213-002-1139-6.
- Nelson R.J., Demas G.E., Huang P.L., Fishman M.C., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H. Behavioral abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature.* 1995;378(6555):383-386. DOI 10.1038/378383a0.
- Olivier B. Serotonin and aggression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010;1036:382-392. DOI 10.1196/annals.1330.022.



- Park H.J., Kim S.K., Kang W.S., Chung J.H., Kim J.W. Increased activation of synapsin I and mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase in the amygdala of maternal separation rats. *CNS Neurosci. Ther.* 2014;20(2):172-181. DOI 10.1111/cns.12202.
- Pavlov K.A., Chistiakov D.A., Chekhonin V.P. Genetic determinants of aggression and impulsivity in humans. *J. Appl. Genet.* 2012;53:61-82. DOI 10.1007/s13353-011-0069-6.
- Qadeer M.I., Amar A., Mann J.J., Hasnain S. Polymorphisms in dopaminergic system genes; association with criminal behavior and self-reported aggression in violent prison inmates from Pakistan. *PLoS One.* 2017;12(6):e0173571. DOI 10.1371/journal.pone.0173571.
- Raleigh M.J., McGuire M.T., Brammer G.L., Pollack D.B., Yuwiler A. Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Res.* 1991;559:181-190. DOI 10.1016/0006-8993(91)90001-C.
- Reif A., Jacob C.P., Rujescu D., Herterich S., Lang S., Gutknecht L., Baehne C.G., Strobel A., Freitag C.M., Giegling I., Romanos M., Hartmann A., Rosler M., Renner T.J., Fallgatter A.J., Retz W., Ehli A.C., Lesch K.P. Influence of functional variant of neuronal nitric oxide synthase on impulsive behaviors in humans. *Arch. Gen. Psych.* 2009;66(1):41-50. DOI 10.1001/archgenpsychiatry.2008.510.
- Saetre P., Strandberg E., Sundgren P.-E., Pettersson U., Jazin E., Bergström T.F. The genetic contribution to canine personality. *Genes Brain Behav.* 2006;5:240-248. DOI 10.1111/j.1601-183X.2005.00155.x.
- Satoh Y., Endo S., Nakata T., Kobayashi Y., Yamada K., Ikeda T., Takeuchi A., Hiramoto T., Watanabe Y., Kazama T. *ERK2* contributes to the control of social behaviors in mice. *J. Neurosci.* 2011;31(33):11953-11967. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2349-11.2011.
- Simler S., Puglisi-Allegra S., Mandel P.  $\gamma$ -Aminobutyric acid in brain areas of isolated aggressive or non-aggressive inbred strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1982;16:57-61. DOI 10.1016/0091-3057(82)90013-2.
- Stork O., Ji F.Y., Kaneko K., Stork S., Yoshinobu Y., Moriya T., Shibata S., Obata K. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking *GAD65*. *Brain Res.* 2000;865(1):45-58. DOI 10.1016/S0006-8993(00)02206-X.
- Summers C.H., Winberg S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *J. Experim. Biol.* 2006;209:4581-4589. DOI 10.1242/jeb.02565.
- Takahashi A., Miczek K.A. Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2014;17:3-44. DOI 10.1007/7854\_2013\_263.
- Topilko P., Schneider-Maunoury S., Levi G., Trembleau A., Gourdji D., Driancourt M.-A., Rao Ch.V., Charnay P. Multiple pituitary and ovarian defects in *Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)*-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* 1998;12(1):107-122. DOI 10.1210/mend.12.1.0049.
- VanErp A.M.M., Miczek K.A. Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *J. Neurosci.* 2000;20(24):9320-9325. DOI 10.1523/JNEUROSCI.20-24-09320.2000.
- VanOortmerssen G.A., Bakker T.C. Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behav. Genet.* 1981;11(2):115-126. DOI 10.1007/bf01065622.
- Værøy H., Adori C., Legrand R., Lucas N., Breton J., Cottard C., do Rego J.C., Duparc C., Louiset E., Lefebvre H., Déchelotte P., Western E., Andersson S., Hökfelt T., Fetissov S.O. Autoantibodies reactive to adrenocorticotrophic hormone can alter cortisol secretion in both aggressive and nonaggressive humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(28):E6576-E6584. DOI 10.1073/pnas.1720008115.
- Vekovischeva O.Y., Aitta-aho T., Echenko O., Kankaanpää A., Sepälä T., Honkanen A., Sprengel R., Korpi E.R. Reduced aggression in AMPA-type glutamate receptor GluR-A subunit-deficient mice. *Genes Brain Behav.* 2004;3:253-265. DOI 10.1111/j.1601-1848.2004.00075.x.
- Veroude K., Zhang-James Y., Fernandez-Castillo N., Bakker M.J., Command B., Faraone S.V. Genetics of aggressive behavior: an overview. *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2016;171B:3-43. DOI 10.1002/ajmg.b.32364.
- Watanabe Y., Stone E., McEwen B.C. Induction and habituation of c-Fos and *Zif/268* by acute and repeated stressors. *NeuroReport.* 1994;5:1321-1324. DOI 10.1097/00001756-199406270-00006.
- Wulsch T., Chourbaji S., Fritzen S., Kittel S., Grünblatt E., Gerlach M., Gutknecht L., Chizat F., Gollfer G., Schmitt A., Gass P., Lesch K.-P., Reif A. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. *J. Neural. Transm. Suppl.* 2007;72:69-85. DOI 10.1007/978-3-211-73574-9\_10.
- Yamaguchi T., Lin D. Functions of medial hypothalamic and mesolimbic dopamine circuitries in aggression. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2018;24:104-112. DOI 10.1016/j.cobeha.2018.06.011.
- Zamponi G. Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15:19-34. DOI 10.1038/nrd.2015.5.

#### ORCID ID

I.V. Chadaeva orcid.org/0000-0002-2724-5441

**Благодарности.** Работа проведена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00496 для ИВЧ, бюджетного проекта № 0324-2019-0042 для НВК, бюджетного проекта АААА-А17-117072710029-7 для СГШ и РВК.

Авторы выражают благодарность д.б.н. В.М. Ефимову за помощь в статистическом анализе данных.

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

Поступила в редакцию 25.03.2020. После доработки 31.10.2020. Принята к публикации 03.11.2020. Опубликовано онлайн 11.02.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Роль кортикотропин-рилизинг гормона и его рецепторов в регуляции нейрофизиологических и поведенческих реакций на стресс

Е.В. Сухарева

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
✉ evsukhareva@mail.ru

**Аннотация.** Стресс является неотъемлемой частью повседневной жизни. Нейропептид кортикотропин-рилизинг гормон (CRH, также называемый CRF и кортиколиберин) играет ключевую роль в интеграции нейроэндокринных, вегетативных и поведенческих реакций на стресс. Активация гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой системы нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN), основного места синтеза CRH, запускает стрессорную реакцию. Помимо гипоталамуса, CRH широко распространен во внегипоталамических структурах головного мозга, где он функционирует как нейромодулятор для координации и взаимодействия между гуморальными и поведенческими аспектами реакции на стресс. Аксоны нейронов, экспрессирующих CRH, направляются к различным структурам головного мозга, где нейропептид взаимодействует со специфическими рецепторами (CRHR1, CRHR2) и может оказывать влияние на различные медиаторные системы, которые действуют сообща для передачи сигналов в разные области мозга, чтобы вызвать множество реакций на стресс. При этом воздействие стресса на функции мозга варьирует от поведенческой адаптации до повышения выживаемости и увеличения риска развития психических расстройств. Нарушения в регуляции системы CRH непосредственно связаны со следующими расстройствами: психическими патологиями (депрессией, тревожностью, зависимостями), отклонениями нейроэндокринологических функций, воспалением, а также с возникновением и развитием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. Кроме того, установлена роль CRH как регулятора структуры нейронов в областях развивающегося и зрелого мозга. На данный момент проведены исследования, в которых CRHR1 выступает мишенью для антидепрессантов, в качестве которых используются антагонисты этого рецептора. В связи с этим исследование участия системы CRH и его рецепторов в негативных эффектах на гормон-зависимые системы, а также возможности их предотвращения является перспективной задачей современной физиологической генетики. В настоящем обзоре внимание уделено роли CRH в регуляции реакции на стресс, а также участию внегипоталамического CRH в патофизиологии и коррекции психических расстройств.

Ключевые слова: кортикотропин-рилизинг фактор; рецепторы кортикотропин-рилизинг фактора; стресс; психопатологии; гипоталамус; внегипоталамические структуры головного мозга.

**Для цитирования:** Сухарева Е.В. Роль кортикотропин-рилизинг гормона и его рецепторов в регуляции нейрофизиологических и поведенческих реакций на стресс. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2): 216-223. DOI 10.18699/VJ21.025

## The role of the corticotropin-releasing hormone and its receptors in the regulation of stress response

E.V. Sukhareva

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
✉ evsukhareva@mail.ru

**Abstract.** Stress is an essential part of everyday life. The neuropeptide corticotropin-releasing hormone (CRH, also called CRF and corticoliberin) plays a key role in the integration of neuroendocrine, autonomic and behavioral responses to stress. The activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis) by neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN), the primary site of synthesis CRH, triggers stress reactions. In addition to the hypothalamus, CRH is widespread in extrahypothalamic brain structures, where it functions as a neuromodulator for coordination and interaction between the humoral and behavioral aspects of a stress response. The axons of neurons expressing CRH are directed to various structures of the brain, where the neuropeptide interacts with specific receptors (CRHR1, CRHR2) and can affect various mediator systems that work together to transmit signals to different brain regions to cause many reactions to stress. Moreover, the effect of stress on brain functions varies from behavioral adaptation to increased survival and increased risk of developing mental disorders. Disturbances of the CRH system regulation are directly related to such disorders: mental pathologies (depression, anxiety, addictions), deviations of neuroendocrinological functions, inflammation, as well as the onset and development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. In addition, the role of CRH as a regulator of the neurons structure in the areas of the de-

veloping and mature brain has been established. To date, studies have been conducted in which CRHR1 is a target for antidepressants, which are, in fact, antagonists of this receptor. In this regard, the study of the participation of the CRH system and its receptors in negative effects on hormone-dependent systems, as well as the possibility of preventing them, is a promising task of modern physiological genetics. In this review, attention will be paid to the role of CRH in the regulation of response to stress, as well as to the involvement of extrahypothalamic CRH in pathophysiology and the correction of mental disorders.

Key words: corticotropin-releasing factor; corticotropin-releasing factor receptors; stress; psychopathology; hypothalamus; extrahypothalamic brain structures.

**For citation:** Sukhareva E.V. The role of the corticotropin-releasing hormone and its receptors in the regulation of stress response. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):216-223. DOI 10.18699/VJ21.025

## Система кортикотропин-рилизинг гормона

Семейство CRH-пептидов у млекопитающих включает CRH, урокортин 1 (UCN1), урокортин 2 (UCN2) и урокортин 3 (UCN3) (Hauger et al., 2006). Эти 38–41-аминокислотные пептиды являются структурно родственными и имеют высокую (26–54 %) идентичность последовательности (Dautzenberg, Hauger, 2002). Данные пептидные гормоны и их рецепторы повсеместно присутствуют в тканях млекопитающих, играя ключевую роль в опосредованных стрессом эффектах. Хотя CRH был первоначально описан в качестве регулятора гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), пептид широко экспрессируется в структурах головного мозга и в периферических тканях, включая сердце, кровеносные сосуды, кожу, легкие, селезенку, поджелудочную железу, почки, печень, жировую ткань, желудочно-кишечный тракт, семенники, яичники и плаценту (Hauger et al., 2006). Экспрессия урокортинов в головном мозге более ограничена, чем экспрессия CRH, и обнаруживается преимущественно в ядре Эдингера-Вестфала, а также в супраоптическом ядре, гипофизе, латеральной верхней olive, сердечно-сосудистой системе, скелетных мышцах, почках, жировой ткани, пищеварительном тракте и половых железах (Waters et al., 2015).

Ген *Crh* расположен на длинном плече хромосомы 8 (8q13), состоит из промоторной последовательности, одного интрона и двух экзонов. У человека, овцы, мыши и крысы промоторная последовательность гена *Crh* имеет 97 % гомологии на протяжении первых 270 п. н. Ген кодирует неактивный прогормон из 196 аминокислот (про-CRH) (King, Nicholson, 2007).

Кортиколиберин и урокортины действуют через два рецептора, CRHR1 и CRHR2, которые принадлежат к семейству рецепторов, сопряженных с  $G_s$ -белком. Эти рецепторы кодируются разными генами, но на уровне аминокислот обладают 70 % идентичностью, причем основная их дивергенция обнаружена в лиганд-связывающих доменах, ответственных за их селективность в отношении агонистов (Dautzenberg, Hauger, 2002). CRH является высокоаффинным лигандом для CRHR1 и плохо связывается с CRHR2, для которого более высокую аффинность имеют другие родственные CRH-пептиды, UCN2 и UCN3. UCN1 обладает одинаковым сродством к обоим CRHR (Hauger et al., 2006). Аминокислотные последовательности внутриклеточного и трансмембранного доменов CRHR обладают 80–85 % идентичностью. CRHR относятся к классу В рецепторов, сопряженных с G-белком (семейство секретиноподобных рецепторов) (Markovic, Grammatopoulos, 2009), которые связывают полипептидные гормоны. В качестве

общей особенности семейства, они демонстрируют ряд разнообразных вариантов сплайсинга, которые могут способствовать тканеспецифичным различиям во взаимодействии лиганда с рецептором. Было идентифицировано два варианта сплайсинга CRHR1 (CRHR1 $\alpha$  и CRHR1 $\beta$ ), но биологической активностью обладает только CRHR1 $\alpha$ , и его экспрессия преобладает (Zmijewski, Slominski, 2010). У людей CRHR2 существует в трех вариантах сплайсинга: CRHR2 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (у мышей обнаружены две изоформы). Они различаются по аминоконцевому домену и распределению в тканях. CRHR2 $\alpha$  – наиболее распространенный вариант сплайсинга в мозге; CRHR2 $\beta$  локализуется исключительно в периферических тканях, таких как сетчатка, половые железы, пищеварительный тракт, сердце, скелетные мышцы, легкие и кожа, тогда как CRHR2 $\gamma$  обнаруживается в перегородке, гиппокампе, миндалине, среднем мозге, лобной коре и лимбических областях мозга человека, однако его функция не определена (Hauger et al., 2006). С точки зрения уровня экспрессии и ее распределения, CRHR1 является основным рецептором CRH в головном мозге, в то время как представленность CRHR2 ограничена (Henckens et al., 2016).

Система CRH включает также белок, связывающий кортикотропин-рилизинг-гормон (CRH-BP), который экспрессируется в периферических тканях и мозге. Ранее считалось, что он связывает свободный CRH и подобные ему лиганды, что ослабляет активацию рецепторов, однако теперь его физиологическая роль кажется более сложной и продолжает изучаться. Например, в вентральной области покрышки (VTA) эффекты активации CRHR2 в значительной степени зависят от CRH-BP (Wang B. et al., 2007), и последние данные *in vitro* свидетельствуют о роли CRH-BP в локализации CRHR2 на клеточной мембране (Slater et al., 2016).

## Механизм действия кортикотропин-рилизинг гормона

Активированные CRHR1 и CRHR2 в первую очередь передают сигналы посредством связывания с  $G_s$ -белком, что запускает сАМФ/ПКА молекулярный каскад (Deussing, Chen, 2018). ПКА фосфорилирует различные субстратные белки, включая CREB, который регулирует экспрессию различных генов-мишеней в ядре. Параллельно с этим сАМФ активирует ЕРАС-фактор (обменные белки, активируемые сАМФ), который, в свою очередь, запускает каскад MAP-киназы, что в конечном итоге приводит к фосфорилированию ERK1/2 (Van Kolen et al., 2010). ERK1/2 активирует различные факторы транскрипции, в том числе



Nur77. Однако оба рецептора CRH могут активировать любую  $G_\alpha$ -субъединицу, хотя и с разной активностью:  $G_s \geq G_o > G_{q/11} > G_{i1/2} > G_z$  (Deussing, Chen, 2018), тем самым активируя каскад фосфолипазы C (PLC) и ERK1/2, что увеличивает внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  (Grammatopoulos, Chrousos, 2002). Связывание с  $G_s$ -белком также приводит к внутриклеточной мобилизации  $Ca^{2+}$  (Gutknecht et al., 2009). При этом связывание рецепторов с  $G_i$ -белком блокирует активность аденилатциклазы (Deussing, Chen, 2018). Таким образом, в зависимости от своей локализации и клеточного контекста рецепторы CRH могут оказывать многообразные эффекты (Deussing, Chen, 2018).

После активации CRHR киназы рецепторов, связанных с G-белками (GRK-киназы), а также протеинкиназы A или C (PKA и PKC) быстро фосфорилируют рецепторы, десенсибилизируют и увеличивают их сродство к  $\beta$ -аррестинам (Deussing, Chen, 2018). Эти процессы могут изменять пути передачи сигналов рецептора.  $\beta$ -аррестины действуют как адаптерные белки, которые связываются с клатрином и  $\beta$ -адаптином – белками, участвующими в рецепторном эндоцитозе, для иницирования интернализации CRHR1 и CRHR2 через покрытые клатрином везикулы (Markovic et al., 2008). Рецепторы затем либо дефосфорилируются, ресенсибилизируются и обратно встраиваются в плазматическую мембрану, либо (при длительном воздействии высоких концентраций агониста) деградируют в лизосомах, что приводит к уменьшению количества рецепторов (Kelly et al., 2008). Сильное воздействие стресса может влиять на эти процессы и способствовать деградации рецепторов CRH (Reyes et al., 2008). Важно отметить, что не все фосфорилированные рецепторы перемещаются в эндосомы (интернализуются); некоторые остаются на мембране (Deussing, Chen, 2018).

Связывание CRH с его рецепторами активирует высвобождение АКТГ из кортикотропных нейронов гипофиза (Herman, Tasker, 2016). АКТГ стимулирует синтез и высвобождение глюкокортикоидов из коры надпочечников – кортизола у приматов и кортикостерона у грызунов. Биологические эффекты глюкокортикоидов поддерживают адаптацию к вызванным стрессом потребностям за счет контроля энергетического обмена (Herman et al., 2003). Адаптивная функция ГГНС зависит от механизмов отрицательной обратной связи, которые приводят систему к базальным уровням (Quax et al., 2013). Стоит отметить, что в промоторе гена *Crh* нет классического глюкокортикоид-зависимого элемента (GRE), однако имеются данные, что глюкокортикоиды могут регулировать экспрессию гена *Crh* посредством белок-белковых взаимодействий (Nicholson et al., 2004; Калинина и др., 2016). В области –278/–249 промотора гена *CRH* человека локализован атипичный GRE/AP-1 элемент, где было обнаружено специфическое, высокоаффинное связывание глюкокортикоидного рецептора, которое обеспечивает дексаметазон-зависимое ингибирование транскрипции гена *CRH* за счет белок-белковых взаимодействий. Удаление этой области уменьшало глюкокортикоид-зависимую репрессию активности промотора гена *CRH* (Aguilera, Liu, 2012). Также была показана отрицательная регуляция глюкокортикоидами cAMP-стимулированной активности промото-

ра гена *CRH*, но не базальной активности, что позволяет предположить, что влияние глюкокортикоидов зависит от взаимодействия с CRE-ассоциированным транскрипционным комплексом.

### Экспрессия CRH и его рецепторов, участие в реакции на стресс

CRH играет важную роль в регуляции работы ГГНС, основной системы стрессорного ответа. CRH синтезируется в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN), которые получают иннервацию как от лимбических, так и от стволовых центров головного мозга, что позволяет им реагировать и на физические, и на психологические стрессоры (Lightman, 2008). В данном ядре описаны три основные группы нейронов:

- 1) передние и медиально-дорсальные парвоцеллюлярные нейроны CRH, аксоны которых направляются к портальным сосудам внешней зоны срединного возвышения. Нейроны в этой области классифицируются как парвоцеллюлярные из-за небольшого размера по сравнению с крупноразмерными нейронами. Помимо CRH, эти нейроны экспрессируют аргинин-вазопрессин (AVP), энкефалины, холецистокины и ангиотензин I;
- 2) дорсолатеральные магноклеточные вазопрессинергические и окситоцинергические нейроны, аксоны которых направляются в задний гипофиз через внутреннюю зону срединного возвышения. Эти нейроны высвобождают пептиды в периферическое кровообращение. Окситоцинергические нейроны, но не вазопрессинергические, тоже экспрессируют CRH и отвечают на осмотические и неосмотические стрессоры;
- 3) вегетативные нейроны CRH в дорсальном, медиально-вентральном и латеральном отделах PVN, с проекциями на ствол мозга и спинной мозг. Нейроны в этом месте экспрессируют CRH и другие нейропептиды и участвуют в регуляции симпатoadrenalовой системы (Aguilera, Liu, 2012).

В дополнение к PVN, мРНК и белок CRH обнаруживаются в других областях мозга, включая лимбические и другие структуры, связанные со стрессовыми реакциями, такие как ядро ложа конечной полоски (BNST), центральное ядро миндалина (CeA), голубое пятно ствола мозга (LC), кора головного мозга, гиппокамп, мозжечок, ядро Баррингтона (Bar), сегменты спинного мозга с проекциями от среднего мозга и моста (Kono et al., 2016). Однако функции секретирующих CRH нейронов значительно различаются в зависимости от области, в которой они находятся. Например, нейроны нижней оливы (IO), экспрессирующие CRH, посылают аксоны в мозжечок и играют важную роль в индукции синаптической пластичности дендритных синапсов клеток Пуркинье (Andres et al., 2013). Электростимуляция IO увеличивает содержание CRH в мозжечке, демонстрируя физиологическое действие эндогенного CRH в мозжечке (Tian, Bishop, 2003). Нейроны CRH в коре головного мозга являются интернейронами и могут модулировать активность пирамидных нейронов (Gallopini et al., 2006). В BNST нейроны CRH участвуют в восстановлении после стресса (Erb, Stewart, 1999) и влияния алкоголя (Pleil et al., 2015). В ран-

нем возрасте кратковременное повышение экспрессии CRH в переднем мозге вызывает у мышей длительные анксиогенные и похожие на отчаяние изменения в поведении (Kolber et al., 2010). CRH в CeA также может быть связан со стресс-индуцированной тревогой (Regev et al., 2012), а CRH в базолатеральном миндалевидном ядре может менять процесс консолидации памяти при стрессе (Rooszendaal et al., 2002). CRH нейроны в Bar посылают проекции в пояснично-крестцовый отдел спинного мозга и напрямую (Studený, Vizzard, 2005) или косвенно (Sasaki, Sato, 2013) контролируют мочеиспускательный рефлекс.

CRH присутствует и в других нервных структурах, таких как хромоаффинные клетки мозгового вещества надпочечников и симпатические ганглии вегетативной нервной системы, а также в ненейрональных периферических органах, таких как яичники, семенники, кишечник, сердце, легкие и селезенка (Stengel, Taché, 2010). Внутри селезенки мРНК *Crh* локализуется специфически в Т-лимфоцитах.

Глюкокортикоиды являются главным элементом регуляции экспрессии CRH в гипоталамусе по типу отрицательной обратной связи, которая опосредуется активацией гормонами глюкокортикоидных рецепторов (GR). GR широко экспрессируются в медиальной парвоцеллюлярной части PVN и локализуются совместно с CRH, что способствует быстрому ингибированию нейронов CRH за счет негеномной передачи сигнала. Такой механизм служит ключом к ограничению продолжительности секреции глюкокортикоидов после острого стресса, поскольку геномная обратная связь не будет достаточно быстрой для своевременного прекращения активации ГГНС (Herman, Tasker, 2016). Дексаметазон (синтетический глюкокортикоид) снижает уровень CRH, стимулированный цАМФ, более чем на 50 % в клетках AtT20 (линия клеток опухоли гипофиза мышей, продуцирующая проопиомеланокортин (ПОМС)) (Abou-Seif et al., 2012). Отрицательная обратная связь, оказываемая глюкокортикоидами, является критической характеристикой ГГНС, которая теряется при АКТГ-секретирующих аденомах (Perez-Castro et al., 2012) и у некоторых пациентов с депрессией (Reul, Holsboer, 2002), создавая избыток глюкокортикоидов. GR приводят как к ингибированию высвобождения АКТГ, так и к репрессии транскрипции *Pomc*. Удаление гена *Crh* блокирует базальное и вызванное стрессом высвобождение АКТГ, что указывает на обязательное участие CRH в активации ГГНС (Muglia et al., 2000). Хроническое влияние шума в качестве стрессора повышает уровень мРНК *Crh* в гипоталамусе, при этом снижает уровень мРНК *Gr* в гиппокампе. Как острое, так и хроническое влияние шума увеличивает уровень мРНК *Crhr1* в гипоталамусе, но снижает его в гиппокампе. Эти данные показывают, что участие CRH и GR в реакциях шумового стресса различно и зависит от структуры головного мозга (Eraslan et al., 2015).

Нарушения в парвоцеллюлярной области PVN уменьшают проявление тревоги в новой обстановке. Было показано, что оптогенетическое ингибирование экспрессии CRH в нейронах PVN уменьшает груминг, вызванный стрессом, и улучшает способность ориентироваться в пространстве и обучение после стресса, в то время как стимуляция индуцирует груминг и снижает исследова-

тельное поведение (Fuzesi et al., 2016). Эти данные подтверждают, что CRH нейроны PVN могут участвовать в координации поведенческих, а также нейроэндокринных реакций на стресс.

### Внегипоталамический CRH: организация и интеграция реакции на стресс

CRH управляет реакцией на стресс, воздействуя на нейроны LC, мозговое вещество надпочечников и периферическую симпатическую нервную систему. Он играет ключевую роль в координации периферических систем реакции на стресс и центрального выброса норадреналина в ответ на стрессорные воздействия. Считается, что влияние CRH на выделение норадреналина, в основном в LC, лежит в основе эмоциональных основ реакции на стресс (Valentino, Van Bockstaele, 2008).

Глюкокортикоиды, как упоминалось ранее, за счет отрицательной обратной связи ингибируют высвобождение CRH и АКТГ в гипоталамусе и гипофизе соответственно. Однако во внегипоталамических структурах мозга действие глюкокортикоидов скорее стимулирует, чем ингибирует синтез CRH (Kovacs, 2013). Такие патологии, как тревожность и аффективные расстройства, вызванные повышенным уровнем глюкокортикоидов и нарушениями в функционировании нейромедиаторных систем мозга, могут быть обусловлены повышенной экспрессией CRH в CeA и BNST (Donner et al., 2016). Например, введение дексаметазона в неонатальном периоде развития приводит к увеличению экспрессии гена *Crh* в стволе мозга в первые часы после инъекции и к полному восстановлению исходного уровня экспрессии к 6-му часу, тогда как экспрессия гена *Th* тирозингидроксилазы (ключевого фермента синтеза норадреналина) в этой же структуре мозга нарастала к 6-му часу после введения дексаметазона, и эффект сохранялся через 24 ч после воздействия. Однако предварительное введение антагонистов CRHR – анталармина и антисаувагина-30 – перед глюкокортикоидной терапией подавляет увеличение экспрессии *Th* в стволе мозга неонатальных крыс, вызванной однократной инъекцией дексаметазона (Sukhareva et al., 2019). На основании этого можно предположить, что использование этих препаратов позволит предотвратить негативные последствия гормональной терапии новорожденных в зрелом возрасте.

В отличие от классических нейротрансмиттеров, CRH и связанные с ним пептиды действуют как нейрорегуляторы: не влияя на синаптическую эффективность, они активируют процессы передачи сигналов в клетках, которые облегчают или подавляют действие нейротрансмиттеров в определенных нейронных сетях. Система CRH анатомически и функционально связана с моноаминергическими системами, которые, действуя сообща, передают сигналы стресса за счет изменения биосинтетической активности нейронов разных областей мозга, тем самым вызывая различные реакции на стресс (Gallagher et al., 2008).

CRH, высвобождаемый внегипоталамическими структурами мозга, вносит непосредственный вклад в поведенческое состояние тревоги, независимо от его влияния на гипофиз и симпатическую систему, так как эффект, подобный тревожному состоянию, после внутрижелудочкового введения CRH сохраняется у крыс с гипофизэктомией

(Inda et al., 2017). У грызунов повышенная экспрессия CRH в головном мозге индуцирует анксиогенный поведенческий фенотип (Van Gaalen et al., 2002), тогда как подавление экспрессии CRH оказывает анксиолитическое действие при базальной и стресс-индуцированной тревоге (Henckens et al., 2016). Уровень CRH повышен в головном мозге людей, страдающих от связанных со стрессом психических заболеваний, таких как большое депрессивное расстройство и посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) (Rasmusson, Pineles, 2018), и в некоторых случаях нормализуется после лечения антидепрессантами (Inda et al., 2017).

Анксиогенные эффекты CRH связывают с активацией рецептора CRHR1. Блокада CRHR1 у грызунов предотвращала индуцированный CRH анксиогенный фенотип (Zorrilla et al., 2002), а у мышей, у которых отсутствовал *Crhr1*, снижалось проявление тревожного поведения (Muller et al., 2003). Эти результаты пробудили интерес к роли гиперактивации CRHR1 в психопатологии, связанной со стрессом, а также открыли возможность применения антагонистов CRHR1 как потенциальных анксиолитиков и антидепрессантов следующего поколения.

Роль активации CRHR2 в проявлении тревоги и депрессии менее ясна. Существуют две теории, пытающиеся объяснить участие CRHR2 в поведенческих эффектах CRH. Наиболее распространенная гипотеза состоит в том, что активация CRHR2 отвечает за обеспечение физиологического и психологического гомеостаза и противодействует начальным эффектам активации CRHR1, вызывающим стрессовую реакцию и тревожно-подобное поведение (Bale, Vale, 2004). Это предположение основано на данных, полученных на нокаутных по *Crhr2* мышцах, у которых наблюдается повышенный выброс кортикостерона при стрессе, анксиогенный фенотип (Bale et al., 2000) и увеличение времени восстановления после стресса (Issler et al., 2014). Аналогичные проявления были отмечены у мышей, у которых отсутствовали все три урокортина (UCN1–UCN3) – первичные лиганды для CRHR2 (Neufeld-Cohen et al., 2010). Альтернативная гипотеза о роли CRHR2 заключается в том, что CRHR1 и CRHR2 отвечают за противоположные типы поведения, связанного со стрессом. CRHR1 опосредует активное защитное поведение (вызванное контролируемым стрессом), а CRHR2 – пассивное копинг-поведение и реакции, подобные проявлению депрессии (такие как выученная беспомощность, вызванная неконтролируемым стрессом) (Maier, Watkins, 2005). Эта гипотеза основана на необходимости передачи сигналов CRHR2 в дорсальном ядре шва для сенсibilизации серотонинергических нейронов и развития депрессивно-подобного фенотипа, возникающего в условиях неизбежного стресса. Однако есть ряд результатов, не согласующихся с данными теориями (Janssen, Kozicz, 2013). Такое противоречие может быть связано с ошибочным определением вклада CRH и связанных с ним пептидов и их рецепторов в наблюдаемые эффекты вследствие их частично перекрывающихся паттернов распределения, неабсолютной специфичности активации рецепторов: высокие концентрации лиганда действуют на оба типа рецепторов, а антагонисты рецепторов не обладают специфичностью (Zorrilla et al., 2013).

Разные типы стрессоров требуют разных физиологических ответных реакций, чтобы оптимально справляться с ними. Не только природа, но также интенсивность и продолжительность стрессорного воздействия оказывают влияние на необходимый нейрональный ответ (Joels, Varam, 2009). Поскольку система CRH реагирует незамедлительно, оказывая свое нейромодулирующее действие на нейроны-мишени в течение нескольких секунд после высвобождения CRH (Gallagher et al., 2008), стоит отметить быстрые эффекты передачи сигналов рецепторов CRH либо в присутствии, либо в отсутствие хронического стресса.

Существует много данных, указывающих, что в случае длительного стресса CRH оказывает эффекты, которые в корне отличаются от острых (Maras, Varam, 2012), и эти эффекты связаны с депрессивным, а не с тревожным фенотипом (Regev et al., 2011). Длительное воздействие CRH и активация CRHR1 ухудшают процессы нейропластичности в гиппокампе. Первоначально активирующие эффекты CRH *in vitro* при длительном влиянии CRH сменяются снижением возбуждающих постсинаптических потенциалов, что блокирует кратко- и долгосрочную синаптическую пластичность, а также полимеризацию актина. CRH дестабилизирует и, таким образом, истончает дендритные шипики, что приводит к уменьшению готовых к потенцированию возбуждающих синапсов (Chen et al., 2013). Было показано, что эти эффекты опосредованы локальной CRHR1-индуцированной активацией рецепторов NMDA.

С точки зрения поведения, длительная активация CRHR1 как следствие хронического стресса связана с нарушением реакции потенциации в гиппокампе. У мышей, у которых отсутствует CRHR1 в нейронах переднего мозга, не выявляются негативные последствия хронического стресса на обучение и память (Wang X. et al., 2011), а введение антагониста CRHR1 грызунам дикого типа сразу после действия стрессора восстанавливает долговременную потенциацию (LTP) и целостность дендритной структуры (Ivy et al., 2010). Таким образом, в отличие от положительных эффектов кратковременного воздействия базальных уровней CRH, действие пептида при сильном стрессе, когда уровень гормона повышен, приводит к потере синапсов на более длительный срок (Chen et al., 2012). Соответственно у людей с ПТСР часто наблюдаются нарушения памяти (Brewin et al., 2007), и повторное введение селективного антагониста CRHR1 предотвращает такое когнитивное нарушение и связанное с этим снижение возбудимости нейронов гиппокампа на мышинной модели ПТСР (Philbert et al., 2013). Различия проявлений краткосрочного и долгосрочного воздействия CRH подчеркивают важность тщательного изучения эффектов передачи сигналов CRHR в течение длительного периода времени (часов, дней) и важность механизмов, стоящих за их постоянством во времени. Такие факторы, как возраст, пол и генетика, часто во взаимодействии с жизненными событиями, являясь основными детерминантами эффектов, наблюдаемых после активации системы CRH (Koenig et al., 2011).

Дифференциальная экспрессия рецепторов и их лигандов в мозге отражает различные действия, которые CRH



оказывает на уровне ЦНС. Результаты показывают более сложную модулирующую роль системы CRH, в отличие от общепринятой точки зрения, что CRHR1 вызывает тревогу, а CRHR2 опосредует восстановление после стресса. Хотя во многих областях мозга, включая BLA, BNST и PAG, CRH-опосредованная активация CRHR1 увеличивает базальную и вызванную стрессом тревогу, для других областей мозга наблюдается более сложная картина. Например, в бледном шаре активация CRHR1 связана с анксиолитическими эффектами, тогда как потенциальные анксиогенные эффекты активации CRHR1 в CeA зависят от силы и длительности стресса (Henry et al., 2006). Аналогичная картина наблюдается и в NAc. Кроме того, эффекты активации CRHR2, по-видимому, являются динамическими и в значительной степени зависят от количества эндогенного лиганда и предшествующего воздействия.

Известно, что повторная ежедневная подпороговая активация CRH-рецепторов в BNST индуцирует состояние, подобное хронической тревожности. Нейроны BNST в значительной степени проецируются на нейроны дорзального ядра шва (DR), основной источник серотонина в мозге. Повторяющаяся активация CRHR в BNST, вызывающая тревожность, увеличивает экспрессию генов серотонинергической системы в DR, включая *Tph2* (ген ключевого фермента синтеза серотонина) и *Slc6a4* (ген, кодирующий транспортер серотонина (SERT)) (Donner et al., 2020). Избыточная экспрессия CRH в нейронах BNST избирательно снижает экспрессию CRHR2 в пределах дорсомедиального DR и увеличивает проявление эмоциональной памяти (Sink et al., 2013). И наоборот, серотонинергические проекции от DR к нейронам CRH в BNST посредством активации рецепторов 5-HT<sub>2C</sub> способствуют развитию тревожности (Marcinkiewicz et al., 2016). Прямая активация нейронов CRH в овальном ядре BNST вызывает тревожное состояние, которое наблюдается после хронического стресса. Таким образом, нейроны CRH в овальном ядре BNST и серотонинергические нейроны в DRD, вероятно, имеют реципрокные связи, которые играют роль в контроле эмоционального поведения, включая защитные поведенческие реакции, подобные тревожным.

## Заключение

Влияние стресса на функции мозга разнообразно. Это и поведенческая адаптация, и повышение выживаемости, и увеличение риска развития психических расстройств, связанных со стрессом. Исходя из представленных данных, активность гипоталамической и внегипоталамических систем CRH способна детерминировать стрессорный ответ. Нарушение в функционировании системы CRH связано с возникновением аддикций, тревожных состояний, посттравматического стрессового синдрома, а также большого депрессивного расстройства. Предотвращение подобных негативных последствий – важнейшая научно-практическая задача. Вовлечение CRH в механизмы формирования такого разнообразия патологий, отражающих влияние стресса на функционирование мозга, позволяет предполагать, что система внегипоталамического CRH может являться потенциальной молекулярной мишенью для предотвращения негативных последствий стресса с

высоким терапевтическим потенциалом, так как хронические повышенные концентрации CRH были обнаружены в спинномозговой жидкости пациентов с аффективными расстройствами, депрессией и посттравматическим стрессовым расстройством.

## Список литературы / References

- Калинина Т.С., Сухарева Е.В., Дыгало Н.Н. Канонический и неканонический механизмы действия глюкокортикоидных гормонов стресса. *Успехи физиол. наук.* 2016;47(3):59-69.  
[Kalinina T.S., Sukhareva E.V., Dygalo N.N. Canonical and noncanonical mechanisms of glucocorticoid stress hormone action. *Uspehi Fiziologicheskikh Nauk = Advances in Physiological Sciences.* 2016;47(3):59-69. (in Russian)]
- Abou-Seif C., Shipman K., Allars M., Norris M., Chen Y., Smith R., Nicholson R. Tissue specific epigenetic differences in CRH gene expression. *Front. Biosci.* 2012;17:713-725. DOI 10.2741/3953.
- Aguilera G., Liu Y. The molecular physiology of CRH neurons. *Front. Neuroendocrin.* 2012;33:67-84. DOI 10.1016/j.yfme.2011.08.002.
- Andres A., Regev L., Phi L., Seese R., Chen Y., Gall C., Baram T. NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *J. Neurosci.* 2013; 33(43):16945-16960. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1445-13.2013.
- Bale T., Contarino A., Smith G., Chan R., Gold L., Sawchenko P., Koob G., Vale W., Lee K. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat. Genet.* 2000;24:410-414. DOI 10.1038/74263.
- Bale T., Vale W. CRF and CRF receptors: role in stress reactivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol.* 2004;44:525-557. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410.
- Brewin C., Kleiner J., Vasterling J., Field A. Memory for emotionally neutral information in posttraumatic stress disorder: a meta-analytic investigation. *J. Abnorm. Psychol.* 2007;116:448-463. DOI 10.1037/0021-843X.116.3.448.
- Chen Y., Andres A., Frotscher M., Baram T. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front. Cell. Neurosci.* 2012;6:13. DOI 10.3389/fncel.2012.00013.
- Chen Y., Kramár E., Chen L., Babayan A., Andres A., Gall C., Lynch G., Baram T. Impairment of synaptic plasticity by the stress mediator CRH involves selective destruction of thin dendritic spines via RhoA signaling. *Mol. Psychiatry.* 2013;18:485-496. DOI 10.1038/mp.2012.17.
- Dautzenberg F., Hauger R. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002;23: 71-77. DOI 10.1016/s0165-6147(02)01946-6.
- Deussing J., Chen A. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. *Physiol. Rev.* 2018;98(4):2225-2286. DOI 10.1152/physrev.00042.2017.
- Donner N., Davies S., Fitz S., Kienzle D., Shekhar A., Lowry C. Crh receptor priming in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) induces *tph2* gene expression in the dorsomedial dorsal raphe nucleus and chronic anxiety. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2020;96:109730. DOI 10.1016/j.pnpbp.2019.109730.
- Donner N., Siebler P., Johnson D., Villarreal M., Mani S., Matti A., Lowry C. Serotonergic systems in the balance: CRHR1 and CRHR2 differentially control stress-induced serotonin synthesis. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;63:178-190. DOI 10.1016/j.psyneuen.2015.09.024.
- Eraslan E., Akyazi İ., Ergül-Ekiz E., Matur E. Noise stress-induced changes in mRNA levels of corticotropin-releasing hormone family molecules and glucocorticoid receptors in the rat brain. *Folia Biol.* 2015;61(2):66-73.
- Erb S., Stewart J. A role for the bed nucleus of the stria terminalis, but not the amygdala, in the effects of corticotropin-releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *J. Neurosci.* 1999; 19(20):RC35. DOI 10.1523/JNEUROSCI.19-20-j0006.1999.

- Fuzesi T., Daviu N., Wamstecker Cusulin J., Bonin R., Bains J. Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nat. Commun.* 2016;7:11937. DOI 10.1038/ncomms11937.
- Gallagher J., Orozco-Cabal L., Liu J., Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;583: 215-225. DOI 10.1016/j.ejphar.2007.11.075.
- Gallopín T., Geoffroy H., Rossier J., Lambolez B. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb. Cortex.* 2006;16(10):1440-1452. DOI 10.1093/cercor/bhj081.
- Grammatopoulos D., Chrousos G. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13:436-444. DOI 10.1016/S1043-2760(02)00670-7.
- Gutknecht E., Van der Linden I., Van Kolen K., Verhoeven K., Vauquelin G., Dautzenberg F.M. Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol. Pharmacol.* 2009;75:648-657. DOI 10.1124/mol.108.050427.
- Hauger R., Risbrough V., Brauns O., Dautzenberg F. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2006;5:453-479. DOI 10.2174/187152706777950684.
- Henckens M., Deussing J., Chen A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016;17:636-651. DOI 10.1038/nrn.2016.94.
- Henry B., Vale W., Markou A. The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *J. Neurosci.* 2006;26:9142-9152. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1494-06.2006.
- Herman J., Figueiredo H., Mueller N., Ulrich-Lai Y., Ostrander M.M., Choi D., Cullinan W. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrin.* 2003;24:151-180. DOI 10.1016/j.yfrne.2003.07.001.
- Herman J., Tasker J. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front. Endocrinol.* 2016;7:137. DOI 10.3389/fendo.2016.00137.
- Inda C., Armando N., Dos Santos Claro P., Silberstein S. Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocr. Connect.* 2017;6(6):R99-R120. DOI 10.1530/EC-17-0111.
- Issler O., Carter R., Paul E., Kelly P., Olverman H., Neufeld-Cohen A., Kuperman Y., Lowry C., Seckl J., Chen A., Jamieson P. Increased anxiety in corticotropin-releasing factor type 2 receptor-null mice requires recent acute stress exposure and is associated with dysregulated serotonergic activity in limbic brain areas. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 2014;4:1. DOI 10.1186/2045-5380-4-1.
- Ivy A., Rex C., Chen Y., Dubé C., Maras P., Grigoriadis D., Gall C., Lynch G., Baram T. Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J. Neurosci.* 2010;30(39):13005-13015. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1784-10.2010.
- Janssen D., Kozicz T. Is it really a matter of simple dualism? Corticotropin-releasing factor receptors in body and mental health. *Front. Endocrinol.* 2013;4:28. DOI 10.3389/fendo.2013.00028.
- Joels M., Baram T. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10:459-466. DOI 10.1038/nrn2632.
- Kelly E., Bailey C., Henderson G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* 2008;153:379-388. DOI 10.1038/sj.bjp.0707604.
- King B., Nicholson R. Advances in understanding corticotrophin-releasing hormone gene expression. *Front. Biosci.* 2007;12:581-590. DOI 10.2741/2084.
- Koenig J., Walker C., Romeo R., Lupien S. Effects of stress across the lifespan. *Stress.* 2011;14:475-480. DOI 10.3109/10253890.2011.604879.
- Kolber B., Boyle M., Wiczorek L., Kelley C., Onwuzurike C., Nettles S., Vogt S., Muglia L. Transient early-life forebrain corticotropin-releasing hormone elevation causes long-lasting anxiogenic and despair-like changes in mice. *J. Neurosci.* 2010;30(7):2571-2581. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4470-09.2010.
- Kono J., Konno K., Talukder A., Fuse T., Abe M., Uchida K., Horio S., Sakimura K., Watanabe M., Itoi K. Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Struct. Funct.* Available online 2016, 16 Sept. Publ. 2017;222(4):1705-1732. DOI 10.1007/s00429-016-1303-0.
- Kovacs K. CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J. Chem. Neuroanat.* 2013;54:25-33. DOI 10.1016/j.jchemneu.2013.05.003.
- Lightman S. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20:880-884. DOI 10.1111/j.1365-2826.2008.01711.x.
- Maier S., Watkins L. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005;29:829-841. DOI 10.1016/j.neubiorev.2005.03.021.
- Maras P., Baram T. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci.* 2012;35:315-324. DOI 10.1016/j.tins.2012.01.005.
- Marcinkiewicz C., Mazzone C., D'Agostino G., Halladay L., Hardaway J., DiBerto J., Navarro M., Burnham N., Cristiano C., Dorrier C., Tipton G., Ramakrishnan C., Kozicz T., Deisseroth K., Thiele T., McElligott Z., Holmes A., Heisler L., Kash T. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature.* 2016;537(7618):97-101. DOI 10.1038/nature19318.
- Markovic D., Grammatopoulos D. Focus on the splicing of secretin GPCRs transmembrane-domain 7. *Trends Biochem. Sci.* 2009;34: 443-452. DOI 10.1016/j.tibs.2009.06.002.
- Markovic D., Punn A., Lehnert H., Grammatopoulos D. Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2 $\beta$  endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Endocrinol.* 2008;22:689-706. DOI 10.1210/me.2007-0136.
- Muglia L., Bethin K., Jacobson L., Vogt S., Majzoub J. Pituitary-adrenal axis regulation in CRH-deficient mice. *Endocr. Res.* 2000;26:1057-1066. DOI 10.3109/07435800009048638.
- Muller M., Zimmermann S., Sillaber I., Hagemeyer T., Deussing J., Timpl P., Kormann M., Droste S., Kühn R., Reul J., Holsboer F., Wurst W. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat. Neurosci.* 2003;6:1100-1107. DOI 10.1038/nn1123.
- Neufeld-Cohen A., Tsoory M., Evans A., Getselter D., Gil S., Lowry C., Vale W., Chen A. A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:19020-19025. DOI 10.1073/pnas.1013761107.
- Nicholson R., King B., Smith R. Complex regulatory interactions control CRH gene expression. *Front. Biosci.* 2004;9:32-39. DOI 10.2741/1204.
- Perez-Castro C., Renner U., Haedo M., Stalla G., Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol. Rev.* 2012;92:1-38. DOI 10.1152/physrev.00003.2011.
- Philbert J., Belzung C., Griebel G. The CRF1 receptor antagonist SSR125543 prevents stress-induced cognitive deficit associated with hippocampal dysfunction: comparison with paroxetine and D-cycloserine. *Psychopharmacol.* 2013;228:97-107. DOI 10.1007/s00213-013-3020-1.
- Pleil K., Rinker J., Lowery-Gionta E., Mazzone C., McCall N., Kendra A., Olson D., Lowell B., Grant K., Thiele T., Kash T. NPY signaling inhibits extended amygdala CRF neurons to suppress binge alcohol drinking. *Nat. Neurosci.* 2015;18(4):545-552. DOI 10.1038/nn.3972.
- Quax R., Manenschijn L., Koper J., Hazes J., Lamberts S., van Rossum E., Felders R. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013;9:670-686. DOI 10.1038/nrendo.2013.183.

- Rasmusson A., Pineles S. Neurotransmitter, peptide, and steroid hormone abnormalities in PTSD: biological endophenotypes relevant to treatment. *Curr. Psychiatry Rep.* 2018;20(7):52. DOI 10.1007/s11920-018-0908-9.
- Regev L., Neufeld-Cohen A., Tsoory M., Kuperman Y., Getselter D., Gil S., Chen A. Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Mol. Psychiatry.* 2011;16:714-728. DOI 10.1038/mp.2010.64.
- Regev L., Tsoory M., Gil S., Chen A. Site-specific genetic manipulation of amygdala corticotropin-releasing factor reveals its imperative role in mediating behavioral response to challenge. *Biol. Psychiatry.* 2012;71(4):317-326. DOI 10.1016/j.biopsych.2011.05.036.
- Reul J., Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002;2:23-33. DOI 10.1016/S1471-4892(01)00117-5.
- Reyes B., Valentino R., Van Bockstaele E. Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. *Endocrinology.* 2008;149:122-130. DOI 10.1210/en.2007-0705.
- Roosendaal B., Brunson K., Holloway B., McGaugh J., Baram T. Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99(21):13908-13913. DOI 10.1073/pnas.212504599.
- Sasaki M., Sato H. Polysynaptic connections between Barrington's nucleus and sacral preganglionic neurons. *Neurosci. Res.* 2013;75(2):150-156. DOI 10.1016/j.neures.2012.11.008.
- Sink K., Walker D., Freeman S., Flandreau E., Ressler K., Davis M. Effects of continuously enhanced corticotropin releasing factor expression within the bed nucleus of the stria terminalis on conditioned and unconditioned anxiety. *Mol. Psychiatry.* 2013;18(3):308-319. DOI 10.1038/mp.2011.188.
- Slater P., Cerda C., Pereira L., Andres M., Gysling K. CRF binding protein facilitates the presence of CRF type 2α receptor on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113:4075-4080. DOI 10.1073/pnas.1523745113.
- Stengel A., Taché Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp. Biol. Med.* 2010;235(10):1168-1178. DOI 10.1258/ebm.2010.009347.
- Studeny S., Vizzard M. Corticotropin-releasing factor (CRF) expression in postnatal and adult rat sacral parasympathetic nucleus (SPN). *Cell Tissue Res.* 2005;322(3):339-352. DOI 10.1007/s00441-005-0014-2.
- Sukhareva E.V., Lanshakov D., Kalinina T., Bulygina V., Dygalo N. Extrahypothalamic CRH and its receptors change tyrosine hydroxylase expression after neonatal dexamethasone treatment. *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 2019;29(6):301-302. DOI 10.1016/j.euroneuro.2019.09.438.
- Tian J., Bishop G. Frequency-dependent expression of corticotropin releasing factor in the rat's cerebellum. *Neuroscience.* 2003;121(2):363-377. DOI 10.1016/S0306-4522(03)00493-7.
- Valentino R., Van Bockstaele E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;583:194-203. DOI 10.1016/j.ejphar.2007.11.062.
- Van Gaalen M., Stenzel-Poore M., Holsboer F., Steckler T. Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 2002;15:2007-2015. DOI 10.1046/j.1460-9568.2002.02040.x.
- Van Kolen K., Dautzenberg F., Verstraeten K., Royaux I., De Hoogt R., Gutknecht E., Peeters P. Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology.* 2010;58:135-144. DOI 10.1016/j.neuropharm.2009.06.022.
- Wang B., You Z., Rice K., Wise R. Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF2 receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat. *Psychopharmacol.* 2007;193:283-294. DOI 10.1007/s00213-007-0782-3.
- Wang X., Chen Y., Wolf M., Wagner K., Liebl C., Scharf S., Harbich D., Mayer B., Wurst W., Holsboer F., Deussing J., Baram T., Müller M., Schmidt M. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol. Dis.* 2011;42:300-310. DOI 10.1016/j.nbd.2011.01.020.
- Waters R., Rivalan M., Bangasser D., Deussing J., Ising M., Wood S., Holsboer F., Summers C. Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;58:63-78. DOI 10.1016/j.neubiorev.2015.07.011.
- Zmijewski M., Slominski A. Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling. *Acta Biochim. Pol.* 2010;57:1-13.
- Zorrilla E., Roberts A., Rivier J., Koob G. Anxiolytic-like effects of antisauvagine-30 in mice are not mediated by CRF2 receptors. *PLoS One.* 2013;8:e63942. DOI 10.1016/j.yhbeh.2016.03.002.
- Zorrilla E., Valdez G., Nozulak J., Koob G., Markou A. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. *Brain Res.* 2002;952:188-199. DOI 10.1016/S0006-8993(02)03189-X.

**ORCID ID**

E.V. Sukhareva orcid.org/0000-0001-9263-9167

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-543013 и бюджетного проекта № 0259-2021-0015.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.06.2020. После доработки 19.08.2020. Принята к публикации 06.10.2020.



Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал

Э.А. Халилова<sup>1</sup>✉, С.Ц. Котенко<sup>1</sup>, Э.А. Исламмагомедова<sup>1</sup>, А.А. Абакарова<sup>1</sup>, Н.А. Черных<sup>2</sup>, Д.А. Аливердиева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала, Республика Дагестан, Россия

<sup>2</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

✉ eslanda61@mail.ru

**Аннотация.** Приведены результаты изучения биоразнообразия и биотехнологического потенциала галофильных микроорганизмов из термального высокоминерализованного Берикейского озера, соленого Тарумовского озера и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан). С использованием микробиологических методов и метода анализа генов 16S рРНК идентифицированы денитрифицирующие галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Virgibacillus*. Выявлен новый вид *Halomonas* sp. G2 (MW386470) с 95 % уровнем сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Штамм G2 – экстремальный галофил, способный расти в диапазоне 5–25 % NaCl (оптимум 25 %) и образовывать каротиноидный пигмент. Мезофил (30–37 °С, оптимум 30 °С), нейтрофил (рН 6–8, оптимум 7.2–7.4). Хемолитотроф; редуцирует нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; каталазо-, амилазо-, протеазо- и β-галактозидазоположительный; липазо-, оксидазо- и уреазоотрицательный. Не способен гидролизовать инозит, индол; продуцирует лизин, желатин, эктоин; в качестве источника углерода и энергии использует цитрат и малат натрия; не продуцирует орнитин, H<sub>2</sub>S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме лактозы и d-глюкозы. Восприимчив к триметоприму, ципрофлоксацину, офлоксацину, канамицину, ванкомицину, рифампицину, цефуроксиму, ампициллину, цефтазидиму, фосфомицину, кларитромицину, цефепиму, цефаклору. Содержание G+C в ДНК 67.3 %. Отличительной характеристикой изолята являлось продуцирование промышленно значимых гидролитических ферментов, таких как амилаза, протеаза, β-галактозидаза и оксиредуктазы – каталазы при концентрации NaCl в среде 25 %. Местообитание: солончаковые почвы на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия). Остальные галофильные изоляты *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473) имели высокую степень сходства (100 %) с типовыми штаммами *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> и *V. salarius* DSM 18441<sup>T</sup>; содержание G+C в ДНК составляло 65.8, 66.5, 42.8 и 37.3 % соответственно. Штаммы имели высокий биотехнологический потенциал при концентрации NaCl в среде 5 и 25 %. Полученные данные расширили представление о разнообразии и экологическом значении денитрифицирующих бактерий в функционировании засушливых экосистем и выявлении штаммов, продуцирующих ферменты промышленного значения.

Ключевые слова: бактерии; род *Halomonas*; род *Virgibacillus*; соленые озера; почвы; солончаки; биотехнологический потенциал.

**Для цитирования:** Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Абакарова А.А., Черных Н.А., Аливердиева Д.А. Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):224-233. DOI 10.18699/VJ21.026

## Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Daghestan) and their biotechnological potential

Е.А. Khalilova<sup>1</sup>✉, S.T. Kotenko<sup>1</sup>, E.A. Islammagomedova<sup>1</sup>, A.A. Abakarova<sup>1</sup>, N.A. Chernyh<sup>1</sup>, D.A. Aliverdiyeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Precaspian Institute of Biological Resources of the Daghestan Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala, Daghestan, Russia

<sup>2</sup> Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ eslanda61@mail.ru

**Abstract.** The article presents the results of studying the biodiversity and biotechnological potential of halophilic microorganisms from the thermal highly mineralized Berikye Lake, the salty Lake Tarumovskoye and saline soils of the Peri-Caspian Lowland (Republic of Daghestan). Denitrifying halophilic bacteria of the genus *Halomonas* and *Virgibacillus* were identified using microbiological methods and 16S rRNA gene analysis. A new species *Halomonas* sp. G2 (MW386470) with a similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA genes is 95 %. Strain G2 is an extreme halophile capable of growing in the range of 5–25 % NaCl (optimum 25 %) and forming a carotenoid pigment. Mesophil, 30–37 °C (optimum 30 °C); neutrophil,

pH 6–8 (optimum 7.2–7.4). Strain G2 chemolithotroph; reduces nitrate or nitrite as electron donors; catalase-, amylase-, protease- and  $\beta$ -galactosidase-positive; lipase-, oxidase- and urease-negative. Not able to hydrolyze inositol, indole; produces lysine, gelatin, ectoine; uses citrate and sodium malate as a source of carbon and energy; does not produce ornithin,  $H_2S$  or acid from d-mannose, sucrose, glycerol, cellobiose, except for lactose and d-glucose. Susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin, vancomycin, rifampicin, cefuroxime, ampicillin, ceftazidime, fosfomycin, clarithromycin, cefepime, cefaclor. The G+C content in DNA is 67.3 %. A distinctive characteristic of the isolate was the production of industrially significant hydrolytic enzymes such as amylase, protease,  $\beta$ -galactosidase, and oxidoreductase (catalase) at a NaCl concentration of 25 % in the medium. Habitat: saline soils on the territory of the Tersko-Kumskaya lowland (Republic of Daghestan, Russia). The rest of the halophilic isolates of *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472), and *V. salinarius* B3 (MW386473) had a high degree of similarity (100 %) with the type strains of *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> and *V. salarius* DSM 18441<sup>T</sup>; the content of G+C in DNA was 65.8, 66.5, 42.8 and 37.3 %, respectively. The strains had a high biotechnological potential at NaCl concentrations of 5 and 25 % in the medium. The data obtained expanded the understanding of the diversity and ecological significance of denitrifying bacteria in the functioning of arid ecosystems and make it possible to identify strains producing enzymes of industrial importance.

Key words: bacteria of the genus *Halomonas* and *Virgibacillus*; salt lakes; salt marshes soils; biotechnological potential.

**For citation:** Khalilova E.A., Kotenko S.T., Islammagomedova E.A., Abakarova A.A., Chernykh N.A., Aliverdiyeva D.A. Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Daghestan) and their biotechnological potential. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):224-233. DOI 10.18699/VJ21.026

## Введение

Экстремофильные микроорганизмы представляют большой интерес благодаря их биологической исключительности. Немалая заслуга в изучении природных микробных сообществ принадлежит школе российских ученых (Заварзин, 2004; Namsaraev et al., 2010; Bonch-Osmolovskaya, Atomi, 2015). Доминирующее положение в экологических нишах с высоким содержанием солей (солнечные солеварни, океаны и моря, гиперсоленые озера, солончаковые почвы, пустыни, растения, соленые продукты) и антропогенных экосистемах с повышенным уровнем минерализации занимают археи и высокоспециализированные бактерии родов *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas* (Wang et al., 2019; Banciu et al., 2020; Begmatov et al., 2020).

Соленые и гиперсоленые почвы и водоемы являются важнейшей составляющей крупнейших экосистем на планете (Ghosh et al., 2019). Дагестан – уникальная природная провинция России, обладающая многообразием природных ландшафтов благодаря влиянию тектонических процессов, эрозионной деятельности текучих вод, трансгрессивной и регрессивной динамике Каспийского моря, засушливому климату. В ряде работ исследуются микробные сообщества различных экологических ниш этого региона: литотрофные сероокисляющие представители сульфидных источников, углеводородокисляющие бактерии геотермального источника Кизлярского месторождения (Черноусова и др., 2008; Гриднева и др., 2009; Халилова и др., 2014).

В высокоминерализованных озерах Терско-Кумской низменности с повышенной соленостью формируются условия для существования галофильных бактерий. Микроорганизмы из экстремальных мест обитаний являются продуцентами ценных, промышленно значимых ферментов, антибиотиков, могут участвовать в биодegradации почв, обладают повышенной устойчивостью к контаминации посторонней микрофлорой (Corral et al., 2020).

Нами проведены исследования пространственного распределения галофильных микробных сообществ растений-галофитов, засоленных почв и высокоминерализованных озер в засушливых регионах Прикаспийской

низменности (Халилова и др., 2017, 2020). Показано, что основными компонентами микробной флоры Терско-Кумской и Терско-Сулакской провинций были хемоорганогетеротрофные бактерии родов *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halomonas* и *Salimicrobium* из филумов *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Выявлена значительная корреляция между изолированными микробными сообществами и концентрациями химических элементов и соединений (Na, K, Ca, Mg, Cl, Cu, Sr,  $SO_4$ , Cl,  $HCO_3$ ), служащими одними из главных регуляторов микробиологической активности в почвах и озерах.

Целью настоящей работы было молекулярно-таксономическое исследование изолированных галофильных бактерий и изучение их биотехнологического потенциала.

## Материалы и методы

**Объектом исследований** служили природные микробные сообщества соленых водоемов и почв на территории Прикаспийской низменности Республики Дагестан (Халилова и др., 2020) (табл. 1). Пробы отобраны в июле-сентябре 2014 г.

**Культивирование.** Для культивирования галофильных бактерий использовали модифицированную среду следующего состава (г/л): bacto yeast extract – 10.00,  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5.5H_2O$  – 3.0, NaCl – 50, 100, 250, KCl – 2.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 20.0, глицерин – 4.0 (Пат. РФ № 2115722, 1998; Пат. РФ № 2323226, 2008). В качестве субстрата применяли bacto-peptone (Difco, Испания) – 5 г/л; pH среды корректировали 1N HCl или 4M KOH (Россия) до 7.2–7.4 с помощью pH-метра Hanna Instrumentals pH 211 (Германия). Инкубирование культур осуществляли в микробиологическом инкубаторе Binder-115 (США) при рабочей температуре  $(30–37) \pm 1$  °C в течение 3–20 дней.

**Морфологию** бактериальных клеток (морфология клеток, подвижность, наличие споробразования) изучали с помощью светового микроскопа CX21 FS1 (Olympus, Япония) и цифровой фотокамеры PoverShot A640 (Canon, Япония) при рабочем увеличении  $\times 600$ .

**Эколого-физиологические характеристики роста** (температура, pH, соленость). Влияние концентрации NaCl (0, 5, 10, 15, 25 %, вес:объем) в количестве 2 % от

**Таблица 1.** Штаммы галофильных бактерий и источники отбора проб

Номер штамма	Место выделения	Характеристика источника
G1	Терско-Кумская низменность, оз. Тарумовское (44°23'28" N, 46°33'55" E)	Вода хлоридно-гидрокарбонатно-сульфатно-натриевая, минерализация 73.5 г/л, температура 50–60 °C, pH 7.2–7.4 Концентрация доминирующих катионов, мг/л: Na <sup>+</sup> – 23.0, Ca <sup>2+</sup> – 1.56, K <sup>+</sup> – 1.36, Mg <sup>2+</sup> – 0.1, Sr <sup>2+</sup> – 0.27, Li <sup>+</sup> – 0.08; анионов: Cl <sup>-</sup> – 44.0, HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> – 1.1, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> – 0.12. В минорном количестве присутствовали катионы Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> и NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
G2 G3	Терско-Кумская низменность, почва, солончак типичный (44°04'25" N, 46°32'10" E)	Почва – гидроморфное хлоридно-сульфатно-натриевое засоление; средние данные зимнего и летнего периода: температура 1.5–3.5 °C, +30...+46 °C; pH 8.0–9.0
B2 B3	Терско-Сулакская низменность, оз. Берикейское (42°13'25" N, 48°04'38" E)	Вода хлоридно-гидрокарбонатно-сульфатно-натриевая, минерализация 76.5 г/л, температура 55–60 °C, pH 6.4–6.5 Концентрация доминирующих катионов, мг/л: Na <sup>+</sup> – 25.4, Ca <sup>2+</sup> – 2.5, K <sup>+</sup> – 0.59, V <sup>+</sup> – 0.33, Mg <sup>2+</sup> – 0.3, Sr <sup>2+</sup> – 0.26, Ba <sup>+</sup> – 0.23, Br <sup>+</sup> – 0.165, Li <sup>+</sup> – 0.11; анионов: Cl <sup>-</sup> – 46.0, HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> – 1.35, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> – 0.24; кислот: H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> – 0.33, H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> – 0.15 г/л. В минорном количестве присутствовали катионы Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , As <sup>3+</sup> , Rb <sup>+</sup> , Cs <sup>+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> и анионы SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , I <sup>-</sup>

объема среды на рост клеток в жидких и твердых средах определяли при 30–37 °C в инкубаторе Binder-115 (США). Рост отслеживали с 24-часовыми интервалами в течение 7 дней путем измерения мутности на спектрофотометре Genesys-20 (Thermo Spectronic, США). Влияние температуры (30 и 37 °C) на скорость роста устанавливали культивированием при тех же условиях.

**Воздействие субстратов роста** (усвоение органических кислот, образование кислоты из углеводов, восстановление нитратов в нитриты) изучали стандартными методами (Gordon, Smith, 1953; Holt et al., 1997; Нетрусов и др., 2005).

**Акцепторы электронов.** Способность к использованию нитрата в качестве акцептора электронов определяли с применением дисков BD BBL Taxo Differentiation Discs Nitrate (Becton Dickinson and Company, Австралия), согласно инструкции фирмы-производителя. Диски пропитаны раствором, содержащим 40 % нитрата калия и 0.1 % молибдата натрия. Восстановление нитрата до нитрита исследовали добавлением сульфаниловой кислоты и N,N-диметил-α-нафтиламина, который реагирует с нитритом с образованием вещества, имеющего красную окраску, – п-сульфобензолазо-α-нафтиламина (положительный результат). При отсутствии изменения окраски после добавления реагентов (отрицательный результат) добавляли цинковую пыль для обнаружения невосстановленного нитрата или продуктов, отличных от нитрита.

**Ферментативная активность.** Бактерии, продуцирующие гидролазу, подвергали скринингу на чашках с крахмалом, трибутирином и желатиновым агаром на амилазу, протеиназу, β-галактозидазу, лактазу, липазу, уреазу, а также на оксиредуктазы (каталазы, оксидазы) в зависимости от концентраций NaCl.

Амилазную активность изучали в электролитной среде (крахмал 1.0 %, пептон 0.5 %, дрожжевой экстракт 0.3 %, NaCl 1.0 %). Изоляты инкубировали при 45 °C в течение 24–36 ч, тестировали раствором Люголя (10.0 г калия йодида, 5 г йода, 100 мл дистиллированной воды). Потенциальные продуценты амилазы выбирали на основе

отношения диаметра зоны клиренса к диаметру колонии. Протеазу определяли на средах с агаром и 10 % обезжиренным молоком; β-галактозидазу (лактазу) – с помощью индикаторных дисков, пропитанных специальным реактивом (орто-нитрофенил-β-d-галактопиранозидом, Conda, Испания). Уреазу проверяли с использованием CLO теста (Kimberly-Clark, США); липазу – на чашках с 1 % трибутирином. Изоляты, показавшие четкие зоны гидролиза трибутирина, были идентифицированы как бактерии, продуцирующие липазу.

Определение оксиредуктаз: каталаза – с использованием 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве субстрата в среде в течение 24–48 ч, оксидаза – методом Ковача (Steel, 1961). Все скрининговые тесты на ферментативную активность были выполнены в трех повторностях. Инкубация бактерий осуществлялась при 37 °C в течение 7 дней.

**Устойчивость к антибиотикам** (триметоприм, ципрофлоксацин, офлоксацин, канамицин, ванкомицин, рифампицин, цефуроксим, ампициллин, цефтазидим; фосфомицин, кларитромицин, цефепим, цефаклор) изучали по интенсивности бактериального роста на базовой агаризованной среде «В» в чашках Петри с помощью стандартных дисков «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов» НПО «Микроген» (холдинг «Надимбио», Россия) с 10–30 мкг антимикробного агента (Baumann P., Baumann L., 1986).

**G+C состав и филогенетический анализ.** Выделение геномной ДНК проводили согласно методам (Marmur, 1961; Thomas et al., 1997). Нуклеотидный состав ДНК определяли термической денатурацией (0.5 °C·мин<sup>-1</sup>) с использованием спектрофотометра Cary-100 Bio UV-VIS (Varian, Австралия). Содержание G+C в составе ДНК – по методике (Owen et al., 1969). В качестве стандарта применяли ДНК *Escherichia coli* K-12 (51.7 %).

Для филогенетического анализа ДНК из образцов выделяли модифицированным щелочным методом Бирнбойма–Доли (Birnboim, Doly, 1979) и с помощью Wizard-технологии фирмы Promega (США) (Бульгина и др., 2002). Концентрация полученного препарата ДНК при этом



методе составляла 30–50 мкг/мл. рНК в препарате присутствует в следовых количествах (менее 1 %, согласно данным электрофоретического анализа, – не представлены).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рНК для каждого из исследуемых образцов были использованы универсальные праймерные системы, позволяющие детектировать как зубактерии (11f-1492г) (Lane, 1991), так и археи (8fa-A915R) (Колганова и др., 2002). Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1× буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>), по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы, по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл – 94 °С × 9 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; последующие 30 циклов – 94 °С × 1 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; завершающий цикл – 72 °С × 7 мин. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 2 % агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов WizardPCRPreps (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов выполняли в Центре «Биоинженерия» РАН, Москва, по методу (Sanger et al., 1977) с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США). Для секвенирования использовали стандартные праймеры (Camacho et al., 2009).

**Анализ последовательностей 16S рНК.** Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК изучаемых штаммов проводили в программе BLAST на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Van de Peer, De Wachter, 1994).

Последовательности генов 16S рНК всех изучаемых штаммов депонированы в GenBank: G1 – MW386469, G2 – MW386470, G3 – MW386471, B2 – MW386472, B3 – MW386473.

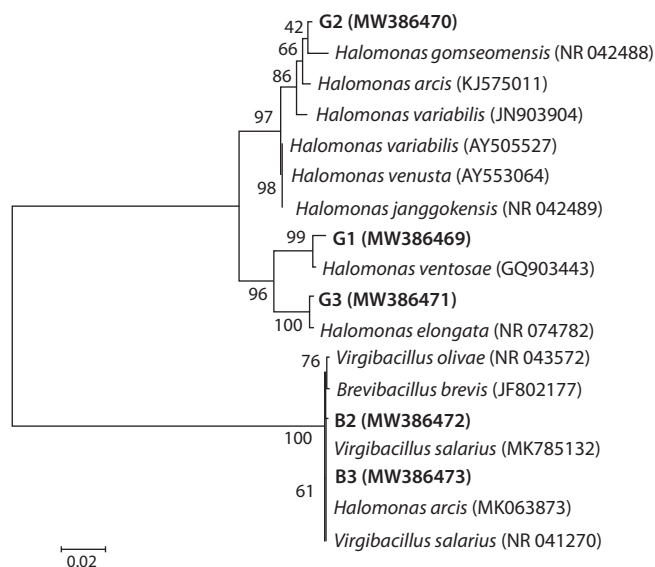
## Результаты и обсуждение

Штаммы галофильных бактерий G1, G2, G3, B2 и B3, выделенные из соленых озер и солончаков Терско-Кумской и Терско-Сулакской низменностей, росли при температуре 30–37 °С и pH 6.4–7.4. Культуры демонстрировали устойчивый рост на агаризованной элективной среде в присутствии 5–25 % NaCl с оптимумом 5, 10, 25 %, что указывало на их принадлежность к умеренным и экстремальным галофилам в соответствии с известной классификацией (Kushner, Kamekura, 1988).

Определено филогенетическое положение выделенных штаммов. Для этого проанализированы последовательности генов 16S рНК новых галофильных штаммов и проведено сравнение их с последовательностями 16S рНК валидно описанных видов бактерий. Анализ показал, что новые изоляты относятся к двум родам бактерий, также содержащих галофильные микроорганизмы *Halomonas* и *Virgibacillus* (табл. 2, рис. 1). При этом штамм G2 представляет новый вид в роде *Halomonas*. Штаммы *H. ventosae* G1 (MW386469) и *H. elongata* G3 (MW386471), по всей

**Таблица 2.** Сходство гена 16S рНК галофильных бактерий, выделенных из соленых озер и солончаков Прикаспийской низменности, с наиболее близкородственными видами

Штамм	Ближайшие родственные виды	Уровень сходства последовательностей генов 16S рНК, %
G1	<i>Halomonas ventosae</i>	99.0
G2	<i>Halomonas</i> sp.	96.8
G3	<i>Halomonas elongata</i>	100
B2	<i>Virgibacillus salinarius</i>	100
B3	<i>Virgibacillus salinarius</i>	100



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) на основе модели Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993) и MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

Всего использовано 18 последовательностей с минимальной длиной 1381 нуклеотид. Бар соответствует двум заменам на 100 нуклеотидов. Значения Bootstrap (500 повторов) показаны рядом с ветвями дерева.

видимости, относятся к видам *H. ventosae* и *H. elongata* соответственно, а штаммы *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473) – к группе видов, родственных *V. salinarius*.

### Характеристика штамма *Halomonas* sp. G2

Основным объектом дальнейших исследований являлся штамм *Halomonas* sp. G2. Содержание G+C в ДНК штамма составляло 67.3 %.

**Морфология клеток и колоний.** Палочковидные грам-отрицательные подвижные палочки размером 0.8–1.0 × 1.5–3.0 мкм. Клетки встречались поодиночке, парами или короткими цепочками (рис. 2, з). Подвижность клеток обеспечивалась за счет одного или двух боковых жгутиков, расположенных с одной стороны клетки. На элективной твердой среде штамм демонстрировал активный рост колоний округлой формы с волнистым краем, желтого и темно-палевого цвета с блеском. С увеличением

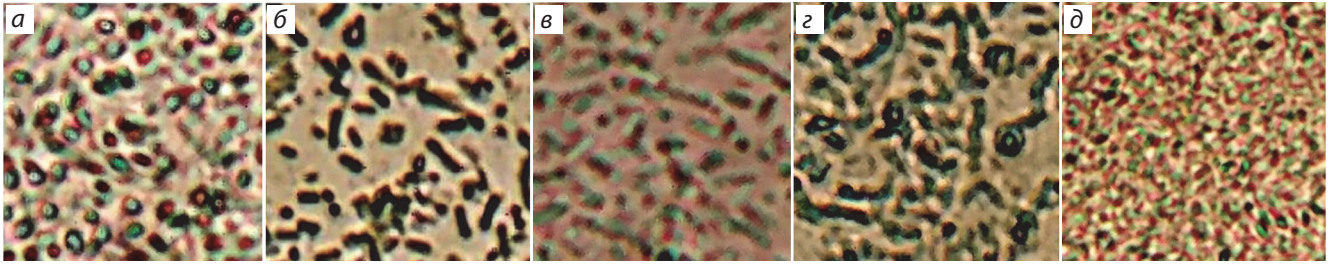


Рис. 2. Морфология клеток штаммов из проб воды и почвы: а – *V. salinarium* B2; б – *V. salinarium* B3; в – *H. elongata* G1; з – *Halomonas* sp. G2; д – *H. elongata* G3.

Световая микроскопия, увеличение  $\times 600$ .

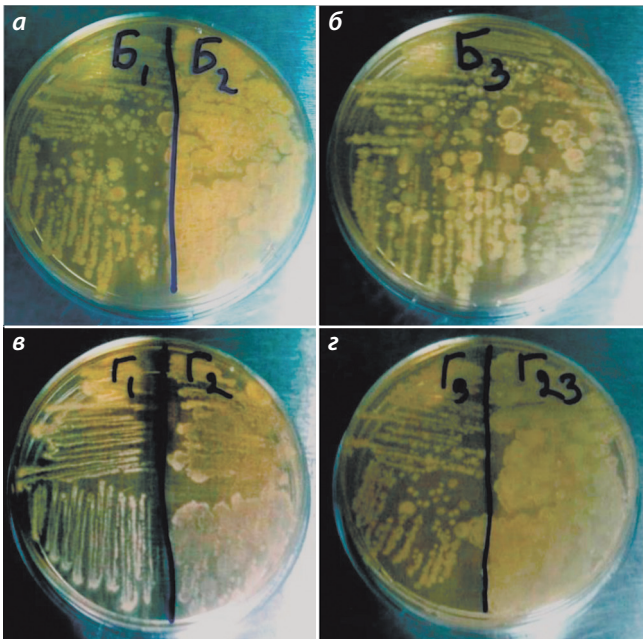


Рис. 3. Рост выделенных чистых культур бактерий на МПА: а – *V. salinarium* B2; б – *V. salinarium* B3; в – *H. elongata* G1, *Halomonas* sp. G2; з – *H. elongata* G3.

концентрации NaCl в среде культивирования в колониях бежевого цвета появлялся яркий каротиноидный пигмент. На мясо-пептонном агаре (МПА) образовывал гладкие блестящие, светло-бежевые с розовинкой, мелкие колонии округлой формы и с волнистым краем, расположенные близко друг к другу цепочкой и переходящие в сплошной рост. Во всех вариантах наблюдалась мажущая консистенция (рис. 3, з).

**Физиология роста штамма** (температура, pH, соленость). При определении оптимальных параметров роста штамм G2 отнесен к мезофилам (от 30 до 37 °C, оптимум 30 °C) и умеренным алкалофилам (pH 6–8, оптимум 7.2–7.4). Как представитель рода *Halomonas*, способен расти в широком диапазоне концентрации NaCl – от 10 до 25 %, с оптимумом 25 %; экстремальный галофил.

**Акцепторы электронов, влияние субстратов, отношение к кислороду.** Штамм G2 способен осуществлять денитрификацию, используя в качестве акцептора электронов нитраты, восстанавливая их до нитритов.

Дифференцирующие характеристики штамма G2 представлены в табл. 3. Штамм имел положительную реакцию на лизин, желатин, эктоин, лактозу и d-глюкозу; утилизировал цитрат и малонат Na. Тесты на  $\beta$ -галактозидазу, амилазу, протеазу и каталазу положительные; на оксидазу, липазу и уреазу – отрицательные. В анаэробных условиях рост не происходит.

**Чувствительность к антибиотикам.** Культура G2 отличалась чувствительностью к триметоприму из группы сульфаниамидов; фторхинолонам первого и второго поколения (ципрофлоксацин, офлоксацин, канамицин); ванкомицину из макролидной группы; рифампицину из группы рифамицинов; цефуроксиму и ампициллину из группы пенициллинов; антибиотикам третьего поколения цефалоспоринов из группы макролидов (цефтазидим, фосфомицин и кларитромицин); антибиотикам четвертого поколения цефалоспоринов (цефепим, цефаклор).

#### Характеристика изолятов G1, G3, B2, B3

Палочковидные подвижные клетки штаммов G1, G3 имели размеры 0.6–0.8  $\times$  1.6–1.9 мкм (G1) и 0.7–1.0  $\times$  1.5–2.5 мкм (G3) (см. рис. 2, в, д). Наблюдались одиночные клетки и цепочки из них. Подвижность обеспечивалась за счет жгутиков, расположенных с одной стороны клетки. Клетки штаммов B2 и B3 – подвижные, в форме палочек размерами 0.5–0.7  $\times$  1.0–2.5 мкм (B2) и 0.2–0.7  $\times$  1.0–5.0 мкм (B3). Образовывали эндоспores. Биомасса изолированных штаммов на среде МПА представлена цепочкой расположенных друг за другом колоний, различающихся формой, цветом, размером, пигментом и морфологией (см. рис. 3, а, б). На элективной агаровой среде с 5–25 % NaCl (G1, G3) и 5–10 % NaCl (B2, B3) культуры формировали колонии с липохромным пигментом.

Результаты филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК свидетельствовали о том, что ближайшим типовым штаммом (100 %) для G1 и G3 являлся штамм *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>, для B2 и B3 – *V. salarius* DSM 18441<sup>T</sup>. На дендрограмме культуры образовали общий с типовыми штаммами кластер, что позволяло причислить изолированные культуры к этим видам. Родственными культурами для G1 и G3 были *H. ventosae* GQ903443, *H. elongata* NR 074782; для B2 и B3 – *V. salarius* MK785132, *B. brevis* JF802177, *V. olivae* NR 043572, *H. arcis* MK063873, *V. salarius* NR 041270, которые объединены типичными признаками умеренных и экстремальных галофилов.

**Таблица 3.** Сравнительные дифференцирующие признаки новых штаммов рода *Halomonas* и типового штамма *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>

Фенотипические признаки	<i>H. ventosae</i> G1 (MW386469)	<i>Halomonas</i> sp. G2 (MW386470)	<i>H. elongata</i> G3 (MW386471)	<i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup> (Vreeland et al., 1980; Schwibbert et al., 2011; Kindzierski et al., 2017)
Восстановление NO <sub>3</sub> в нитриты	+	+	+	+
Субстраты				
эктоин	+	+	+	+
желатин	+	+	+	+
орнитин	+	–	+	+
лизин	+	+	+	+
цитрат натрия	+	+	–	+
малонат натрия	+	+	+	H
сахароза	–	–	–	+
глицерин	–	–	–	+
d-манноза	–	–	–	+
целлобиоза	–	–	–	+
лактоза	–	+	–	+
d-глюкоза	+	+	+	+
Продуцирует ферменты				
оксидаза	–	–	–	–
уреаза	–	–	–	+
липаза	+	–	–	H
β-галактозидаза	+	+	+	+
каталаза	+	+	+	+
амилаза	+	+	+	–
протеаза	+	+	–	–
Содержание G+C в геномной ДНК, %	65.8	67.3	66.5	63.6

Примечание. «+» – положительно; «–» – отрицательно; «H» – не исследовано.

Отличительными характеристиками, дифференцирующими культуры *H. ventosae* G1 и *H. elongata* G3, являлись: оптимум роста при 5–25 % NaCl против 32 %; pH 7.2–7.4 против 7–9; отсутствие утилизации сахарозы, глицерина, d-маннозы, целлобиозы, лактозы и продуцирования уреазы, оксидазы и протеазы (исключение G3) при концентрации NaCl в среде 5–25 % (см. табл. 3). Для штаммов *V. salarius* B2 и B3 в сравнении с типовым *V. salarius* DSM 18441<sup>T</sup> такими признаками служили: отсутствие потребности в d-маннозе, способность к продуцированию ферментов амилазы, протеазы и β-галактозидазы при концентрации NaCl в среде 5–10 % (табл. 4).

#### Характеристика родов *Halomonas* и *Virgibacillus*

Далее мы приводим краткое описание штамма нового вида *Halomonas* sp. G2 и галофильных штаммов *H. ventosae* G1, *H. elongata* G3, *V. salinarius* B2, *V. salinarius* B3, сделанное на основании проведенных фенотипических и генетических исследований.

В настоящее время род *Halomonas* включает 91 вид, среди которых *H. elongata* выступает как типовой ([http://](http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html)

[www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html](http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html)). Впервые семейство Halomonadaceae было описано в 1988 г. при объединении умеренно галофильных и морских бактерий родов *Deleya* и *Halomonas* (Franzmann et al., 1988). В течение последних трех десятилетий многие виды были отнесены к роду *Halomonas*, домену Bacteria, филу Proteobacteria, классу Gammaproteobacteria, порядку Oceanospirillales, семейству Halomonadaceae; однако на момент написания 7 видов реклассифицированы. Представители рода – граммотрицательные факультативные анаэробы, аэробы, прототрофы, мезофилы, денитрифицирующие. Продуцируют экзополисахариды; преимущественно используют кислород, нитрат или нитрит в качестве акцептора электрона; в условиях солевого стресса синтезируют эктоин, обеспечивающий защиту клеток от неблагоприятных воздействий окружающей среды (Schwibbert et al., 2011).

Род *Virgibacillus* создан в результате реклассификации рода *Bacillus* после анализа вида *Virgibacillus pantothenicus* (Heyndrickx et al., 1998; Heyrman et al., 2003). На данный момент род состоит из 27 видов, представители которых являются грамположительными облигатными



**Таблица 4.** Сравнительные дифференцирующие признаки галофильных штаммов *V. salarius* B2 и B3 с типовым *V. salarius* DSM 18441<sup>T</sup>

Фенотипические признаки	<i>V. salarius</i> B2 (MW386472)	<i>V. salarius</i> B3 (MW386473)	<i>V. salarius</i> DSM 18441 <sup>T</sup> (SA-Vb1 <sup>T</sup> = JCM 12946 <sup>T</sup> ) (Hua et al., 2008)
H <sub>2</sub> S	–	–	–
Восстановление NO <sub>3</sub> в нитриты	+	+	–
<b>Субстраты</b>			
индол	–	–	–
эскулин	H	H	+
лизин	–	+	+
цитрат натрия	+	+	–
малонат натрия	–	–	–
d-манноза	–	–	+
d-глюкоза	+	+	+
желатин	+	+	+
инозит	–	–	–
<b>Продуцирует ферменты</b>			
оксидаза	–	–	+
лактоза	–	–	H
уреаза	–	–	–
β-галактозидаза	+	+	H
каталаза	+	+	+
амилаза	+	+	H
протеаза	+	+	H
Содержание G+C в геномной ДНК, %	42.8	37.3	37.3

Примечание. «+» – положительно; «–» – отрицательно; «H» – не исследовано.

аэробами или факультативными анаэробами, умеренными галофилами, хемотаксономичными; основная жирная кислота – C<sub>15:0</sub> (Lee et al., 2012).

**Штамм нового вида *Halomonas* sp. G2.** Клетки штамма G2 – капсулированные подвижные аэробные грамотрицательные палочки, 0.8–1.0 × 1.5–3.0 мкм. Встречались поодиночке или цепочкой из 2–4 сцепленных между собой клеток. Штамм G2 – экстремальный галофил, способен расти в диапазоне 10–25 % NaCl (оптимум 25 %) и образовывать каротиноидный пигмент. На элективной твердой среде с 25 % NaCl формирует колонии округлой формы с волнистым краем, бежевого цвета с блеском, образуя участки яркого каротиноидного пигмента. Штамм растет на мясопептонном бульоне. Мезофил, температурный диапазон 30–37 °C (оптимум 30 °C). Нейтрофил, pH 6–8 (оптимум 7.2–7.4). Штамм денитрифицирующий, хемолитотрофен. Редуцирует нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; каталазо-, амилазо-, протеазо- и β-галактозидазоположительный; липазо-, оксидазо- и уреазоотрицательный. Не способен гидролизовать инозит, индол; продуцирует лизин, желатин, эктоин; в качестве источника углерода и энергии использует цитрат и малат натрия; не продуцирует орнитин; H<sub>2</sub>S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме

лактозы и d-глюкозы. Восприимчив к триметоприму, ципрофлоксацину, офлоксацину, канамицину, ванкомицину, рифампицину, цефуроксиму, ампициллину, цефтазидиму, фосфомоцину, кларитромицину, цефепиму, цефаклору. Содержание G+C в ДНК 67.3 %.

На основании физиологических, биохимических и филогенетических свойств штамм G2 представляет собой новый вид, получивший название *Halomonas* sp. G2. Отличительная характеристика изолята – продуцирование гидролитических ферментов протеазы, амилазы, β-галактозидазы и оксиредуктазы – каталазы при 25 % концентрации NaCl в среде.

Местообитание: почва (солончак типичный) на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия).

**Штаммы *Halomonas ventosae* G1 (MW386469) и *Halomonas elongata* G3 (MW386471).** Штаммы *Halomonas* G1 и G3 – аэробы, грамотрицательные, денитрифицирующие; мезофилы, прототрофы, хемолитотрофы и экстремальные галофилы (от 5 до 25 % NaCl). Не способны гидролизовать инозит; продуцируют лизин, орнитин, желатин, эктоин; редуцируют нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; утилизируют цитрат (исключение G3) и малонат натрия как источник углерода

и энергии; не продуцируют  $H_2S$  и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме d-глюкозы. Содержание G+C в ДНК для G1 и G3 составляло 65.8 и 66.5 % соответственно. На основании фенотипической и генотипической характеристик изолированные бактерии классифицированы как *H. ventosae* G1 (MW386469) и *H. elongata* G3 (MW386471).

Местообитание: солончаковые почвы (Тарумовский район, Кочубейская биосферная станция) и оз. Тарумовское на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия). Типовой штамм *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> выделен при микробиологическом исследовании оборудования для добычи соли из рапы (Нидерландские Антильские острова, южный остров Бонайре).

**Штаммы *V. salinarius* B2 (MW386472) и B3 (MW386473).** Штаммы грамположительные; являются мезофилами, нейтрофилами, хемолитотрофами, умеренными галофилами (оптимум 5 и 10 % NaCl). Культуры не способны гидролизовать инозит, малонат натрия; не продуцировали лизин (исключение B3), индол,  $H_2S$  и кислоту из d-маннозы, сахарозы, кроме d-глюкозы; редуцировали нитрат до нитрита; способны к утилизации полипептидного субстрата желатина и цитрата натрия как источника углерода. Содержание G+C в ДНК штаммов B2 и B3 составляло 42.8 и 37.3 % соответственно. На основании фенотипической и генотипической характеристик выделенные культуры классифицированы как штаммы *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473).

Местообитание: вода техногенного высокоминерализованного Берикейского озера (Дербентский район, Республика Дагестан, Россия). Типовой штамм *Virgibacillus salarius* DSM 18441<sup>T</sup> выделен из соляной корки оз. Гарса в Шотт-эль-Гарса (Сахара) в Тунисе (Hua et al., 2008).

### Биотехнологическая значимость галофильных микроорганизмов

Галофильные бактерии все чаще изучают на предмет их биотехнологического потенциала для производства биохимически активных и устойчивых ферментов к щелочному значению pH, высокой температуре и концентрации солей (Di Donato et al., 2019; Liu et al., 2019). Эти многоплановые свойства привлекательны для различных отраслей (Delgado-García et al., 2012), таких как производство ферментированных пищевых продуктов, текстильная, фармацевтическая, косметическая и кожевенная промышленность (De Lourdes Moreno et al., 2013). Большинство продуцентов внеклеточных гидролитических ферментов липазы, амилазы, протеазы, инулиназы, ксиланазы, целлюлазы, ДНКазы и пектиназы являются галофильными бактериями, в том числе штаммами родов *Halomonas* и *Virgibacillus* (Cira-Chávez et al., 2018; Liu et al., 2019; Kaitouni et al., 2020; Varrella et al., 2020).

Выделение природных штаммов в наших исследованиях позволило обнаружить новый вид *Halomonas* sp. G2 (MW386470) и новые штаммы *Halomonas* G1 (MW386469) и G3 (MW386471), *Virgibacillus* B2 (MW386472) и B3 (MW386473), способные к продуцированию гидролитических ферментов (амилаза, протеаза, лактаза, липаза, уреазы, β-галактозидаза) и оксиредуктаз (каталаза, оксидаза).

### Заключение

Настоящие исследования подтвердили биотехнологическое и научное значение галофильных денитрифицирующих бактерий, обитающих в экстремофильных экологических нишах Прикаспийской низменности Республики Дагестан. Показано, что изолированные нами штаммы бактерий родов *Halomonas* и *Virgibacillus* не являются строго приуроченными к обитанию в соленых озерах и почвах Прикаспийской низменности (Республика Дагестан, Россия), а имеют широкий ареал распространения, включающий экологические ниши о. Бонайре (Нидерландские Антильские острова) и Туниса. Выделение и изучение природных штаммов позволило обнаружить новый вид *Halomonas* sp. G2 и дополнить коллекцию уже известных штаммов, продуцирующих промышленно значимые ферменты, такие как амилаза, протеаза, лактаза, липаза, уреазы, β-галактозидаза, каталаза и оксидаза.

### Список литературы / References

- Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий. *Микробиология*. 2002;71(4):500-508. [Bulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Galchenko V.F. Study of nucleotide sequences of *nifH* genes in methanotrophic bacteria. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2002;71(4):425-432.]
- Гриднева Е.В., Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Черноусова Е.Ю., Акимов В.Н. Экофизиология литотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников Северного Кавказа. *Микробиология*. 2009;78(1):89-97. [Gridneva E.V., Grabovich M.Yu., Dubinina G.A., Chernousova E.Yu., Akimov V.N. Ecophysiology of lithotrophic sulfur-oxidizing *Sphaerotilus* species from sulfide springs in the Northern Caucasus. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2009;78(1):76-83.]
- Заварзин Г.А. Изучение микробного разнообразия в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского. *Микробиология*. 2004;73(5):598-612. [Zavarzin G.A. Microbial diversity studies at the Winogradsky Institute of Microbiology. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2004;73(5):509-522. DOI 10.1023/B:MICI.0000044242.93603.00.]
- Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П. Подбор и тестирование олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов 16S рРНК архей. *Микробиология*. 2002;71(2):283-286. [Kolganova T.V., Kuznetsov B.B., Turova T.P. Designing and testing of oligonucleotide primers for amplification and sequencing of 16S rRNA genes of archaea. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2002;71(2):243-246.]
- Кузнецов А.Е., Каленов С.В. Патент RU 2323226. Способ получения биомассы галобактерий. Бюл. № 12. 2008;6. [Kuznetsov A.E., Kalenov S.V. Russian Federation Patent RU 2323226. Method for preparing halophilic bacterium biomass. Bull. No. 12. 2008;6. (in Russian)]
- Лалов В.В., Осокина Н.В., Пиорунский Д.А., Чижиков М.А. Патент RU 2115722 C1. Способ получения биомассы галобактерий. 1998;5. [Lalov V.V., Osokina N.V., Piorunskij D.A., Chizhikov M.A. Russian Federation Patent RU 2115722 C1. Method of halophilic microorganism culturing. 1998;5 (in Russian)]
- Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. М.: Академия, 2005. [Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Laboratory Manual on Microbiology for college students. Moscow: Akademiya Publ., 2005. (in Russian)]

- Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Гасанов Р.З., Абакарова А.А., Аливердиева Д.А. Экстремофильные микробные сообщества засоленных почв и их разнообразие в регионе Прикаспийской низменности. *Аридные экосистемы*. 2017; 23(2):58-63.  
[Khalilova E.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Hasanov R.Z., Abakarova A.A., Aliverdiyeva D.A. Extremophilic microbial communities of saline soils and their diversity in the regions of the Caspian depression. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2017;7(2):116-120. DOI 10.1134/S2079096117020068.]
- Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Гасанов Р.З., Абакарова А.А., Аливердиева Д.А. Галофильные микробные сообщества и их биоразнообразие в засушливых регионах Прикаспийской низменности. *Аридные экосистемы*. 2020;26(1):94-101. DOI 10.24411/1993-3916-2020-10088.  
[Khalilova E.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Hasanov R.Z., Abakarova A.A., Aliverdiyeva D.A. Halophilic microbial communities and their biodiversity in the arid regions of the Caspian Lowland. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2020;10(1):79-85. DOI 10.1134/S2079096120010084.]
- Халилова Э.А., Нуратинов Р.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А. Углеводородоокисляющие микроорганизмы геотермального источника и их значение в оценке биоразнообразия микробных сообществ. *Аридные экосистемы*. 2014;20(1):51-58.  
[Khalilova E.A., Nuratinov R.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms of hot springs and their significance in the assessment of the biodiversity of microbial communities. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2014;4(1):25-30. DOI 10.1134/S2079096114010028.]
- Черноусова Е.Ю., Акимов В.Н., Гриднева Е.В., Дубинина Г.А., Грабович М.Ю. Филогенетический *in situ/ex situ* анализ микробного сообщества серного мата из термального сульфидного источника Северного Кавказа. *Микробиология*. 2008;77(2):255-260.  
[Chernousova E.Yu., Akimov V.N., Gridneva E.V., Dubinina G.A., Grabovich M.Yu. Phylogenetic *in situ/ex situ* analysis of a sulfur mat microbial community from a thermal sulfide spring in the North Caucasus. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2008;77(2):219-223. DOI 10.1134/S002626170802015X.]
- Banciu H.L., Enach M., Rodriguez R.M., Oren A., Ventosa A. Ecology and physiology of halophilic microorganisms – Thematic issue based on papers presented at Halophiles 2019 – 12th International Conference on Halophilic Microorganisms, Cluj-Napoca, Romania, 24–28 June, 2019. *FEMS Microbiol. Lett.* 2020;366(23):1-4. DOI 10.1093/femsle/fnz250.
- Baumann P., Baumann L. The marine gram-negative Eubacteria. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (Eds.). *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin: Springer-Verlag, 1986;2:1302-1331.
- Begmatov Sh.A., Selitskaya O.V., Vasileva L.V., Berestovskaja Yu.Yu., Manucharova N.A., Drenova N.V. Morphophysiological features of some cultivable bacteria from saline soils of the Aral Sea region. *Eur. J. Soil Sci.* 2020;53(1):90-96. DOI 10.1134/S1064229320010044.
- Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7(6):1513-1523.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Atomi H. Editorial overview: Extremophiles: from extreme environments to highly stable catalysts. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015;25:88-96.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 2009;10(421):1-9. DOI 10.1186/1471-2105-10-421.
- Cira-Chávez L.A., Guevara-Luna J., Soto-Padilla M.Y., Román-Ponce B., Vásquez-Murrieta M.S., Estrada-Alvarado M.I. Kinetics of halophilic enzymes. In: Rajendran L., Fernandez C. (Eds.). *Kinetics of Enzymatic Synthesis*. IntOpen, 2018;1-25. DOI 10.5772/intechopen.81100.
- Corral P., Amoozegar M.A., Ventosa A. Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine Drugs*. 2020;18:2-33. DOI 10.3390/md18010033.
- Delgado-García M., Valdivia-Urdiales B., Aguilar-Gonzalez C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodriguez-Herrera R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J. Sci. Food Agric.* 2012;92(13):2575-2580. DOI 10.1002/jsfa.5860.
- De Lourdes Moreno M., Pérez D., García M.T., Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*. 2013;3(1):38-51. DOI 10.3390/life3010038.
- Di Donato P., Buono A., Poli A., Finore I., Abbamondi R.G., Nicolaus B., Lama L. Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses. *Sustainability*. 2019;11:149-169. DOI 10.3390/su11010149.
- Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Appl. Microbiol.* 1988;11:16-19.
- Ghosh S., Kumar S., Kumar Khare S. Microbial diversity of saline habitats: an overview of biotechnological applications. In: Giri B., Varma A. (Eds.). *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions* (Ser. Soil Biology. 56). Cham: Springer, 2019;65-92. DOI 10.1007/978-3-030-18975-4\_4.
- Gordon R.E., Smith M.M. Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J. Bacteriol.* 1953;66(1):41-48.
- Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G., Logan N.A. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998;48(1):99-106. DOI 10.1099/00207713-48-1-99.
- Heyrman J., Logan N.A., Busse H.-J., Balcaen A., Lebbe L., Rodriguez-Diaz M., Swings J., De Vos P. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003;53(2):501-511. DOI 10.1099/ijs.0.02371-0.
- Holt J.R., Corey D.P., Eatock R.A. Mechano-electrical transduction and adaptation in hair cells of the mouse utricle, a low-frequency vestibular organ. *J. Neurosci.* 1997;17:8739-8748.
- Hua N.P., Hamza-Chaffai A., Vreeland R.H., Isoda H., Naganuma T. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008;58:2409-2414. DOI 10.1099/ijs.0.65693-0.
- Kaitouni L.B.D., Anissi J., Sendide K., Hassouni M.E. Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. *Annals Microbiol.* 2020; 70:33. DOI 10.1186/s13213-020-01570-z.
- Kindzierski V., Raschke S., Knabe N., Siedler F., Scheffer B., Grau K.P., Pfeiffer F., Oesterheld D., Marin-Sanguino A., Kunte H.J. Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: a case study for integrative systems biology. *PLoS One*. 2017;12(1):1-22. DOI 10.1371/journal.pone.0168818.
- Kushner D.J., Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez-Varela F. (Ed.). *Halophilic Bacteria*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1988;1:109-138.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.). New York: John Wiley & Sons, 1991;115-175.
- Lee S.-Y., Kang C.-H., Oh T.K., Yoon J.H. *Virgibacillus campisalis* sp. nov., from a marine solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012;62:347-351. DOI 10.1099/ijs.0.033084-0.



- Liu C., Baffoe D.K., Zhang M. Halophile, an essential platform for bio-production. *J. Microbiol. Methods*. 2019;166:105704. DOI 10.1016/j.mimet.2019.105704.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 1961;3:208-218. DOI 10.1016/S0022-2836(61)80047-8.
- Namsaraev Z.B., Babasanova O.B., Dunaevsky Y.E., Akimov V.N., Barkhutova D.D., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia. *Microbiology*. 2010;79(4):491-499.
- Owen R.J., Hill L.R., Lapage S.P. Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers. *Biopolymers*. 1969; 7:503-516.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977;84:5463-5467.
- Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S.C., Klenk H.P., Pfeiffer F., Oesterhelt D., Kunte H.J. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup>. *Environ. Microbiol.* 2011;13:1973-1994. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02336.
- Steel K.J. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. Gen. Microbiol.* 1961;25:297-306.
- Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993;10:512-526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2725-2729.
- Thomas J.C., Khour R., Neeley C.K., Akroush A.M., Davies E.C. A fast CTAB method of human DNA isolation for polymerase chain reaction applications. *Biochem. Educ.* 1997;25(4):233-235. DOI 10.1016/S0307-4412(97)00122-2.
- Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-570. DOI 10.1093/bioinformatics/10.5.569.
- Varrella S., Tangherlini M., Corinaldesi C. Deep hypersaline anoxic basins as untapped reservoir of polyextremophilic prokaryotes of biotechnological interest. *Mar. Drugs*. 2020;18(2):91. DOI 10.3390/md18020091.
- Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980;3(2):485-495. DOI 10.1099/00207713-30-2-485.
- Wang T., Zhang L., Bo L., Zhu Y., Tang X., Liu W. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl by *Halomonas* bacteria. *IOP Conf. Ser.: Earth. Environ. Sci.* 2019;237(5):052033. DOI 10.1088/1755-1315/237/5/052033.

#### ORCID ID


S.C. Kotenko orcid.org/0000-0002-7099-873X  
E.A. Islammagomedova orcid.org/0000-0002-9897-1256  
A.A. Abakarova orcid.org/0000-0003-0888-9580  
N.A. Chernyh orcid.org/0000-0003-3092-7539  
D.A. Aliverdieva orcid.org/0000-0002-4784-4548

**Благодарности.** Работа Н.А. Черных выполнена при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.Н. Детковой за помощь в определении G+C состава в ДНК.

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

Поступила в редакцию 12.09.2020. После доработки 02.02.2021. Принята к публикации 02.02.2021.


## Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске

А.В. Бардашева<sup>1</sup>, Н.В. Фоменко<sup>2</sup>, Т.В. Калымбетова<sup>2</sup>, И.В. Бабкин<sup>1</sup>, С.О. Кретьен<sup>3</sup>, Е.В. Жираковская<sup>1</sup>,  
Н.В. Тикунова<sup>1</sup>, В.В. Морозова<sup>1</sup> 

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

<sup>2</sup> АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия


 morozova@niboch.nsc.ru

**Аннотация.** Проанализированы 72 клинических штамма *Klebsiella* spp., изолированных в Новосибирске из образцов, полученных от людей. Проведена видовая идентификация штаммов по последовательностям генов 16S рРНК и *rpoB*. Показано, что в популяции клебсиелл доминировали штаммы *Klebsiella pneumoniae* (57 штаммов), остальные 15 штаммов относились к видам *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* и *K. quasipneumoniae*. Методом молекулярного серотипирования с использованием последовательности гена *wzi* штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к двадцати одному К-серотипу, при этом большую долю составляли вирулентные серотипы K1 и K2. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae*, полученные от госпитализированных пациентов, обладали максимально выраженной резистентностью к различным классам антибиотиков в отличие от остальных видов клебсиелл. Методом ПЦР в реальном времени обнаружено, что в исследованной популяции присутствуют гены семейств *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* и ген *bla<sub>OXA-48</sub>*, являющиеся генетическими детерминантами резистентности к бета-лактамам. Показано, что присутствие последовательности *bla<sub>CTX</sub>* коррелирует с продукцией штаммом бета-лактамаз расширенного спектра, а фенотипическая устойчивость к карбапенемам обусловлена наличием гена *bla<sub>OXA-48</sub>*. При этом генов карбапенемаз *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* обнаружено не было. Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам были найдены гены *aph(6)-IId* и *aadA*, однако их наличие не всегда совпадало с фенотипической резистентностью. Устойчивость к фторхинолонам у большинства штаммов сопровождалась присутствием генов *aac(6)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxV*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях, при этом наличие только генов *oqxA* и/или *oqxV* не коррелировало с устойчивостью к фторхинолонам. Таким образом, обнаружение *bla<sub>CTX</sub>* и *bla<sub>OXA-48</sub>* может быть использовано для быстрого выявления продукции бета-лактамаз расширенного спектра и определения резистентности клебсиелл к карбапенемам, а выявление генов *aac(6)-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS* – для быстрого определения устойчивости к фторхинолонам.

**Ключевые слова:** *Klebsiella*; молекулярное серотипирование; бета-лактамы; фторхинолоны; аминогликозиды; бета-лактамазы расширенного спектра; металло-бета-лактамазы; диско-диффузионный анализ; генетические детерминанты антибиотикорезистентности.

**Для цитирования:** Бардашева А.В., Фоменко Н.В., Калымбетова Т.В., Бабкин И.В., Кретьен С.О., Жираковская Е.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В. Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):234-245. DOI 10.18699/VJ21.49-0


## Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk

A.V. Bardasheva<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>2</sup>, T.V. Kalymbetova<sup>2</sup>, I.V. Babkin<sup>1</sup>, S.O. Chretien<sup>3</sup>, E.V. Zhirakovskaya<sup>1</sup>,  
N.V. Tikunova<sup>1</sup>, V.V. Morozova<sup>1</sup> 

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

<sup>2</sup> JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsivyan of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

 morozova@niboch.nsc.ru

**Abstract.** 72 clinical strains of *Klebsiella* spp. isolated from samples obtained from humans in Novosibirsk, Russia, were analyzed. Species identification of strains was performed using 16S rRNA and *rpoB* gene sequences. It was revealed that *Klebsiella pneumoniae* strains were dominant in the population (57 strains), while the remaining 15 strains were *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* and *K. quasipneumoniae*. By molecular serotyping using the *wzi* gene sequence, *K. pneumoniae* strains were assigned to twenty-one K-serotypes with a high proportion of virulent K1- and K2-serotypes. It was found that *K. pneumoniae* strains isolated from the hospitalized patients had a higher resistance to antibiotics compared to the other *Klebsiella* species. Real-time PCR revealed that the population contained genes of the *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* families and the *bla<sub>OXA-48</sub>* gene, which are the genetic determinants of beta-lactam resistance. It has been shown that the presence of the *bla<sub>CTX</sub>* sequence correlated with the production of extended-spectrum beta-lactamases, and phenotypic resistance to car-

bapenems is due to the presence of the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene. At the same time, the carbapenemase genes *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* were not detected. Among the aminoglycoside resistance genes studied, the *aph*(6)-*Id* and *aadA* genes were found, but their presence did not always coincide with phenotypic resistance. Resistance to fluoroquinolones in the vast majority of strains was accompanied by the presence of the *aac*(6')-*Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB*, and *qnrS* genes in various combinations, while the presence of the *oqxA* and/or *oqxB* genes alone did not correlate with resistance to fluoroquinolones. Thus, the detection of *bla*<sub>CTX</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> can be used to quickly predict the production of extended-spectrum beta-lactamases and to determine the resistance of *Klebsiella* to carbapenems. The detection of the *aac*(6')-*Ib-cr* and/or *qnrB/qnrS* genes can be used to quickly determine resistance to fluoroquinolones.

Key words: *Klebsiella*; molecular serotyping; beta-lactam; fluoroquinolone; aminoglycoside; extended-spectrum beta-lactamases; metallo-beta-lactamases; disco-diffusion analysis; genetic determinants of antibiotic resistance.

**For citation:** Bardasheva A.V., Fomenko N.V., Kalymbetova T.V., Babkin I.V., Chretien S.O., Zhirakovskaya E.V., Tikunova N.V., Morozova V.V. Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):234-245. DOI 10.18699/VJ21.49-0 (in Russian)

## Введение

Клебсиеллы представляют собой род грамотрицательных инкапсулированных неподвижных бактерий, относящихся к семейству Enterobacteriaceae порядка Enterobacteriales. Род насчитывает более 12 видов, из которых чаще всего встречаются *Klebsiella pneumoniae* и *K. oxytoca*. Клебсиеллы являются частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, кожных покровов и верхних дыхательных путей здоровых людей (Broberg et al., 2014). В то же время они служат одной из наиболее распространенных причин как нозокомиальных, так и внебольничных инфекций, включая инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, пневмонию, неонатальный абсцесс и гнойный абсцесс печени (Podschun, Ullmann, 1998; Mukherjee et al., 2020).

Для лечения пациентов с клебсиелльными инфекциями используют бета-лактамы антибиотиков, фторхинолоны и аминогликозиды (Galal et al., 2019). При этом основными в терапии являются бета-лактамы, которые блокируют синтез клеточной стенки бактерий и наименее токсичны для человека. Применение данного класса антибиотиков ограничено способностью многих штаммов клебсиелл продуцировать бета-лактамазы, расщепляющие бета-лактамы антибиотиков (Козлова и др., 2018). Традиционно существуют две классификации бета-лактамаз – функциональная и структурная. Первая основана на их способности расщеплять различные классы бета-лактамов и на чувствительности к ингибиторам, таким как clavulanic acid, sulbactam and tazobactam (функциональные группы 1, 2 и 3). Вторая классификация (структурная) распределяет лактамазы по молекулярным классам А, В, С и D соответственно сходству и различиям их белковых последовательностей (Bush, Jacoby, 2010). Серьезную проблему с практической точки зрения представляют бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), относящиеся ко второй функциональной группе. Они характеризуются способностью расщеплять различные классы бета-лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы. К БЛРС относятся ферменты семейств TEM, SHV, CTX-M, OXA и др. (Ghargah et al., 2017; Galal et al., 2019). На сегодняшний день для каждого семейства бета-лактамаз известно большое количество аллельных вариантов, обеспечивающих устойчивость к третьему поколению цефалоспоринов, монобактамам и карбапенемам (Liakouroulos et al., 2016). Помимо функциональной и структурной классификации, ферменты,

гидролизующие бета-лактамы, разделяются на два типа по механизму действия: сериновые бета-лактамазы и металло-бета-лактамазы (МБЛ), требующие двухвалентных катионов, обычно цинка, в качестве кофакторов (Walsh et al., 2005). Известно около десяти семейств металло-бета-лактамаз, а именно: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB и др. Наиболее широко распространены лактамазы семейств IMP, VIM и NDM (Тапальский и др., 2012).

Для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, наряду с бета-лактамами антибиотиками используют аминогликозиды, которые способны связывать молекулы антибиотика с субъединицей 16S рРНК бактерии и ингибировать синтез белка. Самый распространенный механизм бактериальной резистентности к аминогликозидам – продукция аминогликозид-модифицирующих ферментов. Аминогликозид-модифицирующие ферменты представляют собой фосфотрансферазы (APH), ацетилтрансферазы (AAC) или нуклеотидилтрансферазы (ANT) (Ramirez, Tolmasky, 2010).

Еще одним используемым классом антибиотиков являются фторхинолоны, которые воздействуют на ДНК-гиразу и ДНК-топоизомеразу IV (Машковский, 2005). К основным механизмам резистентности грамотрицательных бактерий к данным антибиотикам относятся модификация антибиотика, например с использованием плазмид-кодируемой аминогликозидацетилтрансферазы AAC (6')-Ib-cr, защита мишени (семейство плазмидных генов *qnr*) и система эффлюкса, например OqxAB-ToIC RND, гены которой находятся в хромосоме большинства штаммов *K. pneumoniae* (Yang et al., 2014; Hooper, Jacoby, 2015).

В последние годы заметной проблемой стал рост резистентности клебсиелльных штаммов, в особенности внутрибольничных изолятов, ко всем клинически значимым антибиотикам. Именно резистентность делает клебсиелл лидерами среди оппортунистических патогенов (Чеботарь и др., 2020). Цель нашего исследования – анализ генетических и фенотипических маркеров резистентности, включая бета-лактамы, фторхинолоны и аминогликозиды, клинических изолятов клебсиелл, выделенных в г. Новосибирске (Россия).

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе исследовали 72 штамма бактерий рода *Klebsiella*, выделенных в Новосибирске



из клинических образцов. Чистые культуры бактерий получали, как описано ранее (Козлова и др., 2017); принадлежность к роду *Klebsiella* определяли по культурально-морфологическим признакам с использованием селективных сред – агара МакКонки (BioMerieux, Франция) и агара Левина (OXOID, Великобритания). Штаммы депонировали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины (КЭМТК ИХБФМ) СО РАН ([http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection)).

**Идентификация бактериальных штаммов.** Видовую принадлежность бактерий устанавливали секвенированием последовательностей гена 16S рРНК (1342 п.н.) (Козлова и др., 2017) и подтверждали секвенированием фрагмента гена *rpoB* (501 п.н.) (Morozova et al., 2019). Для определения вида использовали наиболее близкие референсные последовательности рода *Klebsiella*, присутствующие в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), при уровне сходства последовательностей не менее 98 %. Последовательности генов 16S рРНК депонировали в базу данных NCBI GenBank под номерами MT436838–MT436841, MT436848, MT436849, MT436851–MT436856, MT439052–MT439054, MT439056–MT439058, MT439061–MT439079, MT439081–MT439103, MT439106, MT489341–MT489346. Последовательности генов *rpoB* депонировали в базу данных NCBI GenBank под номерами MT447755–MT447758, MT447760–447768, MT447770, MT447771, MT447773–MT447775, MT447778–MT447798, MT447825, MT447828–MT447830.

**Молекулярное серотипирование штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*.** Серотипирование коллекционных штаммов проводили путем секвенирования последовательностей гена *wzi*, относящегося к кластеру генов синтеза полисахаридной капсулы клебсиелл, как описано ранее (Brisse et al., 2013; Morozova et al., 2019). Для определения серотипа использовали наиболее близкие последовательности гена *wzi* референсных штаммов *K. pneumoniae*, присутствующие в базе данных NCBI GenBank. В ходе работы молекулярное серотипирование было проведено для 13 коллекционных штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*. Последовательности генов *wzi* были депонированы в базу данных NCBI GenBank под номерами MT434694, MT447742–MT447754. Остальные коллекционные штаммы *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae* были типированы ранее (Morozova et al., 2019).

**Оценку гипермукоидности штаммов** проводили, используя струнный тест (Lee H.C. et al., 2006). Для этого стандартной бактериологической петлей растягивали слизистый тяж из бактериальных колоний, выращенных на кровяном агаре с 5 % овечьей крови, при 37 °С в течение ночи. При формировании вязкой нити длиной >10 мм штаммы оценивались как гипермукоидные.

**Определение фенотипической антибиотикорезистентности штаммов.** Антибиотикорезистентность штаммов выявляли диско-диффузионным методом согласно рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST, <https://eucast.org>) с использованием агара Мюллера–Хинтона (OXOID, Великобритания). Иссле-

довали чувствительность штаммов к следующим антибиотикам (OXOID): амоксициллин/клавулановая кислота (AMP/CAL, 20/10 мкг); ампициллин/сульбактам (AMP/SUL, 10/10 мкг); пиперациллин/тазобактам (PIP/TZB, 30/10 мкг); цефтазидим (CAZ, 10 мкг); амикацин (AMK, 30 мкг); гентамицин (GEN, 10 мкг); левофлоксацин (LEV, 5 мкг); ципрофлоксацин (CIP, 5 мкг); имипенем (IPM, 10 мкг); меропенем (MEM, 10 мкг); хлорамфеникол (CLM, 30 мкг); азтреонам (ATM, 30 мкг). Штамм *E. coli* ATCC 25922, не обладающий резистентностью к антибиотикам, использовали в качестве контроля.

**Фенотипическое определение БЛРС.** Выявление БЛРС, резистентных к клавуланат-защищенным пенициллинам, проводили, как описано ранее (Hoa et al., 1998; Эйдельштейн, 2001). Штамм *K. pneumoniae* ATCC 700603, продуцирующий БЛРС, использовали в качестве положительного контроля.

**Выявление продукции металло-бета-лактамаз.** Продукцию МБЛ штаммами клебсиелл исследовали методом двойных дисков с использованием этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) по методу, описанному ранее (Lee K. et al., 2001; Yong et al., 2002; Иванов, Егоров, 2008). Увеличение на 8 мм зоны ингибирования роста вокруг диска, содержащего антибиотик и ЭДТА, по сравнению с исходным диском с антибиотиком, интерпретировали как положительный результат (Yong et al., 2002).

**Выявление генов антибиотикорезистентности методом ПЦР в реальном времени.** Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл суспензии клеток *Klebsiella* spp. с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Гены резистентности выявляли с использованием олигонуклеотидов, представленных в табл. 1. Также штаммы анализировали на наличие генов бета-лактамаз семейства OXA: *bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>OXA-10</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*; генов устойчивости к карбапенемам семейств *kpc*, *vim*, *ndm*, *imp*; генов устойчивости к аминогликозидам *aac3*, *aph6*, *ant2*, *ant6*; гена устойчивости к фторхинолонам *qnrA*. Перечисленные гены обнаружены не были, и последовательности соответствующих олигонуклеотидов не приводятся.

ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием амплификатора с флуоресцентной детекцией CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Условия амплификации: прогрев при 94 °С – 1 мин, далее 50 циклов (94 °С – 10 с, 60 °С – 20 с).

## Результаты

### Видовая принадлежность, молекулярное серотипирование и выявление гипермукоидности

Из 1512 клинических образцов от пациентов с разными заболеваниями было выявлено 72 (4.8 %) образца, содержащих клебсиеллы. Из них 46 штаммов были выделены из образцов от амбулаторных больных, а 26 штаммов – от госпитализированных пациентов. В результате видовой идентификации с использованием генов 16S рРНК и *rpoB* среди штаммов от амбулаторных больных было выделено 34 штамма *K. pneumoniae* (74 %), 5 – *K. grimontii*, 4 – *K. aerogenes*, 2 – *K. oxytoca* и 1 – *K. quasipneumoniae*.

**Таблица 1.** Синтетические олигонуклеотиды, использованные для выявления генов резистентности

Ген/семейство генов	Олигонуклеотид	Последовательность олигонуклеотида
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	Fshv	CCTTTTTCGCCAGATC
	Rshv	CCTCATTCAAGTTCCGTT
	SHV	(ROX)ACAACGTCACCCGCTTGACCGCT-BHQ2
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TemF	TGTGGCGCGGTATTATCCCGT
	TemR	AGTACTCACCAGTCACAGAA
	TEM	(SIMA)GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCA-BHQ1
<i>bla<sub>CTX</sub></i>	CTX	(SIMA)TGCCACCACCAACGATATCGCGGT-BHQ1
	CTX9	(SIMA)TGCCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGC-BHQ1
	Fctx	AAGACCGGCAGCGGCGACTA
	Rctx1	GAACCAGCGGTGCGTGGTT
	Rctx2	GAACCAGCGGCGCACGACC
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA48	(ROX)ACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGG-BHQ2
	FOXA48	GCGCAGCCAGCGTATTGTCAA
	F1OXA48	GCGTAGTCAGCGCATCGTGAA
	ROXA48	TTAGCCCGAATAATATAGTC
<i>aph(6)-Id</i>	Aph6F	ATCAAAAACGCAGGTTGTCA
	Aph6R	GAGGCATTGCTCATCATTGA
	Aph6	(ROX)TGACTACGTCCACGCGCGATTATAG-BHQ2
<i>aadA</i>	Raad	AGCGACATCCTTCGGCGC
	Faad	GCTGGCGATGAGCGAAATGT
	aadA	(SIMA)ACCTTGTCTCGCATTGGTACAGCG-BHQ2
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	IbcrF	GACGTACAGGAACAGTACT
	IbcrR	CAATCGGCTCTCCATTCA
	Ibcr	(ROX)AGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGCTACT-BHQ2
<i>oqxB</i>	FOqxB	CTGTTTGGCTGGATTTCC
	ROqxB	CAGGTACACCGCAAACAC
	OqxB	(SIMA)CCACGGCGTCCAAGCGTTTTGCCTACCA-BHQ1
	OqxB2	(SIMA)CCACGGCGTCCGAGGTTTTGCTACCA-BHQ1
<i>oqxA</i>	OqxAF	CAAGAGCCAAAACGCAGG
	OqxAR	GGGAGACGAGTTGGTAT
	OqxAZ	(ROX)CGCAAAGCGAGGCGAACCACCGA-BHQ2
<i>qnrB</i>	QnrBF	CTGTGGGAAAACCGTTGGA
	QnrBR	GTCAGATCGCAATGTGTGAA
	QnrBZ	(SIMA)CCAGGTACTGGGCGGACGTTTCAG-BHQ1
<i>qnrS</i>	QnrSF	CAATTTATGCCACGCCGAA
	QnrSR	GGCTGCAATTTGATACCTGA
	QnrSZ	(ROX)TGATCGACTTTGCGGGGATCTAAACCG-BHQ2

Среди штаммов от госпитализированных пациентов было 23 штамма *K. pneumoniae* (88 %), 2 – *K. grimontii* и 1 – *K. aerogenes*.

Методом молекулярного серотипирования по последовательности гена *wzi* был выявлен 21 К-серотип (табл. 2). К наиболее вирулентным серотипам К1 и К2 принадлежали 15 штаммов от амбулаторных больных и 7 штаммов от госпитализированных пациентов. Из образцов, взятых от пациентов с диареей при поступлении в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска, было

выявлено 4 штамма К47-серотипа. Еще 11 штаммов (серотипы К22/К30 и К17) были получены от пациентов клиники Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна (ННИИТО). К-серотип некоторых штаммов определить не удалось; можно было лишь заключить, что данный штамм относится к некоей группе серотипов (см. табл. 2). По-видимому, для таких штаммов необходимо проводить серотипирование иммунологическими методами или секвенировать весь кластер генов синтеза полисахаридной капсулы (35 тыс. п. н.).

**Таблица 2.** Серотипы и гипермукоидность штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*

К-серотип	Кол-во штаммов данного К-серотипа/ кол-во гипермукоидных штаммов	
	Амбулаторные пациенты	Госпитализированные пациенты
K1	5/1	1/1
K1/KN2*	2/1	–
K2	8/1	6/2
K3/K31*	1/1	–
K5	1/1	–
K6/K64*, **	2	–
K9	1	–
K10	1	–
K17	–	4
K22/K30*	–	7/1
K24	–	1
K25	3/1	–
K34/K57*	–	2/1
K38	2	–
K43	1	–
K47	4	1
K62	1	–
K71	1	–
K80	1	–
K140	1	–
K13/K46/K61/K21*	–	1

Примечание. К-серотипы идентифицированы методом молекулярного серотипирования с использованием последовательности гена *wzi*.

\* Последовательности гена *wzi* недостаточно для точного определения серотипа; \*\* один из штаммов (KQ\_1250) относился к виду *K. quasipneumoniae*.

Количество гипермукоидных среди штаммов *K. pneumoniae* от амбулаторных и госпитализированных больных составило 13 и 19 % соответственно. Этот фактор патогенности присутствовал у штаммов, относившихся к разным К-серотипам (см. табл. 2).

#### Фенотипическая резистентность к антибиотикам

Среди штаммов от амбулаторных больных чаще выявлялась резистентность к ампициллин/клавуланату (более 40 % случаев), почти не встречалась резистентность к карбапенемам, БЛРС продуцировали 28 % штаммов. Штаммов, продуцирующих МБЛ, не выявлено. Среди штаммов от госпитализированных пациентов резистентность к разным классам антибиотиков оказалась выше (см. рисунок). Свыше 70 % штаммов были нечувствительны к защищенным пенициллинам, более 40 % проявляли резистентность к меропенему, 11.5 и 60 % штаммов являлись продуцентами МБЛ и БЛРС соответственно. Также среди штаммов от амбулаторных и госпитализированных пациентов было выявлено соответственно 21.7 и 54 % полирезистентных штаммов, обладавших устойчивостью к четырем классам антибиотиков.

#### Генетические детерминанты резистентности штаммов от амбулаторных больных

**Штаммы, чувствительные к использованным антибиотикам.** В ходе исследования было показано, что 30 (65 %) штаммов *Klebsiella* spp., полученных от амбулаторных больных, чувствительны к использованным антибиотикам либо резистентны только к одному-двум из них (табл. 3). В то же время у большинства штаммов были обнаружены гены бета-лактамаз семейства *shv*, а также хромосомные гены *oqxA* и *oqxB* системы эффлюкса, которая должна способствовать выведению фторхинолонов из клетки. Наличие генов *oqxA* и *oqxB* у чувствительных штаммов согласуется с литературными данными, так как известно, что эти гены присутствуют у большинства штаммов *K. pneumoniae* (Yang et al., 2014; Hooper, Jacoby, 2015). Штамм КР\_2634 содержал ген *aadA*, но был чув-



Фенотипическая резистентность клинических штаммов клебсиелл к антибиотикам.



**Таблица 3.** Гены резистентности, выявленные у амбулаторных штаммов, чувствительных к использованным антибиотикам

Наименование штамма (К-серотип)	Происхождение штаммов	Выявленные гены	Антибиотики, к которым штамм устойчив (I – промежуточная резистентность)
KP_270 (K43) KG_1621 KG_2641 KG_3113 KG_3768 KG_3770	Фекалии (ОКИ), моча	–	–
KO_2335	Фекалии (ОКИ)	<i>oqxA</i>	–
KP_1967 (K38) KP_2686 (K47)	Кожные повреждения, фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	–
KP_2291 (K25) KP_2646 (K71) KP_2405 (K1)	Фекалии (ОКИ), мазок из носоглотки	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA, oqxB</i>	– –
KP_2634 (K62)	Моча	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>aadA</i> <i>oqxA, oqxB</i>	– – –
KP_356 (K80)	Фекалии	–	CIP (I)
KA_2531 KA_2891	Фекалии (ОКИ), мазок из носоглотки	–	AMP/CAL
KQ_1250 (K6/K64)	Гинекологический мазок	<i>oqxA, oqxB</i>	CIP
KO_2487	Фекалии (ОКИ)	– <i>oqxA</i>	CAZ (I) –
KP_2452 (K47)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	PIP/TZB (I)
KP_2505 (K5)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA, oqxB</i>	PIP/TZB (I) –
KP_3647 (K1)	Мазок из глотки	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA</i>	AMP/CAL –
KP_3729 (K2)	Мазок из носоглотки	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA</i>	– CIP (I)
KP_3908 (K38)	Мазок из носоглотки	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA</i>	PIP/TZB –
KP_2810 (K1)	Гинекологический мазок	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA</i>	AMP/SUL, PIP/TZB (I) –
KA_2890	Мазок из носоглотки	–	CAZ (I), AMP/CAL
KP_1751 (K140)	Фекалии (ОКИ)	–	PIP/TZB (I) CIP (I)
KP_3632 (K1) KP_3649 (K1/KN2)	Фекалии	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA, oqxB</i> Н. о.	– LEV (I), CIP CLM
KP_3646 (K1)	Мазок из глотки	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA, oqxB</i> Н. о.	– LEV (I), CIP (I) CLM
KP_3425 (K10)	Гинекологический мазок	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA, oqxB, qnrS</i>	PIP/TZB (I) LEV (I), CIP

Примечание. Здесь и в табл. 4, 5: KA – *K. aerogenes*, KG – *K. grimontii*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*, KQ – *K. quasipneumoniae*. Номер штамма соответствует номеру в КЭМТК ИХБФМ СО РАН. ОКИ – острая кишечная инфекция; СДС – синдром диабетической стопы. Определяли чувствительность штаммов к следующим антибиотикам: амоксициллин/клавулановая кислота (AMP/CAL, 20/10 мкг); ампициллин/сульбактам (AMP/SUL, 10/10 мкг); пиперациллин/тазобактам (PIP/TZB, 30/10 мкг); цефтазидим (CAZ, 10 мкг); амикацин (АМК, 30 мкг); гентамицин (GEN, 10 мкг); левофлоксацин (LEV, 5 мкг); ципрофлоксацин (CIP, 5 мкг); имипенем (IPM, 10 мкг); меропенем (MEM, 10 мкг); хлорамфеникол (CLM, 30 мкг); азтреонам (ATM, 30 мкг). Н. о. – не определяли.

**Таблица 4.** Гены резистентности, выявленные у амбулаторных штаммов, устойчивых к использованным антибиотикам

Наименование штамма (К-серотип)	Происхождение штаммов	Выявленные гены	Антибиотики, к которым штамм устойчив (I – промежуточная устойчивость)
KP_3041 (K3/K31)	Отделяемое из гнойной раны при СДС	<i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB – –
KA_2420	Фекалии (ОКИ)	– – H.o.	AMP/CAL, PIP/TZB (I) IPM ATM, CLM
KP_2473 (K47)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>SHV</sub></i> – H.o.	CAZ (I), PIP/TZB (I) CIP (I) ATM (I)
KP_2685 (K47)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL – – ATM
KP_2827 (K25)	Гинекологический мазок	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H.o.	CAZ (I), AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) – CLM
KP_2826 (K9)	Гинекологический мазок	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>qnrB</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) AMK (I) – ATM
KP_2337 (K13/K64)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL GEN LEV (I), CIP ATM
KP_2548 (K2), KP_2576 (K2)	Моча	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2574 (K2)	Моча	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2728 (K2)	Моча	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2946 (K2)	Моча	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2786 (K25)	Гинекологический мазок	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV (I), CIP ATM
KP_2554 (K2)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV (I), CIP ATM, CLM
KP_2573 (K2)	Фекалии (ОКИ)	<i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV (I), CIP ATM, CLM
KP_3597 (K1/KN2)	Фекалии	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , <i>bla<sub>CTX</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H.o.	IPM, MEM, CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV (I), CIP ATM, CLM

ствителен к аминогликозидам, тогда как резистентный к ципрофлоксацину штамм КР\_3425 обладал, помимо генов *oqxA* и *oqxB*, плазмидным геном *qnrS* (см. табл. 3). По-видимому, присутствие одиночных генов резистентности в клетках клебсиелл не всегда коррелирует с проявлением фенотипической резистентности, наличие которой зависит от экспрессии этих генов или может быть опосредовано другими механизмами.

**Штаммы, устойчивые к использованным антибиотикам.** В эту группу были объединены штаммы, устойчивые к трем и более антибиотикам. При этом устойчивость к двум или более защищенным пенициллинам (AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB) сопровождалась наличием генов семейств *bla<sub>SHV</sub>* и *bla<sub>TEM</sub>* у всех штаммов, кроме КА\_2420, КР\_2826 и КР\_2827. Присутствие гена семейства *bla<sub>CTX</sub>* во всех случаях сопровождалось резистентностью к цефтазидиму (CAZ) и продукцией БЛРС. Резистентность к карбапенемам была выявлена в двух штаммах, из них КР\_3597 содержал ген *bla<sub>OXA-48</sub>*, а в штамме КА\_2420 не обнаружено никаких генов резистентности из изучаемого спектра (табл. 4).

Резистентность к аминогликозидам (AMK и/или GEN) присутствовала у 11 штаммов, но только у четырех из них были найдены последовательности генов *aadA* и/или *aph6-Id*. Последовательность *aph6-Id* выявлялась и у штаммов, не обладавших резистентностью к аминогликозидам (см. табл. 4).

Полная (R) или промежуточная (I) резистентность к фторхинолонам (LEV и/или CIP) была выявлена у 11 штаммов; у 10 из них были найдены гены *aac(6′)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях. Надо отметить, что присутствие только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелирует с наличием резистентности к фторхинолонам (см. табл. 3 и 4).

#### Генетические детерминанты резистентности штаммов от госпитализированных пациентов

Из 26 штаммов только пять не обладали множественной устойчивостью к антибиотикам, и 42 % штаммов были резистентны к карбапенемам (табл. 5). Как и в штаммах от амбулаторных больных, устойчивость к цефтазидиму и продукция БЛРС совпадали с присутствием гена семейства *bla<sub>CTX</sub>*, а устойчивость к карбапенемам была связана с наличием гена *bla<sub>OXA-48</sub>*. Ген *bla<sub>OXA-48</sub>* также был ассоциирован с продукцией БЛРС у штаммов КР\_3521, КР\_3522, КР\_3533, у которых *bla<sub>CTX</sub>* не выявлялся. Генов карбапенемаз семейств *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* не было обнаружено, хотя штаммы КР\_3521, КР\_3526 и КР\_3533 обладали резистентностью к карбапенемам, подавляемой в присутствии ЭДТА (см. табл. 5). По-видимому, резистентность к карбапенемам обусловлена другими генетическими механизмами.

Шестнадцать штаммов от госпитализированных пациентов (61 %) были устойчивы к аминогликозидам (AMK и/или GEN), у 12 из них были выявлены гены *aadA* и/или *aph6-Id*. Устойчивость оставшихся 4 штаммов была обусловлена другими механизмами, так как у них не обнаружены исследуемые гены резистентности (см. табл. 5).

Резистентность к фторхинолонам (LEV и CIP) была выявлена у 20 штаммов, у 18 из них найдены гены *aac(6′)-*

*Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB* и *qnrS* в различных комбинациях. Так же, как и в популяции штаммов от амбулаторных больных, выявление только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелировало с наличием резистентности к фторхинолонам (см. табл. 3–5).

#### Обсуждение

В ходе исследования среди 72 клинических штаммов клебсиелл было выявлено 57 штаммов *K. pneumoniae*. Из 15 оставшихся штаммов семь были отнесены к *K. grimontii*, пять – к *K. aerogenes*, два – к *K. oxytoca* и один штамм – к *K. quasipneumoniae* (см. табл. 3–5). Четырнадцать из этих 15 штаммов показали чувствительность к большинству использованных антибиотиков. Исключением стал штамм *K. aerogenes* КА\_2420, устойчивый к защищенным пенициллинам, имипенему, азтреонаму и хлорамфениколу (см. табл. 4). При этом ни у одного штамма, включая КА\_2420, не выявлено исследуемых генов резистентности, кроме *oqxA*, *oqxB* у штаммов КО\_2335, КО\_2487 и КQ\_1250. Возможно, генетические механизмы резистентности различны у штаммов клебсиелл, относящихся к разным видам.

Основную проблему для терапии представляют штаммы *K. pneumoniae*, поскольку именно они являются полирезистентными (см. табл. 5). Анализ 57 штаммов *K. pneumoniae* на наличие генов бета-лактамаз семейств *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* и бета-лактамаз семейства OXA (*bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>OXA-10</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* и *bla<sub>OXA-58</sub>*) выявил гены первых трех семейств и ген *bla<sub>OXA-48</sub>*. Ген *bla<sub>SHV</sub>* присутствовал у 84 % амбулаторных штаммов *K. pneumoniae* со слабовыраженной резистентностью (табл. 3, 6) и у 100 % резистентных штаммов как от амбулаторных, так и от госпитализированных больных (см. табл. 4–6). Ген *bla<sub>TEM</sub>* отсутствовал у чувствительных к антибиотикам штаммов от амбулаторных больных, но был обнаружен у 80 % резистентных штаммов от амбулаторных больных и лишь у 40 % штаммов от госпитализированных пациентов (см. табл. 4–6). Наличие *bla<sub>SHV</sub>* и/или *bla<sub>TEM</sub>* не всегда сочеталось с резистентностью к исследованным бета-лактамам, поэтому они не могут быть корректными маркерами резистентности, в отличие от *bla<sub>CTX</sub>* и *bla<sub>OXA-48</sub>* (см. табл. 4 и 5), выявление которых может быть использовано для быстрого определения продукции БЛРС и резистентности к карбапенемам соответственно.

Согласно многоцентровому эпидемиологическому исследованию, проведенному в России в 2015–2016 гг., 75.6 % нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae* продуцировали БЛРС, 26.5 % штаммов продуцировали карбапенемазы (OXA-48 – 21.5 %, NDM – 4.3, OXA-48 и NDM – 0.6, KPC – 0.1 %) (Сухорукова и др., 2019). В изученной нами выборке штаммов от госпитализированных пациентов доля штаммов-продуцентов БЛРС была похожей (65 %), но гораздо выше оказалась доля штаммов, устойчивых к карбапенемам и содержащих *bla<sub>OXA-48</sub>* (56 %); при этом генов устойчивости к карбапенемам семейств *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* нами не выявлено.

Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам *aac3*, *aph6*, *ant2*, *ant6*, *aph(6)-Id*, *aadA* были обнаружены только последние два. Их присутствие не всегда коррелировало с фенотипической резистентностью



**Таблица 5.** Гены резистентности, выявленные в штаммах от госпитализированных пациентов

Наименование штамма (К-серотип)	Происхождение штамма*	Выявленные гены	Антибиотики, к которым штамм устойчив (I – промежуточная устойчивость)
KG_1801	Отделяемое из гнойной раны при СДС (ЖДКБ)	–	–
KP_1819 (K21/K13/K46/K61)	Отделяемое из гнойной раны при СДС (ЖДКБ)	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	–
KP_3442 (K47)	Мазок из зева у пациента на ИВЛ (ЦКБ СО РАН)	<i>bla<sub>SHV</sub></i> <i>oqxA, oqxB</i>	– –
KG_1838	Отделяемое из гнойной раны при СДС (ЖДКБ)	–	PIP/TZB
KA_3530	Моча (ННИИТО)	–	AMP/CAL
KP_2067 (K2)	Пунктат из хирургической раны (ННИИТО)	<i>bla<sub>SHV</sub></i> – H.o.	PIP/TZB (I) LEV, CIP CLM
KP_2071 (K2)	Синовиальная жидкость (ННИИТО)	<i>bla<sub>SHV</sub></i> – – H.o.	– GEN LEV, CIP CLM
KP_3772 (K2)	Содержимое гематомы (ЦНМТ)	<i>bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>SHV</sub></i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> H.o.	IPM (I), MEM (I), AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB LEV, CIP CLM
KP_3522 (K2)	Моча (ННИИТО)	<i>bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>SHV</sub></i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> H.o.	MEM (I), БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB LEV, CIP CLM
KP_2894 (K1)	Раневое отделяемое (ЖДКБ)	<i>bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub></i> <i>oqxA</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) – ATM
KP_3813 (K24)	Биоптат (ННИИТО)	<i>bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub></i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA, oqxB, qnrS</i> H.o.	БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL – LEV (I), CIP ATM (I), CLM
KP_3519 (K34/K57)	Биоптат (ННИИТО)	<i>bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>SHV</sub></i> <i>aph6-Id, aadA</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3520 (K34/K57)	Чистая культура (ННИИТО)	<i>bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>SHV</sub></i> <i>aadA</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrS</i> H.o.	CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3521 (K2)	Чистая культура (ННИИТО)	<i>bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>SHV</sub></i> – <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> H.o.	IPM, MEM, БЛРС, МБЛ, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I) LEV, CIP CLM
KP_3533 (K2)	Чистая культура (ННИИТО)	<i>bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>SHV</sub></i> <i>aadA</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> H.o.	IPM, MEM, БЛРС, МБЛ, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I) LEV, CIP CLM
KP_3523 (K22/K30) KP_3524 (K22/K30) KP_3528 (K22/K30) KP_3531 (K22/K30) KP_3537 (K22/K30)	Моча (ННИИТО)	<i>bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub></i> <i>aadA, aph6-Id</i> <i>oqxA, oqxB</i> H.o.	IPM (I), MEM, CAZ, БЛРС, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3526 (K22/K30)	Моча (ННИИТО)	<i>bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub></i> <i>aadA, aph6-Id</i> <i>oqxA, oqxB</i> H.o.	IPM (I), MEM, CAZ, БЛРС, МБЛ, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM

**Окончание табл. 5**

Наименование штамма (К-серотип)	Происхождение штамма*	Выявленные гены	Антибиотики, к которым штамм устойчив (I – промежуточная устойчивость)
КР_3529 (K22/K30)	Моча (ННИИТО)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H. o.	МЕМ, CAZ, БЛРС, АМР/САЛ, АМР/СУЛ, ПИП/ТЗВ АМК, GEN LEV, CIP АТМ, СLM
КР_3835 (K17)	Раневое отделяемое (ННИИТО)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> <i>aadA</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H. o.	IPM (I), МЕМ, CAZ, БЛРС, АМР/САЛ, АМР/СУЛ, ПИП/ТЗВ АМК (I), GEN LEV, CIP АТМ
КР_3836 (K17)	Моча (ННИИТО)	<i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H. o.	CAZ, БЛРС, АМР/САЛ, АМР/СУЛ, ПИП/ТЗВ АМК (I), GEN LEV, CIP АТМ
КР_3838 (K17)	Чистая культура (ННИИТО)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> <i>aadA</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H. o.	IPM, МЕМ, CAZ, БЛРС, АМР/САЛ, АМР/СУЛ, ПИП/ТЗВ АМК, GEN LEV, CIP АТМ
КР_3839 (K17)	Раневое отделяемое (ННИИТО)	<i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> H. o.	CAZ, БЛРС, АМР/САЛ, АМР/СУЛ, ПИП/ТЗВ GEN LEV, CIP АТМ

\* ЖДКБ – Железнодорожная клиническая больница на ст. Новосибирск Главный; ЦКБ СО РАН – Центральная клиническая больница СО РАН; ННИИТО – Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии; ЦНМТ – Центр новых медицинских технологий.

**Таблица 6.** Доля штаммов (%) *K. pneumoniae*, у которых выявлены гены резистентности

Ген или семейство генов	Амбулаторные штаммы		Штаммы от госпитализированных пациентов
	со слабовыраженной резистентностью	резистентные	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	84	100	100
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	0	80	40
<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	0	80	65
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	0	5	56
<i>oqxA</i>	68	93	83
<i>oqxB</i>	47	73	83
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	0	73	43
<i>qnrB</i>	0	20	0
<i>qnrS</i>	5	33	13
<i>aadA</i>	5	13	52
<i>aph6-Id</i>	0	40	39

(см. табл. 3–5), свидетельствуя о том, что резистентность к аминогликозидам может быть обусловлена и другими механизмами.

Из 22 штаммов *K. pneumoniae*, обладавших генами *aac(6')-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS*, резистентность к фторхинолонам (LEV и CIP) была определена у 20 (90 %) штаммов (см. табл. 3–5). Следует отметить, что ген *qnrB* обнаружен лишь в трех случаях (см. табл. 4 и 6) и, возможно, является малораспространенным в новосибирских штаммах. Тем не менее выявление *aac(6')-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS* хоро-

шо согласуется с наличием фенотипической резистентности и может быть использовано для быстрого предсказания устойчивости изолята к фторхинолонам.

Считается, что плазмидные гены резистентности к фторхинолонам семейства *qnr* часто ассоциированы с БЛРС-продуцирующими изолятами (Robicsek et al., 2006). В нашем исследовании такая ассоциация была выявлена среди штаммов, выделенных от амбулаторных больных, так как 10 из 12 штаммов-продуцентов БЛРС содержали гены *qnrB* и/или *qnrS* (см. табл. 4). В то же время толь-

ко 3 из 18 штаммов-продуцентов БЛРС, полученных от госпитализированных пациентов, содержали ген *qnrS*, при этом 17 из них были резистентны к фторхинолонам. Это свидетельствует о других возможных механизмах резистентности, таких как уменьшение проницаемости мембраны и сверхактивность эффлюксной помпы.

## Заключение

Таким образом, среди клинических штаммов клебсиелл, выделенных у пациентов в г. Новосибирске, доминировали штаммы *K. pneumoniae*. Обнаружены также штаммы *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* и *K. quasipneumoniae*. Методом молекулярного серотипирования штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к 21 К-серотипу; большинство среди них составляли вирулентные серотипы К1 и К2. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae* обладали наибольшей резистентностью к антибиотикам среди различных видов клебсиелл. Генетическими детерминантами резистентности к бета-лактамам в исследованной популяции являлись *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* и *bla<sub>OXA-48</sub>*. Показаны ассоциации между присутствием *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* и продукцией БЛРС и устойчивостью к карбапенемам соответственно. Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам были обнаружены гены *aph(6)-Id* и *aadA*, однако их наличие не всегда совпадало с фенотипической резистентностью. Резистентность к фторхинолонам у большинства штаммов сопровождалась присутствием генов *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxV*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях. Следует отметить, что присутствие одних только генов *oqxA* и/или *oqxV* не коррелировало с наличием устойчивости к фторхинолонам.

## Список литературы / References

Иванов Д.В., Егоров А.М. Распространение и механизмы резистентности микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазы. Молекулярные механизмы устойчивости к бета-лактамам антибиотикам штаммов клебсиелл, выделенных при внутрибольничных инфекциях. *Биомед. химия*. 2008;54(1):104-113. [Ivanov D.V., Egorov A.M. Spreading and mechanisms of antimicrobial resistance in microorganisms, producing beta-lactamases. Molecular mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics of *Klebsiella* spp. strains, isolated in cases of nosocomial infections. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B*. 2008;2:311-317. DOI 10.1134/S1990750808030141.]

Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(1):79-84. DOI 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(1):79-84. (in Russian)]

Козлова Ю.Н., Фоменко Н.В., Морозова В.В., Саранина И.В., Тикунов А.Ю., Ганичев Д.А., Самохин А.Г., Павлов В.В., Рожнова О.М., Бондарь И.А., Зенкова Е.В., Нимаев В.В., Климонтов В.В., Тикунова Н.В. Идентификация стафилококков, включая метициллинрезистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318. [Kozlova Y.N., Fomenko N.V., Morozova V.V., Saranina I.V., Tikunov A.Yu., Ganichev D.A., Samokhin A.G., Pavlov V.V., Rozhnova O.M., Bondar' I.A., Zenkova E.V., Nimaev V.V., Klimontov V.V., Tikunova N.V. Genetic and biochemical characterization of staphy-

lococci occurring in Novosibirsk, Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017; 21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318. (in Russian)]

Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2005. [Mashkovsky M.D. Medicinal Preparations. Moscow: Novaya Volna Publ., 2005. (in Russian)]

Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С., Шек Е.А., Кузьменков А.Ю., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Семенова Н.В., ... Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х., Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):147-159. DOI 10.36488/cmasc.2019.2.147-159. [Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Ivanchik N.V., Skleenova E.Yu., Shaidullina E.R., Azizov I.S., Shek E.A., Kuzmenkov A.Iu., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., Semenova N.V., ... Zvonareva O.V., Kornilova P.A., Krianga V.G., Portniagina U.S., Shamaeva S.Kh., Popov D.A., Vostrikova T.Iu. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(2):147-159. DOI 10.36488/cmasc.2019.2.147-159. (in Russian)]

Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Мед. журн.* 2012;2(40):10-15. [Tapalsky D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Meditsynskiy Zhurnal = Medical Journal*. 2012;2(40):10-15. (in Russian)]

Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригра И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020;22(1):4-19. DOI 10.36488/cmasc.2020.1.4-19. [Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigrora I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;22(1):4-19. DOI 10.36488/cmasc.2020.1.4-19. (in Russian)]

Эйдельштейн М.В. Выявление β-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001;3(2):183-189. [Edelstein M.V. Detection of extended spectrum β-lactamases by phenotypic methods in gram-negative bacteria. *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;3(2):183-189. (in Russian)]

Brisse S., Passet V., Haugaard A.B., Babosan A., Kassis-Chikhani N., Struve C., Decré D. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:4073-4078. DOI 10.1128/JCM.01924-13.

Broberg C.A., Palacios M., Miller V.L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 2014;6:64. DOI 10.12703/P6-64.

Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976. DOI 10.1128/AAC.01009-09.

Galal L., Abdel Aziz N.A., Hassan W.M. Defining the relationship between phenotypic and genotypic resistance profiles of multidrug-resistant enterobacterial clinical isolates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1214:9-21. DOI 10.1007/5584\_2018\_208.

Gharrah M.M., El-Mahdy A.M., Barwa R.F. Association between virulence factors and extended spectrum beta-lactamase producing *Kleb-*



- siella pneumoniae* compared to nonproducing isolates. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2017;7279830. DOI 10.1155/2017/7279830.
- Hoa P.L., Chowa K.H., Yuena K.Y., Ngb W.S., Chaua P.Y. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998;42:49-54.
- Hooper D.C., Jacoby G.A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015;1354(1):12-31. DOI 10.1111/nyas.12830.
- Lee H.C., Chuang Y.C., Yu W.L., Lee N.Y., Chang C.M., Ko N.Y., Wang L.R., Ko W.C. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J. Intern. Med.* 2006;259(6):606-614. DOI 10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x.
- Lee K., Chong Y., Shin H.B., Kim Y.A., Yong D., Yum J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001;7:88-91.
- Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front. Microbiol.* 2016;5(7):1374. DOI 10.3389/fmicb.2016.01374.
- Morozova V.V., Babkin I.V., Kozlova Y.N., Baykov I.K., Bokovaya O.V., Tikunov A.Yu., Ushakova T.A., Bardasheva A.V., Ryabchikova E.I., Zelentsova E., Tikunova N.V. Isolation and characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* N4-like bacteriophage KP8. *Viruses.* 2019;11(12):1115. DOI 10.3390/v11121115.
- Mukherjee S., Naha S., Bhadury P., Saha B., Dutta M., Dutta S., Basu S. Emergence of OXA-232-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 causing neonatal sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(7):2004-2006. DOI 10.1093/jac/dkaa080.
- Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11(4):589-603.
- Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug. Resist. Updat.* 2010;13(6):151-171.
- Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2006;6:629-640.
- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18(2):306-325.
- Yang H.Y., Nam Y.S., Lee H.J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2014;25(3):163-169.
- Yong D., Lee K., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M., Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(10):3798-3801.

#### ORCID ID

A.V. Bardasheva orcid.org/0000-0002-3872-4122  
I.V. Babkin orcid.org/0000-0001-7158-3774  
E.V. Zhirakovskaya orcid.org/0000-0001-6787-8393  
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278  
V.V. Morozova orcid.org/0000-0002-0869-3476

**Благодарности.** Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-29-08015. Штаммы для исследования взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН, поддержанной базовым проектом ИХБФМ СО РАН № 0245-2021-0008.

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

Поступила в редакцию 11.09.2020. После доработки 30.11.2020. Принята к публикации 08.12.2020. Опубликовано онлайн 11.02.2021.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>  
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”  
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/  
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:  
на сайте ИЦиГ СО РАН – [bionet.nsc.ru/vogis/](http://bionet.nsc.ru/vogis/)  
платформе Elpub – [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour)  
платформе Научной электронной библиотеки – [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=32440)  
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: [vavilov\\_journal@bionet.nsc.ru](mailto:vavilov_journal@bionet.nsc.ru)

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963\*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 16.04.2021. Выход в свет 30.04.2021. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.02.

Уч.-изд. л. 15.2. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.). Заказ № 71. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.