

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2021 • 25 • 6



Молекулярная и клеточная биология / Генетика растений / Популяционная генетика / Генетика животных /
Физиологическая генетика / Биоресурсные коллекции

vavilov.ejpub.ru/
biomet.nsc.ru/vogjs
vavilov_journal@biomet.nsc.ru
Индекс издания 42153



Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ21.067

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

А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (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)

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)

Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)

С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)

П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)

И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)

Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)

С.А. Демаков – 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)

А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)

Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)

В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)

В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)

М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)

Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)

Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)

В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)

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, проф. РАН (Россия)

Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)

Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)

С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

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/VJ21.067

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*A.V. Kochetov*, Corr. Member of the RAS, 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*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.A. Bespalova*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*N.P. Bondar*, Cand. Sci. (Biology), Russia*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A. Börner*, Dr. Sci., Germany*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),
Belarus*S.V. Kostrov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*A.M. Kudryavtsev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*I.N. Lavrik*, Dr. Sci. (Biology), Germany*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.),
Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.R. Mursalimov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),
Russia*I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States*A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia*E.Y. Rykova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*Y.N. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia*R.I. Sheiko*, Corr. Member of the NAS of Belarus,
Dr. Sci. (Agricul.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*V.A. Stepanov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. 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

Молекулярная и клеточная биология

- 607 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Здесь и там: двусторонняя локализация интеграций трансгена. П.А. Сальников, А.А. Хабарова, Г.С. Кокшарова, Р.В. Мунгалов, П.С. Белокопытова, И.Е. Пристяжнюк, А.Р. Нурисламов, П. Соматич, М.М. Гридина, В.С. Фишман (на англ. языке)

- 613 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оценка компетентности к развитию ооцит-кумулясных комплексов *Sus scrofa domesticus* (L.) после интра- и экстраовариальной витрификации. Т.И. Кузьмина, И.В. Чистякова

Генетика растений

- 620 **ОБЗОР**
Генетические ресурсы люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) и их роль в доместикации и селекции культуры. М.А. Вишнякова, Е.В. Власова, Г.П. Егорова

- 631 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Межфазный период «всходы–колошение» у 8х и 6х тритикале с различными доминантными генами *Vrn*. П.И. Стёпочкин, А.И. Стасюк

Популяционная генетика

- 638 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Злаковые травы – резерватеры инфекции видов ржавчины для озимой мягкой пшеницы на Северном Кавказе России. Е.И. Гулятьева, Л.А. Беспалова, И.Б. Аблова, Е.Л. Шайдаюк, Ж.Н. Худокормова, Д.Р. Яковлева, Ю.А. Титова

- 647 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изменчивость размеров ядерных геномов у представителей комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). С.В. Шеховцов, Я.Р. Ефремов, Т.В. Полубаярова, С.Е. Пельтек

Генетика животных

- 652 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Необычная врожденная полидактилия мини-свиней селекционной группы ИЦиГ СО РАН. С.В. Никитин, С.П. Князев, В.А. Трифонов, А.А. Проскурякова, Ю.Д. Шмидт, К.С. Шатохин, В.И. Запорожец, Д.С. Башур, Е.В. Коршунова, В.И. Ермолаев

- 661 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Отрицательный гетерозис по частоте мейотической рекомбинации в сперматоцитах домашней курицы *Gallus gallus*. Л.П. Малиновская, К.В. Тишакова, Т.И. Бикчурина, А.Ю. Слободчикова, Н.Ю. Торгунаков, А.А. Торгашева, Я.А. Цепилов, Н.А. Волкова, П.М. Борodin (на англ. языке)

Физиологическая генетика

- 669 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние введения лептина беременным самкам мышей на развитие ожирения, вкусовые предпочтения и экспрессию генов в печени и мышцах у потомства разного пола. Е.И. Денисова, М.М. Савинкова, Е.Н. Макарова

Биоресурсные коллекции

- 677 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генотипирование образцов картофеля коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН с применением ДНК-маркеров генов устойчивости к фитопатогенам. И.В. Тоцкий, И.В. Розанова, А.Д. Сафонова, А.С. Батов, Ю.А. Гуреева, Е.К. Хлесткина, А.В. Кочетов

Molecular and cell biology

- 607 ORIGINAL ARTICLE
Here and there: the double-side transgene localization. P.A. Salnikov, A.A. Khabarova, G.S. Koksharova, R.V. Mungalov, P.S. Belokopytova, I.E. Prityazhnik, A.R. Nurislamov, P. Somatich, M.M. Gridina, V.S. Fishman
- 613 ORIGINAL ARTICLE
Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domestica* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification. T.I. Kuzmina, I.V. Chistyakova

Plant genetics

- 620 REVIEW
Genetic resources of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) and their role in its domestication and breeding. M.A. Vishnyakova, E.V. Vlasova, G.P. Egorova
- 631 ORIGINAL ARTICLE
The interphase period “germination–heading” of 8x and 6x triticale with different dominant *Vrn* genes. P.I. Stepanchkin, A.I. Stasyuk

Population genetics

- 638 ORIGINAL ARTICLE
Wild grasses as the reservoirs of infection of rust species for winter soft wheat in the Northern Caucasus. E.I. Gulyaeva, L.A. Bepalova, I.B. Ablova, E.L. Shaydayuk, Zh.N. Khudokormova, D.R. Yakovleva, Yu.A. Titova
- 647 ORIGINAL ARTICLE
Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskioldi* complex (Lumbricidae, Annelida). S.V. Shekhovtsov, Ya.R. Efremov, T.V. Poluboyarova, S.E. Peltek

Animal genetics

- 652 ORIGINAL ARTICLE
Unusual congenital polydactyly in mini-pigs from the breeding group of the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). S.V. Nikitin, S.P. Knyazev, V.A. Trifonov, A.A. Proskuryakova, Yu.D. Shmidt, K.S. Shatokhin, V.I. Zaporozhets, D.S. Bashur, E.V. Korshunova, V.I. Ermolaev
- 661 ORIGINAL ARTICLE
Negative heterosis for meiotic recombination rate in spermatocytes of the domestic chicken *Gallus gallus*. L.P. Malinovskaya, K.V. Tishakova, T.I. Bikchurina, A.Yu. Slobodchikova, N.Yu. Torgunakov, A.A. Torgasheva, Y.A. Tsepilov, N.A. Volkova, P.M. Borodin


Physiological genetics

- 669 ORIGINAL ARTICLE
Influence of leptin administration to pregnant female mice on obesity development, taste preferences, and gene expression in the liver and muscles of their male and female offspring. E.I. Denisova, M.M. Savinkova, E.N. Makarova

Bioresource collections


- 677 ORIGINAL ARTICLE
Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens. I.V. Totsky, I.V. Rozanova, A.D. Safonova, A.S. Batov, Yu.A. Gureeva, E.K. Khlestkina, A.V. Kochetov

Here and there: the double-side transgene localization

P.A. Salnikov^{1,2}, A.A. Khabarova¹, G.S. Koksharova^{1,2}, R.V. Mungalov¹, P.S. Belokopytova^{1,2}, I.E. Pristyazhnik¹, A.R. Nurislamov^{1,2}, P. Somatich¹, M.M. Gridina¹, V.S. Fishman^{1,2} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia


 minja-f@ya.ru

Abstract. Random transgene integration is a powerful tool for developing new genome-wide screening approaches. These techniques have already been used for functional gene annotation by transposon-insertion sequencing, for identification of transcription factor binding sites and regulatory sequences, and for dissecting chromatin position effects. Precise localization of transgenes and accurate artifact filtration are essential for this type of method. To date, many mapping assays have been developed, including Inverse-PCR, TLA, LAM-PCR, and splinkerette PCR. However, none of them is able to ensure localization of both transgene's flanking regions simultaneously, which would be necessary for some applications. Here we proposed a cheap and simple NGS-based approach that overcomes this limitation. The developed assay requires using intentionally designed vectors that lack recognition sites of one or a set of restriction enzymes used for DNA fragmentation. By looping and sequencing these DNA fragments, we obtain special data that allows us to link the two flanking regions of the transposon. This can be useful for precise insertion mapping and for screening approaches in the field of chromosome engineering, where chromosomal recombination events between transgenes occur in a cell population. To demonstrate the method's feasibility, we applied it for mapping SB transposon integration in the human HAP1 cell line. Our technique allowed us to efficiently localize genomic transposon integrations, which was confirmed via PCR analysis. For practical application of this approach, we proposed a set of recommendations and a normalization strategy. The developed method can be used for multiplex transgene localization and detection of rearrangements between them.

Key words: transgenesis; genome-wide screening; transgene mapping; sleeping beauty transposon.


For citation: Salnikov P.A., Khabarova A.A., Koksharova G.S., Mungalov R.V., Belokopytova P.S., Pristyazhnik I.E., Nurislamov A.R., Somatich P., Gridina M.M., Fishman V.S. Here and there: the double-side transgene localization. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):607-612. DOI 10.18699/VJ21.068

Здесь и там: двусторонняя локализация интеграций трансгена

П.А. Сальников^{1,2}, А.А. Хабарова¹, Г.С. Кокшарова^{1,2}, Р.В. Мунгалов¹, П.С. Белокопытова^{1,2}, И.Е. Пристяжнюк¹, А.Р. Нурисламов^{1,2}, П. Соматич¹, М.М. Гридина¹, В.С. Фишман^{1,2} 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 minja-f@ya.ru

Аннотация. Полногеномные скрининговые методы, основанные на случайной интеграции экзогенных генетических конструкций, – новейший класс инструментов, открывающий возможности для изучения широкого спектра геномных процессов. Данный подход уже был применен к функциональному аннотированию генов млекопитающих, скринингу приспособленности бактерий, определению сайтов связывания факторов транскрипции, идентификации регуляторных генетических элементов и исследованию хромосомного эффекта положения. Все эти эксперименты требуют точной локализации трансгенов в геноме. Существующие на сегодняшний день методы картирования, такие как Inverse-PCR, TLA, splinkerette PCR и LAM-PCR, не позволяют одновременно определять оба участка генома, фланкирующие одну интеграцию трансгена, что ограничивает применимость подходов, в том числе связанных с хромосомной инженерией. В настоящей работе мы предлагаем метод, с помощью которого можно преодолеть это ограничение. Разработанная технология основана на фрагментации геномной ДНК, не затрагивающей интеграции трансгена. Это достигается путем исключения из последовательности вектора сайтов узнавания одного или нескольких ферментов рестрикции. Затем, как и в Inverse-PCR, были закольцованы молекулы лигированием в разбавленной смеси и секвенированы. Полученные данные дают возможность с высокой точностью идентифицировать перестройки и отделить их от артефактов лигирования, и, кроме того, отследить события транслокаций между интеграциями трансгенов. Это может быть использовано в экспериментах по изучению индуцируемых хромосомных перестроек. Для доказательства применимости метода мы с его помощью картировали интеграции транспозона Sleeping Beauty в клетки человека линии Hap1. Картированные интеграции были валидированы с помощью ПЦР-анализа. В статье приведен ряд рекомендаций для практического использования этого метода в экспериментах по множественной локализации интеграций трансгенных конструкций.

Ключевые слова: трансгенез; полногеномный скрининг; локализация трансгена; транспозон «Спящая красавица».

Introduction

Genome-wide screening assays are important tools for modern genetics and genomics. Many of these methods rely on the integration of exogenous sequences in unknown or random genomic regions, mostly via retroviral or transposon vectors. This approach has already been used for functional gene annotation by transposon-insertion sequencing (Deutschbauer et al., 2011; Goodman et al., 2011; Goh et al., 2017; Cain et al., 2020), for transcription factor binding sites (Wang et al., 2012; Moudgil et al., 2020) and regulatory sequences identification (Pindyurin et al., 2015), and for chromatin position effects dissection (Akhtar et al., 2013).

For all of these techniques, accurate localization of transgene integration sites is crucial. There are several well-established methods for massive parallel genomic mapping of integration sites, from Nanopore (Li et al., 2019; Nicholls et al., 2019) or whole-genome Next Generation Sequencing (NGS) (Zhang et al., 2012; Zastrow-Hayes et al., 2015; Park et al., 2017) to cheaper target PCR-mediated approaches, including Inverse-PCR (Akhtar et al., 2013), LAM-PCR (Gabriel et al., 2014; Wang et al., 2016), splinkerette PCR (Friedrich et al., 2017), and TLA (de Vree et al., 2014; Laboulaye et al., 2018).

Importantly, current NGS-based methods cannot capture both transgene-flanking regions (5' and 3') simultaneously. Double-side localization is useful for artifact filtration and detection of translocation events occurring during the integration process, which could confound certain experiments (Francke et al., 1992). Furthermore, this is useful for screening approaches in the field of chromosome engineering, where chromosomal recombination events between transgenes occur in a cell population, such as Scramble technique (Dymond, Boeke, 2012; Hochrein et al., 2018) and others (Smith et al., 1995; Uemura et al., 2010). Conventional Inverse-PCR, routinely employed for transgene insertion identification, is unable to differentiate cases of normal insertion and exchange of flanking regions between different integrations in multiplex analysis. Despite its rarity in the standard conditions, a number of developing methods requires a precise detection of these events. Our approach provides double-sided transgene localization that can be applied for translocation detection between transgene integration points.

Here we developed a cheap Inverse-PCR-based approach enabling us to link 5' and 3' transposon flanking regions for all integration sites simultaneously. To demonstrate the method's feasibility, we applied it for mapping SB transposon integration in the human HAP1 cell line. Our technique allowed us to efficiently localize genomic transposon integrations. For practical application of this approach, we suggested a set of recommendations and a normalization strategy. The developed method can be used for multiplex transgene localization and detection of rearrangements between them.

Materials and methods

Plasmid vectors. The Sleeping Beauty transposon vector pSB_LoxP was generated via Gibson Assembly (NEB) by amplifying ITR sites from pSBbi-GP (Addgene #60511) and LoxP-rtTA sequence from pLeGO-rtTA (kind gift from Dr. A.M. Yunusova) and integrating into the pJET 1.2 vector (ThermoFisher, USA). We used PCR-mediated mutagenesis

to substitute C to G in the CATG sequence within the right ITR (*FaeI* site). This resulted in the vector used for genomic transposon integration.

A vector expressing SB100X transposase was from Addgene (#34879). To allow selection of transposase-expressing cells, IRES-GFP cassette was amplified from vector Cre-IRES-PuroR (Addgene #30205) and inserted between transposase coding sequence and polyA signal using NEB Gibson Assembly, resulting in pSB100X-GFP vector.

Cell culture and Neon transfection. HAP1 cells were cultured in IMDM with 10 % FBS and 1xPen/Strep (Gibco, USA) according to manufacturer recommendations. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and subcloning was performed on BD FACSAria™ III sorter on 96-well plates or manually. Transfections were done on the Neon transfection system under the following conditions: 1400 V, 20 ms 1 pulse and 1.5 µg total plasmid DNA (transposase expression and transposon carrying plasmid ratio 1:4). On day 2 after transfection, we performed a cell sorting of GFP positive cells.

PCR. For PCRs, qPCR and Double-side Inverse-PCR genomic DNA was extracted using a standard phenol-chloroform extraction protocol. All PCR procedures were performed using the PCR with Taq enzyme (#M0267 NEB, USA) and specific primers (available on request). qPCR was performed using BioMaster HS-qPCR (2×) (MN020-2040 Biolabmix, Russia) kit with specific primers and FAM-BHQ1 probe (qpcr_M2RTta_F: AGACTGGACAAGAGCAAAGT; qpcr_M2RTta_R: TTGAGCAGCCTACCCTGT; qpcr_M2RTta_probe: FAM-TCGAAGGCCTGACGACAAGGA-BHQ; qpcr_Syn1_F CCCAAATACCAGGCAACCCA, qpcr_Syn1_R GGAAGGGCTCAACAGTAGG, qpcr_Syn1_probe: FAM-TTGGTCCCAAATCTCTCCAGCACA-BHQ). To allow absolute quantification, plasmid vector containing transposon and *SYN1* PCR fragments was constructed and used for normalization. The data was analyzed using 2^{ddCt} methods implemented in QuantStudio v1.3 software (Applied Biosystems, USA).

Double-side Inverse-PCR sequencing library preparation. DNA was isolated from cell pellet by phenol-chloroform extraction. DNA was digested overnight in 50 µl reaction at 37 °C by 5U *NlaIII* isoschizomer *FaeI* (E495 SibEnzyme, Russia) in final DNA concentration 100 ng/µl. Enzyme was inactivated by incubation at 65 °C for 10 min and 500 ng of digested DNA was ligated using T4 DNA ligase (E319, SibEnzyme) at 4 °C overnight in 100 µl reaction volume. 1 µl of ligation mix was used in PCR with Taq polymerase (#M0267 NEB, USA) (annealing 60 °C, elongation 3 min, 40 cycles). PCR products were diluted 100-fold and 1 µl was used in the next round of nested PCR. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and either used in the third round of nested PCR or purified using AMPure XP beads (A63882 Beckman Coulter, USA). 1 ng of purified PCR product was used for NGS adaptor ligation (SeqCap Adapter Kit B, 07141548001 Roche, Switzerland) using KAPA HyperPrep kit (07962363001 Roshe) according to manufacturer protocol with 15 cycles of post-ligation PCR.

NGS data analysis. We demultiplexed reads originating from different NGS-libraries based on barcode sequences (barcode_seq) included in 5'-end of primers using cutadapt (Martin, 2011) with -g barcode_seq -G barcode_seq

–overlap 6 –e 0. Next, primers (primer_seq) were removed using cutadapt with parameters –g primer_seq –G primer_seq –overlap 20. Processed reads were aligned to human genome hg38 using bwa mem with default parameters (Li, Durbin, 2009). Regions covered by at least one read were found using bedtools genomecov (Quinlan, Hall, 2010) and a homemade python script. In addition, every covered region was manually analyzed in Integrated Genome Browser (IGV) (Robinson et al., 2011), which allowed distinguishing insertions sites from random ligations and other artifacts. The following analysis of rearrangements was done using homemade python scripts that counted the number of reads with mates or supplementary alignments in different insertion sites.

Results and discussion

We improved a standard inverse-PCR assay for efficient localization of transgene integration. A key aspect of this strategy is the ability to recognize simultaneously both 5' and 3' flanking regions of transgenes in a multiplex NGS-based assay. As in conventional inverse-PCR, our assay consists of five steps: 1) DNA fragmentation, 2) ligation under low DNA concentration conditions, which favors circularization, 3) nested-PCR using primer pairs annealing to the ends of transgenic sequence in outward orientation, 4) PCR products sequencing, and 5) computational analysis.

In our modification (Fig. 1), we propose to fragment DNA by restriction enzyme (RE), which recognizes sites that are absent in the transgene sequence. This results in the generation of DNA fragments, containing transposon and both 5' and 3' flanking regions up to the first RE recognition site in length. A subsequent ligation reaction generates circular molecules, which enables us to proceed with nested inverse-PCRs. PCR products are then used for NGS library preparation and paired-end sequencing. Reads are next trimmed from primers and transgenic sequences and aligned to the reference genome,

which produces a recognizable pattern, defining integration sites and allowing to distinguish them from artifacts.

To prove this concept, we chose to use the pSB_LoxP plasmid previously constructed in our laboratory as a sleeping beauty (SB) transposon-containing vector. It contains a short LoxP-sequence cloned between two SB inverse terminal repeats (ITRs), and via transposase-mediated integration generates 833 bp long DNA inserts. Although 4-bp cutting RE is preferable for effective Inverse-PCR library construction, it is hardly possible to find at least one RE that does not cleave the integrating DNA. However, we noted that the transposon sequence contains a single *FaeI* (*NlaIII*) recognition site within ITR sequence. To disrupt this site, we introduced single nucleotide substitution by site-directed mutagenesis. This allowed us to employ *FaeI* as RE for DNA fragmentation in integration localization assay.

To test this approach, we co-transfected human HAP1 cells with the developed transposon-containing plasmid and the SB100X vector expressing transposase and GFP proteins, followed by cell sorting of the GFP-positive cells the next day. Five days after transfection the GFP-negative cells were subcloned using FACS. This ensured the loss of the transposase-expressing plasmid and excluded the possibility of continuous “jumping” of the transposons across the genome. Two of the obtained subclones were randomly picked to proceed with localization assay.

For these clones, we constructed and sequenced an Inverse PCR NGS library following the approach described above. We obtained ~300000 read pairs for the first and ~200000 for the second clone. NGS data analysis suggested 73 and 13 integration site candidates (regions covered by at least ten reads) for each clone respectively. Every covered region was manually analyzed in IGV genome browser to distinguish insertion sites from random ligations and other artifacts. This analysis allowed us to identify 12 transposon insertions in

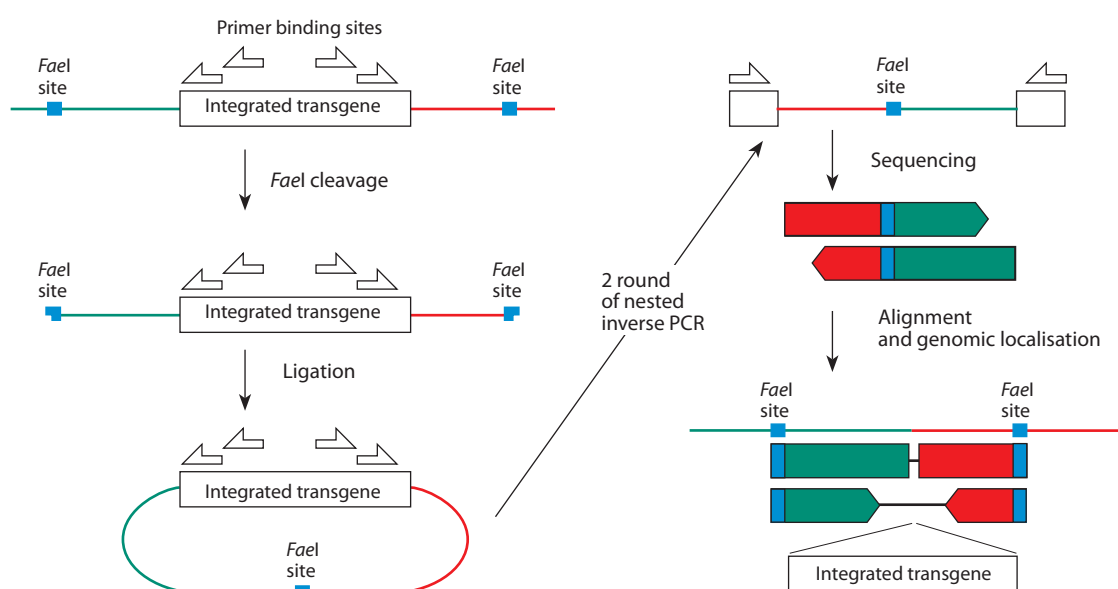


Fig. 1. Conceptual scheme of Inverse-PCR-based strategy allowing double-side detection of transgene integration sites.

Genomic DNA carrying transgene integration sequentially are fragmented, re-ligated, PCRed from nested primers and obtained products are sequenced. Resulting reads alignment forms recognizable patterns depending on integration point and fragmentation sites position.

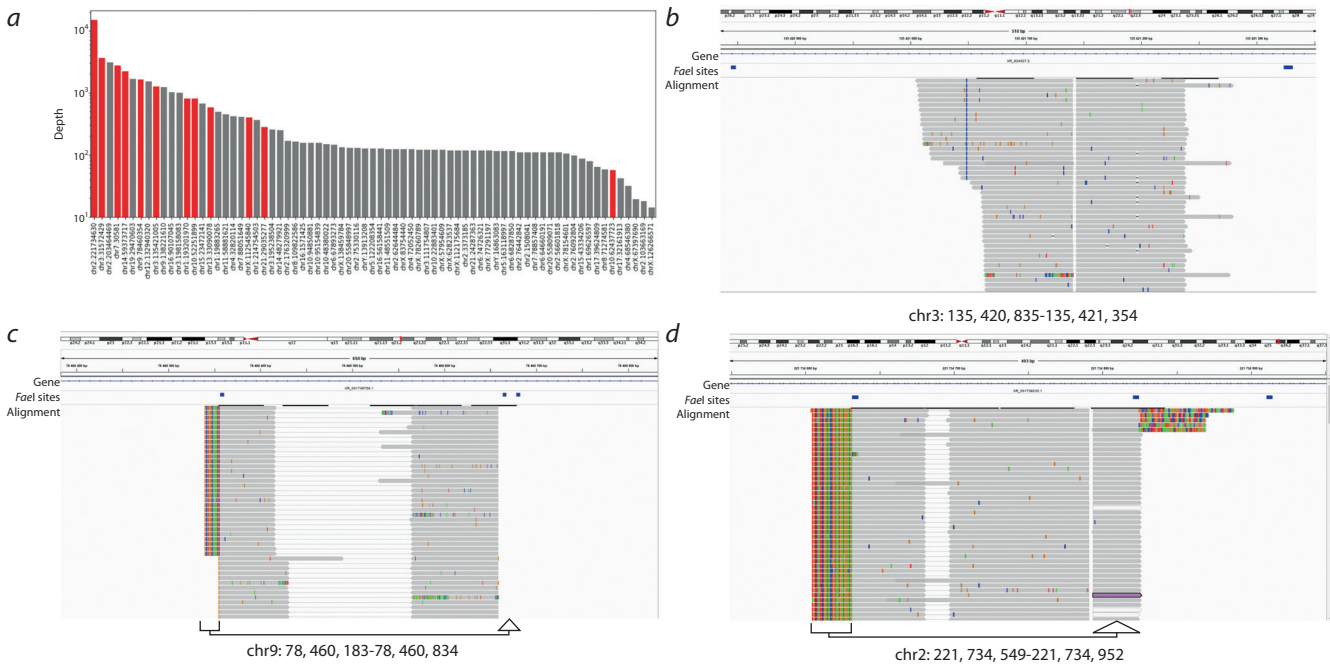


Fig. 2. Transposon integrations analysis.

a – bar plot representation of sequencing depth (*y*, log scale) among integration candidate sites (*x*) for the first subclone. Red bars represent bona fide integrations, gray – ligation artifacts. Bona fide integrations were discriminated based on the manual curation of NGS results in the IGV browser and confirmed using PCR (see the text for details); *b–d* – IGV screenshots showing read alignments for some integrations. Arrows underneath represent supplementary sequences or soft-clipped read bases corresponding to the bases transferred from another transgene flanking region through the *FaeI* site.

the first clone and 6 insertions in the second clone. The rest were identified as artifacts generated on ligation step and supplementary alignment regions for transposons integrated into repetitive DNA elements.

To obtain an estimate of the number of integrations using an orthogonal approach, we employed qPCR strategy with internal plasmids control (see Materials and methods). We obtained approximately 20 insertions for the first clone and 10 for the second. Despite the possibly low estimation accuracy of qPCR method, this result can identify bias of insertion under-representation of our Inverse-PCR-based strategy. Moreover, coverage is not a sufficient parameter for integration site identification. As shown on Fig. 2, *a*, both high-represented artifacts and low-represented transposon integrations are observed, although *bona fide* integration sites typically show higher coverage.

To dissect the nature of these biases, we investigated alignments individually. The typical expected pattern is shown on Fig. 2, *b*: both mates in the reads pair start at the same point (TA dinucleotide, the obligatory SB integration site) and extend divergently. Depending on RE sites position, this pattern can transform: if a read crosses the RE site involved in the DNA circularization, its alignment will be truncated at RE site position and continue again on the other side of transgene integration loci (see Fig. 2, *c, d*). The situation is more complicated if two RE sites are close to integration on both sides. The distance between these sites may be smaller than read length, and in this case transposon sequence appears at the end of the read. The worst case is when transposon integration is in a repeated sequence, which results in multiple reads alignment and difficulties with precise localization (Fig. 3, *a* and *b*). We observed one integration located in a repeated

sequence and also flanked by closely located *FaeI* sites. We managed to recognize its position only using complementary information accidentally produced due to unintended ligation of a random sequence to one of the transgene ends. Supplementary aligned bases of those reads revealed the *bona fide* transposon integration point (see Fig. 3, *c* and *d*).

Further, we decided to validate the integration sites determined by NGS-approach using conventional PCR. Six transposons were mapped within intergenic regions, and seven were integrated into gene introns. Since SB integration is semi-random and tends to occur in the active chromatin, this is not surprising. However, the genomic context of most integration sites in our subclones is low-complex. We picked a few integrations, the flanking regions of which allow us to design PCR primers. First, we confirmed integration events from one side using primer pairs, one of which was targeted to flanking regions and the other was placed in the transposon (see Fig. 3, *e*). Next, we obtained the PCR products containing the entire transposon with flanking sequences, using pairs of primers targeted to endogenous regions around the predicted integration site. This unambiguously confirmed the NGS-based localization results (see Fig. 3, *f*).

Conclusion

Summing up, we demonstrated the applicability of the proposed double-side transgene localization approach by successfully mapping 18 SB transposon integrations carrying an exogenic sequence. Our method provides simple detection of integration sites with confident artifact filtration via analysis of the read pair alignment pattern. Because the developed methods allow simultaneous detection of the flanking sequences at both transgene ends, we argue that this method can be used

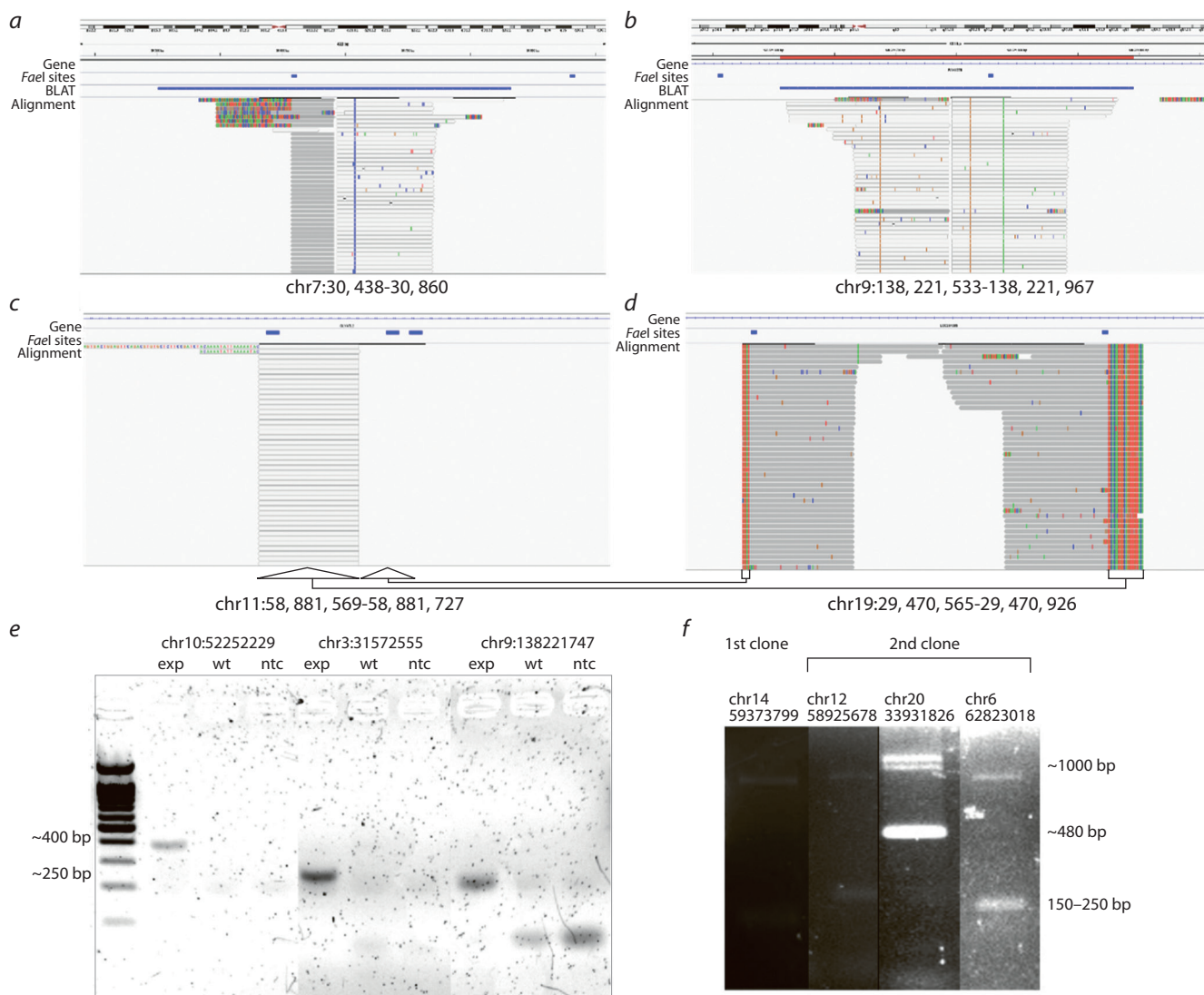


Fig. 3. Transposon integrations analysis and PCR-confirmation.

a-d – IGV screenshots showing read alignments for some integrations (*a-c*) and ligation artifact (*d*). Arrows underneath represent supplementary sequences or soft-clipped read bases, corresponding to the bases transferred from another transgene flanking region through the *FaeI* site. *e* – one side PCR detection of transposon integration in the first clone. exp – experimental subclone with transposon integrations; wt – intact HAP1 cells; ntc – non-template control; *f* – double-side PCR integration detection. 1 kb product represents allele carrying transposon integration, whereas lower bands correspond to wild type allele product.

in future for genome-wide detection of transgene recombination events. Notably, the SB-transposon derived in this study contained a *LoxP*-site sequence, which makes it very simple to repurpose the developed system for induction of Cre-mediated chromosomal rearrangements.

However, these experiments revealed some limitations of the developed method that we have to discuss. First, the proximity of chosen RE sites to transposon integration has a huge influence on the representation of integration site in the sequencing data. In this experiment we have already seen that too close RE sites complicate transposon mapping, whereas too distant sites can fully prevent PCR product generation. It happens because library preparation steps such as PCR and purification have a size-selecting manner. To solve this problem, one may develop new protocols where sonication is used for DNA fragmentation during library construction. Importantly, sonication will yield significantly higher noise for transgene recombination events detection due to the possibi-

lity to introduce DNA breaks inside the transgene. Second, in contrast to common inverse-PCR, our approach requires the choice of a RE that would not cut the transgene sequence. It is challenging even for short insertions, so we propose to introduce single-nucleotide substitutions into vector sequences. Third, neither our approach, nor other transgene localization methods ensure the identification of all integrations. For practical use, we recommend complementing our method with transgene insertions quantification via qPCR.

References

- Akhtar W., de Jong J., Pindyurin A.V., Pagie L., Meuleman W., de Ridder J., Berns A., Wessels L.F., van Lohuizen M., van Steensel B. Chromatin position effects assayed by thousands of reporters integrated in parallel. *Cell*. 2013;154(4):914-927. DOI 10.1016/j.cell.2013.07.018.
- Cain A.K., Barquist L., Goodman A.L., Paulsen I.T., Parkhill J., van Opijnen T. A decade of advances in transposon-insertion sequenc-

- ing. *Nat. Rev. Genet.* 2020;21(9):526-540. DOI 10.1038/s41576-020-0244-x.
- de Vree P.J., de Wit E., Yilmaz M., van de Heijning M., Klous P., Verstege M.J., Wan Y., Teunissen H., Krijger P.H., Geeven G., Eijk P.P., Sie D., Ylstra B., Hulsman L.O., van Dooren M.F., van Zutven L.J., van den Ouweland A., Verbeek S., van Dijk K.W., Cornelissen M., Das A.T., Berkhout B., Sikkema-Raddatz B., van den Berg E., van der Vlies P., Weening D., den Dunnen J.T., Matusiak M., Lamkanfi M., Ligtenberg M.J., ter Brugge P., Jonkers J., Foekens J.A., Martens J.W., van der Luijt R., van Amstel H.K., van Min M., Splinter E., de Laat W. Targeted sequencing by proximity ligation for comprehensive variant detection and local haplotyping. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(10):1019-1025. DOI 10.1038/nbt.2959.
- Deutschbauer A., Price M.N., Wetmore K.M., Shao W., Baumohl J.K., Xu Z., Nguyen M., Tamse R., Davis R.W., Arkin A.P. Evidence-based annotation of gene function in *Shewanella oneidensis* MR-1 using genome-wide fitness profiling across 121 conditions. *PLoS Genet.* 2011;7(11):e1002385. DOI 10.1371/journal.pgen.1002385.
- Dymond J., Boeke J. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRAmBLE system and genome minimization. *Bioeng. Bugs.* 2012;3(3):168-171. DOI 10.4161/bbug.19543.
- Francke U., Hsieh C.L., Kelly D., Lai E., Popko B. Induced reciprocal translocation in transgenic mice near sites of transgene integration. *Mamm. Genome.* 1992;3(4):209-126. DOI 10.1007/BF00355721.
- Friedrich M.J., Rad L., Bronner I.F., Strong A., Wang W., Weber J., Mayho M., Pongstingl H., Engleitner T., Grove C., Pfau A., Saur D., Cadiñanos J., Quail M.A., Vassiliou G.S., Liu P., Bradley A., Rad R. Genome-wide transposon screening and quantitative insertion site sequencing for cancer gene discovery in mice. *Nat. Protoc.* 2017;12(2):289-309. DOI 10.1038/nprot.2016.164.
- Gabriel R., Kutschera I., Bartholomae C.C., von Kalle C., Schmidt M. Linear amplification mediated PCR-localization of genetic elements and characterization of unknown flanking DNA. *J. Vis. Exp.* 2014; (88):e51543. DOI 10.3791/51543.
- Goh K.G.K., Phan M.D., Forde B.M., Chong T.M., Yin W.F., Chan K.G., Ulett G.C., Sweet M.J., Beatson S.A., Schembri M.A. Genome-wide discovery of genes required for capsule production by uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio.* 2017;8(5):e01558-17. DOI 10.1128/mBio.01558-17.
- Goodman A.L., Wu M., Gordon J.I. Identifying microbial fitness determinants by insertion sequencing using genome-wide transposon mutant libraries. *Nat. Protoc.* 2011;6(12):1969-1980. DOI 10.1038/nprot.2011.417.
- Hochrein L., Mitchell L.A., Schulz K., Messerschmidt K., Mueller-Roeber B. L-SCRAmBLE as a tool for light-controlled Cre-mediated recombination in yeast. *Nat. Commun.* 2018;9(1):1931. DOI 10.1038/s41467-017-02208-6.
- Laboulaye M.A., Duan X., Qiao M., Whitney I.E., Sanes J.R. Mapping transgene insertion sites reveals complex interactions between mouse transgenes and neighboring endogenous genes. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:385. DOI 10.3389/fnmol.2018.00385.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li S., Jia S., Hou L., Nguyen H., Sato S., Holding D., Cahoon E., Zhang C., Clemente T., Yu B. Mapping of transgenic alleles in soybean using a nanopore-based sequencing strategy. *J. Exp. Bot.* 2019; 70(15):3825-3833. DOI 10.1093/jxb/erz202.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* 2011;17:10-12. DOI 10.14806/ej.17.1.200.
- Moudgil A., Wilkinson M.N., Chen X., He J., Cammack A.J., Vasek M.J., Lagunas T.J., Qi Z., Lalli M.A., Guo C., Morris S.A., Dougherty J.D., Mitra R.D. Self-reporting transposons enable simultaneous readout of gene expression and transcription factor binding in single cells. *Cell.* 2020;182(4):992-1008.e21. DOI 10.1016/j.cell.2020.06.037.
- Nicholls P.K., Bellott D.W., Cho T.J., Pyntikova T., Page D.C. Locating and characterizing a transgene integration site by nanopore sequencing. *G3 (Bethesda).* 2019;9(5):1481-1486. DOI 10.1534/g3.119.300582.
- Park D., Park S.H., Ban Y.W., Kim Y.S., Park K.C., Kim N.S., Kim J.K., Choi I.Y. A bioinformatics approach for identifying transgene insertion sites using whole genome sequencing data. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):67. DOI 10.1186/s12896-017-0386-x.
- Pindur A.V., de Jong J., Akhtar W. TRIP through the chromatin: a high throughput exploration of enhancer regulatory landscapes. *Genomics.* 2015;106(3):171-177. DOI 10.1016/j.ygeno.2015.06.009.
- Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-842. DOI 10.1093/bioinformatics/btq033.
- Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(1):24-26. DOI 10.1038/nbt.1754.
- Smith A.J., De Sousa M.A., Kwabi-Addo B., Heppell-Parton A., Impy H., Rabbits P. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat. Genet.* 1995;9(4):376-385. DOI 10.1038/ng0495-376.
- Uemura M., Niwa Y., Kakazu N., Adachi N., Kinoshita K. Chromosomal manipulation by site-specific recombinases and fluorescent protein-based vectors. *PLoS One.* 2010;5(3):e9846. DOI 10.1371/journal.pone.0009846.
- Wang H., Mayhew D., Chen X., Johnston M., Mitra R.D. "Calling cards" for DNA-binding proteins in mammalian cells. *Genetics.* 2012;190(3):941-949. DOI 10.1534/genetics.111.137315.
- Wang W., Bartholomae C.C., Gabriel R., Deichmann A., Schmidt M. The LAM-PCR method to sequence LV integration sites. *Methods Mol. Biol.* 2016;1448:107-120. DOI 10.1007/978-1-4939-3753-0_9.
- Zastrow-Hayes G.M., Lin H., Sigmund A.L., Hoffman J.L., Alarcon C.M., Hayes K.R., Richmond T.A., Jeddloh J.A., May G.D., Beatty M.K. Southern-by-sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. *Plant Genome.* 2015;8(1):1-15. DOI 10.3835/plantgenome2014.08.0037.
- Zhang R., Yin Y., Zhang Y., Li K., Zhu H., Gong Q., Wang J., Hu X., Li N. Molecular characterization of transgene integration by next-generation sequencing in transgenic cattle. *PLoS One.* 2012;7(11): e50348. DOI 10.1371/journal.pone.0050348.

ORCID ID

P.A. Salnikov orcid.org/0000-0001-9470-7178
A.A. Khabarova orcid.org/0000-0002-9425-9763
G.S. Koksharova orcid.org/0000-0001-5664-492X
R.V. Mungalov orcid.org/0000-0001-6321-3917
P.S. Belokopytova orcid.org/0000-0003-1390-7341

I.E. Pristyazhnuk orcid.org/0000-0003-0226-4213
A.R. Nurislamov orcid.org/0000-0002-0553-1316
P. Somatich orcid.org/0000-0001-5681-2911
M.M. Gridina orcid.org/0000-0002-7972-5949
V.S. Fishman orcid.org/0000-0002-5573-3100

Acknowledgements. We gratefully thank the Center for Shared Use of Microscopic Analysis of Biological Objects SB RAS and Center for Shared Use of Flow Cytometry SB RAS for providing metaphase chromosomes analysis and FACS sorting facilities (supported by budget project No. 0259-2021-0016). Computational data analysis was performed on the high-throughput nodes of the Novosibirsk State University. Generation of plasmid vectors, derivation, and expansion of cell lines, molecular analysis, and NGS sequencing were supported by Russian Science Foundation grant No. 19-74-00102.



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

Received June 2, 2021. Revised June 22, 2021. Accepted July 1, 2021.

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

Оценка компетентности к развитию ооцит-кумулюсных комплексов *Sus scrofa domestica* (L.) после интра- и экстраовариальной витрификации

Т.И. Кузьмина, И.В. Чистякова 



Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
 prof.kouzmina@mail.ru;  itjeren7@gmail.com

Аннотация. Цель настоящей работы – идентификация влияния экстра- (ЭОВ) и интраовариальной витрификации (ИОВ) на митохондриальную активность (МА), состояния хроматина в ооцитах свиней в процессе созревания *in vitro*. При ЭОВ ооциты свиней обрабатывали растворами криопротекторов (КПР): КПР-1 – 0.7 М диметилсульфоксида (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПР-2 – 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; КПР-3 – 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалозы. При ИОВ фрагменты яичников опускали в КПР-1 – 7.5 % ЭГ + 7.5 % ДМСО, затем в КПР-2 – 15 % ЭГ, 15 % ДМСО и 0.5 М сахарозы. Пайеты с ооцитами и фрагменты яичников погружали и хранили в LN₂. Для девитрификации ЭОВ ооциты экспонировали в 0.25, 0.19 и 0.125 М растворах трегалозы, ИОВ – в 0.5 и 0.25 М трегалозы. Ооциты культивировали в среде NCSU-23 с 10 % жидкости фолликулов, их стенками, гормонами. Все среды дополняли 0.001 % наночастиц высокодисперсного кремнезема (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, Украина). Режимы оплодотворения и культивирования эмбрионов представлены нами в методических рекомендациях. Митохондриальную активность и статус хроматина оценивали MitoTracker Orange CMTMRos и цитогенетическим методом. Выявлены достоверные различия в уровне ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом между контрольной и витрифицированными группами (81 % против 59 и 52 % соответственно, $p \leq 0.001$). Доля пикнотических клеток у нативных ооцитов составила 19 %, у ЭОВ и ИОВ ооцитов – 39 и 49 % соответственно. Стадии метафазы II достигли 86 % нативных ооцитов, и только 48 % ЭОВ и 33 % ИОВ ооцитов завершили созревание ($p \leq 0.001$). Отмечена достоверная разница в МА между группами, подвергнутыми ИОВ и ЭОВ (89.4 ± 7.5 и 149.2 ± 11.3 мкА соответственно, $p < 0.05$). Впервые получены доимплантационные эмбрионы из ооцитов свиней, подвергнутых интраовариальной витрификации.
Ключевые слова: ооцит; витрификация; экстраовариальная; интраовариальная; митохондрии; *Sus scrofa domestica* (L.).

Для цитирования: Кузьмина Т.И., Чистякова И.В. Оценка компетентности к развитию ооцит-кумулюсных комплексов *Sus scrofa domestica* (L.) после интра- и экстраовариальной витрификации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):613-619. DOI 10.18699/VJ21.069

Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domestica* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification

T.I. Kuzmina, I.V. Chistyakova 

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia
 prof.kouzmina@mail.ru;  itjeren7@gmail.com

Abstract. The aim of the present study was to identify the influence of extra- (EOV) and intraovarian vitrification (IOV) on mitochondrial activity (MA) and chromatin state in porcine oocytes during maturation *in vitro*. During EOV porcine oocytes were exposed in cryoprotective solutions (CPS): CPS-1 – 0.7 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.9 M ethylene glycol (EG); CPS-2 – 1.4 M DMSO + 1.8 M EG; CPS-3 – 2.8 M DMSO + 3.6 M EG + 0.65 M trehalose. At IOV the ovarian fragments were exposed in CPS-1 – 7.5 % EG + 7.5 % DMSO, then in CPS-2 – 15 % EG, 15 % DMSO and 0.5 M sucrose. Straws with oocytes and ovarian fragments were plunged into LN₂ and stored. For devitrification, the EOV oocytes were washed in solutions of 0.25 M, 0.19 M and 0.125 M of trehalose, the IOV – in 0.5 M and 0.25 M trehalose. Oocytes were cultured in NCSU-23 medium with 10 % fluid of follicles, follicular walls, hormones. 0.001 % of highly dispersed silica nanoparticles (ICP named after A.A. Chuyko of the NAS of Ukraine) were added to all media. The methods of fertilization and embryo culture are presented in the guidelines developed by us. MA and chromatin state were measured by MitoTracker Orange CMTMRos and the cytogenetic method. Significant differences in the level of oocytes with high-expanded cumulus between control and experimental vitrified groups (81 % versus

59 % and 52 %, respectively, $p \leq 0.001$) were observed. The percentage of pyknotic cells in native oocytes was 19 %, EOY or IOY oocytes were 39 % and 49 %, respectively. After culture, the level of matured native oocytes was 86 %, 48 % EOY and 33 % IOY cells finished the maturation ($p \leq 0.001$). Differences were also observed in the level of MA between groups treated by EOY and IOY ($89.4 \pm 7.5 \mu\text{A}$ and $149.2 \pm 11.3 \mu\text{A}$, respectively, $p \leq 0.05$). For the first time, pre-implantation embryos were obtained from oocytes treated by IOY.

Key words: oocyte; vitrification; extraovarian; intraovarian; mitochondria; *Sus scrofa domesticus* (L.).

For citation: Kuzmina T.I., Chistyakova I.V. Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domesticus* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):613-619. DOI 10.18699/VJ21.069

Введение

Разработка метода витрификации для криоконсервации репродуктивных клеток – наиболее значимое достижение для вспомогательных репродуктивных технологий человека и животных в последние 70 лет (Coello et al., 2018). Однако за более чем полувековые исследования этой области результаты по получению жизнеспособных эмбрионов из девитрифицированных ооцитов остаются неоднозначными (Mullen, Fahy, 2012). В первую очередь, это связано с медленно развивающимся прогрессом в области модернизации протоколов (параметров) экстра- или интраовариальной технологии замораживания/оттаивания (Yurchuk et al., 2018).

При экстраовариальной витрификации женских гамет с применением открытых систем замораживания, таких как соломины, криотопы, криолупы, насыщение клеток криопротекторами достигается за короткие сроки при сравнительно невысоком времени экспозиции в витрифицирующих растворах, так же как и переход клеток в витрифицированное состояние. При закрытой интраовариальной (внутрифолликулярной) системе время экспозиции в криопротекторах значительно увеличивается, а скорость перехода воды в ооцитах в «стеклоподобную» фазу медленнее из-за повышения точки эвтектики (Obata et al., 2018). За счет удлинения времени фазового перехода воды возникает опасность образования вне- и внутриклеточного льда, оказывающего повреждающее действие на клетки (Амстиславский и др., 2015). Однако при использовании открытого способа витрификации существует риск инвазивирования витрифицируемой среды и ооцит-кумулясных комплексов, что впоследствии может повлиять на компетентность клеток к оплодотворению и последующему эмбриональному развитию (Joaquim et al., 2017). В таком случае интраовариальная витрификация может стать альтернативной закрытой системой, нивелирующей воздействие резистентных криогенных микроорганизмов и грибов на ткани яичника и ооциты (Bielanski, 2012). Между тем применение обеих моделей витрификации предполагает возникновение температур- и осмотически-зависимых повреждений субклеточных компартментов половых и соматических клеток (Buderatska, Petrushko, 2016).

Наиболее чувствительными органеллами являются цитоскелет, митохондрии и ядерный аппарат, которые играют важную роль в процессе пролиферации соматических клеток, а также созревания и дальнейшего развития женских гамет (Lai et al., 2014). В результате криогенных фазово-структурных переходов и перекисного окисления аннулярных липидов барьерные свойства митохондриальной мембраны нарушаются, происходит утечка транс-

портируемых ионов, в том числе Ca^{2+} и H^{+} , и метаболитов как через систему активного транспорта, так и путем пассивной диффузии через трансмембранные эффекты (неспецифические поры высокой проницаемости), которая обуславливает снижение энергоснабжения ооцита в период развития и способствует возникновению условий для запуска реакций апоптоза (Кузьмина и др., 2019). Низкотемпературное повреждение ядерного аппарата ооцитов характеризуется главным образом снижением его матричной активности (синтеза ДНК и РНК), вследствие криоденатурации и потери функциональной активности ферментов (Pereira et al., 2019).

Таким образом, создание оптимальной и эффективной технологии витрификации, способной максимально сохранить архитектуру и функциональную активность клеточных компартментов, которые обеспечивают формирование яйцеклетки, компетентной к оплодотворению, – одна из основных задач, стоящих перед репродуктологами и криобиологами, занимающимися проблемами низкотемпературного сохранения половых клеток.

Цель настоящей работы – идентифицировать характер влияния различных моделей (экстра- и интраовариальной) витрификации на функциональную активность митохондрий (интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos) и статус хроматина в нативных и девитрифицированных ооцитах *Sus scrofa domesticus* (L.) при экстракорпоральном созревании женских гамет и развитие из них доимплантационных эмбрионов.

Материалы и методы

Все реагенты, задействованные при выполнении экспериментов, за исключением обозначенных в тексте, – производства компании Sigma-Aldrich (США). Пластиковая лабораторная посуда – фирмы BD Falcon™ (США).

В экспериментах использовали ооцит-кумулясные комплексы (ОКК), аспирированные из антральных фолликулов яичников *S. scrofa domesticus* (L.) (свинья домашняя) породы ландрас. Яичники свиней после овариоэктомии животных доставляли в лабораторию в 0.9 % растворе NaCl при температуре 30–35 °С, содержащем антибиотики. Для экспериментов брали ооциты, окруженные не менее чем пятью компактными слоями кумулюсных клеток с равномерной по ширине зоной пеллюцида гомогенной ооплазмы. Денудированные ооциты и ооциты с рыхлым кумулюсом не брали.

Клетки, предназначенные для экстраовариальной витрификации, обрабатывали тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на основе среды ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, Великобритания): КПА-1 – 0.7 М диметилсуль-

фосфида (ДМСО)+0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2 – 1.4 М ДМСО+1.8 М ЭГ; КПА-3 – 2.8 М ДМСО+3.6 М ЭГ+0.65 М трегалозы. Ооцит-кумуляционные комплексы поэтапно экспонировали в течение 30 с в КПА-1, затем 30 с в КПА-2 и 20 с – в КПА-3. При интраовариальной витрификации препарированные яичники животных делили на 6–8 секций (15×20 мм), помещали в стерильные марлевые мешочки и опускали в растворы КПА, приготовленные на основе фосфатного буферного раствора Дюльбекко (ФБР) с добавлением 20 % ФБС: КПА-1 – 7.5 % ЭГ+7.5 % ДМСО (15 мин), затем в КПА-2 – 15 % ЭГ, 15 % ДМСО и 0.5 М сахарозы (2 мин). Пайеты с ооцитами и стерильные марлевые мешочки с фрагментами яичников погружали в сосуды Дьюара с LN₂ (–196 °С) не менее чем на 1 ч. Экстраовариально витрифицированные ОКК извлекали из пайет после оттаивания и экспонировали в 0.25 М растворе трегалозы (3 мин) на основе среды ТС-199 с добавлением 10 % ФБС при 37 °С, отмывали последовательно в 0.19 М растворе (3 мин) и затем в 0.125 М растворе трегалозы (3 мин). Аспирированные ооциты из фрагментов после оттаивания последовательно обрабатывали 0.5 М (1 мин) и 0.25 М (5 мин) растворами трегалозы, приготовленными на основе ФБР с 20 % содержанием ФБС. Финальную отмывку клеток проводили в среде ТС-199 с добавлением 10 % ФБС. Все среды для витрификации/девитрификации дополняли наночастицами высокодисперсного кремнезема (нВДК) в концентрации 0.001 % (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, Украина). При выборе концентрации руководствовались данными, полученными разработчиками (Галаган и др., 2010).

Нативные и девитрифицированные ОКК культивировали в атмосфере с 5 % CO₂ при 90 % влажности, температуре 38 °С, в среде North Carolina State University-23 (NCSU-23), в которую добавляли 10 % фолликулярной жидкости (из фолликулов диаметром 3–6 мм), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека, 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади, фрагменты стенок фолликулов (размером 600×900 мкм), 50 мкг/мл гентамицина и 0.001 % наночастиц ВДК (Abeydeera et al., 1998). Режимы оплодотворения ооцитов и культивирования эмбрионов представлены в методических рекомендациях (Кузьмина и др., 2008).

Для оценки митохондриальной активности в нативных и девитрифицированных ооцитах применяли флуоресцентный зонд MitoTracker Orange CMTRos (ThermoFisher Scientific, Великобритания). Ооцит-кумуляционные комплексы помещали в капли 500 нМ раствора зонда и инкубировали в темноте при температуре 37 °С 30 мин. Затем ооциты отмывали в ФБР с добавлением 0.3 % бычьего сывороточного альбумина. Отмытые ооциты очищали от кумулюсных клеток путем инкубации в 0.1 % растворе трипсина при 37 °С в течение 5–10 мин, переносили в раствор Хенкса, содержащий 3.7 % параформальдегида, затем фиксировали (15 мин, 37 °С). После фиксации ооциты отмывали в ФБР, помещали на стекла Super frost.

Для анализа статуса хроматина очищенные (от кумулюса) ооциты и клетки кумулюса помещали на 5–10 мин в теплый 0.9 % гипотонический раствор 3-замещенного цитрата натрия. Затем клетки фиксировали смесью мета-

нола и уксусной кислоты (3:1). Суховоздушные препараты окрашивали 4 % раствором Романовского–Гимзе 3–4 мин (Tarkowski, 1966).

Измерение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTRos и оценку ядерного созревания в нативных и девитрифицированных ооцитах, уровня пикноза в клетках кумулюса проводили с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия) и фотометра (Nikon, Германия). Длины волн возбуждения для MitoTracker Orange CMTRos – 554 нм, излучения – 576 нм. Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTRos измеряли в мкА.

Результаты обрабатывали с помощью статистической программы SigmaStat (Jandel Scientific Software, США). Данные представлены как средние значения (М) и стандартные ошибки средних (\pm SEM), а также в виде частотных переменных значений. Для оценки достоверности различий между значениями использовали *t*-критерий Стьюдента и критерий χ^2 Пирсона. Значимость различий оценивали при следующих уровнях: $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$ для трех-пяти независимых экспериментов.

Результаты и обсуждение

Трудности в создании эффективных методов замораживания яйцеклеток обусловлены прежде всего структурно-функциональными особенностями организации ооцита, а также внутри- и межклеточными сигнальными взаимодействиями в девитрифицированных ооцитах (Moussa et al., 2014).

В наших исследованиях выявлено, что доля интактных ооцитов, окруженных высокоэкспандированным кумулюсом, значительно превышала таковые в группах, где культивировали ооциты, предварительно девитрифицированные, независимо от модели витрификации (81 % против 59 и 52 % соответственно, $p \leq 0.001$) (рис. 1 и 2). Достоверных различий между группами ооцитов, витрифицированных вне (экстра-) или внутри (интра-) фрагментов яичника, по вышеуказанному показателю не наблюдалось (см. рис. 1). Анализ деструктивных процессов в кумулюсных клетках нативных и девитрифицированных ооцитов продемонстрировал значительные различия по уровню пикнозов в представленных группах (см. рис. 1). Наименьшие показатели деструкции хроматина клеток кумулюса обнаружены в контрольной нативной группе (19 %). Достоверных различий между долями клеток кумулюса с пикнотическими ядрами, окружающими экстра- или интраовариально девитрифицированные ооциты, не установлено (39 и 49 % соответственно).

В процессе культивирования девитрифицированных и интактных ооцитов *in vitro* показано, что после экстраовариальной витрификации 68 % клеток реиницировали мейоз, при интраовариальной витрификации этот показатель составил 58 %, что оказалось значительно ниже, чем в группе нативных ооцитов (89 %, $p \leq 0.001$) (рис. 3 и 4). Около половины ооцитов, витрифицированных экстраовариально (49 %), достигли завершающей стадии созревания (метафаза II), при интраовариальной витрификации доля созревших клеток была 33 %, при этом эти показатели оказались достоверно ниже процента завершающих свое созревание нативных клеток (86 %, $p \leq 0.001$).

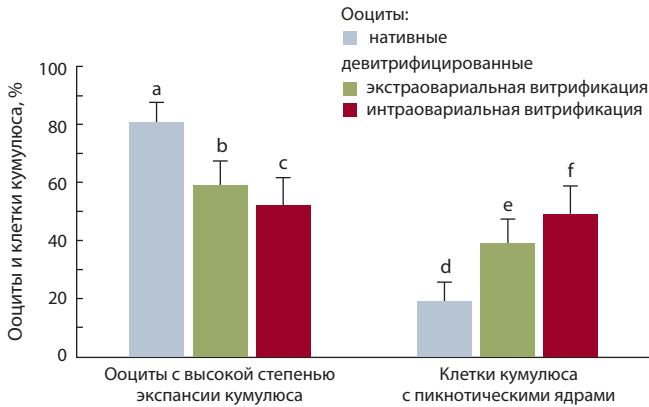


Рис. 1. Анализ показателей криорезистентности соматических клеток фолликула (кумулюс) *S. scrofa domestica* (L.) при использовании различных моделей витрификации (интра- и экстраовариальная, количество ооцитов – 379, число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a,b; a,c; d,f $p \leq 0.001$; d,e $p \leq 0.01$.

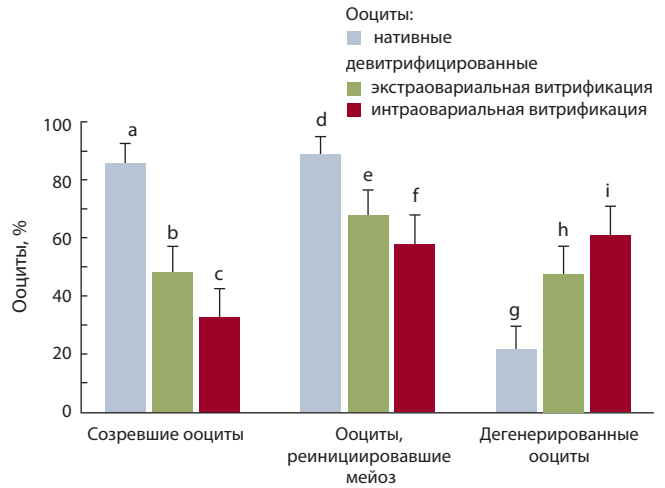


Рис. 3. Статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов *S. scrofa domestica* (L.) после культивирования *in vitro* при использовании различных моделей витрификации (интра- и экстраовариальная, количество ооцитов – 323; число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a,b; a,c; d,e; d,f; g,h; g,i $p \leq 0.001$; b,c $p \leq 0.05$.

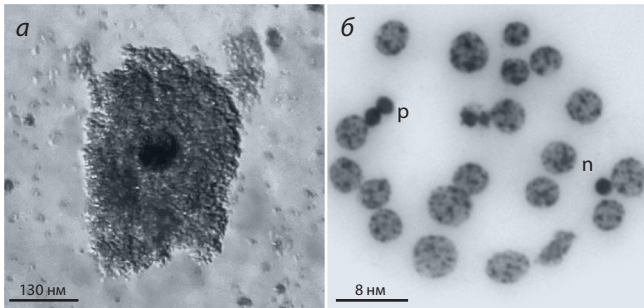


Рис. 2. Ооцит-кумулюсный комплекс с высокой степенью экспансии кумулюсных клеток (a) и клетки кумулюса *S. scrofa domestica* (L.) с нормальными, n, и пикнотическими, p, ядрами (b) после экстраовариальной витрификации.

$p \leq 0.001$). Доля клеток с признаками деструкции хроматина достигла 22 % среди нативных ооцитов, 48 % – среди экстра- и 61 % – среди интраовариально витрифицированных ооцитов свиней ($p \leq 0.001$).

Митохондрии обеспечивают клетку аденозинтрифосфатом, необходимым для завершения мейотического созревания, особенности их функционирования – один из биомаркеров функционального состояния гаметы и ее качества (Al-Zubaidi et al., 2019). В группе интраовариально витрифицированных ооцитов митохондриальный потенциал (интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos) был значительно снижен по сравнению с ооцитами, витрифицированными экстраовариально (89.4 ± 7.5 против 149.2 ± 11.3 мкА соответственно, $p \leq 0.05$) (рис. 5 и 6). В группе нативных ооцитов показатель интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos составил 161.2 ± 10.8 мкА.

Во всех экспериментальных группах были получены эмбрионы, в том числе и на завершающей стадии доимплантационного развития – стадии бластоцисты (рис. 7 и 8). После оплодотворения экспериментальных групп ооцитов доли раздробившихся клеток при экстра- и

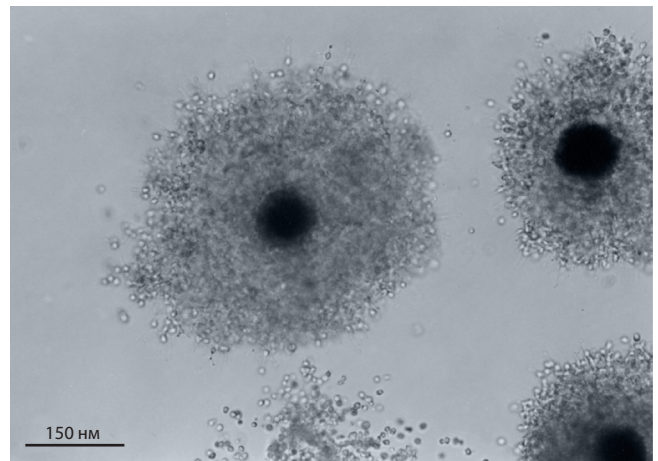


Рис. 4. Интраовариально витрифицированные ооциты *S. scrofa domestica* (L.) после 44 ч культивирования *in vitro*.

интраовариальной витрификации составили 27 и 21 % соответственно, что все же оказалось достоверно ниже процента оплодотворенных клеток в интактной нативной группе (49 %, $p \leq 0.001$). Выход эмбрионов свиней на стадиях поздней морулы, бластоцисты, развившихся из ооцитов, витрифицированных интра- и экстраовариально, составил 5 и 8 % соответственно.

Основным из косвенных признаков, по которому можно судить о зрелости и компетентности ооцита к развитию, является степень экспансии кумулюсных клеток (Spricigo et al., 2011). В проведенном нами анализе степени экспансии кумулюсных клеток после 44 ч культивирования нативных и девитрифицированных ооцитов *S. scrofa domestica* (L.) показано, что наибольшее количество ооцитов, обладающих низкой степенью экспансии, находится среди экстра- или интраовариально витрифицированных

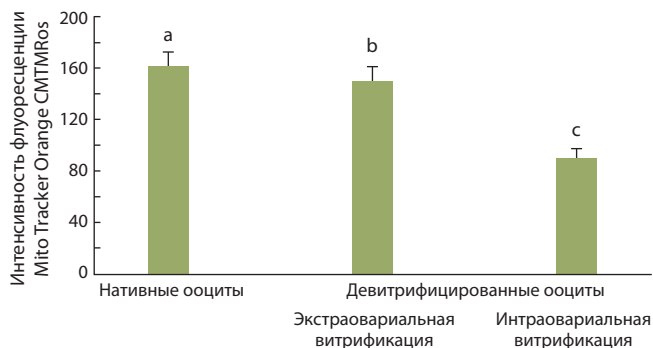


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в нативных и девитрифицированных ооцитах *S. scrofa domestica* (L.) ($M \pm SEM$, количество ооцитов – 103, число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (t-критерий Стьюдента):
a;c; b:c $p \leq 0.05$.

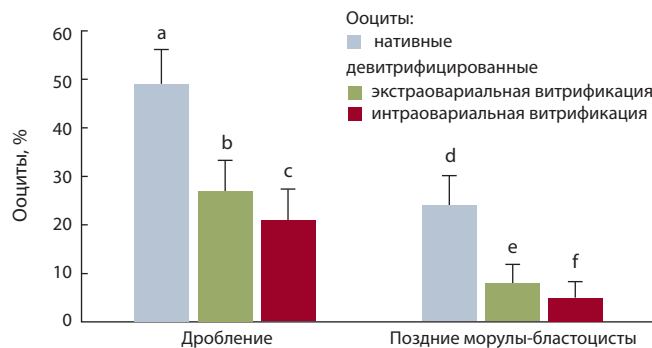


Рис. 7. Развитие доимплантационных эмбрионов *S. scrofa domestica* (L.), полученных из девитрифицированных ооцитов (количество ооцитов – 556, число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона):
a;c; d:f $p \leq 0.001$; a;b; d:e $p \leq 0.01$.

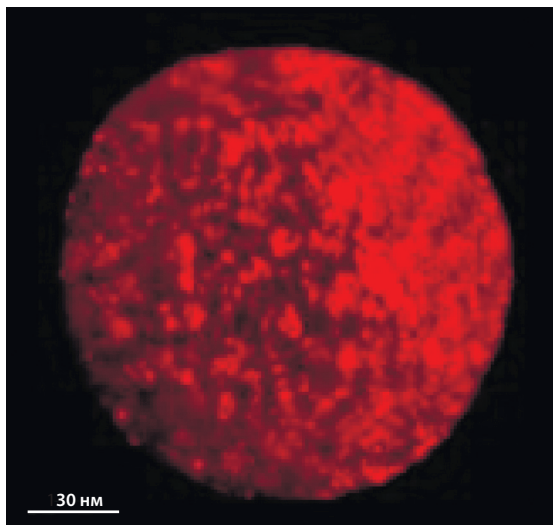


Рис. 6. Ооцит *S. scrofa domestica* (L.) с высокой степенью интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos после экстраовариальной витрификации.

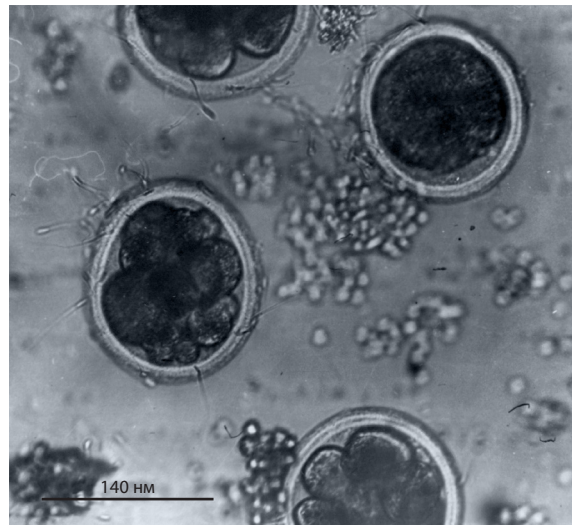


Рис. 8. Раздробившиеся эмбрионы, полученные из экстраовариально витрифицированных ооцитов *S. scrofa domestica* (L.).

ооцитов в сравнении с контрольной интактной группой (59 и 52 % против 86 %, $p \leq 0.001$). При обработке ооцитов свиней сверхнизкими температурами происходит снижение степени экспансии клеток кумулюса из-за повреждения так называемых «трансзональных мостов», образованных щелевыми контактами и осуществляющих коммуникацию за счет передачи паракринных сигналов (Appelant et al., 2017). Усиление процесса пикнотизации ядер девитрифицированных клеток кумулюса можно объяснить тем, что в процессе криоконсервации (а именно дегидратации клетки при обработке растворами криопротекторов) наблюдается чрезмерная конденсация хромосом, приводящая к «сморщиванию» клеточного ядра, которое обуславливает снижение числа нормально функционирующих клеток кумулюса (Wei et al., 2016; Kokotsaki et al., 2018).

Клетки кумулюса обеспечивают поступление в ооцит циклического гуанозин-монофосфата, который предотвращает разрушение циклического аденозин-монофосфата

цАМФ через ингибирование его гидролиза фосфодиэстеразой PDE3A (Mehlmann, 2005), и таким образом, поддерживает арест первого мейотического деления на стадии профазы I. При последующем снижении уровня цАМФ и активации фактора, способствующего созреванию (maturation promoting factor, MPF) за счет дефосфорилирования *p34cdc2* и синтеза циклина В происходит стимуляция реинициации мейоза (Yang et al., 2010). В наших исследованиях показано, что при использовании обеих моделей витрификации (экстра- или интраовариальной) отмечается ингибирование реинициации мейоза у более чем половины девитрифицированных ооцитов (см. рис. 2), что может быть обусловлено термозависимым разрывом связи клеток кумулюса с ооцитом и, как следствие, нарушением концентрационного баланса внутриклеточного цАМФ (Mehlmann, 2005).

В течение культивирования экстра- или интраовариально витрифицированных ооцитов резко снижается доля созревших ооцитов с нормальным хроматином, возраст

тает уровень клеток с дегенерацией хроматина по сравнению с такими показателями контрольной группы, что по-видимому, опосредовано разрушением нуклеотидов, появлением одно- и двухнитевых разрывов ДНК (Pereira et al., 2019). Возрастание количества дегенерированных клеток во время культивирования также может быть обусловлено смещением равновесия между полимеризацией и деполимеризацией анафазного веретена в процессе прохождения ооцитами стадий метафазы I и анафазы, последующим нарушением его сборки, которое влияет на сегрегацию хромосом при первом мейотическом делении (Yang et al., 2012).

При воздействии ультранизких температур ввиду повышения цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} в клетке митохондрии подвергаются чрезмерной нагрузке ионизированной формой Ca^{2+} (Shahsavari et al., 2019). В результате такой нагрузки открываются неспецифические поры высокой проницаемости (НПВП), что неизбежно ведет к гибели ооцитов по апоптотическому механизму (Новодережкина и др., 2016). Определяющую роль в открытии НПВП при заморозке играет окислительный стресс, опосредованный накоплением активных форм кислорода, который приводит к разрушению структуры мембранных белков и снижению трансмембранного потенциала митохондрий (Заводник, 2016).

Таким образом, снижение митохондриального потенциала при воздействии сверхнизких температур на митохондрии в процессе витрификации может быть связано с увеличением концентрации активных форм кислорода и, как следствие, повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} и образованием НПВП. Значительное снижение митохондриальной активности в группе интраовариально витрифицированных ооцитов, по сравнению с экстраовариально витрифицированными, может быть обусловлено дополнительными процессами рекристаллизации тканей ввиду недостаточности насыщения тканей яичников криопротекторами (Кузьмина, Чистякова, 2020).

Снижение процента раздробившихся клеток и выхода эмбрионов из интра-/экстраовариально витрифицированных ооцитов, возможно, связано с тем, что в процессе криоконсервации ооцитов при обработке криопротекторами и замораживания происходит временный подъем внутриклеточной концентрации ионов кальция в ооцитах (Larman et al., 2006), что приводит к экзоцитозу кортикальных гранул (Kline D., Kline J.T., 1992) и преждевременному уплотнению зоны пеллюциды, препятствующему оплодотворению яйцеклетки.

Заключение

Криобанки как источники биологического сырья имеют большое значение для последующего использования ооцитов животных или их оопластов в клеточной и генетической инженерии, в частности в широко практикуемой методике геномного редактирования CRISPR-cas9, а также в сохранении генофонда исчезающих пород и генетического разнообразия. Разработка эффективной технологии витрификации на основе применения различных подходов, в том числе использования веществ различного (природного или синтетического) происхо-

ждения, обладающих криопротекторными свойствами, – одно из основных практических направлений развития репродуктивной биологии.

В нашем исследовании проанализированы показатели ядерно-цитоплазматического созревания донорских ооцитов, подвергнутых воздействию сверхнизких температур, в том числе статус хроматина и уровень митохондриальной активности гамет. Выявленные особенности в функционировании обозначенных выше клеточных компарментов позволили дополнить имеющиеся в литературе данные о характере деструктивных процессов, проводимых процедурами витрификации/девитрификации. Воздействие сверхнизких температур обусловило снижение уровня ооцитов, завершивших ядерное созревание, и уменьшение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (маркера функциональной активности митохондрий).

Продемонстрирована также важность коммуникации ооцита с соматическими клетками овариального фолликула (кумулюс). Морфология кумулюсных клеток после процедуры (витрификация/девитрификация) во многом определяла «судьбу» самого ооцита – завершение ядерного созревания (достижение ооцитом стадии метафазы II) и функциональную активность митохондрий. Представленные в работе протоколы интра- и экстраовариальной витрификации/девитрификации, модернизированные введением в состав криопротекторных и культуральных сред наночастиц высокодисперсного кремнезема, позволили впервые получить доимплантационные эмбрионы свиней (*S. scrofa domestica* (L.)) из фрагментов девитрифицированных яичников.

Список литературы / References

- Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. *Онтогенез*. 2015;46(2): 67-81. DOI 10.7868/S0475145015020020.
[Amstislavsky S.Y., Brusentsev E.Y., Rozhkova I.N., Okotrub K.A. Embryo and gamete cryopreservation for genetic resources conservation of laboratory animals. *Russ. J. Dev. Biol.* 2015;46(2):47-59. DOI 10.1134/S1062360415020022.]
- Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л., Новикова Е.А., Туров В.В. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот. *Biopolym. Cell.* 2010;26(3):205-213. DOI 10.7124/bc.000158.
[Galagan N.P., Klymenko N.Y., Orel I.L., Novikova E.A., Turov V.V. Biofunctional nanomaterials based on ultrafine silica, protein and aminocarbohydrates. *Biopolym. Cell.* 2010;26(3):205-213. DOI 10.7124/bc.000158.]
- Заводник И.Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация. *Биомед. химия*. 2016;62(3):311-317. DOI 10.18097/PBMC20166203311.
[Zavodnik I.B. Mitochondria, calcium homeostasis and calcium signaling. *Biomeditsinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry*. 2016; 62(3):311-317. DOI 10.18097/PBMC20166203311. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Альм Х., Торнер Х. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*: методические рекомендации. СПб., 2008.
[Kuzmina T.I., Alm H., Tomer H. Methods of Porcine Embryo Production *in vitro*. St. Petersburg, 2008. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Епишко О.А., Усенбеков Е.С. Влияние витрификации на митохондриальную активность ооцитов свиней при созревании *in vitro*. *Ветеринария*. 2019;4:38-41. DOI 10.30896/0042-4846.2019.22.4.38-41.

- [Kuzmina T.I., Epishko O.A., Usenbekov E.S. Effect of vitrification on mitochondrial activity of oocytes during *in vitro* maturation. *Veterinariya = Veterinary*. 2019;4:38-41. DOI 10.30896/0042-4846.2019.22.4.38-41. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Чистякова И.В. Оценка компетентности к развитию ооцитов *Bos taurus* после интра- или экстраовариальной витрификации. *Достижения науки и техники АПК*. 2020;34(2):61-64. DOI 10.24411/0235-2451-2020-10213.
- [Kuzmina T.I., Chistyakova I.V. Assessment of competence for the development of *Bos taurus* oocytes after intra- or extraovarial vitrification. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2020;34(2):61-64. DOI 10.24411/0235-2451-2020-10213. (in Russian)]
- Новодережкина Е.А., Животовский Б.Д., Гогвадзе В.Г. Индукция неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны и ее роль в гибели клеток. *Молекуляр. биология*. 2016;50(1):51-68. DOI 10.7868/S002689841601016X.
- [Novoderezhkina E.A., Zhivotovsky B.D., Gogvadze V.G. Induction of unspecific permeabilization of mitochondrial membrane and its role in cell death. *Mol. Biol.* 2016;50(1):43-58. DOI 10.1134/S0026893316010167.]
- Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Prather R.S., Day B.N. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 1998;50:747-756. DOI 10.1016/S0093-691X(98)00180-0.
- Al-Zubaidi U., Liu J., Cinar O., Robker R.L., Adhikari D., Carroll J. The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. *Mol. Hum. Rep.* 2019;25(11):695-705. DOI 10.1093/molehr/gaz055.
- Appeltant R., Somfai T., Santos E.C.S., Dang-Nguyen T.Q., Nagai T., Kikuchi K. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2017;29(12):2419-2429. DOI 10.1071/RD16386.
- Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*. 2012;77(3):467-482. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.07.043.
- Buderatska N.O., Petrushko M.P. Oocytes as alternative to embryos in cryopreservation applied in assisted reproductive technologies. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2016;26(4):375-382. DOI 10.15407/cryo26.04.375.
- Coello A., Pellicer A., Cobo A. Vitrification of human oocytes. *Minerva Ginecol.* 2018;70(4):415-423. DOI 10.23736/S0026-4784.18.04218-1.
- Joaquim D.C., Borges E.D., Viana I.G.R., Navarro P.A., Vireque A.A. Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination. *BioMed Res. Int.* 2017;4:1-11. DOI 10.1155/2017/1840417.
- Kline D., Kline J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 1992;149:80-89. DOI 10.1016/0012-1606(92)90265-i.
- Kokotsaki M., Mairhofer M., Schneeberger C., Marschalek J., Pietrowski D. Impact of vitrification on granulosa cell survival and gene expression. *Cryobiology*. 2018;85:73-78. DOI 10.1016/j.cryobiol.2018.09.006.
- Lai D., Ding J., Smith G.W., Smith G.D., Takayama S. Slow and steady cell shrinkage reduces osmotic stress in bovine and murine oocyte and zygote vitrification. *Hum. Rep.* 2014;30(1):37-45. DOI 10.1093/humrep/deu284.
- Larman M.G., Sheehan C.B., Gardner D.K. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction*. 2006;131:53-61. DOI 10.1530/rep.1.00878.
- Mehlmann L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 2005;130(6):791-799. DOI 10.1530/rep.1.00793.
- Moussa M., Shu J., Zhang X., Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspective. *Sci. China Life Sci.* 2014;57(9):903-914. DOI 10.1007/s11427-014-4689-z.
- Mullen S.F., Fahy G.M. A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. *Theriogenology*. 2012;78:1709-1719. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.06.008.
- Obata R., Nakamura Y., Okuyama N., Sasaki C. Comparison of residual dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG) concentration in bovine ovarian tissue during warming steps between slow freezing and vitrification. *Cryo Lett.* 2018;39(4):251-254. PMID: 30963170.
- Pereira B.C., Ortiz I., Dorado J.M., Diaz-Jimenez M.A., Consuegra C., Gosalvez J., Hidalgo M. Effect of permeable cryoprotectant-free vitrification on DNA fragmentation of equine oocyte-cumulus cells. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(3):53-56. DOI 10.1111/rda.13491.
- Shahsavari M.H., Moghaddam G., Daghigh Kia H. Effects of new synthetic cryoprotectant agents on histological characteristics of various classes of vitrified bovine pre-antral follicles. *Vet. Res. Forum*. 2019;10(1):9-16. DOI 10.30466/vrf.2019.34306.
- Spricigo J., Rumpf R., Dode M.A.N. Vitrification of bovine oocytes: effect of the meiotic stage on nuclear and cytoplasmic maturation. *Biol. Reprod.* 2011;85(1):721. DOI 10.1093/biolreprod/85.s1.721.
- Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. *Cytogenetic*. 1966;1:394-400.
- Wei J.H., Yuan X.Y., Zhang J.M., Wei J.Q. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016;198:22-26. DOI 10.1016/j.ejogrb.2015.12.010.
- Yang C.R., Miao D.Q., Zhang Q.H., Guo L., Tong J.S., Wei Y., Huang X., Hou Y., Schatten H., Liu Z., Sun Q.Y. Short-term preservation of porcine oocytes in ambient temperature: novel approaches. *PLoS One*. 2010;5(12):e14242. DOI 10.1371/journal.pone.0014242.
- Yang C.R., Wei Y., Qi S.T., Chen L., Zhang Q.H., Ma J.Y., Luo Y.B., Wang Y.P., Hou Y., Schatten H., Liu Z.H., Sun Q.Y. The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. *PLoS One*. 2012;7(6):e38807. DOI 10.1371/journal.pone.0038807.
- Yurchuk T., Petrushko M., Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum. Dev.* 2018;126:6-9. DOI 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016.

ORCID ID

T.I. Kuzmina orcid.org/0000-0002-4218-6080
I.V. Chistyakova orcid.org/0000-0001-7229-5766

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (№ 0445-2021-0005 и 121052600350-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.04.2021. После доработки 15.06.2021. Принята к публикации 17.06.2021.

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

Генетические ресурсы люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) и их роль в доместикации и селекции культуры

М.А. Вишнякова¹✉, Е.В. Власова², Г.П. Егорова¹

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

² Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

✉ m.vishnyakova.vir@gmail.com

Аннотация. Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.) – окультуренный вид многоцелевого назначения с очень короткой историей доместикации. Его используют как сидеральную, кормовую, продовольственную культуру, в качестве корма в рыбоводстве и в фармакологии. Однако генетический потенциал вида для создания продуктивных и адаптивных сортов далеко не реализован. Неоднократно показана узкая генетическая основа окультуренного генофонда по сравнению с диким. Поэтому эффективное использование генетических ресурсов вида имеет важное значение для дальнейшего развития культуры. Разнообразие генетических ресурсов люпина узколистного в мире, степень их изученности и пути применения можно представить посредством анализа сведений о коллекциях гермоплазмы вида, сохраняемых в национальных генбанках разных стран. В контексте этого анализа в статье приведены сведения о коллекции люпина узколистного ВИР: ее численности, составе, селекционном статусе образцов, методах изучения и выявления внутривидовой дифференциации, используемых классификациях. Показано, что коллекция люпина узколистного ВИР, занимающая второе место в мире по числу образцов, значительно отличается от других преобладанием в ней сортов научной селекции и селекционного материала, в то время как в большинстве коллекций преобладают дикие формы. Освещено значение дикого генофонда в селекции люпина узколистного в Австралии – мировом лидере производства культуры. Показана необходимость выявления эколого-географического разнообразия вида для создания сортов с адаптивными свойствами, соответствующими определенным условиям возделывания. Приведены данные оценки образцов коллекции ВИР по основным селекционно значимым признакам. Особое внимание уделено изучению образцов с ограниченным ветвлением, как перспективному генофонду для возделывания в сравнительно северных районах нашей страны. Они обладают меньшей, но более стабильной продуктивностью, пригодны для возделывания в загущенном посеве, что имеет целый ряд агротехнических преимуществ. Анализ работы с генетическими ресурсами люпина узколистного в различных национальных коллекциях мира способствует определению путей дальнейшей работы с коллекцией ВИР как единственным источником исходного материала для отечественной селекции.

Ключевые слова: люпин узколистный; генетические ресурсы; коллекции *ex situ*; разнообразие; генофонд; внутривидовая дифференциация; дикие формы.

Для цитирования: Вишнякова М.А., Власова Е.В., Егорова Г.П. Генетические ресурсы люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) и их роль в доместикации и селекции культуры. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):620-630. DOI 10.18699/VJ21.070

Genetic resources of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) and their role in its domestication and breeding

M.A. Vishnyakova¹✉, E.V. Vlasova², G.P. Egorova¹

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

² Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

✉ m.vishnyakova.vir@gmail.com

Abstract. Narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) is a cultivated multipurpose species with a very short history of domestication. It is used as a green manure, and for feed and food. This crop shows good prospects for use in pharmacology and as a source of fish feeds in aquaculture. However, its genetic potential for the development of productive and adaptable cultivars is far from being realized. For crop species, the genetic base of the cultivated gene pool has repeatedly been shown as being much narrower than that of the wild gene pool. Therefore, efficient utilization of a species' genetic resources is important for the crop's further improvement. Analyzing the information on the germplasm collections preserved in national gene banks can help perceive the worldwide diversity of *L. angustifolius* genetic resources and understand how they are studied and used. In this context, the data on the

narrow-leaved lupine collection held by VIR are presented: its size and composition, the breeding status of accessions, methods of studying and disclosing intraspecific differentiation, the classifications used, and the comparison of this information with available data on other collections. It appeared that VIR's collection of narrow-leaved lupine, ranking as the world's second largest, differed significantly from others by the prevalence of advanced cultivars and breeding material in it, while wild accessions prevailed in most collections. The importance of the wild gene pool for the narrow-leaved lupine breeding in Australia, the world leader in lupine production, is highlighted. The need to get an insight into the species' ecogeographic diversity in order to develop cultivars adaptable to certain cultivation conditions is shown. The data on the testing of VIR's collection for main crop characters valuable for breeders are presented. Special attention is paid to the study of accessions with limited branching as a promising gene pool for cultivation in relatively northern regions of Russia. They demonstrate lower but more stable productivity, and suitability for cultivation in planting patterns, which has a number of agronomic advantages. Analyzing the work with narrow-leaved lupine genetic resources in different national gene banks over the world helps shape the prospects of further activities with VIR's collection as the only source of promising material for domestic breeding.

Key words: narrow-leaved lupine; genetic resources; *ex situ* collections; diversity; gene pool; intraspecific differentiation; wild forms.

For citation: Vishnyakova M.A., Vlasova E.V., Egorova G.P. Genetic resources of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) and their role in its domestication and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):620-630. DOI 10.18699/VJ21.070

Введение

Коллекции генетических ресурсов растений (ГРП) – депозитарии гермоплазмы, существующие во многих странах мира и сохраняющие мировое разнообразие возделываемых растений и их диких родичей, отличаются друг от друга возрастом, численностью хранящихся в них образцов, таксономическим разнообразием, целями создания и использования. Сравнение различных коллекций по этим критериям достаточно затруднено, поскольку единого документального источника, содержащего данные по всем мировым коллекциям, нет.

Род *Lupinus* L. имеет широкий ареал. В Средиземноморье и Северной Африке распространены виды люпина Старого Света (подрод *Lupinus* L.), на Американских материках, в достаточном широком градиенте широт и высот – люпины Нового Света (подрод *Platycarpus* (Wats.) Kurl.). Среди богатого видового разнообразия рода только несколько видов доместицированы и широко введены в производство.

Наиболее насыщенным информацией, но далеко не полным документом, содержащим информацию о коллекциях люпина, является Европейская база данных (БД) *Lupinus* (The ECPGR *Lupinus* Database). В ней приведены сведения о 13964 образцах рода *Lupinus*, содержащихся в 13 генбанках 10 стран мира.

К сожалению, в Европейскую базу *Lupinus* не вошли сведения о коллекциях ВИР и Белоруссии, к тому же приведенные в ней данные в последний раз актуализированы почти десять лет назад. В других источниках о видовом составе мировых коллекций люпина повторяются эти же данные (Święcicki et al., 2015) или приведены еще более старые (Buirchell, Cowling, 1998) либо только суммарное число образцов разных видов рода (Berger et al., 2013).

По занимаемым площадям в мире в настоящее время среди других культурных видов лидирует люпин узколистный (*L. angustifolius* L.). Это самый скороспелый и наиболее пластичный из возделываемых видов и единственный адаптированный к сравнительно северным широтам. Область применения растения очень разнопланова. Традиционно это сидеральная и кормовая культура. С недавнего времени активно реализуется его продоволь-

ственный потенциал. Хинолизидиновые алкалоиды семян люпинов представляют интерес для фармакологии (Вишнякова и др., 2020). Уже несколько десятилетий переработанное зерно разных видов люпина, в том числе узколистного, используют в составе кормов в аквакультуре. Этому аспекту посвящено множество публикаций и интернет-ресурсов. В качестве примера приводим сводку B.D. Glencross (2001).

Питательная ценность люпина узколистного определяется высоким содержанием белка – 30–40 %, углеводов – 40 %, масла – 6 %, множеством минеральных веществ, витаминов и других ценных ингредиентов. Он широко возделывается в Северо-Восточной Европе (Германия, Нидерланды, Польша, Литва), США, Новой Зеландии, Белоруссии. Мировой лидер производства и экспорта культуры, а также изучения генетических ресурсов (ГР) вида и наиболее значимых селекционных достижений – Австралия (Вишнякова и др., 2020; Cowling, 2020). В Российской Федерации в 2019 г. его производственные площади составили 78971 га, благодаря чему наша страна – один из лидеров мирового производства культуры (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>).

В Государственном реестре селекционных достижений РФ 27 сортов люпина, из них за последние пять лет было создано всего семь. Это немного по масштабам страны, однако нужно отметить, что все сорта российской селекции. Совершенно очевидно, что для интенсификации селекции культуры необходим хорошо охарактеризованный исходный материал. Единственный источник такого материала в нашей стране – коллекция ГРП ВИР.

Цель нашей статьи – проанализировать мировое разнообразие генетических ресурсов люпина узколистного, сохраняемых в национальных коллекциях *ex situ* в генбанках разных стран, с акцентом на коллекцию ВИР и обсудить перспективы эффективного использования этих ресурсов.

Когда и где доместицирован *L. angustifolius*

Lupinus angustifolius – очень полиморфный вид, обладающий широким адаптационным потенциалом. Географический диапазон возделывания люпина узколистного – от 30° ю. ш. до 60° с. ш. Растения могут выдерживать пони-

жение температуры воздуха до -9°C (Купцов, Такунов, 2006). Известная максимальная высота местообитаний вида – 1800 м над ур. моря. Градиент рН почвы – 4.2–9.0. Годовое количество осадков в местах естественного произрастания представителей вида составляет 200–1500 мм (Buirchell, Cowling, 1998). Растения люпина узколистного способны произрастать на почвах с дефицитом азота и фосфора. На разнообразии морфологических признаков и адаптивных свойств люпина наложила отпечаток широкая экологическая амплитуда его местообитаний.

Центр происхождения люпина узколистного – Средиземноморье. В диком состоянии *L. angustifolius* встречается гораздо чаще, чем другие виды люпина Старого Света, и до сих пор распространен по всему Средиземноморью (Cowling, 1986), а также в Малой Азии, Закавказье, Иране (Gladstones et al., 1998). Исследования последних лет показали, что самый большой полиморфизм отмечается у диких форм люпина узколистного из Западного Средиземноморья. Сделано предположение, что именно генофонд Иберийского полуострова, мигрируя на восток, положил основу domestikации вида (Mousavi-Derazmahalleh et al., 2018a, b).

Началом domestikации вида принято считать 1930–1940-е гг., когда на основе открытых безалкалоидных мутантов (Sengbusch, 1931) в Германии и Швеции стали создавать кормовые сорта (Майсурия, Атабекова, 1974). Однако австралийские ученые ведут отсчет с 1960–1970-х гг. (Gladstones, 1970). В это время в Австралии выводили сорта, сочетающие в генотипе максимум генов, определяющих синдром domestikации, а именно: безалкалоидности (*iuc*), нерастрескиваемости бобов (*le*, *ta*), раннего цветения (*Jul*, *Ku*), проницаемости семенной оболочки (*moll*), белой окраски цветков и семян (*leuc*) (Cowling, 2020). Успехи австралийской селекции привели к увеличению урожайности культуры в начале XXI в. в основных районах возделывания в Западной Австралии в два-три раза с момента выпуска первого сорта в 1967 г. (French, Buirchell, 2005).

История коллекции люпина узколистного ВИР

Со времен Н.И. Вавилова в коллекцию ВИР привлекаются представители культурной и сопутствующей ей дикой флоры, виды и сорта с необходимыми определенными отдельными свойствами, которые могут быть использованы отечественной селекцией (Вавилов, 1925).

Первые образцы люпина узколистного, поступившие в коллекцию ВИР, датированы 1919 г. (рис. 1). Эти образцы были получены от профессора Д.Н. Прянишникова из Московского сельскохозяйственного института (ныне РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева). Интенсивный рост коллекции люпина, как и большинства коллекций ВИР, начался с приходом в институт Н.И. Вавилова. В 1920-х гг. Н.И. Вавилов и сотрудники института масштабно выписывали материал из ботанических садов Франции, Англии, Швеции, Польши, Чехословакии, Швейцарии, Дании и др. Активно поступал селекционный материал из Франции (фирма Vilmorin), Англии (Suttons seeds & Bulbs) и Германии (Haage und Schmidt). Чрезвычайно важными для формирования коллекции стали экспедиции Н.И. Вавилова в центры происхождения люпина. В 1926–1927 гг.

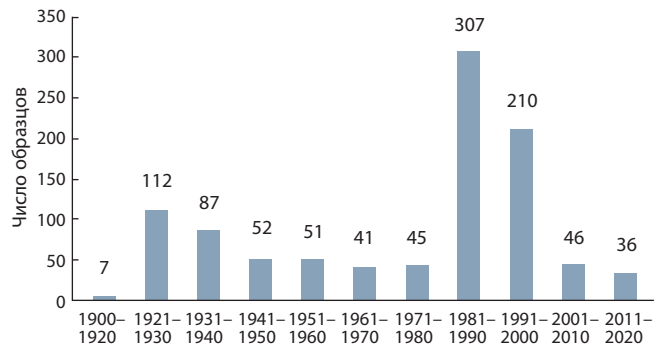


Рис. 1. Динамика пополнения коллекции в историческом аспекте.

в странах Средиземноморья – Италии, Греции, Испании, Алжире, Палестине – были собраны ценные образцы *L. angustifolius*. В частности, из Палестины привезены образцы, характеризующиеся скороспелостью, быстрым ростом в первую половину вегетации, высокой урожайностью вегетативной массы, высоким содержанием белка и масла в семенах (Курлович и др., 1991). Образцы из Алжира отличаются термонейтральностью и высокой продуктивностью. Всего Н.И. Вавиловым привлечено в коллекцию 109 образцов разных видов люпина: 54 – из Средиземноморья, 9 – с Американских континентов, 46 – из Западной Украины и Белоруссии. Среди них 12 образцов люпина узколистного. В последней экспедиции по Западной Украине Н.И. Вавиловым был найден безалкалоидный образец люпина узколистного, поступивший в коллекцию 16 ноября 1940 г.

В 1930–1940-х гг. продолжался интенсивный рост коллекции, в том числе за счет материала с опытных селекционных станций (ОСС), например Новозыбковской ОС, где селекционная работа с люпином была начата в 1925 г., а также за счет экспедиционных сборов по Белоруссии и Украине, откуда поступали преимущественно местные сорта и селекционный материал.

Во время Великой Отечественной войны, несмотря на усилия сотрудников института по сохранению коллекции, часть образцов была утрачена. Однако уже в 1945 г. начал поступать материал с ОСС: Новозыбковской, Белорусской, Тирайненской (Латвия), из МСХА им. К.А. Тимирязева.

В последующие годы коллекция пополнилась селекционным материалом из Белоруссии и России, в частности из созданного в 1987 г. ВНИИ люпина (в настоящее время филиал Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса). Постоянно привлекался материал из генбанков Германии (Gatersleben), Китая, Австралии (CLIMA), Кении (GBK – National Gene Bank of Kenya) и др. Значительное число образцов было выписано из Польши (*Lupinus Gene Bank*). Это сорта, местные популяции и дикие формы *L. angustifolius* из центров происхождения. Кроме того, выписывали материал из ботанических садов Великобритании, Франции, Германии и др.

Из двух международных экспедиций в Португалию в 1991 и 2001 гг. сотрудники ВИР привезли 28 образцов местных, диких и одичавших форм *L. angustifolius*. Из экспедиции в Бразилию получены местные сорта.

Состав коллекции ВИР

В настоящее время коллекция насчитывает 887 образцов из 26 стран мира (рис. 2).

Самые большие поступления были из Белоруссии, где селекция люпина узколистного началась в 30-х гг. прошлого столетия. Сорт Розовый 399, выведенный Я.Н. Свирским, поступил в коллекцию в 1945 г. Сорт Белорусский 155, полученный из высокорослого белоцветкового мутанта, включен в коллекцию в 1952 г. Образцы из Белоруссии представляют собой сорта и селекционный материал, обладающий такими ценными признаками, как скороспелость, продуктивность, детерминантный тип роста, нерастрескиваемость бобов, безалкалоидность, устойчивость к болезням и др. Среди них много сортов, сочетающих комплекс селекционно значимых генов: высокого содержания белка, устойчивости к болезням, нерастрескиваемости бобов, низкого содержания алкалоидов и т. п.

Внутривидовые классификации люпина узколистного, используемые в ВИР

Эколого-географическая. Результатом изучения эволюционной структуры вида – продолжения заложенного Н.И. Вавиловым учения о внутривидовой дифференциации (Вавилов, 1928, 1962) – явилась эколого-географическая классификация, созданная на основе анализа коллекции ВИР (Курлович и др., 1995). Дикие формы классифицированы на геотипы или эколого-географические группы экотипов. Из семи установленных геотипов шесть произрастают в Средиземноморье (рис. 3). В пределах геотипов различают экотипы: придорожные, скальные, горные, сидерационные и т. п.

Широкого признания у исследователей и селекционеров эта классификация не получила. Тем не менее она отражает закономерности внутривидовой изменчивости генофонда, знание которых оптимизирует поиск определенных генов и признаков для селекции специализированных сортов. Показано, что источники для создания мелкосемянных сортов с большой биомассой следует искать на Иберийском полуострове. Здесь же в горных районах

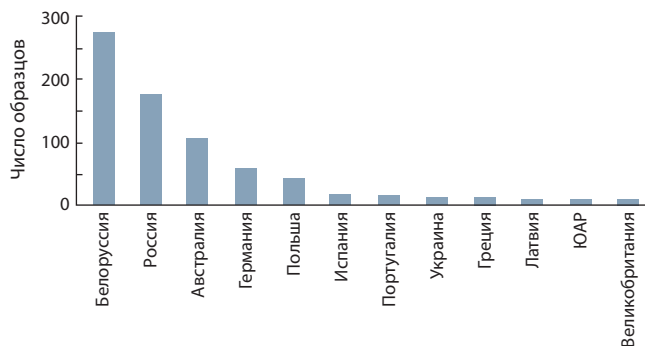


Рис. 2. Число образцов *L. angustifolius*, поступивших в коллекцию ВИР из разных стран мира. Показаны страны, из которых поступило не менее 10 образцов.

можно найти источники холодоустойчивости, а также образцы, устойчивые к антракнозу и серой пятнистости. Образцы с Балканского полуострова и из Палестины можно использовать для выведения зерновых скороспелых и крупносемянных сортов (Курлович и др., 1995).

Агроэкологическая. Разнообразие окультуренных форм представлено агрогеотипами: Австралийским, Германским, Польским, Северо-Американским и Восточно-Европейским, объединяющими различные сортотипы (Курлович и др., 1995). Сортотипы включают группы сортов одного направления использования со сходными биологическими и агрономическими свойствами.

Эта классификация отразила историю и специфику селекции в разных странах, определяемую почвенно-климатическими условиями, приемами выращивания, традициями селекции, имеющимся исходным материалом и т. п. Так, австралийские и американские сорта возделывают в осенне-зимний период, поэтому для американских сортов важна устойчивость к заморозкам и возврату холодов в весенний период. Сорта, создаваемые в Северной Европе (Gresta et al., 2017), а также в РФ и Белоруссии, должны обладать коротким вегетационным периодом, быть адаптированы к невысокой сумме среднесуточных температур. Вовлечение в гибридизацию местных сортов и диких



Рис. 3. Распределение геотипов (эколого-географических групп) *L. angustifolius* в Средиземноморье – центре разнообразия вида, по (Курлович и др., 1995).

образцов из коллекции позволяет придать сортам устойчивость к заморозкам и болезням (Анохина и др., 2012). Однако использование такого материала в европейской селекции незначительно. В Австралии же селекционеры, начав селекцию в 1960-х гг. на основе нескольких элитных сортов из Европы и США («сортов-основателей») и наблюдая эффект «бутылочного горлышка» деструкции, стали активно привлекать в скрещивания дикие формы. Со временем в родословных новых сортов пропорция диких экотипов увеличивалась, а «сортов-основателей» снижалась. Это позволило получить в начале 2000-х гг. высокопродуктивные сорта, которые по урожайности на 81 % превысили сорта австралийской селекции 1960-х гг., а кроме того, приобрели устойчивость к основным патогенам и толерантность к гербицидам (Cowling, 2020). Надо отметить, что во всех странах приоритетом является создание сортов, устойчивых к болезням.

Агроэкологическая классификация указывает на конкретные признаки и свойства, которые нужно искать в сортотипах как источниках для селекции. Однако, в связи с прогрессом селекции и сортоосменой за последние 25 лет, эта типизация требует развития. К примеру, в ней нет сортотипов, являющихся источниками признаков для селекции сортов продовольственного назначения, а также для корма рыб в индустрии рыбоводства – стремительно развивающихся направлениях применения люпина узколистного.

Ботаническая классификация (Курлович, Станкевич, 1990; Kurlovich, 2002; Купцов, Такунов, 2006; Vlasova, 2015) систематизирует внутривидовое разнообразие вида *L. angustifolius* по окраске вегетативных и генеративных органов. Определяет разновидности люпина узколистного (по окраске венчика в совокупности с окраской и рисунком семенной кожуры) и подразновидности (по окраске и наличию антоциана на вегетативных органах). В ранге формы выделяют детерминантные и фасцированные морфотипы. Классификация позволяет поддерживать аутентичность образцов ВИР в ходе их репродуцирования, используется селекционерами при апробации посевов и генетиками для установления сцепления генов.

Одна из наиболее трудно выполнимых задач при морфологической характеристике образцов у люпина узколистного – описание габитуса растений, особенностей ветвления и плодообразования. Трудности связаны с отсутствием устоявшейся терминологии, изменчивостью признаков под влиянием среды и наличием переходных форм.

Морфофизиологическая классификация по характеру роста и ветвления стебля, предложенная Н.С. Купцовым (2001), в настоящее время признана наиболее удобным инструментом характеристики габитуса образцов люпина узколистного. В зависимости от степени редукции ветвления формируются морфотипы: дикий, квазидикий, псевдодикий, щитковидный, метельчатый, колосовидный, пальмовидный. Дикий тип отличается индетерминантным ростом стебля и неограниченным ветвлением. При этом формирование бобов и созревание семян происходят одновременно и, как правило, затягиваются. У остальных морфотипов ветвление в той или иной степени ограничено (детерминировано) генетически и заблокировано соцветия-

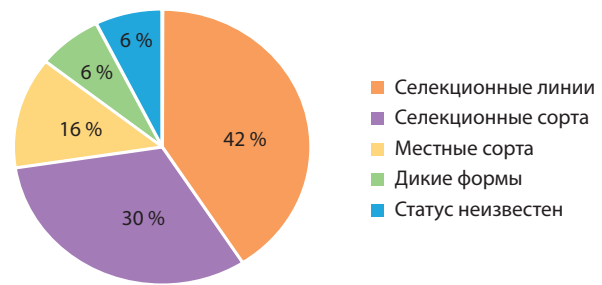


Рис. 4. Диаграмма, отражающая состав коллекции люпина узколистного ВИР по статусу образца.

ми. Гибридологическими методами установлено число генов и характер наследования признаков у разных форм с редукцией ветвления (Adhikari et al., 2001; Oram, 2002; Купцов, Такунов, 2006).

В качестве примеров образцов коллекции ВИР с ограниченным ветвлением можно привести следующие: *колосовидного типа*: к-3546, к-3695, Россия; к-3762, Германия; к-2955, к-3829, к-3830, к-3832, Беларусь; к-3501, к-3502, Польша; *щитковидного*: к-3923, Беларусь; *метельчатого*: к-3646, к-3641, Россия; *пальмовидного*: к-2979, к-2249, Россия. Разная морфофизиологическая структура растений определяет их биологические свойства, такие как толерантность к загущению в монопосеве, темпы роста, дружные цветение и созревание, стабильная урожайность и др.

Селекционный статус. В коллекции люпина узколистного ВИР представлены: 261 сорт научной селекции, 370 образцов селекционного материала, 142 местных сорта, 55 диких форм, 50 образцов с неопределенным статусом (рис. 4).

Результаты скрининга коллекции люпина узколистного ВИР по селекционно значимым признакам

Содержание алкалоидов в семенах оценено у 640 образцов (73 % коллекции): >1 % – 140 образцов (высокоалкалоидные); 0.4–1.0 % – 23 образца; 0.1–0.399 % – 50 образцов; 0.025–0.099 % – 230 образцов (малоалкалоидные); <0.025 % – 197 образцов (безалкалоидные). Данные получены в результате полевой экспресс-оценки посредством реактива Драгендорфа (Ермаков и др., 1987) и из литературных источников. Большинство проанализированных образцов (67 %) относятся к мало- и безалкалоидным. В настоящее время в ВИР апробированы и выбраны способы для массового скрининга коллекции по содержанию алкалоидов посредством хроматографических методов анализа, которые обеспечат более точную оценку (Kushnareva et al., 2020).

Коллекцию изучали также по устойчивости к пониженным температурам. Выделены источники холодоустойчивости (Барашкова и др., 1978).

Биохимический скрининг по содержанию белка и масла в семенах выявил размах изменчивости этих признаков и образцы с максимальным содержанием белка (37.9–39.2 %) и масла (7.5–8.4 %) (Бенкен и др., 1993).

Довольно длительное время (1971–1987 гг.) проводили оценку коллекции на устойчивость к фузариозу на

Таблица 1. Значения основных признаков семенной продуктивности образцов люпина узколистного из коллекции ВИР, оцененных в Московской (Ступинский район) и Ленинградской (г. Пушкин) областях

Признак	Область	Mean	Min	Max	SD
Высота растения (главный стебель), см	Московская	44.7	33.0	64.8	5.2
	Ленинградская	86.6	55.5	123.8	18.21
Число продуктивных ветвей	Московская	2.6	0.7	5.4	1.2
	Ленинградская	5.6	2.8	10.8	1.59
Число бобов на растении	Московская	9.2	7.6	26.3	1.1
	Ленинградская	35.5	16.2	76.9	13.36
Число бобов на боковых ветвях	Московская	5.0	0.8	15.2	2.9
	Ленинградская	28.7	7.3	68.7	13.58
Масса семян/растение, г	Московская	4.9	3.3	9.9	1.2
	Ленинградская	15.7	3.5	35.0	6.41
Масса 1000 семян	Московская	117.2	67.3	167.5	18.7
	Ленинградская	151.1	114.0	186.1	1.85

жестком инфекционном фоне, в том числе на двух-трех фонах, созданных разными методами и расположенных в разных регионах: в Брянской, Киевской и Ленинградской областях. Выявлены образцы с очень высокой степенью устойчивости к болезни, среди которых к-2166, 2167 (Польша), к-1908, 2266 (Россия), к-74 (Беларусь). Для большинства образцов известны группа спелости и масса 1000 семян (Киселев и др., 1981, 1988, 1993; Курлович и др., 1990).

В течение многих лет коллекцию люпина узколистного ВИР изучают в двух пунктах: в Центральном Нечерноземье (Ступинский район Московской области, пос. Михнево) и на Северо-Западе РФ (г. Пушкин, Ленинградская область). В Ступино климат умеренно континентальный, средняя многолетняя сумма активных температур 2000–2200 °С, сумма осадков 379 мм, а вегетационный период длится 130–135 дней. Климат г. Пушкин умеренный и влажный, переходный от морского к континентальному, средняя многолетняя сумма активных температур 1879 °С, сумма осадков 637 мм, вегетационный период 105–125 дней. Необходимо отметить, что в условиях г. Пушкин не все образцы люпина узколистного успевают сформировать зрелые семена.

Полевое фенотипирование включает оценку основных агрономических признаков: урожайность, группу спелости и поражаемость болезнями, элементы продуктивности растения: ветвистость, число бобов на растении, массу семян с растения и массу 1000 семян.

В Московской области в 2009–2019 гг. изучали образцы с ограниченным типом ветвления – генофонд, полученный на основе естественных и индуцированных мутаций. В Пушкине в течение многих лет исследовали разные по происхождению и статусу образцы коллекции. Сопоставление результатов свидетельствует о меньшем размахе варьирования признаков продуктивности у форм с детерминантным ветвлением, представленных современными сортами и селекционным материалом России, Белоруссии и стран Европы (Германия, Польша, Латвия

и др.), по сравнению с очень разнородным материалом, изучаемым в Ленинградской области. Меньшая, но стабильная продуктивность, ограниченная высота растений и число ветвей позволяют выращивать такие мутанты в загущенных посевах, что облегчает борьбу с сорняками; они не требуют дефолиации для ускорения созревания, и в целом повышается технологичность уборки (табл. 1).

Сравнение селекционно значимых признаков образцов с ограниченным типом ветвления с таковыми у сортов с индетерминантным ростом (диким морфотипом) в условиях Московской области свидетельствовало о более низкой семенной продуктивности первых из-за небольшого числа бобов, формирующихся на боковых ветвях. В течение восьми лет в условиях жаркого лета продолжительность вегетационного периода образцов разного типа ветвления была на одном уровне – 60–80 дней. Но за четыре года с летними температурами воздуха, понизившимися до среднееголетних значений, получение семян с индетерминантных сортов, в отличие от детерминантных, стало затруднительным без применения дефолиантов либо дозаривания. Таким образом, образцы колосовидного типа имеют преимущества при выращивании в северных и северо-западных регионах страны благодаря скороспелости и дружному созреванию семян.

Выявлен комплекс фитофагов, поражающих растения люпина узколистного в Центральном Нечерноземье – основном регионе производства культуры. Наибольшее поражение наносили: *Cerathophorum setosum* Kirchn., *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris, *Fusarium sambucinum* Fuckel, *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire, *Pythium mamillatum* Meurs, *Cylindrocladium* spp. (Головин, Власова, 2015).

На Северо-Западе РФ отмечались массовые поражения люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig), наблюдались симптомы вирусных болезней *Phaseolus virus 2* Smith (BYMV – bean yellow mosaic virus) и вирус мозаики огурца *Cucumis virus 1* Smith (CMV – cucumber mosaic

virus). Среди патогенных грибов доминировали представители родов *Fusarium* Link, *Botrytis* P. Micheli ex Pers., *Sclerotinia* Fuckel и *Stemphylium* Wallr. Найдены также сапротрофные грибы из родов *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link и *Epicoccum* Link. Проявления антракноза (возбудитель – *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.) в обоих регионах незначительны.

Сравнение мировых коллекций ГР люпина узколистного по ряду параметров

Размер коллекций. Крупнейшая в мире коллекция люпина узколистного принадлежит Австралии (CLIMA) – 2165 образцов. Коллекция ВИР на втором месте – 887 образцов, далее (по убывающей) коллекции: Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси – 690 образцов, Испании – 542, Белорусского государственного университета – 371, Польши – 361, Португалии – 291, Германии – 279, США – 190. Численность образцов приведена по Европейской БД *Lupinus*, сведения о коллекции ВИР – по данным авторов статьи, о коллекции Белоруссии – по (Привалов и др., 2020).

Статус образца. Анализируя селекционный статус 3894 образцов люпина узколистного, представленных в Европейской БД *Lupinus*, надо отметить, что сопоставление нашей коллекции с мировыми по этому критерию затруднено. Во-первых, не везде одинаково понимают все категории статуса. К примеру, в этой БД очень мало местных сортов – 1.8 %, тогда как в коллекции ВИР мы считаем таковыми 16 %. Во-вторых, категория “weedy” (сорные) по отношению к люпину узколистному номинирована только в БД Испанского центра и в португальских коллекциях ГР вида. В коллекции ВИР такой категории нет. В некоторых генбанках отсутствует видовая дифференциация рода *Lupinus*. В ряде БД нет идентификации статуса образца. Картирующие популяции указаны только в австралийской коллекции, а мутанты имеются лишь в австралийской и польской коллекциях. Поэтому дифференциация мировых ГР люпина узколистного по статусу образцов в определенной степени условна. В качестве безусловного факта следует признать, что преобладают в мировых коллекциях дикие образцы вида. Так, в коллекции Центра ГРР Испании они составляют 82 %, в национальной коллекции Австралии (CLIMA) – 60 %.

По результатам нашего анализа, в среднем в мировом генофонде люпина узколистного содержится 62 % диких форм, 12 % селекционного материала (линий, гибридов, картирующих популяций), 11 % сортов научной селекции, 11 % образцов с неопределенным статусом, 2 % мутантов, 1.7 % местных сортов и 0.7 % сорных образцов.

Анализ более старого, но более репрезентативного источника, включающего 5684 образца люпина узколистного из 17 коллекций мира (Buirchell, Cowling, 1998), также свидетельствует о преобладании в коллекциях диких форм и местных сортов. В конце XX в. в австралийской коллекции они составляли 70 %, в коллекции Португалии – 100 %, в трех коллекциях Испании – от 80 до 100 %, в коллекции Германии (Braunschweig) – 78 %, Польши – около 50 %.

В коллекции ВИР на современном этапе 42 % образцов представлены селекционным материалом, 30 % – сортами научной селекции, 16 % – местными сортами, по 6 % – дикими формами и образцами неопределенного статуса. То есть коллекция люпина узколистного ВИР имеет значительно больше материала, так или иначе затронутого селекцией (селекционные сорта и селекционный материал), чем все мировые коллекции вида; при этом наличие диких форм, которые преобладают в других коллекциях, в ней несравнимо мало. Между тем самые продуктивные австралийские безалкалоидные сорта созданы методами скрещиваний культурных и диких генотипов, несмотря на то что в коллекции имеются элитные сорта из других стран мира. Австралийские специалисты полагают, что ГР диких форм принципиально важны и для будущего улучшения люпина узколистного (Gladstones et al., 1998; Mousavi-Derazmahalleh et al., 2018a; Cowling, 2020).

Фенотипические данные мы могли сравнить только для нескольких признаков, оцененных и у образцов коллекции ВИР, и в австралийской коллекции (CLIMA). Сравнение показывает большой размах изменчивости значений этих признаков в австралийской коллекции (табл. 2), что можно объяснить наличием в ней преимущественно диких форм, рекомбинантных инбредных линий, популяций мутантов и гибридов, генетическое разнообразие которых в совокупности значительно шире, чем у коллекции ВИР, содержащей преимущественно сорта научной селекции и селекционный материал.

Таблица 2. Значение некоторых фенотипических признаков в коллекциях люпина ВИР и Австралии (CLIMA) (Buirchell, Cowling, 1998)

Признак	Генбанк	Min	Mean	Max	SD
Высота растения, см	ВИР	47.1	70.1	135.1	20.3
	CLIMA	10.0	85.0	170.0	22.3
Масса 100 семян, г	ВИР	7.5	14.3	21.1	–
	CLIMA	2.9	11.3	24.4	3.9
Число бобов на главном стебле, шт.	ВИР	2.4	6.8	11.3	2.30
	CLIMA	1.0	10.0	27.0	7.7
Белок в семенах, %	ВИР	18.0	–	39.2	–
	CLIMA	18.8	31.5	40.6	–

Примечание. Данные оценки ВИР – г. Пушкин (59° с. ш., 30° в. д.), CLIMA – г. Перт (31 ю. ш., 115° в. д.).

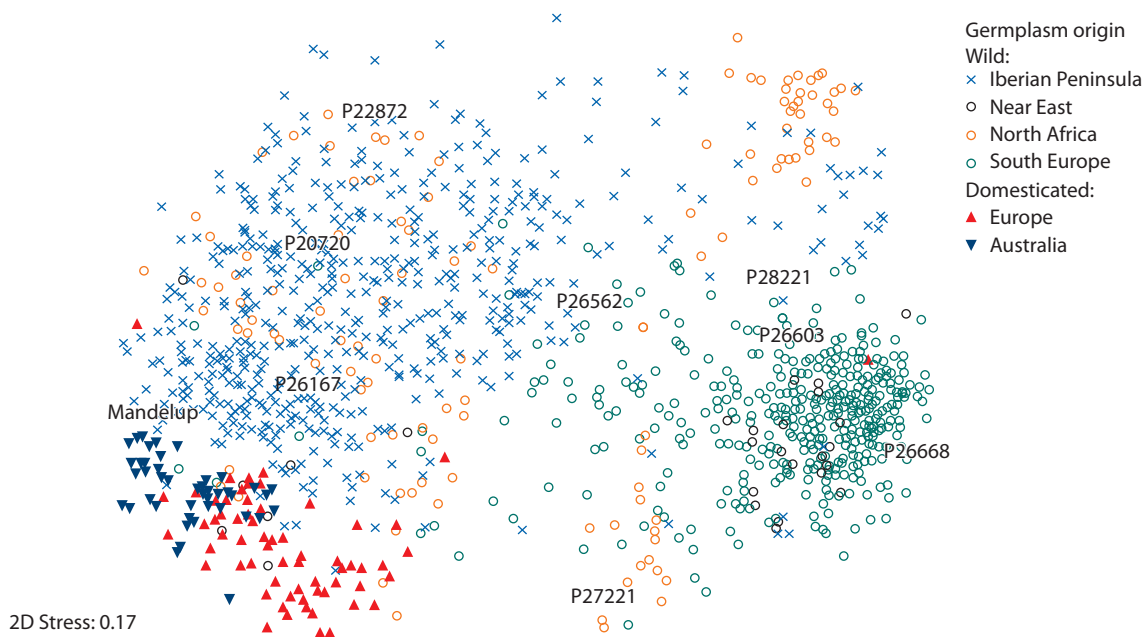


Рис. 5. Распределение в многомерном пространстве образцов *L. angustifolius* австралийской коллекции, основанное на данных 137 DArT маркеров (Berger et al., 2012a), классифицирующих образцы по статусу доместикации и происхождению. Обозначенные образцы P20720, P22872, P26167, P26562, P26603, P26668, P27221 и P28221 использованы для обогащающих BC₂-скрещиваний с сортом Mandelup, но (Berger et al., 2013).

Генетическое разнообразие дикого и культурного генофондов вида, выявленное в разных коллекциях

Как у большинства культурных растений, генетическое разнообразие доместичированных форм люпина узколистного меньше, чем у дикорастущих популяций и местных сортов, и селекция имеет дело лишь с небольшой частью этого разнообразия (Berger et al., 2012a, b). Узкая генетическая основа современных сортов по сравнению с дикими сборами из южной Португалии доказана посредством AFLP и ISSR маркеров на образцах коллекции Португальского генбанка (Talhinhas et al., 2006). Маркирование австралийской коллекции *L. angustifolius* с применением 137 DArT (Diversity Array Technology) маркеров показало четкие различия дикого генофонда, собранного в разных частях Средиземноморья, и современных сортов. При этом выявилось различие сортов, созданных в Европе и в Австралии, при наличии группы сортов с «заходящими» признаками и свойствами (Berger et al., 2013) (рис. 5).

Полногеномное секвенирование 146 диких и 85 культивируемых образцов из разных генбанков мира позволило установить, что разнообразие генома у современных сортов в три раза меньше, чем у диких популяций (Mousavi-Derazmahalleh et al., 2018b).

Методы выявления дифференциации генофонда в коллекциях генбанков разных стран мира

Наиболее эффективно степень разнообразия и дифференциация генофонда в наши дни выявляются молекулярно-генетическими методами. В детально изученной коллекции люпина узколистного Австралии имеется подробная информация о местах обитания образцов: широте, долготе, высоте мест сбора с сочетанием климатических и почвенных данных, нередко контрастных по этим харак-

теристикам. Осуществляется массовое фенотипирование коллекции, молекулярное маркирование посредством DArT маркеров, изучаются генетический контроль и его молекулярные механизмы у ключевых признаков (Berger et al., 2013).

Фенотипирование и молекулярное маркирование образцов португальской коллекции люпина узколистного (Instituto Superior de Agronomia Gene Bank) выявило три большие четко отличимые группы образцов:

- 1) преимущественно кормовые образцы, на 1/3 представленные селекционными сортами, остальные – селекционным материалом из Европы, сочетающие признаки доместикации (белоцветковость, крупные семена, водопроницаемая оболочка семян, нерастрескивающиеся бобы). Однако габитус растений близок к дикому типу: они высокие и сильно ветвящиеся. В цветках мало антоциана;
- 2) в основном дикие формы и несколько сортов и селекционных линий с сильно растрескивающимися бобами, обильным антоцианом на лепестках, водонепроницаемой оболочкой. В основном позднецветущие генотипы;
- 3) преимущественно сорта и селекционные линии с малой массой главного стебля, недлинными ветвями, очень крупными семенами и крупными нерастрескивающимися бобами.

AFLP и ISSR маркирование сгруппировало современные сорта как субкластеры внутри широкого разнообразия дикой гермоплазмы, обнаруживая более узкую генетическую основу доместичированных форм (Talhinhas et al., 2006).

Полиморфизм генофонда люпина узколистного по содержанию алкалоидов в семенах отражен в работе исследователей, изучивших 329 образцов коллекции Польского генбанка в Вятрово (Kamel et al., 2016). Были рассмотрены

143 дикие формы и популяции, собранные в местах естественного произрастания, 108 образцов селекционного материала и 78 сортов научной селекции. Содержание алкалоидов варьировало в пределах 0.0005–2.8752 % от сухого веса семян. Дикие формы характеризовались высоким содержанием алкалоидов, сорта – низким, среди образцов прочего статуса также преобладали образцы с низким содержанием алкалоидов. Заключение о значительно меньшем содержании алкалоидов в семенах сортов *L. angustifolius* более поздней селекции по сравнению со старыми сортами сделано для коллекции Белорусского госуниверситета (Саук и др., 2008). Эта коллекция состоит из различных сортов отечественной и зарубежной селекции, а также форм, полученных путем мутагенеза, межсортовой и межлинейной гибридизации.

Практически с самого начала сбора диких форм люпина узколистного в центре происхождения вида – Средиземноморье – австралийские ученые выявили его эколого-географическую дифференциацию (Cowling, 1986; Clements, Cowling, 1994), позволяющую понять морфофизиологические (адаптационные) свойства природного генофонда. Известно, что сильная расчлененность рельефа и разнообразие почвенно-климатических условий обусловили на этой обширной территории значительное биологическое и ландшафтное разнообразие. Сезонные осадки, температуры, относительная влажность, инсоляция, скорость ветра очень переменчивы в пределах Средиземноморского бассейна (Hijmans et al., 2005). Работы австралийцев по определению экотипической дифференциации генофонда – по существу, продолжение работ Н.И. Вавилова, впервые обратившего внимание на то, что «виды, занимающие значительные ареалы, нередко выявляют резко различные эколого-географические комплексы форм» (Вавилов, 1965, с. 246). Почти сто лет спустя после Н.И. Вавилова (Вавилов, 1928, 1962) австралийские ученые тоже пришли к заключению о том, что выявление адаптационных способностей у большого числа генотипов в разных экологических нишах позволяет определить адрес их дальнейшего производства в качестве культурных растений в соответствующих условиях (Berger et al., 2017).

Изучение разнообразия экотипов люпина узколистного в Средиземноморье позволило понять репродуктивную стратегию вида: скороспелость, уменьшение потребности в яровизации и покое семян в районах с низким количеством осадков и засухой конца сезона. В этих условиях растения раньше цветут, быстрее созревают, формируют более крупные семена, меньшую биомассу, что увеличивает уборочный индекс при меньшей продуктивности растений. В более влагообеспеченных и вместе с тем более холодных местообитаниях наблюдается противоположная картина. Эти данные позволяют считать фенологию ключевым атрибутом для адаптации диких популяций вида к различным местообитаниям в пределах его естественного произрастания и окультуренных форм к регионам возделывания по всему земному шару (Taylor et al., 2020). На очереди определение участков генома, связанных с климатической адаптацией, в частности со скороспелостью (Mousavi-Derazmahalleh et al., 2018a).

Генетическая изменчивость и фенотипическая пластичность были выявлены и у архитектуры корневой

системы при моделировании различных почвенных условий для выращивания диких генотипов *L. angustifolius* (Chen et al., 2011).

Таким образом, спектр исследований, выявляющих мировое разнообразие ГР люпина узколистного с целью придания ему статуса ценной кормовой и продовольственной культуры, обладающей хорошими адаптивными свойствами и стабильной урожайностью, достаточно широк. Перспективы усовершенствования культуры, учитывая ее молодость, обширны. Ключевые признаки, определяющие ее хозяйственное значение, определены. Инструментарий для поиска источников этих признаков в мировом генофонде вида имеется. Необходимо объединение усилий ученых, держателей коллекций и селекционеров для обмена генетическими ресурсами культуры с целью расширения ее генетического разнообразия. Об этом неустанно заявляют австралийские специалисты, работающие с ГР люпина узколистного (Burchell, Cowling, 1998; Berger et al., 2013; Cowling, 2020).

Заключение

Коллекция ГР люпина узколистного ВИР представлена большим разнообразием образцов разного статуса, среди которых преобладают сорта научной селекции и селекционный материал. Особое место в этом генофонде занимают образцы с ограниченным ветвлением, наиболее адаптированные к возделыванию в сравнительно северных регионах. Они обладают скороспелостью, меньшей, но более стабильной продуктивностью, пригодны для загущенных посевов, что имеет целый ряд агротехнических преимуществ. Сопоставление коллекции *L. angustifolius* ВИР с другими национальными коллекциями в генбанках стран, производящих культуру, показывает, что в ней очень мало диких форм. Между тем ими богаты коллекции других генбанков, а в Австралии, достигшей впечатляющих успехов в использовании ГР вида для создания продуктивных сортов, селекция базируется на активном использовании дикого генофонда.

К настоящему времени установлены особенности репродуктивной стратегии вида, позволившей ему адаптироваться к широкому спектру условий. Поэтому для более интенсивной селекции и масштабного производства люпина узколистного в РФ как кормовой и продовольственной культуры необходимо дальнейшее раскрытие и эксплуатация генетического и экотипического потенциала вида, включая дикие формы и местные сорта. Интрогрессия признаков адаптации последних в современные сорта позволит расширить их производственный ареал. Для этого требуется усилить селекционно-генетические, физиолого-биохимические, метаболомные исследования генофонда, а также развивать геномные ресурсы вида. Определение участков генома, связанных, в частности, со скороспелостью, неизмеримо повысит производительность поиска в коллекциях исходного материала для селекции в Российской Федерации.

Список литературы / References

- Анохина В.С., Дебелый Г.А., Конорев П.М. Люпин. Селекция. Генетика. Эволюция. Минск, 2012.
[Anokhina V.S., Debely G.A., Konorev P.M. Lupine. Selection. Genetics. Evolution. Minsk, 2012. (in Russian)]

- Барашкова Э.А., Степанова С.И., Смирнова В.С. Устойчивость проростков люпина к пониженным температурам. В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 242. Л., 1978.
[Barashkova E.A., Stepanova S.I., Smirnova V.S. Resistance of lupine seedlings to low temperatures. In: VIR World Collection Catalog. Iss. 242. Leningrad, 1978. (in Russian)]
- Бенкен И.И., Курлович Б.С., Картузова Л.Т., Никишкина М.А., Власов В.А., Кутузова Е.А., Назарова Н.С., Пилипенко С.И., Рыбникова В.А. Люпин узколистный – *Lupinus angustifolius* L. (Биохимическая характеристика образцов). В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 637. СПб., 1993.
[Benken I.I., Kurlovich B.S., Kartuzova L.T., Nikishkina M.A., Vlasov V.A., Kutuzova E.A., Nazarova N.S., Pilipenko S.I., Rybnikova V.A. Narrow-leaved lupine – *Lupinus angustifolius* L.: Biochemical characterization of specimens. In: VIR World Collection Catalog. Iss. 637. St. Petersburg, 1993. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Очередные задачи сельскохозяйственного растениеводства. (Растительные богатства земли и их использование). *Труды по прикл. ботанике и селекции*. 1925;14(5):1-17.
[Vavilov N.I. Immediate tasks of agricultural crop production (Vegetable resources and their use). *Trudy po Prikladnoy Botanike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany and Breeding*. 1925;14(5):1-17. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Географическая изменчивость растений. *Науч. слово*. 1928;1:23-33.
[Vavilov N.I. Geographical variability of plants. *Nauchnoe Slovo = The Scientific Word*. 1928;1:23-33. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Мировые растительные ресурсы и их использование в селекции. В: Вавилов Н.И. Избр. труды. Т. 3. Проблемы географии, филогении и селекции пшеницы и ржи. Растительные ресурсы и вопросы систематики культурных растений. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1962;474-491.
[Vavilov N.I. World plant resources and their use in breeding. In: Vavilov N.I. Selected Works. Vol. 3. Issues in wheat and rye geography, phylogeny, and breeding: Plant resources and crop taxonomy. Moscow–Leningrad: AN SSSR Publ., 1962;474-491. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Линнеевский вид как система. В: Вавилов Н.И. Избр. труды. Т. 5. Проблемы происхождения, географии, генетики, селекции растений, растениеводства и агрономии. М.; Л.: Наука, 1965;233-252.
[Vavilov N.I. Linnean species as a system. In: Vavilov N.I. Selected Works. Vol. 5. Issues of plant origin, geography, genetics, and breeding: plant industry and agronomy. Moscow–Leningrad: Nauka Publ., 1965;233-252. (in Russian)]
- Вишнякова М.А., Кушнарева А.В., Шеленга Т.В., Егорова Г.П. Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные пути использования и селекции культуры. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):625-635. DOI 10.18699/VJ20.656.
[Vishnyakova M.A., Kushnareva A.V., Shelenga T.V., Egorova G.P. Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):625-635. DOI 10.18699/VJ20.656.]
- Головин С.Е., Власова Е.В. Мониторинг видового состава возбудителей пятнистостей и корневых гнилей на коллекции ВИР *Lupinus angustifolius* L. *Образование, наука и производство*. 2015;3(12):23-24.
[Golovin S.E., Vlasova E.V. Monitoring of the species composition of spotting and root rot agents on *Lupinus angustifolius* L. VIR collection. *Obrazovanie, Nauka i Proizvodstvo = Education, Science, and Production*. 2015;3(12):23-24. (in Russian)]
- Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л., 1987.
[Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P., Peruanski Y.V., Lukovnikova G.A., Ikonnikova M.I. Methods of Biochemical Study of Plants. Leningrad, 1987. (in Russian)]
- Киселев И.И., Курлович Б.С., Картузова Л.Т., Корнейчук Н.С. Люпин (Оценка образцов на устойчивость к фузариозу на инфекционных фонах). В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 638. СПб., 1993.
[Kiselev I.I., Kurlovich B.S., Kartuzova L.T., Korneychuk N.S. Lupine (Evaluation of accessions for resistance to fusarium against infectious backgrounds). In: VIR World Collection Catalog. Iss. 638. St. Petersburg, 1993. (in Russian)]
- Киселев И.И., Курлович Б.С., Степанова С.И. Люпин (Оценка образцов на устойчивость к фузариозу). В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 447. Л., 1988.
[Kiselev I.I., Kurlovich B.S., Stepanova S.I. Lupine: Evaluation of accessions for resistance to fusarium. In: VIR World Collection Catalog. Iss. 447. St. Petersburg, 1988. (in Russian)]
- Киселев И.И., Степанова С.И., Духанина И.А. Устойчивость видов люпина к фузариозу. В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 298. Л., 1981.
[Kiselev I.I., Stepanova S.I., Dukhanina I.A. Resistance of lupine species to fusarium. In: VIR World Collection Catalog. Iss. 298. Leningrad, 1981. (in Russian)]
- Купцов Н.С. Стратегия и тактика селекции люпина. *Кормопроизводство*. 2001;1:8-12.
[Kuptsov N.S. Strategy and tactics of lupin breeding. *Kormoproizvodstvo = Fodder Production*. 2001;1:8-12. (in Russian)]
- Купцов Н.С., Такунов И.П. Люпин (Генетика, селекция, гетерогенные посевы). Брянск, 2006.
[Kuptsov N.S., Takunov I.P. Lupin: Genetics, breeding, heterogeneous cultivation. Bryansk, 2006. (in Russian)]
- Курлович Б.С., Волузнева Т.А., Петрова М.В. Значение вавиловских экспедиций для селекции зерновых бобовых культур. *Сб. трудов по прикл. ботанике, генетике и селекции*. Л., 1991; 140:84-89.
[Kurlovich B.S., Voluzneva T.A., Petrova M.V. The significance of Vavilov expeditions for the breeding of grain legumes. *Sbornik Trudov po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. Leningrad, 1991;140:84-89. (in Russian)]
- Курлович Б.С., Картузова Л.Т., Корнейчук Н.С., Киселев И.И., Назарова Н.С., Пилипенко С.И. Люпин (Оценка образцов на устойчивость к фузариозу на инфекционных фонах). В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 537. Л., 1990.
[Kurlovich B.S., Kartuzova L.T., Korneychuk N.S., Kiselev I.I., Nazarova N.S., Pilipenko S.I. Lupine: Evaluation of accessions for resistance to fusarium against infectious backgrounds. In: VIR World Collection Catalog. Iss. 537. Leningrad, 1990. (in Russian)]
- Курлович Б.С., Репьев С.И., Щелко Л.Г., Буданова В.И., Петрова М.В., Буравцева Т.В., Станкевич А.К., Леокене Л.В., Бенкен И.И., Рыбникова В.А., Картузова Л.Т., Золотов С.В., Александрова Т.Г., Дебелый Г.А., Таранухо Г.И., Теплякова Т.Е., Малыш Л.К. Теоретические основы селекции растений. Т. 3. Генотип и селекция зерновых бобовых культур (Люпин, вика, соя, фасоль). СПб., 1995;9-116.
[Kurlovich B.S., Repiev S.I., Shchelko L.G., Budanova V.I., Petrova M.V., Buravtseva T.V., Stankevich A.K., Leokene L.V., Benken I.I., Rybnikova V.A., Kartuzova L.T., Zolotov S.V., Alexandrova T.G., Debely G.A., Taranuho G.I., Teplyakova T.E., Malyshev L.K. The Gene Pool and Breeding of Grain Legumes (lupins, vetch, soy, and beans). St. Petersburg, 1995;9-116. (in Russian)]
- Курлович Б.С., Станкевич А.К. Внутривидовое разнообразие трех однолетних видов люпина (*Lupinus* L.). *Сб. трудов по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1990;135:19-34.
[Kurlovich B.S., Stankevich A.K. Intraspecific diversity of three annual species of lupin (*Lupinus* L.). *Sbornik Trudov po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1990;135:19-34. (in Russian)]
- Майсуриян Н.А., Атабекова А.И. Люпин. М., 1974.
[Maysuryan N.A., Atabekova A.I. Lupin. Moscow, 1974. (in Russian)]

- Привалов Ф.И., Гриб С.И., Матыс И.С. Генетические ресурсы национального банка семян – основа селекции сельскохозяйственных растений в Беларуси. *Земледелие и селекция в Беларуси*. 2020;56:276-283.
[Privalov F.I., Grib S.I., Matys I.S. Genetic resources of the national bank of seeds, a basis of crop breeding in Belarus. *Zemledelie i Seleksiya v Belarusi = Agriculture and Breeding in Belarus*. 2020; 56:276-283. (in Russian)]
- Саук И.Б., Анохина В.С., Тимошенко М.К., Цибульская И.Ю., Брыль Е.А. Морфогенетические и биохимические исследования коллекции желтого и узколистного люпина. В: Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. трудов. 2008;8:133-137.
[Sauk I.B., Anokhina V.S., Timoshenko M.K., Tsiubul'skaya I.Yu., Bryl E.A. Morphogenetic and biochemical studies of the collection of yellow and narrow-leaved lupine. In: *Molecules and Applied Genetics*. 2008;8:133-137. (in Russian)]
- Adhikari K.N., Galwey N.W., Dracup M. The genetic control of highly restricted branching in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Euphytica*. 2001;117:261-274.
- Berger J., Buirchell B., Luckett D., Nelson M. Domestication bottlenecks limit genetic diversity and constrain adaptation in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2012a; 124:637-652. DOI 10.1007/s00122-011-1736-z.
- Berger J., Buirchell B., Luckett D., Palta J., Ludwig C., Liu D. How has narrow-leaved lupin changed in its 1st 40 years as an industrial, broadacre crop? A G×E-based characterization of yield-related traits in Australian cultivars. *Field Crop. Res.* 2012b;126:152-164. DOI 10.1016/j.fcr.2011.10.006.
- Berger J.D., Clements J.C., Nelson M.N., Kamphuis L.G., Singh K.B., Buirchell B. The essential role of genetic resources in narrow-leaved lupin improvement. *Crop Pasture Sci.* 2013;64:361-373. DOI 10.1071/CP13092.
- Berger J., Shrestha D., Ludwig C. Reproductive strategies in Mediterranean legumes: trade-offs between phenology, seed size and vigor within and between wild and domesticated *Lupinus* species collected along aridity gradients. *Front. Plant Sci.* 2017;8:548. DOI 10.3389/fpls.2017.00548.
- Buirchell B., Cowling W. Genetic resources in lupins. In: *Lupins as Crop Plants. Biology, Production and Utilization*. Ch. 2. CAB International, 1998.
- Chen Y., Dunbabin V., Postma J., Diggle A., Palta J., Lynch J., Siddique K., Rengel Z. Phenotypic variability and modelling of root structure of wild *Lupinus angustifolius* genotypes. *Plant Soil*. 2011; 348:345-364. DOI 10.1007/s11104-011-0939-z.
- Clements J.C., Cowling W.A. Patterns of morphological diversity in relation to geographical origins of wild *Lupinus angustifolius* from the Aegean region. *Genet. Resour. Crop Evol.* 1994;41:109-122. DOI 10.1007/BF00053055.
- Cowling W. Collection of wild *Lupinus* in Greece. *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter*. Rome, 1986;65:20-22.
- Cowling W.A. Genetic diversity in narrow-leaved lupin breeding after the domestication bottleneck. In: Singh K., Kamphuis L., Nelson M. (Eds.). *The Lupin Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, 2020. DOI 10.1007/978-3-030-21270-4_1.
- French R., Buirchell B. Lupin: the largest grain legume crop in Western Australia, its adaptation and improvement through plant breeding. *Austral. J. Agric. Res.* 2005;56(11):1169-1180. DOI 10.1071/AR05088.
- Gladstones J. Lupins as crop plants. *Field Crop Abstr.* 1970;23(2):123-148.
- Gladstones J., Atkins C., Hamblin J. (Eds.). *Lupins as Crop Plants: Biology, Production, and Utilization*. N.Y.: CAB International, 1998; 1-39.
- Glencross B.D. Feeding lupins to fish: a review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Department of Fisheries – Research Division Government of Western Australia. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.68.1305&rep=rep1&type> (Access date 01.02.2021).
- Gresta F., Wink M., Prins U., Abberton M., Capraro J., Scarafoni A., Hill G. Lupins in European cropping systems. In: *Legumes in Cropping Systems*. Wallingford, 2017;88-108. DOI 10.1079/9781780644981.0088.
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 2005;25:1965-1978. DOI 10.1002/joc.1276.
- Kamel K.A., Świącicki W., Kaczmarek Z., Barzyk P. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2016;63:711-719. DOI 10.1007/s10722-015-0278-7.
- Kurlovich B.S. *Lupins. Geography, Classification, Genetic Researches and Breeding*. St. Petersburg: Intan, 2002.
- Kushnareva A.V., Shelenga T.V., Perchuk I.N., Egorova G.P., Malyshchev L.L., Kerv Yu.A., Shavarda A.L., Vishnyakova M.A. Selection of an optimal method for screening the collection of narrow-leaved lupine held by the Vavilov Institute for the qualitative and quantitative composition of seed alkaloids. *Vavilov J. Genet. Breed.* 2020;24(8):829-835. DOI 10.18699/VJ20.680.
- Mousavi-Derazmahalleh M., Bayer P.E., Nevado B., Hurgobin B., Filatov D., Kilian A., Kamphuis L.G., Singh K.B., Berger J.D., Hane J.K., Edwards D., Erskine W., Nelson M.N. Exploring the genetic and adaptive diversity of a pan-Mediterranean crop wild relative: narrow-leaved lupin. *Theor. Appl. Genet.* 2018a;131:887-901. DOI 10.1007/s00122-017-3045-7.
- Mousavi-Derazmahalleh M., Nevado B., Bayer P.E., Filatov D.A., Hane J.K., Edwards D., Erskine W., Nelson M.N. The western Mediterranean region provided the founder population of domesticated narrow-leaved lupin. *Theor. Appl. Genet.* 2018b;131(12):2543-2554. DOI 10.1007/s00122-018-3171-x.
- Oram R.N. Two reduced branching mutants in *Lupinus angustifolius* L. *SABRAO J. Breed. Genet.* 2002;34:27-33.
- Sengbusch R. Bitterstoffarme Lupinen. *Züchter*. 1931;4:93-109.
- Świącicki W., Kroc M., Kamel K.A. Lupins. Ch. 6. In: *Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding*. Springer, 2015;10:179-218.
- Talhinhas P., Leitao J., Martins J.N. Collection of *Lupinus angustifolius* L. germplasm and characterization of morphological and molecular diversity. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2006;53(3):563-578. DOI 10.1007/s10722-004-2684-0.
- Taylor C.M., Kamphuis L.G., Cowling W.A., Nelson M.N., Berger J.D. Ecophysiology and Phenology: Genetic Resources for Genetic/Genomic Improvement of Narrow-Leaved Lupin. In: Singh K., Kamphuis L., Nelson M. (Eds.). *The Lupin Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, 2020. DOI 10.1007/978-3-030-21270-4_2.
- The ECPGR *Lupinus* Database. Available at: http://www.igr.poznan.pl/uploads/resources/Linki%20WS/Lupinus_Collections_Database.pdf (дата обращения 26.01.2021).
- Vlasova E.V. Morphological and taxonomic description of *Lupinus angustifolius* L. spikelike samples into VIR collection. *Rev. Bras. Bot.* 2015;1(10):88-91.

ORCID ID

M.A. Vishnyakova orcid.org/0000-0003-2808-7745
E.V. Vlasova orcid.org/0000-0003-3285-8186
G.P. Egorova orcid.org/0000-0002-8645-3072

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00072-А и бюджетного проекта № 0662-2019-0002.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.02.2021. После доработки 19.05.2021. Принята к публикации 19.05.2021.

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

Межфазный период «всходы–колошение» у 8х и 6х тритикале с различными доминантными генами *Vrn*

П.И. Стёпочкин¹✉, А.И. Стасюк²

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

² Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ petstep@ngs.ru

Аннотация. Существующие коллекционные формы яровых пшенично-ржаных амфиплоидов характеризуются позднеспелостью из-за большой продолжительности межфазного периода «всходы–колошение». На проявление этого признака влияют гены *Vrn-1*, аллели которых в доминантном состоянии обуславливают яровой тип развития. В статье приведены результаты изучения межфазного периода «всходы–колошение» у яровых окта- и гексаплоидных форм тритикале, создаваемых для использования в исследовательских и селекционных программах в условиях лесостепи Западной Сибири. Исследования проводили в питомнике октаплоидных (8х) тритикале в полевых условиях у первичных форм *8xVrnA1*, *8xVrnD1* и *8xVrnB1*, полученных искусственным удвоением числа хромосом пшенично-ржаных гибридов от опыления пыльцой озимой ржи (сорт Короткостебельная 69) трех линий мягкой пшеницы Triple Dirk – доноров разных доминантных генов *Vrn-1*. В питомнике гексаплоидных (6х) тритикале изучали этот признак растений в популяциях гибридов от скрещиваний трех форм первичных октаплоидных тритикале с гексаплоидным озимым сортом тритикале Сирс 57. С помощью молекулярных маркеров у гибридов определен аллельный состав генов *Vrn-1*. В потомстве, полученном от скрещивания *8xVrnD1* × Сирс 57, выделены и определены методом ПЦР генотипы яровых растений 6х тритикале с доминантным геном *Vrn-D1*. Данный факт свидетельствует о включении в них генетического материала хромосомы пятой гомеологичной группы генома D мягкой пшеницы, входящего в геномный состав октаплоидного тритикале. Этот геном отсутствует в озимом 6х тритикале Сирс 57. У созданных гексаплоидных форм тритикале озерненность колоса была лучше, чем у материнских октаплоидных. Показано, что растения из гибридных популяций *8xVrnA1* × Сирс 57 и *8xVrnD1* × Сирс 57, несущие доминантные аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-D1a* соответственно, обладают более короткой продолжительностью межфазного периода «всходы–колошение», чем исходные родительские формы первичных 8х тритикале. Короткий межфазный период «всходы–колошение» у полученных 6х тритикале является селекционно ценным признаком для создания раннеспелых и продуктивных генотипов тритикале. Ключевые слова: октаплоидные; гексаплоидные тритикале; межфазный период «всходы–колошение»; гены *Vrn-1*; гибриды.

Для цитирования: Стёпочкин П.И., Стасюк А.И. Межфазный период «всходы–колошение» у 8х и 6х тритикале с различными доминантными генами *Vrn*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(6):631-637. DOI 10.18699/VJ21.071

The interphase period “germination–heading” of 8x and 6x triticales with different dominant *Vrn* genes

P.I. Stepochkin¹✉, A.I. Stasyuk²

¹ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ petstep@ngs.ru

Abstract. The existing spring forms of wheat-rye amphiploids are characterized by late maturity due to the long duration of the interphase period “germination–heading”. The manifestation of this trait is influenced by *Vrn-1* genes. Their dominant alleles also determine the spring type of development. The results of studying the interphase period “germination–heading” of spring octaploid and hexaploid forms of triticales created for use in research and breeding programs under the conditions of forest-steppe of Western Siberia are given in this article. The interphase period of the primary forms *8xVrnA1*, *8xVrnB1* and *8xVrnD1* obtained by artificial doubling of the chromosome number of the wheat-rye hybrids made by pollination of three lines of the soft wheat ‘Triple Dirk’ – donors of different dominant *Vrn-1* genes – by a winter rye variety ‘Korotkostebel’naya 69’ was determined under the field conditions in the nursery of octaploid (8x) triticales. In the nursery of hexaploid triticales, this trait was studied in the populations of hybrids obtained by hybridization of these three primary forms of octaploid triticales with the hexaploid winter triticales variety ‘Sears 57’. In the offspring of crossing *8xVrnD1* × ‘Sears 57’, spring genotypes of 6x triticales bearing *Vrn-D1* were selected. This fact was determined

by PCR. It means that the genetic material from the chromosome of the fifth homeologous group of the D genome of the bread wheat is included in the plant genotypes. This genome is absent in the winter 6x triticale 'Sears 57'. The grain content of spikes of the created hexaploid forms of triticale is superior to that of the maternal octaploid triticale forms. It was shown that plants of the hybrid populations 8x*VrnA1* × 'Sears 57' and 8x*VrnD1* × 'Sears 57' carrying the dominant alleles *Vrn-A1a* and *Vrn-D1a*, respectively, have a shorter duration of the "germination–heading" interphase period than the initial parental forms of primary 8x triticale. The short interphase period of "germination–heading" of the 6x triticale is a valuable breeding trait for the creation of early maturing and productive genotypes of triticale.

Key words: octaploid; hexaploid triticale; interphase period "germination–heading"; *Vrn-1* genes; hybrids.

For citation: Stepochkin P.I., Stasyuk A.I. The interphase period "germination–heading" of 8x and 6x triticale with different dominant *Vrn* genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6): 631–637. DOI 10.18699/VJ21.071

Введение

За более чем 130-летнюю историю искусственной зерновой культуры тритикале (*×Triticosecale* Wittmack), или пшенично-ржаного амфиплоида (ПА), совмещающей геномы пшеницы (*Triticum* spp.) и ржи (*Secale* spp.), в мире созданы сорта и коллекционные формы как озимого, так и ярового образа жизни. По последним данным всемирной организации ФАО, в 2017 г. общая площадь посевов этой культуры достигала почти 4.17 млн га, а производство зерна – 15.6 млн т. В Российской Федерации в 2017 г. снизилась площадь посевов до 171.7 тыс. га по сравнению с максимальным значением в 2014 г. – 274.5 тыс. га. Сбор зерна за эти годы составил 500.7 и 654.1 тыс. т соответственно (<http://www.fao.org/faostat/ru/#data/QC/visualize>). Данное обстоятельство связано с уменьшением в последнее время в РФ селекционных работ, в частности направленных на создание сортов пшенично-ржаных амфиплоидов.

В сельскохозяйственной практике применение нашли преимущественно гексаплоидные (6x) тритикале (V^4B^4AARR , $2n = 42$), которые по сравнению с октаплоидными (8x) ($V^4B^4AADDRR$, $2n = 56$) являются более цитогенетически стабильными и фертильными (Lukaszewski, Gustafson, 1987). Однако имеются также редкие сообщения об успешном возделывании 8x тритикале (Cheng, Murata, 2002).

В Сибирском регионе эта культура пока не получила широкого распространения, так как селекция яровых тритикале не велась, яровые образцы из мировой коллекции ВИР позднеспелые, а озимые сорта европейской селекции в климатических условиях Сибири плохо перезимовывают и часто не дают урожая. Созданные в СибНИИРС (филиал ИЦиГ СО РАН) два озимых низкостебельных сорта зернофуражного направления – Сирс 57 и Цекад 90 – занимают лишь несколько десятков тысяч гектаров. Яровых сортов в России создано более десятка (Tyslenko et al., 2016), но сибирских сортов ярового тритикале пока нет, хотя яровые культуры разных видов (пшеница, тритикале) ежегодно дают урожай, в отличие от озимых. Для того чтобы успешно проводить селекционную работу с яровым тритикале, необходимо разносторонне изучать признаки, связанные с продуктивностью и адаптивностью растений, в том числе и те, которые касаются типа развития растения и продолжительности вегетационного периода.

Тип развития (яровой, озимый, факультативный) и продолжительность вегетационного периода контролируются генами *Vrn* (response to vernalization – реакция на яровизацию). Из них ключевую роль у видов пшениц играют

гены *Vrn-1*: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* (Yan et al., 2003; Muterko et al., 2015, 2016; Shcherban et al., 2015; Dixon et al., 2019), которые содержатся в каждом из трех геномов мягкой пшеницы А, В и D, в длинных плечах хромосом 5A, 5B и 5D соответственно. Известен также ген *Vrn-D4*, локализованный в районе центромеры хромосомы 5D (Yoshida et al., 2010; Kirpes et al., 2015), и ген *Vrn-B3* в коротком плече хромосомы 7B (Yan et al., 2006). Проведенные исследования выявили наличие нескольких аллелей у каждого из генов *Vrn* (Yan et al., 2004; Fu et al., 2005; Shcherban et al., 2012; Muterko et al., 2015). Доминантное состояние любого из этих генов приводит к яровому типу развития, а рецессивное – к озимому (Pugsley, 1971; Worland, 1996; Yan et al., 2003, 2004, 2006; Fu et al., 2005). У ржи тип развития контролируется геном *Vrn-R1*, расположенным в длинном плече хромосомы 5R (Plaschke et al., 1993).

Изучение яровых сортов пшеницы показало, что в основном гены *Vrn-1* определяют продолжительность фаз от кущения до выхода в трубку. Продолжительность периода от всходов до колошения зависит от аллельного состояния генов *Vrn-1*. Растения, содержащие аллель *Vrn-B1c*, выколашиваются раньше, чем растения с аллелем *Vrn-B1a* (Емцева и др., 2013), а наличие аллеля *Vrn-A1a* приводит к более раннему колошению по сравнению с аллелями *Vrn-B1a* или *Vrn-B1c* (Кручинина и др., 2017). Наибольшим эффектом у мягкой пшеницы *T. aestivum* L. обладает доминантный ген *Vrn-A1*, а наименьшим – доминантный ген *Vrn-B1* (Košner, Pánková, 2004). У линий октаплоидных тритикале, созданных на основе почти изогенных по доминантным генам *Vrn-1* линий мягкой пшеницы Triple Dirk, растения с генами *Vrn-A1a* и *Vrn-D1a* выколашивались раньше, чем те, у которых был ген *Vrn-B1a* (Стёпочкин, Емцева, 2017).

Цель данной статьи – изучить в условиях лесостепи Западной Сибири продолжительность межфазного периода «всходы–колошение» у создаваемых в Сибирском НИИ растениеводства и селекции (СибНИИРС) яровых окта- и гексаплоидных форм тритикале с разными доминантными генами *Vrn-1*.

Материал и методы

Продолжительность межфазного периода «всходы–колошение» октаплоидных (8x) и гексаплоидных (6x) тритикале с различными доминантными генами *Vrn-1*, влияющими на продолжительность вегетационного периода растений, изучали в разных поколениях: F_1 – в 2014 г., F_3 – в 2016, F_4 – в 2017, F_5 – в 2018, F_6 – в 2019 г.

Три первичные 8х формы тритикале были получены в СибНИИРС путем скрещивания озимой диплоидной ржи сорта Короткостебельная 69 с почти изогенными линиями мягкой пшеницы Triple Dirk D, Triple Dirk B и Triple Dirk E (Pugsley, 1971, 1972). Последние являются источниками и донорами доминантных генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* соответственно, с последующим удвоением числа хромосом у пшенично-ржаных гибридов (Стёпочкин, 2009, 2017). Аллельный состав генов *Vrn-1* у этих трех 8х ПРА следующий: *Vrn-A1a*, *vrn-B1*, *vrn-D1*, *vrn-R1* (*8xVrnA1*); *vrn-A1*, *Vrn-B1a*, *vrn-D1*, *vrn-R1* (*8xVrnB1*); *vrn-A1*, *vrn-B1*, *Vrn-D1a*, *vrn-R1* (*8xVrnD1*).

Яровые гексаплоидные формы тритикале создавали путем отбора наиболее раннеспелых растений в потомствах F₃–F₄ гибридов между первичными 8х ПРА и озимым 6х тритикале Сирс 57, несущим рецессивные гены *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-R1* (рис. 1). Аллельный состав генов *Vrn-1* у растений гибридных популяций и родительских форм определяли с помощью метода ПЦР с использованием аллель-специфичных праймеров. Структура праймеров к *Vrn-1* генам и условия ПЦР описаны в работах (Potokina et al., 2012; Likhenko et al., 2015).

Геномную ДНК выделяли по ранее описанной методике (Likhenko et al., 2015). ПЦР проводили на амплификаторе BIO-RAD T-100 Thermal Cycler (США) в общем объеме реакционной смеси 20 мкл, включающей ДНК (50–100 нг/мкл) – 1 мкл, 10×буфер для Taq полимеразы (650 мМ Tris-HCl (pH 8.9); 160 мМ (NH₄)₂SO₄; 25 мМ MgCl₂; 0.5 % Tween 20) – 2 мкл, dNTP – 2 мкл, прямой и обратный праймер – по 0.5 мкл, Taq полимеразы (1 ед./мкл) – 1 мкл, H₂O – до конечного объема 20 мкл. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Посев в открытом грунте вручную проводили в третьей декаде мая (21–24 мая в разные годы в зависимости от погоды) в ряды длиной 0.8 м, по 50 семян в ряд на изолированном от зерновых культур опытном участке СибНИИРС, где поддерживается трехпольный севооборот: овощи–пар–тритикале. В течение вегетационного периода проводили фенологические наблюдения и оценки. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью *t*-критерия Стьюдента (Доспехов, 1985).



Рис. 1. Колосья растений яровых октаплоидных тритикале *8xVrnA1* (1), *8xVrnD1* (2), *8xVrnB1* (3) и озимого гексаплоидного тритикале Сирс 57 (4).

Результаты

Оценка растений в популяциях первичных октаплоидных ПРА показала, что продолжительность межфазного периода «всходы–колошение» у образцов *8xVrnA1* и *8xVrnD1* в 2018 и 2019 гг. была короче, чем в 2014, 2016 и 2017 (табл. 1). В 2019 г. самый короткий период «всходы–колошение» среди октаплоидных ПРА наблюдался у *8xVrnA1* (52.9 сут), а самый длительный (72.5 сут) – у *8xVrnB1*. У материнской формы *8xVrnD1* этот показатель был 53.8 сут. Среди гексаплоидных форм у растений, полученных от скрещивания *8xVrnA1* × 6х Сирс 57 в 2019 г., отмечен самый короткий период «всходы–колошение» (47.3 сут), а у гибридов *8xVrnB1* × 6х Сирс 57 – самый длительный (57.8 сут). По сравнению с материнскими формами произошло сокращение периода «всходы–колошение» на 6х уровне на 6 и 14 дней соответственно. У 6х растений, полученных от скрещивания *8xVrnD1* × Сирс 57, продолжительность периода от всходов до колошения составила 53.4 сут, что достоверно не отличалось от показателя ярового октаплоидного родителя. При сравнении данных по всем годам исследований можно отметить, что отбор самых раннеспелых растений в каждом поколении привел к значительному сокращению продолжительности периода от всходов до колошения как у гексаплоидных, так и у материнских октаплоидных тритикале. Исключе-

Таблица 1. Продолжительность межфазного периода «всходы–колошение» гибридных гексаплоидных и материнских октаплоидных растений тритикале с разными доминантными генами *Vrn-1*

Гибриды и материнские формы тритикале	Длительность межфазного периода «всходы–колошение», сут (m ± sem)				
	2014 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г.	2019 г.
<i>8xVrnA1</i> × Сирс 57	69.2 ± 1.3*	66.1 ± 3.3	55.0 ± 1.9**	45.1 ± 2.5*	47.3 ± 1.9*
<i>8xVrnD1</i> × Сирс 57	75.9 ± 2.1**	68.3 ± 1.7	63.3 ± 2.4	55.2 ± 6.7	53.4 ± 1.7
<i>8xVrnB1</i> × Сирс 57	79.6 ± 4.4	71.7 ± 1.5	68.6 ± 3.4	56.4 ± 2.1**	57.8 ± 1.5**
<i>8xVrnA1</i>	65.2 ± 1.7	65.1 ± 2.0	61.7 ± 1.1	51.0 ± 1.8	52.9 ± 1.4
<i>8xVrnD1</i>	67.0 ± 1.9	66.3 ± 0.7	63.9 ± 1.0	49.5 ± 2.6	53.8 ± 2.1
<i>8xVrnB1</i>	73.6 ± 1.9	71.3 ± 0.9	69.0 ± 3.1	71.2 ± 4.3	72.5 ± 1.6

* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01 – достоверные различия между гибридом и материнской формой 8х тритикале.



Рис. 2. Колосья растений тритикале: октаплоидные 8xVrnA1 (1), 8xVrnB1 (2), 8xVrnD1 (3) и гексаплоидные, полученные от скрещивания 8xVrnA1 × Сирс 57 (4), 8xVrnB1 × Сирс 57 (5), 8xVrnD1 × Сирс 57 (6).

нием является родительская форма 8xVrnB1, у которой по всем годам исследований не обнаружено значительных изменений по продолжительности этого периода.

По морфологии колоса гексаплоидные тритикале отличаются от исходных октаплоидных форм (рис. 2). Все октаплоидные тритикале безостые, а у гексаплоидных форм имеются, как и у отцовской озимой формы Сирс 57, небольшие рудименты остей, в основном на конце колоса. У октаплоидного амфиплоида 8xVrnD1 так же, как и у полученного на его основе гексаплоида 6xVrnD1 (гибрид 8xVrnD1 × Сирс 57), опушен колос – признак, унаследованный от пшеницы Triple Dirk E (*VrnD1*).

При оценке важных для практического использования признаков было отмечено, что колос у всех гексаплоидов более плотный и озерненный, чем у 8x тритикале (табл. 2). Количество зерен в колосе у 6x форм в 2019 г. изменялось от 25.8 шт. у гибридов 8xVrnB1 × Сирс 57 до 36.4 шт. у 8xVrnA1 × Сирс 57, а у октаплоидных форм – от 9.1 шт. у 8xVrnD1 до 16.4 шт. у 8xVrnA1. Масса зерен с колоса варьировала у 6x форм от 0.76 ± 0.10 до 1.28 ± 0.21 г, а у 8x форм – от 0.24 ± 0.03 до 0.50 ± 0.13 г. Кроме того, натура зерна у гексаплоидных форм несколько выше, чем у 8x ПРА. По массе 1000 зерен достоверных различий между гекса- и октаплоидными тритикале не найдено.

Сочетание раннеспелости, которая в большей степени обусловлена продолжительностью межфазного периода «всходы–колошение», и озерненности колоса делает перспективными для дальнейшей селекционной работы два гексаплоида – 8xVrnA1 × Сирс 57 и 8xVrnD1 × Сирс 57.

Отобранные раннеспелые гексаплоидные растения были проанализированы с помощью метода ПЦР с использованием аллель-специфичных праймеров к генам *Vrn-1*. В качестве контроля были взяты их родители – озимый сорт тритикале Сирс 57 и октаплоидные материнские формы (рис. 3). Анализ показал, что озимый сорт Сирс 57 несет рецессивные аллели *vrn-A1*, *vrn-B1* и *vrn-D1*. Для материнских форм получен следующий аллельный состав: 8xVrnA1 – *Vrn-A1a*, *vrn-B1*, *vrn-D1*; 8xVrnB1 – *vrn-A1*, *Vrn-B1a*, *vrn-D1*; 8xVrnD1 – *vrn-A1*, *vrn-B1*, *Vrn-D1a*. Потомки от скрещивания 8xVrnA1 × Сирс 57 оказались гетерозиготными по гену *Vrn-A1*, так как они содержат два аллеля – *Vrn-A1a* и *vrn-A1*. Кроме того, у них выявлен рецессивный аллель *vrn-B1*, а аллели гена *Vrn-D1* не были определены в связи с отсутствием продукта амплификации. Растения из гибридной популяции 8xVrnB1 × Сирс 57 несут рецессивный аллель *vrn-A1*, последовательность гена *Vrn-D1* у них амплифицировать не удалось. По гену *Vrn-B1* растения являются гетерозиготными и несут два аллеля, *Vrn-B1a* и *vrn-B1*. У растений, полученных от скрещивания 8xVrnD1 × Сирс 57, выявлены два рецессивных аллеля (*vrn-A1*, *vrn-B1*) и один доминантный (*Vrn-D1a*).

Обсуждение

В результате скрещивания первичных 8x ПРА, несущих доминантные аллели генов *Vrn-1*, с 6x ПРА, несущими рецессивные аллели, были получены вторичные яровые 6x тритикале с доминантными аллелями *Vrn-1*. При этом гены *Vrn-1* по силе действия на сокращение периода «всходы–колошение» на 6x уровне в потомствах гибридов во всех изученных поколениях сохраняют почти такое же ранжирование (8xVrnA1 × 6x Сирс 57 > 8xVrnD1 × 6x Сирс 57 > 8xVrnB1 × 6x Сирс 57), как и на 8x уровне у тритикале (8xVrnA1 ≥ 8xVrnD1 > 8xVrnB1). Последние, в свою очередь, повторили ранжирование данных генов у исходных линий Triple Dirk (Стёпочкин, 2009; Стёпочкин, Емцева, 2017). Таким образом, действие доминантных аллелей *Vrn-A1a* и *Vrn-D1a* приводит к более короткому

Таблица 2. Некоторые количественные признаки колоса 8x и 6x тритикале с разными генами *Vrn-1*, 2019 г.

Наименование тритикале	Плотность колоса	Число зерен колоса, шт.	Масса зерен колоса, г	Масса 1000 зерен, г	Натура зерна, г/л
8xVrnA1	2.01 ± 0.06*	16.4 ± 3.1**	0.50 ± 0.13*	30.5 ± 4.0	563 ± 16*
8xVrnB1	1.89 ± 0.07**	10.2 ± 2.7**	0.25 ± 0.04**	25.4 ± 4.0	538 ± 2*
8xVrnD1	1.95 ± 0.06**	9.1 ± 1.4**	0.24 ± 0.03**	26.7 ± 2.0	578 ± 13
8xVrnA1 × Сирс 57	2.52 ± 0.08	36.4 ± 4.4	1.28 ± 0.21	35.1 ± 2.5	650 ± 10
8xVrnB1 × Сирс 57	2.60 ± 0.04	25.8 ± 2.2	0.76 ± 0.10	29.2 ± 2.1	591 ± 8
8xVrnD1 × Сирс 57	2.74 ± 0.07	36.1 ± 3.1	1.20 ± 0.10	33.1 ± 1.4	589 ± 12
Сирс 57 (6x)	2.87 ± 0.04	30.0 ± 1.9	0.92 ± 0.17	30.8 ± 6.1	542 ± 9

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – достоверные различия между гибридом и материнской формой 8x тритикале.

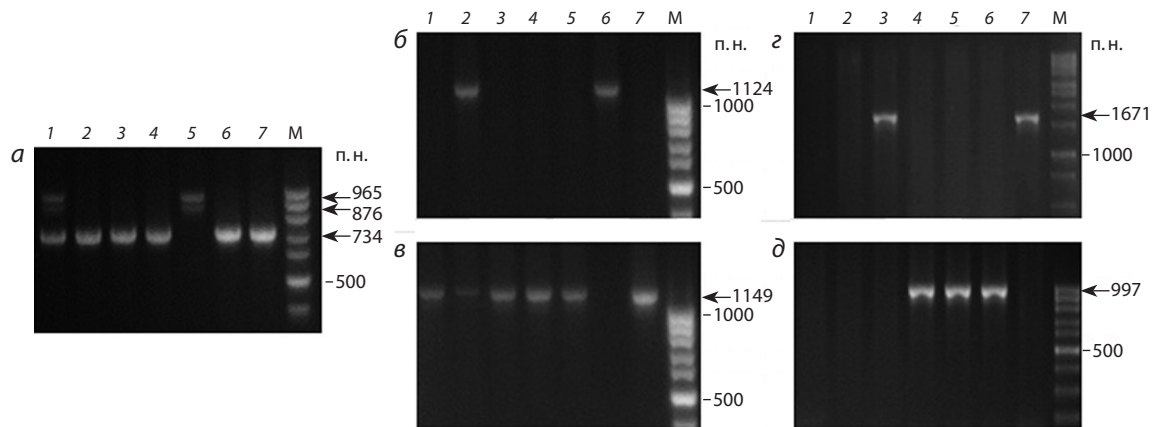


Рис. 3. Амплификация ПЦР-продуктов с использованием праймеров к генам *Vrn-1* у гексаплоидных гибридов тритикале и родительских форм: а – *Vrn-A1a* (965 + 876 п.н.) и *vrn-A1* (734 п.н.); б – *Vrn-B1a* (1124 п.н.); в – *vrn-B1* (1149 п.н.); г – *Vrn-D1a* (1671 п.н.); д – *vrn-D1* (997 п.н.).

1–3 – гибриды $8xVrnA1 \times$ Сирс 57, $8xVrnB1 \times$ Сирс 57 и $8xVrnD1 \times$ Сирс 57 соответственно; 4 – озимый сорт Сирс 57; 5–7 – яровые октаплоидные формы $8xVrnA1$, $8xVrnB1$ и $8xVrnD1$ соответственно; М – маркер длины фрагментов ДНК (а–в, д – 100 bp ladder; г – 1000 bp ladder).

межфазному периоду по сравнению с эффектом аллеля *Vrn-B1a*. Известно, что кроме гена *Vrn-D1* в хромосоме 5D локализован также ген *Vrn-D4*, который может оказывать существенное влияние на продолжительность периода от всходов до колошения (Kippes et al., 2014). Теоретически существует вероятность, что наряду с геном *Vrn-D1* может происходить встройка гена *Vrn-D4*. Однако в нашем случае это исключено, поскольку для получения первичных октаплоидных тритикале использовались изогенные по генам *Vrn* линии пшеницы Triple Dirk D, Triple Dirk B и Triple Dirk E, несущие соответственно только гены *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*. Сравнение набора 8х тритикале и образцов из мировой коллекции ВИР показало, что гексаплоидные тритикале обладают более коротким межфазным периодом «всходы–колошение» (Стёпочкин, Емцева, 2017). Высказывалось предположение, что, снижая уровень плоидности, можно сократить продолжительность периода от всходов до колошения у пшенично-ржаных амфилоидов. В частности, в пределах комбинации скрещивания октаплоидные линии выколашивались позже гексаплоидных (Каминская и др., 2005).

У гексаплоидного отцовского сорта Сирс 57 (геномная формула B^uB^uAARR) озимый тип развития, т. е. все гены *vrn-1* представлены рецессивными аллелями. Материнские формы – три яровых октаплоида (геномная формула B^uB^uAADRR), каждый из которых несет по одному доминантному гену: $8xVrnA1$ несет аллель *VrnA1a* в хромосоме 5A, $8xVrnB1$ содержит аллель *VrnB1a* в хромосоме 5B, $8xVrnD1$ несет аллель *Vrn-D1a* в хромосоме 5D генома D. Предполагалось, что у гибридов $8xVrnD1 \times$ Сирс 57 в последующих поколениях, начиная с F_2 , хромосомы гаплоидного генома D в ходе мейоза будут теряться и доля озимых растений в популяциях гибридов увеличится. В итоге в старших поколениях будут только озимые гексаплоидные формы с числом хромосом 42, без гаплоидного генома D и лишённые доминантного аллеля *Vrn-D1a*. Факты полной элиминации хромосом генома D в таких типах скрещивания известны в литературе (Нао

et al., 2013). Однако отбором яровых растений к четвертому поколению нам удалось создать популяции 6х форм, способных полностью переходить к генеративному развитию при весеннем севе без яровизации. Молекулярно-генетический анализ с помощью метода ПЦР показал наличие у этих форм доминантного аллеля *Vrn-D1a* (см. рис. 3). Значит, в результате либо замещения хромосом, либо транслокации ген *Vrn-D1* остался в сложном геноме гексаплоидных растений. В литературе имеются сведения о включении генетического материала генома D пшеницы в геном гексаплоидных тритикале (Каминская и др., 2005). В отличие от растений из популяции $8xVrnD1 \times$ Сирс 57, у гексаплоидных тритикале, полученных от скрещиваний $8xVrnA1 \times$ Сирс 57 и $8xVrnB1 \times$ Сирс 57, молекулярный анализ с праймерами к гену *Vrn-D1* не дал результатов, хотя материнские формы содержат рецессивный аллель *vrn-D1*. Отсутствие амплификации, вероятно, связано как раз с элиминацией хромосом генома D.

Следует отметить, что полученные октаплоидные тритикале цитогенетически нестабильны. В результате нарушений в мейозе образуются гаметы с несбалансированным числом хромосом, что приводит к появлению в популяциях 8х ПРА анеуплоидных растений (Vettel, 1960a, b; Krolow, 1962, 1963). Гексаплоидные тритикале с доминантными генами *Vrn-1* могут возникнуть в результате спонтанного процесса деплоидизации октаплоидных ПРА, несущих эти гены. Этот процесс сопровождается преимущественной элиминацией хромосом генома D мягкой пшеницы у октаплоидных ПРА и появлением стабильных 6х тритикале, что и обнаружено в популяциях ряда 8х тритикале (Стёпочкин, 1978; Li et al., 2015).

Заключение

Представленные результаты показали, что созданные и поддерживаемые в СибНИИРС – филиале ИЦиГ СО РАН популяции яровых октаплоидных тритикале являются донорами разных доминантных генов *Vrn-1*. Эти популяции

используются для получения новых форм 8x и 6x ПРА и в селекционном процессе. С помощью молекулярно-генетического анализа у созданных на их основе гексаплоидных тритикале определен аллельный состав генов *Vrn-1*. Выявлено, что у растений из популяций 8x*VrnA1* × Сирс 57 и 8x*VrnB1* × Сирс 57 имеются гены *Vrn-A1* и *Vrn-B1* в гетерозиготном состоянии, поэтому необходимо провести дальнейший отбор для создания гомозиготных генотипов. У созданных гексаплоидных форм тритикале озерненность колоса лучше, чем у исходных октаплоидных. Показано, что растения из гибридных популяций 8x*VrnA1* × Сирс 57 и 8x*VrnD1* × Сирс 57, несущие доминантные аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-D1a* соответственно, обладают более короткой продолжительностью межфазного периода «всходы–колошение», чем исходные родительские формы первичных 8x тритикале, что является селекционно ценным признаком для создания раннеспелых и продуктивных генотипов тритикале.

Список литературы / References

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М., 1985.

[Dospikhov B.A. Methodology of Field Experiments with the Fundamentals of Statistical Processing of Results. Moscow, 1985. (in Russian)]

Емцева М.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С. Влияние аллелей *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* на продолжительность фаз развития замещенных и изогенных линий мягкой пшеницы. *Генетика*. 2013;49(5): 632-640. DOI 10.7868/S0016675813050056.

[Emtseva M.V., Efremova T.T., Arbuzova V.S. The influence of *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* alleles on the length of developmental phases of substitution and near-isogenic lines of common wheat. *Russ. J. Genet.* 2013;49(5):545-552. DOI 10.1134/S1022795413050050.]

Каминская Л.Н., Корень Л.В., Леонова И.Н., Адонина И.Г., Хотылева Л.В., Салина Е.А. Создание линий тритикале, маркированных *Vrn*-генами, и их молекулярно-генетический анализ. *Вестн. ВОГУС*. 2005;9(4):481-489.

[Kaminskaya L.N., Koren L.V., Leonova I.N., Adonina I.G., Khotyleva L.V., Salina E.A. Development of triticales lines tagged with *Vrn* genes and their molecular-genetic study. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2005;9(4):481-489. (in Russian)]

Кручинина Ю.В., Ефремова Т.Т., Чуманова Е.В., Попова О.М., Арбузова В.С., Першина Л.А. Влияние аллелей *Vrn-B1* на продолжительность фаз развития замещенных и изогенных линий мягкой пшеницы при естественном длинном дне. *Международ. журн. прикл. и фундам. исследований*. 2017;1:278-286.

[Kruchinina Y.V., Efremova T.T., Chumanova E.V., Popova O.M., Arbuzova V.S., Pershina L.A. Influence of *Vrn-B1* alleles on the phase duration of development of substituted and isogenic wheat lines under natural long day. *Mezhdunarodny Zhurnal Prikladnykh i Fundamentalnykh Issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2017;1:278-286. (in Russian)].

Стёпочкин П.И. Появление растений 6x тритикале в потомстве C_2 гомогеномных 8x тритикале. *Генетика*. 1978;14(9):1658-1659.

[Stepochkin P.I. The appearance of 6x triticales plants among the C_2 offspring of homogenomic 8x triticales. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1978;14(9):1658-1659. (in Russian)]

Стёпочкин П.И. Создание и изучение серии по генам *Vrn* форм тритикале. *Сиб. вестн. с.-х. науки*. 2009;11:26-32.

[Stepochkin P.I. Development and study of a set of triticales forms as to the *Vrn* genes. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences*. 2009;11:26-32. (in Russian)]

Стёпочкин П.И. Изучение продолжительности фазы «всходы–колошение» у гибридов ранних поколений яровых тритикале разных уровней плоидности. *Вестн. АПК Ставрополя*. 2017; 1(25):148-152.

Stepochkin P.I. Study of duration of the “shoots–earring” phase of the spring triticales early generations hybrids of different ploidy levels. *Vestnik APK Stavropolya = Agricultural Bulletin of Stavropol Region*. 2017;1(25):148-152. (in Russian)]

Стёпочкин П.И., Емцева М.В. Изучение межфазного периода «всходы–колошение» у исходных родительских форм и гибридов тритикале с разными генами *Vrn*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(5):530-533. DOI 10.18699/VJ17.22-о.

[Stepochkin P.I., Emtseva M.V. Study of the interphase period “shoots–earring” of the initial parental forms and hybrids of triticales with different *Vrn* genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(5):530-533. DOI 10.18699/VJ17.22-о. (in Russian)]

Cheng Z.-J., Murata M. Loss chromosomes 2R and 5RS in octoploid triticales selected for agronomic traits. *Genes. Genet. Syst.* 2002;7: 23-29.

Dixon L., Karsai I., Kiss T., Adamski N., Liu Z., Ding Y., Allard V., Boden S., Griffiths S. *VERNALIZATION1* controls developmental responses of winter wheat under high ambient temperatures. *Development*. 2019;146(3):dev172684. DOI 10.1242/dev.172684.

Fu D., Szücs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Genet. Genomics*. 2005;273:54-65.

Hao M., Luo J., Zhang L., Yuan Z., Yang Y., Wu M. Production of hexaploid triticales by a synthetic hexaploid wheat-rye hybrid method. *Euphytica*. 2013;193:347-357. DOI 10.1007/s10681-013-0930-2.

Kippes N., Debernardi J., Vasquez-Gross H., Akpinar B., Budak H., Kato K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(39):E5401-E5410. DOI 10.1073/pnas.1514883112.

Kippes N., Zhu J., Chen A., Vanzetti L., Lukaszewski A., Nishida H., Kato K., Dvorak J., Dubcovsky J. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics*. 2014;289:47-62. DOI 10.1007/s00438-013-0788-y.

Košner J., Pánková K. Chromosome substitutions with dominant loci *Vrn-1* and their effect on developmental stages of wheat. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2004;2(40):37-44.

Krolow K.-D. Aneuploidie und Fertilität bei amphidiploiden Weizen-Roggen-Bastarden (*Triticale*). 1. Aneuploidie und Selection auf Fertilität bei oktoploiden Triticales-Formen. *Z. Pflanzenzucht*. 1962; 48(2):177-196.

Krolow K.-D. Aneuploidie und Fertilität bei amphidiploiden Weizen-Roggen-Bastarden (*Triticale*). 2. Aneuploidie und Fertilitäts-Untersuchungen an einer oktoploiden Triticales-Form mit starker Abregulierungstendenz. *Z. Pflanzenzucht*. 1963;49(3):210-242.

Li H., Guo X., Wang C., Ji W. Spontaneous and divergent hexaploid triticales derived from common wheat × rye by complete elimination of D-genome chromosomes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120421. DOI 10.1371/journal.pone.0120421.

Likhenko I.E., Stasyuk A.I., Shcherban' A.B., Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. Study of allelic composition of *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in early-ripening and middle-early varieties of spring soft wheat in Siberia. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2015;5(3):198-207. DOI 10.1134/S2079059715030107.

Lukaszewski A.J., Gustafson J.P. Cytogenetics of triticales. *Plant Breed. Rev.* 1987;5:41-93.

Muterko A., Balashova I., Cokram J., Kalrndar R., Sivolap Y. The new wheat vernalization response allele *Vrn-D1s* is caused by DNA transposon insertion in the first intron. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015; 33:294-303. DOI 10.1007/s11105-014-0750-0.

- Muterko A., Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMS Plant Biol.* 2016;16(Suppl.1):9. DOI 10.1186/s12870-015-0691-2.
- Plaschke J., Börner A., Xie D.X., Koebner R.M.D., Schlegel R., Gale M.D. RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theor. Appl. Genet.* 1993;85:1049-1054.
- Potokina E.K., Koshkin V.A., Alekseeva E.A., Matvienko I.I., Bespalova L.A., Filobok V.A. The combination of the *Ppd* and *Vrn* gene alleles determines the heading time in common wheat varieties. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2(4):311-318. DOI 10.1134/S2079059712040089.
- Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 1971;22:21-31.
- Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat. *Euphytica.* 1972;21:547-552.
- Shcherban A., Börner A., Salina E. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. *Plant Breed.* 2015;134(1):49-55. DOI 10.1111/pbr.12223.
- Shcherban A., Efremova T., Salina E. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Mol. Breed.* 2012;29:675-685.
- Tyslenko A., Zuev D., Skatova S., Shvidchenko V. Rossica – new stern spring triticale cultivar for field crop in Russia. 2016. Available at: <https://ipi1.ru/images/PDF/2016/73/rossika-novyj-kormovoj-sort.pdf> (in Russian)
- Vettel F.K. Mutationsversuche an Weizen-Roggen-Bastarden. 2. Zytologische Untersuchung und Fertilitats – Bestimmungen an Triticale Rimpau und einigen Mutanten. *Zuchter.* 1960a;30(5):181-189.
- Vettel F.K. Mutationsversuche an Weizen-Roggen-Bastarden (*Triticale*). 3. Mutationsauslösung bei Triticale Meister und Triticale 8324. *Zuchter.* 1960b;30(8):313-329.
- Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. *Euphytica.* 1996;89:49-57.
- Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN-3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;104:19581-19586.
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN1* promoter region in polyploidy wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1677-1686.
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:6263-6268.
- Yoshida T., Nishida H., Zhu J., Nitcher R., Distelfeld A., Akashi Y., Kato K., Dubcovsky J. *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120:543-552.

Благодарности. Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0012.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.09.2020. После доработки 27.05.2021. Принята к публикации 09.06.2021.

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

Злаковые травы – резерваторы инфекции видов ржавчины для озимой мягкой пшеницы на Северном Кавказе России

Е.И. Гульяева¹✉, Л.А. Беспалова², И.Б. Аблова², Е.Л. Шайдак¹, Ж.Н. Худокормова², Д.Р. Яковлева¹, Ю.А. Титова¹

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

² Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

✉ eiguiltyaeva@gmail.com

Аннотация. Озимая мягкая пшеница – основная зерновая культура, возделываемая на Северном Кавказе. Поражение ржавчинными болезнями – один из факторов, лимитирующих урожайность пшеницы. В регионе отмечаются три вида ржавчины: бурая (*Puccinia triticina*), стеблевая (*P. graminis*) и желтая (*P. striiformis*), значимость которых варьирует по годам. Наиболее распространена бурая ржавчина, но в последнее десятилетие частота ее эпифитотийного развития существенно снизилась. При этом возрастает вредоносность желтой ржавчины (*P. striiformis*). Стеблевая ржавчина в регионе преимущественно отсутствует или наблюдается в слабой степени в конце вегетации пшеницы. В отдельные годы с благоприятными погодными условиями наблюдается ее массовое развитие на восприимчивых сортах. Считается, что источниками инфекции видов ржавчины на Северном Кавказе служат зараженные посевы мягкой пшеницы, дикорастущие злаки и экзодемичная инфекция, заносимая воздушными потоками с сопредельных территорий. На Северном Кавказе практически ежегодно встречается поражение кормовых и дикорастущих злаковых трав видами *Puccinia*. В зависимости от погодных условий проявление симптомов отмечается с конца сентября до декабря и затем с конца февраля до мая-июня. Потенциально осенняя инфекция на травах может служить источником для заражения сортов озимой мягкой пшеницы, высеваемых в октябре. Цель настоящих исследований – охарактеризовать вирулентность *P. triticina*, *P. graminis*, *P. striiformis* на диких злаках и оценить их специализацию к озимой мягкой пшенице на Северном Кавказе. Инфекционный материал, представленный листьями с урединиопустулами бурой, стеблевой и желтой ржавчины, был собран в Краснодарском крае на дикорастущих злаках (*Poa* spp., *Bromus* spp.) в октябре-ноябре 2019 г. В лабораторных условиях урединиоматериал *P. triticina*, *P. striiformis* и *P. graminis* был размножен и клонирован. Монопустульные изоляты видов *Puccinia* использовали для анализа вирулентности. В экспериментах по изучению специализации видов ржавчины с дикорастущих злаков на мягкой пшенице задействовали 12 озимых сортов: Гром, Таня, Юка, Табор, Безостая 100, Юбилейная 100, Веха, Васса, Алексеич, Стан, Гурт, Баграт. Эти сорта широко возделываются в Северо-Кавказском регионе и характеризуются разной степенью устойчивости к ржавчинам. Дополнительно материал пшеницы инокулировали краснодарскими популяциями *P. triticina*, *P. striiformis*, *P. graminis* с мягкой пшеницы. В анализе вирулентности *P. triticina* на злаковых травах выявили четыре фенотипа (расы): МСТКН (30 %), ТСТТТ (30 %), ТНТТТ (25 %), МНТКН (15 %), а *P. graminis* – пять фенотипов: РКМТФ (60 %), ТКТТФ, РКЛТФ, ҚКЛТФ, ЛНЛПФ (по 10 %). Среди изолятов *P. striiformis* с применением международного и европейского наборов сортов-дифференциаторов определены три фенотипа: 111Е231 (88 %), 111Е247 (6 %) и 78Е199 (6 %). С использованием изогенных линий Avocet также идентифицированы три расы, которые различались между собой по вирулентности к генам *Yr1*, *Yr11*, *Yr18* (с доминированием вирулентных (94 %)). Сборные урединиоматериалы (смесь всех идентифицированных рас) каждого вида ржавчины со злаковых трав были задействованы для инокуляции сортов озимой пшеницы. Большинство сортов озимой мягкой пшеницы (75 %) характеризовались устойчивой реакцией при заражении популяциями *P. graminis* с мягкой пшеницы и злаковых трав. Все эти сорта созданы с участием доноров ржаной транслокации 1BL.1RS, в которой локализованы гены *Lr26*, *Sr31* и *Yr9*. Число сортов озимой пшеницы, устойчивых в фазе проростков к бурой ржавчине, было ниже (58 %). При этом все изученные сорта в фазе проростков в разной степени были восприимчивы к *P. striiformis*. Проведенный анализ вирулентности популяций возбудителей бурой, стеблевой и желтой ржавчины не выявил существенных различий в вирулентности патогена на дикорастущих злаковых травах и мягкой пшенице. Урединиоматериал всех изученных видов ржавчины успешно заражал сорта мягкой пшеницы. Полученные результаты указывают на то, что злаковые травы являются резерваторами инфекции ржавчин для посевов мягкой пшеницы на Северном Кавказе.

Ключевые слова: *Puccinia triticina*; *P. graminis*; *P. striiformis*; вирулентность; устойчивость; *Triticum aestivum*; *Lr*-гены; *Sr*-гены; *Yr*-гены.

Для цитирования: Гульяева Е.И., Беспалова Л.А., Аблова И.Б., Шайдак Е.Л., Худокормова Ж.Н., Яковлева Д.Р., Титова Ю.А. Злаковые травы – резерваторы инфекции видов ржавчины для озимой мягкой пшеницы на Северном Кавказе России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):638-646. DOI 10.18699/VJ21.072

Wild grasses as the reservoirs of infection of rust species for winter soft wheat in the Northern Caucasus

E.I. Gulyaeva¹✉, L.A. Bepalova², I.B. Ablova², E.L. Shaydayuk¹, Zh.N. Khudokormova², D.R. Yakovleva¹, Yu.A. Titova¹

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

² National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

✉ eigulyaeva@gmail.com

Abstract. Common winter wheat is the main grain crop cultivated in the North Caucasus. Rust disease damage is one of the factors limiting wheat productivity. There are three species of rust in the region: leaf (*Puccinia triticina*), stem (*P. graminis*) and stripe rust (*P. striiformis*), and their significance varies from year to year. The most common is leaf rust, but in the last decade the frequency of its epiphytotic development has significantly decreased. At the same time, an increase in the harmfulness of stripe rust (*P. striiformis*) is noted. Stem rust in the region is mainly absent or observed at the end of the wheat growing season to a weak degree. Only in some years with favorable weather conditions its mass development is noted on susceptible cultivars. It is believed that the sources of infection with rust species in the North Caucasus are infested soft wheat crops, wild-growing cereals and exodemic infection carried by air currents from adjacent territories. In the North Caucasus, forage and wild grasses are affected by *Puccinia* species almost every year. Depending on weather conditions, the symptom expression is noted from late September to December and then from late February to May–June. Potentially, an autumn infection on grasses can serve as a source for infection of winter soft wheat cultivars sown in October. The purpose of these studies is to characterize the virulence of *P. triticina*, *P. graminis*, *P. striiformis* on wild cereals and to assess the specialization of causative agents to winter wheat in the North Caucasus. Infectious material represented by leaves with urediniopustules of leaf, stem and stripe rusts was collected from wild cereals (*Poa* spp., *Bromus* spp.) in the Krasnodar Territory in October–November 2019. Uredinium material from *P. triticina*, *P. striiformis*, and *P. graminis* was propagated and cloned. Monopustular *Puccinia* spp. isolates were used for virulence genetics analysis. In experiments to study the specialization of rust species from wild-growing cereals on common wheat, 12 winter cultivars were used (Grom, Tanya, Yuka, Tabor, Bezostaya 100, Yubileynaya 100, Vekha, Vassa, Alekseich, Stan, Gurt, Bagrat). These cultivars are widely cultivated in the North Caucasus region and are characterized by varying degrees of resistance to rust. Additionally, wheat material was inoculated with Krasnodar populations of *P. triticina*, *P. striiformis*, *P. graminis* from common wheat. In the virulence analysis of *P. triticina* on cereal grasses, 4 phenotypes (races) were identified: MCTKH (30 %), TCTTR (30 %), TNTTR (25 %), MHTKH (15 %), and 5 were identified in *P. graminis* (RKMTF (60 %), TKTTF, RKLTF, QKLTf, LHLPF (10 % each)). Among *P. striiformis* isolates, 3 phenotypes were identified using the International and European sets of differentiating cultivars – 111E231 (88 %), 111E247 (6 %) and 78E199 (6 %). Using isogenic Avocet lines, 3 races were also identified, which differed among themselves in virulence to the *Yr1*, *Yr11*, *Yr18* genes (with the prevalence of virulent ones (94 %)). Composite urediniums' samples (a mixture of all identified races) of grass rust of each species were used to inoculate winter wheat cultivars. The most common winter wheat cultivars (75 %) were characterized by a resistant response when infected with *P. graminis* populations from common wheat and cereal grasses. All these cultivars were developed using donors of the rye translocation 1BL.1RS, in which the *Lr26*, *Sr31*, and *Yr9* genes are localized. The number of winter wheat cultivars resistant to leaf rust in the seedling phase was lower (58 %). At the same time, all the studied cultivars in the seedling phase were susceptible to *P. striiformis* to varying degrees. The virulence analysis of the leaf, stem and stripe rust populations did not reveal significant differences in the virulence of the pathogens between wild-growing cereals and soft wheat. Urediniomaterial of all studied rust species successfully infested soft wheat cultivars. The results obtained indicate that grasses are rust infection reservoirs for common wheat crops in the North Caucasus.

Key words: *Puccinia triticina*; *P. graminis*; *P. striiformis*; virulence; resistance; *Triticum aestivum*; *Lr*-genes; *Sr*-genes; *Yr*-genes.

For citation: Gulyaeva E.I., Bepalova L.A., Ablova I.B., Shaydayuk E.L., Khudokormova Zh.N., Yakovleva D.R., Titova Yu.A. Wild grasses as the reservoirs of infection of rust species for winter soft wheat in the Northern Caucasus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):638-646. DOI 10.18699/VJ21.072

Введение

Озимая мягкая пшеница – основная зерновая культура, возделываемая на Северном Кавказе. Посевные площади ее в регионе составляют более 7 млн га, в том числе 1.5 – в Краснодарском крае, 3 – в Ростовской области, 2.5 млн га – в Ставропольском крае и других республиках. Поражение листовыми болезнями – один из факторов, лимитирующих урожайность пшеницы.

Бурая ржавчина – наиболее распространенное заболевание пшеницы в Северо-Кавказском регионе (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.). В последнее десятилетие частота ее эпифитотийного развития существенно снизилась по сравнению с периодом до 2005 г. Это обусловлено посте-

пенным увеличением генетического разнообразия возделываемых сортов, своевременной сортоосменой и отсутствием в производстве сорта-лидера.

При этом в регионе отмечается увеличение значимости желтой ржавчины (*P. striiformis* West.), что связано с изменением климата (продолжительные теплые осени, мягкие зимы, отсутствие промерзания почвы, затяжные прохладные весны) (Аблова и др., 2012). Желтая ржавчина характеризуется большей вредоносностью, чем бурая, и может снижать урожай до 30 % (Санин, 2012).

Стеблевая ржавчина (*P. graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. & E.) в регионе преимущественно отсутствует или наблюдается в конце вегетации пшеницы в слабой степени.



Злаковые травы (*Poa* spp., *Bromus* spp.) с инфекцией видов ржавчины (Краснодарский край, ноябрь 2019 г.).

Только в отдельные годы с благоприятными погодными условиями отмечено ее массовое развитие на восприимчивых сортах. Это обусловлено широким возделыванием в регионе сортов озимой пшеницы с геном *Sr31*, который до настоящего времени остается высокоэффективным в защите от стеблевой ржавчины в России. Кроме этого, в процессе селекции существенно сокращена продолжительность вегетационного периода современных сортов, что способствует уходу их от болезни (Аблова и др., 2012).

Считается, что источниками инфекции видов ржавчины на Северном Кавказе служат зараженные посевы мягкой пшеницы, дикорастущие злаки и экзодемичная инфекция, заносимая воздушными потоками с сопредельных территорий. Озимую пшеницу высевают в сентябре-октябре. Уборку производят со второй половины июня до конца июля. Соответственно, урединиоинфекция возбудителей ржавчин на озимой пшенице может сохраняться с октября до июня. Дополнительными резервуарами могут служить кормовые и дикорастущие злаковые травы (*Bromus*, *Poa*, *Festuca*, *Agropyron*, *Elimus*, *Aegilops*, *Hordeum*, *Agrostis* spp.). Трансграничный перенос урединиоспор возбудителей ржавчины на территорию Северного Кавказа возможен из Турции, Ирака, Ирана (Санин, 2012). По мнению Л.К. Анпиловой с коллегами (1995), на Северном Кавказе в эпифитотийные годы инфекция возбудителя желтой ржавчины пшеницы появляется за счет миграции с территории Закавказья в Дагестан, Осетию, Ингушетию, Кабардино-Балкарию, предгорные и прилегающие к ним степные районы Ставропольского и Краснодарского края.

На Северном Кавказе ежегодно наблюдается поражение кормовых и дикорастущих злаковых трав видами *Puccinia* (см. рисунок). В зависимости от погодных условий проявление симптомов отмечается с конца сентября до декабря и затем с конца февраля до мая-июня. Потенциально осенняя инфекция на травах может служить источником для заражения сортов озимой мягкой пшеницы, высеваемых в октябре.

Цель настоящих исследований – охарактеризовать вирулентность *P. triticina*, *P. graminis*, *P. striiformis* на диких злаках и оценить их специализацию к озимой мягкой пшенице на Северном Кавказе.

Материалы и методы

Инфекционный материал, представленный листьями с урединиопустулами бурой, стеблевой и желтой ржавчины, собирали в Краснодарском крае на дикорастущих злаках (*Poa* spp., *Bromus* spp.) в октябре-ноябре 2019 г. (см. рисунок). В анализе использовано 18 урединиообразцов. В инфекционном материале доминировали виды *P. triticina* и *P. striiformis*. Пустулы *P. graminis* имели ограниченную представленность. Всего изучено монопустульных изолятов: 20 – *P. triticina*, 16 – *P. striiformis* и 10 – *P. graminis*.

Размножение инфекционного материала и получение монопустульных изолятов *Puccinia* sp. Для размножения инокулюма видов ржавчины и получения монопустульных изолятов использовали универсально восприимчивый сорт озимой мягкой пшеницы Michigan Amber. В лабораторных условиях урединиоматериал *P. triticina* и *P. graminis* размножали и клонировали с применением метода отрезков листьев, помещенных в раствор бензимидазола (0.004 %) (Михайлова и др., 1998). Урединиоспоры каждого монопустульного изолята микроскопировали для уточнения вида *Puccinia* и предотвращения контаминации.

Поскольку жизнеспособность урединиоспор *P. striiformis* в гербарном материале непродолжительна, проводили «реанимацию» популяций на отрезках листьев (Михайлова и др., 1998). Для этого листья трав с урединиопустулами разрезали на кусочки 5–8 см, раскладывали в чашки Петри, на дно которых было положено два предметных стекла. Концы листьев прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (0.004 %), закрывали чашки и ставили в холодильник (температура 3–5 °С) на 2–4 дня. Этот прием позволял стимулировать возобновление спороношения патогена. Последующее размножение возбудителя проводили на 10–12-дневных растениях пшеницы, выращенных в сосудах с почвой, с применением метода микрокамер. Для этого отрезки листьев с урединиопустулами прикладывали к листьям и закрепляли с помощью пищевой пленки. Сосуды с растениями опрыскивали водой, накрывали каркасами с полиэтиленовой пленкой и помещали на 18–20 ч в темную камеру при температуре 10 °С. Далее снимали каркасы и микрокамеры с инфекционным материалом. Растения переносили в кли-

матическую камеру Versatile Environmental Test Chamber MLR-352H (SANYO Electric Co., Ltd.), где инкубировали на свету (10000–20000 лк) при температуре 16 °С в течение 16 ч и далее в темноте при 10 °С в течение 8 ч (влажность 70 %). Проявление симптомов наблюдали спустя 12–18 дней после заражения.

Для сбора спор монопустульных изолятов ржавчины действовали вакуумный насос Merck (Millipore) (220 В/50 Гц) со специальными насадками (1 клон – 1 насадка).

Анализ вирулентности популяций проводили с использованием 10–12 дневных растений линий-дифференциаторов, выращенных в сосудах с почвой (1 набор – 1 монопустульный изолят). Растения опрыскивали суспензией спор в специализированной жидкости NOVEC 7100, накрывали каркасом с полиэтиленом (для создания влажной камеры) и выдерживали в темноте при температуре 20–23 °С для бурой и стеблевой ржавчины, 10 °С – для желтой ржавчины. Спустя 12 ч полиэтилен снимали и на каркасы натягивали специальные перфорированные изоляторы для предотвращения контаминации. Наборы линий-дифференциаторов, зараженных видами *P. trititica* и *P. graminis*, инкубировали в светоустановке при температуре 20–23 °С (фотопериод: 16 ч день (освещенность 10000–15000 лк)/8 ч ночь), а *P. striiformis* – в климатической камере по вышеописанным параметрам.

Для изучения вирулентности изолятов возбудителя бурой ржавчины использовали линии Thatcher (Tc) с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr9*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17a*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26* и *Lr30*; возбудителя стеблевой ржавчины – линии Marquis (Mq) с генами *Sr5*, *Sr6*, *Sr7b*, *Sr8a*, *Sr9a*, *Sr9b*, *Sr9g*, *Sr9e*, *Sr9d*, *Sr10*, *Sr11*, *Sr17*, *Sr21*, *Sr24*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr36*, *Sr38*, *SrTmp* и *SrMcN*.

Анализ возбудителя желтой ржавчины проводили с помощью международного (Chinese 166 (*Yr1*), Lee (*Yr7*, *Yr+*), Heines Kolben (*Yr2* + *Yr6*), Vilmorin 23 (*Yr3*), Moro (*Yr10*, *YrMor*), Strubes Dickkopf (*YrSD*, *Yr+*), Suwon 92/Omar (*YrSu*, *Yr+*) и европейского (Hybrid 46 (*Yr4*, *Yr+*), Reichersberg 42 (*Yr7*, *Yr+*), Heines Peko (*Yr6*, *Yr+*), Nord Desprez (*Yr3*, *YrND*, *Yr+*), Compair (*Yr8*, *Yr19*), Carstens V (*Yr32*, *Yr+*), Spaldings Prolific (*YrSP*, *Yr+*), Heines VII (*Yr2*, *Yr+*)) наборов сортов-дифференциаторов, а также линий Avocet (Ac) с генами *Yr1*, *Yr5*, *Yr6*, *Yr7*, *Yr8*, *Yr9*, *Yr10*, *Yr11*, *Yr12*, *Yr15*, *Yr17*, *Yr18*, *Yr24*, *Yr26*, *YrSk(27)*, *YrAR*, *YrSp*. Семенной материал сортов и линий-дифференциаторов был любезно предоставлен А.С. Рсалиевым (Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Казахстан).

Для обозначения рас бурой и стеблевой ржавчины применяли североамериканскую буквенную аббревиатуру, согласно которой линии объединены в группы (по четыре линии в каждой) (Long, Kolmer, 1989). Набор линий для стеблевой ржавчины включал линии с генами: *Sr5*, *Sr21*, *Sr9e*, *Sr7b* (1-я группа); *Sr11*, *S6*, *Sr8a*, *Sr9g* (2-я группа); *Sr36*, *Sr9b*, *Sr30*, *Sr17* (3-я группа); *Sr9a*, *Sr9d*, *Sr10*, *SrTmp* (4-я группа); *Sr24*, *Sr31*, *Sr38*, *SrMcN* (5-я группа) (Сколотнева и др., 2020); для бурой ржавчины – *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3* (1-я группа); *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26* (2-я группа); *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30* (3-я группа); *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a*,

Lr14b (4-я группа); *Lr15*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20* (5-я группа) (Gulyaeva et al., 2020).

Определение рас возбудителя желтой ржавчины проводили с использованием международного и европейского наборов. Для обозначения применяли десятичную номенклатуру. Основу ее составляет двоичная система обозначения типов инфекции (устойчивый тип реакции (R) обозначается как 0, восприимчивый (S) – как 1) и десятичная система обозначения каждого сорта (первый дифференциатор 2⁰, второй 2¹, третий 2² и т.д.). Ввиду того, что было задействовано два набора сортов-дифференциаторов, международный и европейский, при наименовании расы сначала писали номер по международному набору, затем номер по европейскому с приставкой E (например, 1E3) (Гультяева, Шайдаюк, 2020).

Иммунологические исследования сортов озимой пшеницы в лабораторных и полевых условиях. Двенадцать сортов озимой мягкой пшеницы, Гром, Таня, Юка, Табор, Безостая 100, Юбилейная 100, Веха, Васса, Алексеич, Стан, Гурт, Баграт, были использованы для инокуляции краснодарскими популяциями *P. trititica*, *P. graminis* и *P. striiformis* со злаковых трав и мягкой пшеницы. Эти сорта широко возделываются в Северо-Кавказском регионе и характеризуются разной степенью устойчивости к ржавчинам.

В лабораторных условиях растения выращивали в пластиковых контейнерах (по 5–8 зерен каждого сорта). В фазе первого листа (10–12-дневные растения) их опрыскивали суспензией спор в NOVEC 7100 каждым из видов ржавчины. Инкубация растений после заражения проведена по вышеописанным параметрам.

Тип реакции линий-дифференциаторов и сортов пшеницы на заражение бурой ржавчиной оценивали на 8–10-й день по шкале E.V. Mains и H.S. Jackson (1926), стеблевой ржавчиной – на 10–12-й день по шкале E.C. Stakman с коллегами (1962), желтой ржавчиной – на 16–18-й день по шкале G. Gassner и W. Straib (1928). Растения с баллами 0, 1, 2 относили к устойчивым, с баллами 3, 4, X – к восприимчивым.

Для создания искусственных инфекционных фоно в полевых условиях Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко (Краснодарский край) применяли следующие методы: растения инокулировали опрыскиванием водной суспензией спор с прилипателем Твин 80 и создавали влажную камеру с помощью полиэтиленовых пакетов (бурая и желтая ржавчины). Стеблевой ржавчиной растения заражали с помощью шприца. Инфекционная нагрузка составляла 10 мг/м² спор возбудителей бурой, 20 мг/м² – стеблевой и желтой ржавчины. Для успешного заражения бурой ржавчиной температура должна быть не ниже 15 °С, стеблевой – 18 °С, желтой – 10 °С. Желтой ржавчиной растения заражали в фазу трубкования, бурой и стеблевой – в фазу трубкования–колошения.

Устойчивость к видам ржавчины определяли по качественным (тип реакции) и количественным показателям (интенсивность поражения). Тип реакции к бурой ржавчине определяли по шкале E.V. Mains и H.S. Jackson (1926), к желтой – G. Gassner и W. Straib (1928), к стеблевой – E.C. Stakman с коллегами (1962). Пораженность растений определяли глазомерно: бурой ржавчиной – флагового и

предфлагового листьев, желтой – трех верхних листьев, стеблевой – двух верхних междоузлий, влагалищ флагового и предфлагового листьев. Степень поражения бурой и стеблевой ржавчинами определяли по шкале Петерсона, желтой ржавчиной – по модифицированной шкале Кобба (McIntosh et al., 1995). Учет поражения видами ржавчины проводили в период от колошения до молочно-восковой спелости.

Результаты и обсуждение

Урединиоспоры *P. triticina*, *P. graminis*, *P. striiformis* с диких злаков успешно заражали универсально восприимчивый сорт озимой мягкой пшеницы Michigan Amber, что позволило провести популяционно-генетические исследования патогенов и иммунологические – сортов пшеницы. В анализе вирулентности *P. triticina* изучили 20 монопустульных изолятов и выявили четыре расы (фенотипа): МСТКН (30 %), ТСТТТ (30 %), ТНТТТ (25 %), МНТКН (15 %). Все изоляты были авирулентными к линиям Thatcher с генами *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* и вирулентными к *Lr1*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr17a*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr26*, *Lr30*. Варьирование частот отмечено на линиях *TcLr2a*, *TcLr2b*, *TcLr2c*, *TcLr15* (вирулентность 55 %) и *TcLr16* (40 %).

При анализе популяции *P. graminis* обнаружено более высокое фенотипическое разнообразие. Пять рас, РКМТФ (60 %), ТКТТФ, РКЛТФ, КЛЛТФ, ЛЛЛПФ (по 10 %), определено среди десяти изученных монопустульных изолятов. Все изоляты были авирулентными к линиям Marquis с генами *Sr9e*, *Sr11*, *Sr24*, *Sr30*, *Sr31* и вирулентными – к *Sr5*, *Sr6*, *Sr9a*, *Sr9g*, *Sr10*, *Sr36*, *Sr38*, *SrTmp*, *SrMcN*. Вариативность по типам реакции наблюдали на линиях *Sr7b*, *Sr8a*, *Sr9b*, *Sr9e*, *Sr9d*, *Sr17*, *Sr21*.

Вирулентность к желтой ржавчине изучили у 16 монопустульных изолятов. Все изоляты были авирулентными к сортам-дифференциаторам Moro, Nord Desprez, Compair и линиям Avocet с генами *Yr5*, *Yr8*, *Yr10*, *Yr12*, *Yr15*, *Yr17*, *Yr24*, *Yr26* и вирулентными к сортам Lee, Heines Kolben, Vilmorin 23, Hybrid 46, Reichersberg 42, Suwon 92/Omar, Heines Peko, Spaldings Prolific, Heines VII и линиям с генами *Yr6*, *Yr10*, *YrSk(27)*, *YrAR*, *YrSp*. Варьирование по вирулентности отмечено на сортах Chinese 166, Strubes Dickkopf, Carstens V и линиях *AcYr1*, *AcYr11* и *AcYr18*. Согласно международному и европейскому наборам сортов-дифференциаторов, изоляты *P. striiformis* были представлены расами 111E231 (88 %), 111E247 (6 %) и 78E199 (6 %). В анализе вирулентности с использованием линий Avocet выявлено три фенотипа, различающихся между собой по вирулентности к *Yr1*, *Yr11*, *Yr18* (с доминированием вирулентных (94 %)).

Сборные популяции каждого из видов ржавчины со злаковых трав были задействованы для заражения широко возделываемых в регионе сортов озимой пшеницы (табл. 1). Инокулом включал изоляты всех рас патогена, определенных в анализе вирулентности. Дополнительно изучаемые сорта были заражены краснодарскими популяциями *P. triticina*, *P. striiformis*, *P. graminis* с мягкой пшеницы. Популяция *P. triticina* была авирулентна к линиям Thatcher с генами *Lr*: 9, 16, 19, 24 и вирулентна к *Lr*: 1, 2a, 2b, 2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a, 14b, 15, 17, 18, 20, 26, 30; *P. striiformis* *Yr*: 5, 10, 15, 17, 24; 26/*Yr*: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18, 32, Sp; *P. graminis* *Sr*: 24, 30, 31/*Sr*: 5, 6, 7b, 8a, 9a, 9e, 9d, 10, 21, 36, 38, McN, Tmp.

Большинство сортов озимой мягкой пшеницы (75 %) характеризовались устойчивой реакцией при заражении популяциями *P. graminis* с мягкой пшеницы и злаковых

Таблица 1. Устойчивость сортов озимой пшеницы к ржавчинам в фазе проростков

Сорт	Гены устойчивости	Тип реакции к образцам популяций <i>Puccinia</i> , балл					
		<i>P. graminis</i>		<i>P. triticina</i>		<i>P. striiformis</i>	
		Мягкая пшеница	Злаковые травы	Мягкая пшеница	Злаковые травы	Мягкая пшеница	Злаковые травы
Гром	<i>Lr1</i>	3–4	3–4	3–4	3–4	3	3–4
Табор		3 ⁻	3–4	2	0–1	3–4	3
Юбилейная 100	<i>Lr34/Sr57/Yr18</i>	3	3–4	3–4	3–4	3	3–4
Васса	<i>Lr26/Sr31/Yr9</i>	1–2	0–1–2	3–4	3	3–4	3–4
Алексеич		1–2	1–2	0–1	0–1	3	3
Таня	<i>Lr26/Sr31/Yr9</i> <i>Lr34/Sr57/Yr18</i>	1–2	1–2	1	0–1	3	3
Гурт	<i>Lr1 + Lr26/Sr31/Yr9</i>	1–2	0	0–1	0–2	3–4	3
Юка		0–1	1–2	2	1–2	3	3–4
Безостая 100	<i>Lr26/Sr31/Yr9</i> <i>Lr34/Sr57/Yr18</i>	0	0	2	2 ⁺ –3 ⁻	2–3	3
Вежа	<i>Lr10 + Lr26/Sr31/Yr9</i>	1–2	1–2	2–2 ⁺	3–4	3	3
Стан		1–2	1	0	0–1	3	3
Баграт	<i>Lr1 + Lr10 + Lr26/Sr31/Yr9</i>	0	0	0	0–1	2–3	3 ⁻

трав (см. табл. 1). Многие из них имели ржаную транслокацию 1BL.1RS, в которой локализованы гены *Lr26*, *Sr31* и *Yr9*. Несмотря на то что эффективность гена *Sr31* преодолена в ряде стран мира, вирулентность к нему в Северо-Кавказском регионе до настоящего времени не выявлена. При этом стремительное расширение ареала рас группы Ug99, вирулентных к *Sr31*, и ее обнаружение в близко расположенных с Северным Кавказом России территориях (например, Иране) предполагает проведение постоянного мониторинга популяций этого патогена и совершенствование генетической защиты (Nazari et al., 2009).

Число сортов озимой пшеницы, устойчивых в фазе проростков к бурой ржавчине, было ниже (58 %). К ним относились сорта Табор, Алексеич, Таня, Гурт, Юка, Стан, Баграт. Сорта Безостая 100 и Веха были умеренно устойчивы (балл 2–2⁺) к популяции патогена с мягкой пшеницы, но восприимчивы к популяции со злаковых трав. Ген *Lr26*, имеющийся у этих сортов, давно утратил свою эффективность в России. При этом эффективно его пирамидирование с другими генами (Сибикеев и др., 2011). К группе восприимчивых к бурой ржавчине относились сорта Гром, Юбилейная 100 и Васса.

Все изученные сорта показали разную степень восприимчивости к популяциям *P. striiformis* злаковых трав и с мягкой пшеницы (баллы 2–3, 3, 3–4). Это указывает на то, что гены *Yr9* и *Yr18*, широко представленные в сортах озимой пшеницы, возделываемых на Северном Кавказе, не эффективны в защите от желтой ржавчины в фазе всходов и кущения. Соответственно, они могут аккумулировать аэрогенную инфекцию со злаковых трав и при благоприятных погодных условиях способствовать ее проявлению и массовому развитию.

В настоящих исследованиях определено высокое разнообразие изученных изолятов видов *Puccinia*. Значительный интерес представлял анализ соотношения рас видов ржавчины на злаковых травах и посевах пшеницы. Расы *P. triticina*, обнаруженные на злаковых травах в нашей работе (МСТКН, МНТКН, ТСТТТ, ТНТТТ), регулярно отмечаются в анализе северокавказских и других российских популяций (Kolmer et al., 1915; Gulyaeva et al., 2020). Раса *P. striiformis* 11E247 доминировала в краснодарской и ленинградской популяциях патогена на мягкой пшенице в 2019 г., а раса 78E199 – в новосибирской (Гультяева, Шайдаюк, 2020). Расы *P. graminis* RKMFT, TKTTF, RKLTF, QKLTF, LHLPF являются близкими по вирулентности с идентифицируемыми на мягкой пшенице в образцах северокавказских и европейских популяций патогена (Синяк и др., 2013; Skolotneva et al., 2013).

Полученные нами результаты согласуются с представленными в литературе данными (Бударина, 1955; Борисенко, 1970; Лесовой, Терещенко, 1972; Краева, Матвиенко, 1974; Пайчадзе, Яременко, 1974; Берлянд-Кожевников и др., 1978; Попов, 1979; Novmøller et al., 2011; Cheng et al., 2016). При изучении урединообразцов *P. striiformis*, собранных на широком наборе диких злаков на Северном Кавказе в 1969–1972 гг., выделены расы (20, 31, 19, 9 и др.), также высоко специализированные к мягкой пшенице (Краева, Матвиенко, 1974). В анализе инокулюма желтой ржавчины, собранного в Алтайском крае в 1973 г. с пяти видов злаковых трав (пырей ползучий, регнерия

волокнистая, волоснец сибирский, ежа сборная, полевица белая), вирулентность к мягкой пшенице проявили изоляты с волоснеца сибирского, регнерии волокнистой и пырея ползучего (Попов, 1979). Среди образцов *P. striiformis*, полученных на обширной территории Грузии на диких злаках в 1968–1972 гг., обнаружено восемь рас, 20, 31, 40, 19, 42A2, 25, 13, 20A2, специализированных также к мягкой пшенице (Пайчадзе, Яременко, 1974).

Высокое генетическое разнообразие изолятов желтой ржавчины по вирулентности на дикорастущих злаках отмечено и в других странах (Novmøller et al., 2011; Cheng et al., 2016). Это обусловлено сбалансированным генетическим разнообразием хозяев и их паразитов в естественных биоценозах. Например, среди изолятов *P. striiformis*, выделенных в США из 11 видов дикорастущих злаков, идентифицированы изоляты, вирулентные к мягкой пшенице (f. sp. *tritici*), ячменю (f. sp. *hordei*), к обоим этим видам, а также ко ржи, тритикале и другим злакам.

Аналогичные результаты получены при изучении возбудителя стеблевой ржавчины в Центральном регионе России в 2000–2009 гг. (Skolotneva et al., 2013). Определено высокое сходство в составе популяций патогена на мягкой пшенице и диких злаках. Анализ многолетней динамики основных рас *P. graminis* показал, что фенотипы, доминирующие в отдельные годы на мягкой пшенице и других культурных злаках, в неблагоприятные сезоны не исчезают полностью, а сохраняются на дикорастущих злаках (Skolotneva et al., 2013).

По мнению В.М. Берлянд-Кожевникова с коллегами (1978), основная (материнская) популяция возбудителя бурой ржавчины в южном Дагестане – совокупность клонов патогена, паразитирующих в течение года на пырее и других многолетних злаках. Ранней весной, а иногда и с осени болезнь появляется и на различных однолетних злаках. Распространение популяции возбудителя болезни с многолетних злаков на посевах пшеницы начинается с развития клонов, которые могут паразитировать на соответствующих растениях-хозяевах. Это предположение подтверждено при изучении специализации возбудителя бурой ржавчины в условиях лесостепи Украины в 1970-х гг. (Лесовой, Терещенко, 1972). Собранные с трав изоляты гриба успешно заражали сорта мягкой пшеницы и были представлены пятью расами, среди которых доминировала раса 77. Частота ее в образцах ржавчины с *Elitrigia repens*, *Bromus tectorum*, *Festuca pratensis*, *Poa angustifolia* достигала 100 %. Другие расы встречались единично: раса 6 – в образцах гриба с *P. trivialis*, раса 4 – с *A. imbricatum*, расы 130 и 144 – с *B. mollis*. В популяции гриба на мягкой пшенице эти расы также были представлены в незначительном количестве. Н.А. Бударина (1955) показала, что в Крыму резерваторами бурой ржавчины могут служить *Ae. cylindrica*, костер кровельный (*B. tectotium*) и житняк узкоколосый (*Ag. cristatum* var. *imbricatum*). Инфекция бурой ржавчины с этих видов успешно заражала пшеницу. А.Н. Борисенко (1970) при изучении популяций *P. triticina* на дикорастущих злаках в Казахстане, Киргизии и Западной Сибири выявил на них 10 рас, и все эти расы отмечены на мягкой пшенице.

Большинство видов дикорастущих злаков – многолетние растения, соответственно, возбудители ржавчины

Таблица 2. Иммунологическая характеристика сортов озимой пшеницы в Краснодарском крае на искусственном инфекционном фоне (2018–2020 гг.)

Сорт	Пораженность, %, тип реакции, балл		
	<i>P. graminis</i>	<i>P. triticina</i>	<i>P. striiformis</i>
Гром	67 S	79 S	30 S
Табор	60 S	20 MS	40 MS
Юбилейная 100	80 S	30 MS	60 S
Васса	10 R	10 MR	30 MS
Алексеич	10 MR	1 R	1 R
Таня	30 MR	32 MS	30 MS
Гурт	40 MS	60 S	30 MS
Юка	30 MS	68 S	40 MS
Безостая 100	10 MR	1 R	10 R
Вежа	10 R	20 MS	20 MR
Баграт	10 MR	10 MR	20 MR
Стан	10 R	10 MR	40 MS

Примечание. Тип реакции: R – 1 балл, MR – 2 балла, MS – гетерогенный тип реакции X (2–3), S – 3–4 балла.

имеют возможность сохраняться в виде урединиопустул или урединиомицелия в течение длительного периода. В вегетационном сезоне 2019–2020 гг. в Краснодарском крае отмечено превышение температуры воздуха над среднемесячными значениями во все месяцы, за исключением апреля и мая. Вегетация озимой пшеницы практически не прекращалась как в осенний, так и в зимний периоды.

Несмотря на то что осенью 2019 г. в центральной и южно-предгорной зоне Краснодарского края, предгорной зоне Ставрополья на диких и сорных злаках сформировался мощный инфекционный потенциал возбудителей ржавчин с доминированием желтой ржавчины, в осенних и зимних обследованиях селекционных и производственных посевов озимой пшеницы симптомов желтой ржавчины не обнаружено. Обусловлено это недостаточно благоприятными для заражения пшеницы погодными условиями. Весной из-за острого лимита влагообеспеченности, низкой относительной влажности воздуха, ветреной погоды распространение и развитие фитопатогенов на злаковых травах приостановилось. При этом осенью 2020 г., как и в 2019 г., было отмечено появление ржавчины на диких и кормовых злаках, но значительно в меньшей степени развития, чем в 2019 г. Это подтверждает стабильность в сохранении урединиоинфекции видов ржавчины в естественных биоценозах и потенциальную возможность заражения зерновых культур при благоприятных погодных условиях.

Сорта озимой пшеницы, используемые в настоящих исследованиях для оценки специализации ржавчинных патогенов, лидируют по посевным площадям на Северном Кавказе. Например, сорт Таня в Краснодарском крае занимает 18 % от общей площади посевов, занятых озимой

пшеницей, и возделывается более 15 лет, Гром – 15 %, Алексеич – 9,5 %, Юка – 9 %. Эти сорта характеризуются разным уровнем устойчивости к ржавчинам при искусственном заражении в полевых условиях. Групповую устойчивость к трем видам ржавчины имеют сорта Алексеич и Безостая 100. Они допущены к использованию в производстве с 2017 г. Сорт Таня характеризуется высокой полевой устойчивостью к *Puccinia* spp. Сорта Баграт, Вежа, Васса, Стан, Табор, Юбилейная 100 отнесены к группе среднеустойчивых к бурой ржавчине. Степень их поражения варьирует от 10 до 40 % при умеренно устойчивом и умеренно восприимчивом типах реакции. Сорт Гром относится к группе восприимчивых к ржавчинам. К стеблевой ржавчине устойчивость проявляют сорта, в гаплотипе которых присутствует *Sr31*: Васса, Вежа, Баграт, Стан, степень их поражения не превышает 10 % при устойчивом и умеренно устойчивом типах реакции. У сортов Гурт и Юка со схожим генетическим материалом установлена степень поражения 30 и 40 % соответственно, с умеренно восприимчивым типом реакции. Восприимчивость к стеблевой ржавчине показывают Табор и Юбилейная 100. Умеренной устойчивостью к желтой ржавчине обладают сорта Вежа и Баграт. Средняя пораженность этих сортов к ржавчинам на инфекционном участке Национального центра зерна при искусственном заражении в 2018–2020 гг. представлена в табл. 2.

Не установлено существенных различий в поражении изученных сортов бурой и желтой ржавчинами на искусственном инфекционном фоне в 2018–2020 гг., по сравнению с представленной ранее характеристикой (Беспалова и др., 2020). Для большинства сортов результаты оценок в полевых условиях коррелировали с полученными данными в фазе проростков.

Иммунологические исследования сортов озимой мягкой пшеницы показывают, что при сравнительно одинаковых гаплотипах по генам устойчивости к видам ржавчины иммунная активность и ее продолжительность различаются даже при «антимонопольном» законе, эффективно работающем в агрофитоценозах на территории Северного Кавказа. Этот факт обусловлен продолжительностью вегетационного периода, периода «атаки», а также инфекционной нагрузкой в критические для заражения фазы онтогенеза растения-хозяина. Для стабильной защиты растений пшеницы от *Puccinia* spp. необходимо использовать гены, определяющие разные механизмы устойчивости.

Заключение

Проведенный анализ расового состава и вирулентности популяций возбудителей бурой, стеблевой и желтой ржавчины указывает на то, что в условиях Северного Кавказа России дикорастущие злаки являются резервуарами видов ржавчины и при благоприятных погодных условиях могут служить источником инфекции для посевов мягкой пшеницы и других культурных злаков. Высокое разнообразие расового состава патогена в естественных ценозах и широкая специализация изолятов *Puccinia* предполагают непрерывную эволюцию патогена за счет возникновения новых мутаций по вирулентности и соматической гибридизации, что следует учитывать в селекции на устойчивость зерновых культур к ржавчине.

Список литературы / References

- Аблова И.Б., Беспалова Л.А., Худокормова Ж.Н., Васильев А.В., Давоян Э.Р., Афанасенко О.С., Баранова О.А., Клевцова С.В., Бойко А.П. Достижения и перспективы селекции на устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. В: Матер. III Всерос. и междунар. конф. Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам. Санкт-Петербург, 23-26 октября 2012. СПб.: ВИЗР, 2012;2:190-195.
- [Ablova I.B., Bepalova L.A., Khudokormova Zh.N., Vasiliev A.V., Davoyan E.R., Afanassenko O.S., Baranova O.A., Klevtsova S.V., Boyko A.P. Achievements and prospects of breeding for resistance to stem rust at the Lukyankenko Krasnodar Research Institute of Agriculture. In: Third All-Russian and International Conference Current Issues of Plant Immunity to Pests. St. Petersburg, October 23-26, 2012. St. Petersburg, 2012;2:190-195. (in Russian)]
- Анпилогова Л.К., Алексеева Т.П., Левашова Г.И., Ваганова О.Ф. Эффективные гены устойчивости взрослых растений пшеницы к бурой, стеблевой, желтой ржавчине, мучнистой росе и их использование в селекции на Северном Кавказе. В: Соколова М.С., Угрюмова Е.П. (ред.). Производство экологически безопасной продукции растениеводства: региональные рекомендации. Пушкино, 1995;1:79-100.
- [Anpilogova L.K., Alekseeva T.P., Levashova G.I., Vaganova O.F. Effective genes for resistance of adult wheat plants to leaf, stem, and yellow rusts and powdery mildew and their use in breeding in the North Caucasus. In: Sokolova M.S., Ugryumova E.P. (Eds.). Production of Environmentally Friendly Crop Products: Regional Recommendations. Pushchino, 1995;1:79-100. (in Russian)]
- Берлянд-Кожевников В.М., Дмитриев А.П., Будашкина Е.Б., Шитова И.Т., Рейтер В.Г. Устойчивость пшеницы к бурой ржавчине (генетическое разнообразие популяций гриба и растения-хозяина). Новосибирск: Наука, 1978.
- [Berlyand-Kozhevnikov V.M., Dmitriev A.P., Budashkina E.B., Shitova I.T., Reiter V.G. Wheat Resistance to Leaf Rust (Genetic Diversity of Fungus Populations and Host Plant Populations). Novosibirsk: Nauka Publ., 1978. (in Russian)]
- Беспалова Л.А., Романенко А.А., Кудряшов И.Н., Аблова И.Б., Мудрова А.А., Котуненко В.Я., Боровик А.Н., Набоков Г.Д., Лысак Н.И., Грицай В.А., Филобок В.А., Пузырная О.Ю., Керимов В.Р., Мохова Л.М., Худокормова Ж.Н., Панченко В.В., Яновский А.С., Новиков А.В., Левченко Ю.Г., Калмыш А.П., Ефименко И.В., Зиновкина О.А., Гуенкова Е.А., Агаев Р.А., Агаева Е.В., Котляров Д.В., Цвиринок В.Г., Кузилова Н.М., Тархов А.С., Пономарев Д.А., Михалко А.В., Давоян Р.О., Колесникова О.Ф., Букреева Г.И., Мельникова Е.Е., Домченко М.И., Васильева А.М., Ефременкова В.И., Новикова С.В. Сорты пшеницы и тритикале: каталог. Краснодар: ЭДВИ, 2020.
- [Bepalova L.A., Romanenko A.A., Kudryashov I.N., Ablova I.B., Mudrova A.A., Kotunenkov V.Ya., Borovik A.N., Nabokov G.D., Lysak N.I., Gritsay V.A., Filobok V.A., Puzyrnaya O.Yu., Kerimov V.R., Mkhova L.M., Khudokormova Zh.N., Panchenko V.V., Yanovskiy A.S., Novikov A.V., Levchenko Yu.G., Kalmysh A.P., Efimenko I.V., Zinovkina O.A., Guenkova E.A., Agaev R.A., Agaeva E.V., Kotlyarov D.V., Tsvirinko V.G., Kuzilova N.M., Tarkhov A.S., Ponomarev D.A., Mikhalko A.V., Davoyan R.O., Kolesnikova O.F., Bukreeva G.I., Melnikova E.E., Domchenko M.I., Vasil'yeva A.M., Efremenkova V.I., Novikova S.V. Wheat and Triticale Varieties: Catalog. Krasnodar, 2020. (in Russian)]
- Борисенко А.Н. Расы бурой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* Er. в Киргизии, Казахстане, Западной Сибири и Южном Урале. *Микология и фитопатология*. 1970;31(5):55-59.
- [Borisenko A.N. Wheat leaf rust *Puccinia triticina* Er. races in Kyrgyzstan, Kazakhstan, West Siberia, and the Southern Urals. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1970; 31(5):55-59. (in Russian)]
- Бударина Н.А. Об источниках заражения пшеницы бурой ржавчиной в Крыму. *Труды Крымской государственной комплексной с.-х. опытной станции*. Симферополь: Крымиздат, 1955;1:193-196.
- [Budarina N.A. On the source of wheat infection with leaf rust in Crimea. *Trudy Krymskoy Gosudarstvennoy Kompleksnoy Selskhozayustvennoy Opytnoy Stantsii = Proceedings of the Crimean State Complex Agricultural Experimental Station*. Simferopol: Krymizdat Publ., 1955;1:193-196. (in Russian)]
- Гульятеева Е.И., Шайдаюк Е.Л. Вирулентность российских популяций возбудителя желтой ржавчины пшеницы. *Микология и фитопатология*. 2020;54(4):299-304. DOI 10.31857/S0026364820040042.
- [Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L. Virulence of Russian populations of the stripe rust causal agent. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(4):299-304. DOI 10.31857/S0026364820040042. (in Russian)]
- Краева Г.А., Матвиенко А.Н. Расовый состав *Puccinia striiformis* West. на злаках в условиях Северного Кавказа. *Микология и фитопатология*. 1974;8(6):521-523.
- [Krayeva G.A., Matviyenko A.N. The race composition of *Puccinia striiformis* West. on small grasses in the North Caucasus. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 1974;8(6): 521-523. (in Russian)]
- Лесовой М.П., Терещенко Б.А. Специализация гриба *Puccinia triticina* Erikss. и его рас на дикорастущих злаковых травах. В: Сб. докладов Европейской и Средиземноморской конференции о ржавчине хлебных злаков. Прага, 1972;171-174.
- [Lesovoy M.P., Tereshchenko B.A. Specialization of *Puccinia triticina* Erikss. and its races on wild grasses. In: Proceedings of the European and Mediterranean Cereal Rusts Conference. Praha, 1972; 171-174. (in Russian)]
- Михайлова Л.А., Гульятеева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования структуры популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы. Сборник методических рекомендаций по защите растений. СПб.: ВИЗР, 1998;105-126.
- [Mikhailova L.A., Gulyaeva E.I., Mironenko N.V. Methods for Studying the Structure of Populations of the Leaf Rust Causative Agent: Collection of Guidelines on Plant Protection. St. Petersburg: All-Russia Institute of Plant Protection, 1998;105-126. (in Russian)]
- Пайчадзе Л.В., Яременко З.И. Специализация возбудителя желтой ржавчины пшеницы к дикорастущим злакам. *Сообщения Академии наук Грузинской ССР*. 1974;76(2):469-471.
- [Paichadze L.V., Yaremenko Z.I. Specialization of the causal agent of yellow rust to wild grasses. *Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoy SSR = Bulletin of the Academy of Sciences of the Georgian SSR*. 1974;76(2):469-471. (in Russian)]
- Попов Д.Ф. Местные источники возбудителя желтой ржавчины пшеницы в Алтайском крае. *Сибирский вестник*. 1979;3:63-66.
- [Popov D.F. Local sources of the causative agent of wheat yellow rust in Altai. *Sibirskiy Vestnik = Siberian Herald*. 1979;3:63-66. (in Russian)]
- Санин С.С. Эпифитотии болезней зерновых культур: теория и практика. Избранные труды. М.: НИПКЦ Восход-А, 2012;161-166.
- [Sanin S.S. Epiphytotics of Cereal Crops Diseases: Theory and Practice. Moscow, 2012;161-166. (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Маркелова Т.С., Дружин А.Е., Веденева М.Л., Сингх Д. Оценка набора интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции НИИСХ Юго-Востока на устойчивость к расе стеблевой ржавчины Ug99+Sr24 (TTKST). *Докл. РАСХН*. 2011;2:3-5.
- [Sibikeev S.N., Markelova T.S., Druzhin A.E., Vedeneva M.L., Singh D. Evaluation of a set of introgressive spring bread wheat lines developed for resistance to stem rust race Ug99+Sr24 (TTKST) at the Southeast Agricultural Research Institute. *Russian Agricultural Sciences*. 2011;37(2):95-97.]

- Синяк Е.В., Волкова Г.В., Надыкта В.Д. Характеристика популяций *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* по вирулентности в Северо-Кавказском регионе России. Докл. РАСХН. 2013;6:27-30. [Sinyak E.V., Volkova G.V., Nadykta V.D. Characteristics of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* population by virulence in the North Caucasian region of Russia. *Russian Agricultural Sciences*. 2014;40(1): 32-34. DOI 10.3103/S1068367414010169.]
- Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргун А.И., Бойко Н.И., Шаманин В.П., Салина Е.А. Расовый состав новосибирской популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Микология и фитопатология*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092. [Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Morgunov A.I., Boiko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races composition of the Novosibirsk population of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092. (in Russian)]
- Cheng P., Chen X.M., See D.R. Grass hosts harbor more diverse isolates of *Puccinia striiformis* than cereal crops. *Phytopathology*. 2016;106(4):362-371. DOI 10.1094/PHYTO-07-15-0155-R.
- Gassner G., Straib W. Untersuchungen über die infektionsbedingungen von *Puccinia glumarum* und *Puccinia graminis*. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft*. 1928;16(4):609-629.
- Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Kosman E.G. Regional and temporal differentiation of virulence phenotypes of *Puccinia triticina* from common wheat in Russia during the period 2001–2018. *Plant Pathol*. 2020;69(5):860-871. DOI 10.1111/ppa.13174.
- Hovmöller M.S., Sørensen C.K., Walter S., Justesen A.F. Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2011;49(1):197-217. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095230.
- Kolmer J.A., Kabdulova M.G., Mustafina M.A., Zhemchuzhina N.S., Dubovoy V. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype. *Plant Pathol*. 2015;64(2):328-336. DOI 10.1111/ppa.12248.
- Long D.L., Kolmer J.A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*. 1989;79(5):525-529. DOI 10.1094/Phyto-79-525.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology*. 1926;16:89-120.
- McIntosh R.A., Wellings C., Park R.F. Wheat Rusts: an Atlas of Resistance Genes. London: Kluwer Academic Publ., 1995.
- Nazari K., Mafi M., Yahyaoui A., Singh R.P., Park R.F. Detection of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) race TTKSK (Ug99) in Iran. *Plant Dis*. 2009;93(3):317. DOI 10.1094/PDIS-93-3-0317B.
- Skolotneva E.S., Lekomtseva S.N., Kosman E. The wheat stem rust pathogen in the central region of the Russian Federation. *Plant Pathol*. 2013;62(5):1003-1010. DOI 10.1111/ppa.12019.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *U. S. Dept. Agr. E*. 1962; 617:53. <https://ufdc.ufl.edu/AA00024889/00001>.

ORCID ID

E.I. Gulyaeva orcid.org/0000-0001-7948-0307
L.A. Bespalova orcid.org/0000-0002-0245-7835
I.B. Ablova orcid.org/0000-0002-3454-9988
E.L. Shaydayuk orcid.org/0000-0003-3266-6272
Zh.N. Khudokormova orcid.org/0000-0001-8764-3946
D.R. Yakovleva orcid.org/0000-0003-0464-042X
J.A. Titova orcid.org/0000-0002-8188-1852

Благодарности. Исследования поддержаны Российским научным фондом, проект № 19-76-30005.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.02.2021. После доработки 22.03.2021. Принята к публикации 06.04.2021.

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

Изменчивость размеров ядерных геномов у представителей комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida)

С.В. Шеховцов^{1,2}✉, Я.Р. Ефремов¹, Т.В. Полубоярова¹, С.Е. Пельтек¹

¹ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

✉ shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Аннотация. Размеры ядерного генома у большинства эукариот определяются преимущественно содержанием мобильных элементов и некодирующих последовательностей и варьируют в широких пределах. Они могут значительно различаться как между крупными таксонами (причем размер генома не коррелирует со сложностью организма – так называемый С-парадокс), так и между близкородственными видами в пределах рода. В то же время размах внутривидовой изменчивости по этому параметру изучен значительно хуже. Комплекс *Eisenia nordenskioldi* объединяет несколько близкородственных видов дождевых червей, широко распространенных на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке России, заходящих своими ареалами и в сопредельные регионы. Для этого комплекса характерна значительная морфологическая, кариотипическая, экологическая и генетическая изменчивость. Целью настоящей работы было оценить размеры ядерного генома у нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* при помощи проточной цитофотометрии. Получены данные о размерах генома для 13 популяций, относящихся к семи филогенетическим линиям *E. nordenskioldi*. Наши результаты показали, что между линиями комплекса наблюдается заметный разброс по размерам, что является еще одним подтверждением их видовой самостоятельности. В целом по размеру генома выборки разделены на две группы. В одну вошли три популяции с небольшим (250–500 м. п. н.), во вторую – с крупным (2300–3500 м. п. н.) размером генома. Кроме того, разные популяции в пределах одной филогенетической линии также имели заметные различия в размере генома (15–25 %). Полученные данные были сопоставлены с филогенетическими деревьями, построенными на основе транскриптомных данных. Судя по топологии филогенетических деревьев, предковые популяции комплекса с большей вероятностью имели большой размер генома, а уменьшение или увеличение его размера происходило в разных линиях независимо и, возможно, было связано с изменением размеров тела и/или переходом к собственно почвенному образу жизни.

Ключевые слова: дождевые черви; *Eisenia nordenskioldi*; размер генома; проточная цитофотометрия; филогения.

Для цитирования: Шеховцов С.В., Ефремов Я.Р., Полубоярова Т.В., Пельтек С.Е. Изменчивость размеров ядерных геномов у представителей комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):647-651. DOI 10.18699/VJ21.073

Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskioldi* complex (Lumbricidae, Annelida)

S.V. Shekhovtsov^{1,2}✉, Ya.R. Efremov¹, T.V. Poluboyarova¹, S.E. Peltek¹

¹ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Biological Problems of the North of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

✉ shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Abstract. The size of the nuclear genome in eukaryotes is mostly determined by mobile elements and noncoding sequences and may vary within wide limits. It can differ significantly both among higher-order taxa and closely related species within a genus; genome size is known to be uncorrelated with organism complexity (the so-called C-paradox). Less is known about intraspecific variation of this parameter. Typically, genome size is stable within a species, and the known exceptions turn out to be cryptic species. The *Eisenia nordenskioldi* complex encompasses several closely related earthworm species. They are widely distributed in the Urals, Siberia, and the Russian Far East, as well as adjacent regions. This complex is characterized by significant morphological, chromosomal, ecological, and genetic variation. The aim of our study was to estimate the nuclear genome size in several genetic lineages of the *E. nordenskioldi* complex using flow cytometry. The genome size in different genetic lineages differed strongly, which supports the hypothesis that they are separate species. We found two groups of lineages, with small (250–500 Mbp) and large (2300–3500 Mbp) genomes. Moreover, different populations within one lineage also

demonstrated variation in genome size (15–25 %). We compared the obtained data to phylogenetic trees based on transcriptome data. Genome size in ancestral population was more likely to be big. It increased or decreased independently in different lineages, and these processes could be associated with changes in genome size and/or transition to endogeic lifestyle.

Key words: earthworms; *Eisenia nordenskioldi*; genome size; flow cytometry; phylogeny.

For citation: Shekhovtsov S.V., Efremov Ya.R., Poluboyarova T.V., Peltek S.E. Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskioldi* complex (Lumbricidae, Annelida). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):647–651. DOI 10.18699/VJ21.073

Введение

Количество ядерной ДНК у эукариот варьирует в широких пределах, причем размер генома в целом не коррелирует со сложностью строения организма (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001). Эта закономерность получила название С-парадокса (Thomas, 1971). В настоящее время закономерности изменчивости количества ядерной ДНК хорошо изучены как для таксонов высокого ранга, так и для групп близкородственных видов в разных классах животных (Gregory, 2005). В то же время картина изменчивости внутри видов исследована значительно хуже. Считается, что само поддержание общности генофонда вида подразумевает сохранение его размера и строения. От этого правила есть некоторые отступления: различия между самцами и самками из-за разницы в размере половых хромосом, полиплоидия, присутствие добавочных В-хромосом или крупных блоков гетерохроматина (Gregory, 2005; Viémont, 2008). Тем не менее в большинстве случаев внутривидовая изменчивость невысока и составляет не более нескольких процентов (Blommaert, 2020). Однако известны исключения, когда размеры геномов в разных популяциях одного вида различались более значительно (Alvarez-Fuster et al., 1991; Marescalchi et al., 1998; Neiman et al., 2011; Stelzer et al., 2011; Jeffery et al., 2016). Во многих случаях данная изменчивость может объясняться присутствием так называемых видов-двойников, которые ранее не были выявлены.

Комплекс *Eisenia nordenskioldi* (Eisen, 1874) – группа видов/филогенетических линий дождевых червей семейства Lumbricidae, широко распространенных в азиатской части России и заходящих также на Восточно-Европейскую равнину и в некоторые сопредельные страны (Перель, 1979; Жуков и др., 2007; Blakemore, 2013; Hong, Csuzdi, 2016; Шеховцов и др., 2017). В пределах этого комплекса отмечена огромная морфологическая (Малевиц, 1956; Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997), кариотипическая (Графодатский и др., 1982; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008), экологическая (Berman et al., 2019) и генетическая (Малинина, Перель, 1984; Shekhovtsov et al., 2013, 2016a, b, 2017, 2018a, b) изменчивость. Филогенетические работы, проведенные на геномных и транскриптомных данных, подтвердили глубокие различия между филогенетическими линиями комплекса (Shekhovtsov et al., 2019, 2020a, b) и показали, что его можно разделить по меньшей мере на два отдельных вида.

Значительные различия между линиями комплекса *E. nordenskioldi* на уровне ядерного и митохондриально-геномов указывают на очень давнюю их дивергенцию (Shekhovtsov et al., 2013, 2015). В связи с этим вполне вероятно, что за этот период могла накопиться и заметная

изменчивость в размерах ядерного генома, выражаемая не только как изменения плоидности. С целью исследовать этот вопрос мы изучили изменчивость размеров ядерного генома у нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi*, а также других видов рода *Eisenia* при помощи метода проточной цитофотометрии.

Материалы и методы

Живые особи дождевых червей были собраны в ходе полевого сезона 2020 г. в различных точках на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке (см. таблицу). Живых червей промывали и сажали по одному в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой, где их выдерживали 3–7 дней до опорожнения кишечника. Размер генома у дождевых червей оценивали по интенсивности свечения ядер единичных клеток, окрашенных пропидий йодидом в соответствии с методикой D.W. Galbraith с коллегами (1997). Ядра клеток выделяли из нескольких хвостовых сегментов живого червя (100–300 мкг) либо из целой особи, если ее размер был мал. Часть материала (приблизительно 50–100 мкг) фиксировали в спирте для выделения ДНК на колонках, как описано ниже.

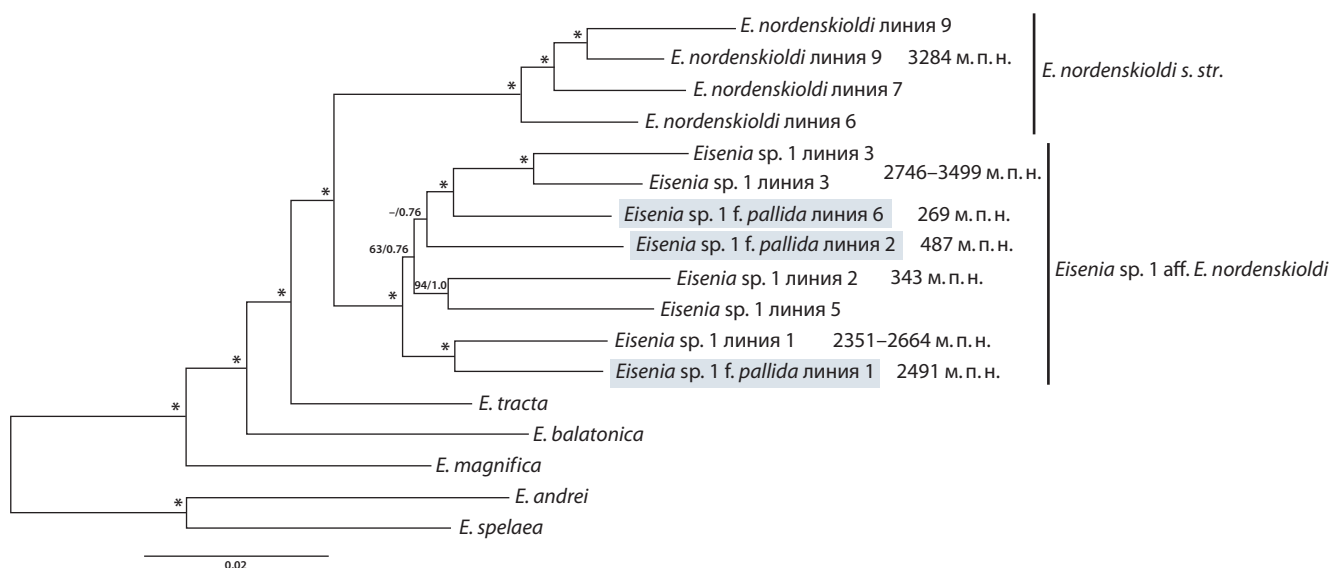
Живой материал помещали в чашку Петри с 500 мкл буфера Galbraith: 45 mM MgCl₂, 20 mM 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS), 30 mM цитрат Na, 0.1 % Triton X-100 (Galbraith et al., 1983). Материал измельчали лезвием бритвы. Жидкую фазу переносили в пробирку Eppendorf. Затем промывали материал 500 мкл буфера Galbraith и снова переносили жидкую фазу в ту же пробирку. Образец инкубировали 15–60 мин, затем пропускали через фильтр 40 мкм и наносили поверх 2 мл буфера Galbraith, содержащего 3 % глицерин. Проводили центрифугирование при 200 g в течение 10 мин; супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера Galbraith и добавляли 10 мкл РНКазы (1 е. а./мкл). Образец инкубировали 30 мин, добавляли 100 мкл раствора пропидий йодида (1 мг/мл) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria III (BD Biosciences, США). В качестве референсных геномов использовали клетки крови курицы (2C = 1250 м. п. н.) (Kasai et al., 2012) и селезенки мыши (2C = 3280 м. п. н.) (Redi et al., 2005).

Для определения генетической принадлежности особей проводили секвенирование фрагмента гена цитохром с-оксидазы I в соответствии с методикой, описанной в (Shekhovtsov et al., 2018c). Филогенетические деревья, построенные методами максимального правдоподобия и байесовского анализа на основе филогеномных данных, были взяты из работы S.V. Shekhovtsov с коллегами (2020b).

Исследованные образцы

Вид/линия	Точка сбора образцов	Геном, м.п.н.	С.о.	Повт.
<i>E. nordenskioldi</i> линия 9	Магаданская область, г. Магадан	3284	168	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия 1	Новосибирская область, с. Китерня	2351	124	4
	Свердловская область, с. Хомутовка	2664	128	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия 2	Республика Алтай, база Бирюзовая Катунь	343	30	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия 3	Кемеровская область, с. Кузедеево	2746	126	3
	Кемеровская область, с. Золотой Китат	3499	227	4
	Алтайский край, с. Макарьевка	2780	9	4
	Новосибирская область, с. Китерня	3120	49	3
	Хабаровский край, с. Тигровое	3215	43	3
<i>Eisenia</i> sp. 1 <i>f. pallida</i> линия 1	Магаданская область, г. Магадан	2494	18	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 <i>f. pallida</i> линия 2	Хабаровский край, с. Лесопильное	487	3	3
<i>Eisenia</i> sp. 1 <i>f. pallida</i> линия 6	Алтайский край, с. Макарьевка	269	28	3

Примечание. С. о. – стандартная ошибка; повт. – число повторностей.



Филогенетическое дерево, построенное для комплекса *E. nordenskioldi* на основе транскриптомных данных, из (Shekhovtsov et al., 2020b).

Серыми прямоугольниками показана непигментированная форма *pallida*. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку метода максимальной правдоподобия/байесовскую апостериорную вероятность, звездочки – поддержку 100/1.0.

Результаты и обсуждение

В нашей работе получена информация о размерах ядерного генома для нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* (см. таблицу и рисунок). Данные свидетельствуют о том, что в пределах комплекса наблюдается значительный разброс по размерам генома. Можно выделить две группы размеров: небольшие (250–500 м.п.н.) и крупные (2350–3500 м.п.н.) геномы. Небольшие геномы выявлены для двух непигментированных линий, *Eisenia* sp. 1 aff. *E. nordenskioldi*, и для пигментированной линии 2 того же вида. Крупные геномы (2350–3500 м.п.н.) были характерны для всех остальных филогенетических линий.

Результаты показали, что разные линии комплекса *E. nordenskioldi* имеют значительно различающиеся размеры генома. Это может объясняться тем, что они – действительно отдельные виды, о чем свидетельствуют генетические данные (Shekhovtsov et al., 2020 a, b), или же влиянием полиплоидии. Известно, что для *E. nordenskioldi* характерно существование нескольких рас различной плоидности, $2n$, $4n$, $6n$, $7n$, $8n$, с количеством хромосом от 36 до 142–152 соответственно (Viktorov, 1997). Диплоидный набор хромосом при этом присущ представителям непигментированной формы *pallida* (Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014). Исходя из этого можно было бы предполагать, что непигментированные формы

E. nordenskioldi являются предковыми. Однако транскриптомные данные продемонстрировали (см. рисунок) (Shekhovtsov et al., 2020b), что такие формы вовсе не находятся в основании филогенетического дерева комплекса и его предковые формы, скорее всего, были пигментированными. Кроме того, одна из линий *pallida* имела крупный геном, а одна из пигментированных линий – небольшой геном. Таким образом, нельзя утверждать, что все непигментированные популяции диплоидны, а пигментированные – исключительно полиплоидны. Это подтверждается и филогенетическими данными, согласно которым линии *pallida* возникали несколько раз независимо.

Те же рассуждения можно применить и к размерам генома: более вероятно, что предки комплекса имели крупный геном. Этот геном, скорее всего, был диплоидным, так как большинство популяций вида способны к амфимиктическому размножению. Для вида *Eisenia* sp. 1 также наиболее вероятным будет предположение, что исходным состоянием был крупный геном, а в дальнейшем отдельные ветви (линии) претерпели уменьшение размеров генома.

Для двух филогенетических линий (линии 1 и 3 *Eisenia* sp. 1) было взято несколько популяций из разных географических точек. Проведенный анализ показал, что существует и значительная изменчивость размеров генома внутри линий, приблизительно 13 и 27 % соответственно. На рисунке продемонстрировано, что генетические расстояния между двумя популяциями линии 3 достаточно глубоки. Известно (Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008), что у октаплоидных популяций *E. nordenskioldi* число хромосом может варьировать в относительно широких пределах. В этом случае мы можем предполагать сходный механизм.

У многих животных повышение плоидности приводит к увеличению размера тела (Otto, 2007). Для дождевых червей, однако, эта закономерность может не работать: Т.В. Малинина и Т.С. Перель (1984) не обнаружили различий в размере тела между расами *E. nordenskioldi* разной плоидности. В нашей работе мы не имели возможности измерить размеры тела, так как особи были полностью или большей частью измельчены в живом состоянии, однако грубые оценки показывают, что филогенетические линии с небольшим геномом отличались небольшим или средним размером тела (4–7 см в длину). В то же время линии с большими геномами могли быть как крупными (*Eisenia* sp. 1 линии 3 – до более 10 см в длину), так и среднего размера (5–10 см у остальных линий). Таким образом, хотя мы и не наблюдали четкой закономерности, можно предположить, что размеры ядерного генома в некоторой степени определяют размеры тела.

Заключение

В настоящей работе мы показали, что размеры ядерного генома у различных филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* варьируют в широких пределах, что подтверждает глубину различий между ними, выявленную при помощи молекулярно-генетических методов. Кроме того, существует и изменчивость размеров генома внутри линий. В ходе эволюции комплекса, по всей видимости, происходило как увеличение, так и уменьшение размеров генома.

Список литературы / References

- Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви России: кадастр и определитель. М.: Наука, 1997.
[Vsevolodova-Perel T.S. The Earthworms of the Russian Fauna: Cadaster and Key. Moscow: Nauka Publ., 1997. (in Russian)]
- Всеволодова-Перель Т.С., Булатова Н.Ш. Полиплоидные расы дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta), распространенные в пределах Восточно-Европейской равнины и в Сибири. *Изв. РАН. Сер. биол.* 2008;4:448-452. DOI 10.1134/S1062359008040092.
[Vsevolodova-Perel T.S., Bulatova N.Sh. Polyploid races of earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta) in the East European Plain and Siberia. *Biology Bulletin*. 2008;35(4):385-388. DOI 10.1134/S1062359008040092.]
- Всеволодова-Перель Т.С., Лейрих А.Н. Распространение и экология дождевого червя *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae), массового на юге Сибири и Дальнего Востока. *Зоол. журн.* 2014;93:45-52. DOI 10.7868/S0044513414010206.
[Vsevolodova-Perel T.S., Leirikh A.N. Distribution and ecology of the earthworm *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) dominant in southern Siberia and the Russian Far Eastern. *Entomol. Rev.* 2014;94(4):479-485. DOI 10.1134/S0013873814040034.]
- Графодатский А.С., Перель Т.С., Раджабли С.И. Хромосомные наборы двух форм *Eisenia nordenskioldi* (Eisen.) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Докл. АН СССР*. 1982;262:1514-1516.
[Grafodatsky A.S., Perel T.S., Radzhabli S.I. Chromosome sets of two forms of *Eisenia nordenskioldi* (Eisen.) (Oligochaeta: Lumbricidae). *Doklady Akademii Nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR*. 1982;262:1514-1516. (in Russian)]
- Жуков О.В., Пахомов О.Е., Кунах О.М. Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Дощові черв'яки (Lumbricidae). Дніпропетровськ: Вид-во Дніпропетр. Нац. ун-ту, 2007.
[Zhukov A.V., Pakhomov O.Ye., Kunach O.N. Biological Diversity of Ukraine. The Dnipropetrovsk region. Earthworms (Lumbricidae). Dnipropetrovsk, 2007. (in Ukrainian)]
- Малевиц И.И. К познанию дождевых червей Дальнего Востока. *Ученые записки МГПИ им. В.П. Потемкина*. 1956;61:439-449.
[Malevich I.I. On the study of earthworms in the Far East. *Uchenye Zapiski MGPI im. V.P. Potemkina = Transactions of the V.P. Potemkin Moscow City Pedagogical Institute*. 1956;61:439-449. (in Russian)]
- Малинина Т.В., Перель Т.С. Характеристика хромосомных рас *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) с использованием биохимических маркеров. *Докл. АН СССР*. 1984;279:1265-1269.
[Malinina T.V., Perel T.S. Characterization of *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) chromosome races using allozyme markers. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR*. 1984;279:1265-1269. (in Russian)]
- Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. М.: Наука, 1979.
[Perel T.S. The Range and Regularities in the Distribution of Earthworms of the USSR Fauna. Moscow: Nauka Publ., 1979. (in Russian)]
- Шеховцов С.В., Берман Д.И., Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Генетическое разнообразие дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(5):588-595. DOI 10.18699/VJ17.24-o.
[Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(5):588-595. DOI 10.18699/VJ17.24-o. (in Russian)]
- Alvarez-Fuster A., Juan C., Petitpierre E. Genome size in *Tribolium* flour-beetles: inter- and intraspecific variation. *Genet. Res.* 1991;58:1-5. DOI 10.1017/S0016672300029542.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Shekhovtsov S.V. Cold resistance and the distribution of genetic lineages of

- the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Biol. Bull.* 2019;46:430-437. DOI 10.1134/S1062359019050042.
- Biémont C. Genome size evolution: Within-species variation in genome size. *Heredity.* 2008;101:297-298. DOI 10.1038/hdy.2008.80.
- Blakemore R.J. Earthworms newly from Mongolia (Oligochaeta, Lumbricidae, *Eisenia*). *ZooKeys.* 2013;285:1-21. DOI 10.3897/zookeys.285.4502.
- Blommaert J. Genome size evolution: towards new model systems for old questions. *Proc. Royal Soc. B.* 2020;287:20201441. DOI 10.1098/rspb.2020.1441.
- Cavalier-Smith T. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.* 1978;34:247-278.
- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science.* 1983;220:1049-1051.
- Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Curr. Protoc. Cytom.* 1997;2:6-7.
- Gregory T.R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol. Rev.* 2001;76:65-101. DOI 10.1111/j.1469-185X.2000.tb00059.x.
- Gregory T.R. Genome size evolution in animals. In: *The Evolution of the Genome.* San Diego: Elsevier, 2005;3-87. DOI 10.1016/B978-012301463-4/50003-6.
- Hong Y., Csuzdi C. New data to the earthworm fauna of the Korean peninsula with redescription of *Eisenia koreana* (Zicsi) and remarks on the *Eisenia nordenskioldi* species group (Oligochaeta, Lumbricidae). *Zool. Stud.* 2016;55:1-15. DOI 10.6620/ZS.2016.55-12.
- Jeffery N.W., Hultgren K., Chak S.T.C., Gregory T.R., Rubenstein D.R. Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome.* 2016;59:393-402. DOI 10.1139/gen-2015-0206.
- Kasai F., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken. *Biol. Lett.* 2012;8:631-635. DOI 10.1098/rsbl.2012.0141.
- Marescalchi O., Scali V., Zuccotti M. Flow-cytometric analyses of intraspecific genome size variations in *Bacillus atticus* (Insecta, Phasmatodea). *Genome.* 1998;41:629-635. DOI 10.1139/g98-064.
- Neiman M., Paczesniak D., Soper D.M., Baldwin A.T., Hehman G. Wide variation in ploidy level and genome size in a New Zealand freshwater snail with coexisting sexual and asexual lineages. *Evolution.* 2011;65:3202-3216. DOI 10.1111/j.1558-5646.2011.01360.x.
- Otto S.P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell.* 2007;131:452-462. DOI 10.1016/j.cell.2007.10.022.
- Redi C.A., Zacharias H., Merani S., Oliveira-Miranda M., Aguilera M., Zuccotti M., Garagna S., Capanna E. Genome sizes in afrotheria, xenarthra, euarchontoglires, and laurasiatheria. *J. Hered.* 2005;96:485-493. DOI 10.1093/jhered/esi080.
- Shekhovtsov S.V., Bazarova N.E., Berman D.I., Bulakhova N.A., Golovanova E.V., Konyaev S.V., Krugova T.M., Lyubchanskii I.I., Peltek S.E. DNA barcoding: How many earthworm species are there in the south of West Siberia? *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7:57-62. DOI 10.1134/S2079059717010130.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bazarova N.E., Bulakhova N.A., Porco D., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Eur. J. Soil Biol.* 2016a;75:151-156. DOI 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Vinokurov N.N., Peltek S.E. Phylogeography of *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) from the north of Asia. *Polar Biol.* 2018a;41:237-247. DOI 10.1007/s00300-017-2184-2.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Makarova O.L., Peltek S.E. Phylogeography of earthworms from high latitudes of Eurasia. *Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae.* 2018b;64:369-382. DOI 10.17109/AZH.64.4.369.2018.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Peltek S.E. Phylogeography of the earthworm *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) in northeastern Eurasia. *Dokl. Biol. Sci.* 2015;461:85-88. DOI 10.1134/S0012496615020039.
- Shekhovtsov S.V., Ershov N.I., Vasiliev G.V., Peltek S.E. Transcriptomic analysis confirms differences among nuclear genomes of cryptic earthworm lineages living in sympatry. *BMC Evol. Biol.* 2019;19:50. DOI 10.1186/s12862-019-1370-y.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Ershov N.I., Poluboyarova T.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Szederjesi T., Peltek S.E. Phylogeny of the *Eisenia nordenskioldi* complex based on mitochondrial genomes. *Eur. J. Soil Biol.* 2020a;96:103137. DOI 10.1016/j.ejsobi.2019.103137.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiöld's earthworm, *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2013;58:13-18. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.05.004.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Mitochondrial DNA variation in *Eisenia n. nordenskioldi* (Lumbricidae) in Europe and Southern Urals. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.* 2016b;27:4643-4645. DOI 10.3109/19401736.2015.1101594.
- Shekhovtsov S.V., Shipova A.A., Poluboyarova T.V., Vasiliev G.V., Golovanova E.V., Geraskina A.P., Bulakhova N.A., Szederjesi T., Peltek S.E. Species delimitation of the *Eisenia nordenskioldi* complex (Oligochaeta, Lumbricidae) using transcriptomic data. *Front. Genet.* 2020b;11:1508. DOI 10.3389/fgene.2020.598196.
- Shekhovtsov S.V., Sundukov Y.N., Blakemore R.J., Gongalsky K.B., Peltek S.E. Identifying earthworms (Oligochaeta, Megadrili) of the southern Kuril islands using DNA barcodes. *Anim. Biodivers. Conserv.* 2018c;41:9-17. DOI 10.32800/abc.2018.41.0009.
- Stelzer C.-P., Riss S., Stadler P. Genome size evolution at the speciation level: The cryptic species complex *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *BMC Evol. Biol.* 2011;11:90. DOI 10.1186/1471-2148-11-90.
- Thomas C.A.J. The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 1971;5:237-256.
- Viktorov A.G. Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae. *Soil. Biol. Biochem.* 1997;29:217-221. DOI 10.1016/S0038-0717(96)00086-7.

ORCID ID

S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
Ya.R. Efremov orcid.org/0000-0002-0649-7543
T.V. Poluboyarova orcid.org/0000-0002-5652-0553
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00661_а, бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0010 и Курчатовским геномным центром ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662). Секвенирование ампликонов ДНК проведено в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск). Авторы выражают глубокую благодарность Д.И. Берману, Н.А. Булаховой и Е.В. Головановой за предоставленные образцы дождевых червей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.02.2021. После доработки 30.03.2021. Принята к публикации 31.03.2021.

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

Необычная врожденная полидактилия мини-свиней селекционной группы ИЦиГ СО РАН

С.В. Никитин¹, С.П. Князев², В.А. Трифонов³, А.А. Проскурякова³, Ю.Д. Шмидт², К.С. Шатохин²✉, В.И. Запорожец¹, Д.С. Башур¹, Е.В. Коршунова¹, В.И. Ермолаев^{1,2}

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

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ true_genetic@mail.ru

Аннотация. Приведено описание нового для мини-свиней селекционной группы Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН феномена – полидактилии (многопалости). Она отличается от описанных ранее у *Sus scrofa* проявлений этой аномалии тем, что дополнительные пальцы располагаются либо на латеральной стороне конечностей, либо на латеральной, и на медиальной. Аномалия впервые была обнаружена в 2017 г. у взрослых животных, предназначенных для выбраковки по причине неправильной постановки ног («медвежья лапа»). Таким образом, полидактилия мини-свиней ИЦиГ имеет явно выраженный негативный селекционный эффект. Проведено визуальное обследование поголовья и составлено описание этой аномалии. Полидактилия мини-свиней ИЦиГ является изолированной и не входит в состав каких-либо синдромов. Особи с полидактилией могут иметь дополнительные пальцы или на грудных, или на грудных и тазовых конечностях. На грудных конечностях могут присутствовать либо по одному латеральному дополнительному пальцу, либо латеральный палец и медиально расположенное зачаточное копытце. На тазовых конечностях встречаются только латеральные дополнительные пальцы. Анатомо-морфологические исследования показали, что латеральный дополнительный палец – анатомически достаточно полноценная структура, тогда как медиальный зачаток представлен только копытцем без остальных, свойственных нормальным пальцам, структур. Цитологическое исследование не выявило кариотипических особенностей, за исключением ранее описанной для мини-свиней ИЦиГ робертсоновской транслокации Rb 16;17. Впрочем, результаты исследований не указывают на сцепление полидактилии и робертсоновской транслокации. Генеалогический анализ и результаты скрещиваний позволяют принять в качестве рабочей гипотезы предположение о рецессивном наследовании признака. В целом исследование показало, что данная форма полидактилии анатомически и морфологически уникальна и не типична для вида *S. scrofa*, у которого ранее были описаны только формы полидактилии с медиальными дополнительными пальцами, как правило, наследуемые по доминантному типу с неполной пенетрантностью. В нашем случае результаты анализирующих скрещиваний указывают на рецессивное и, возможно, немонотенное наследование признака с варьирующей экспрессией и неполной пенетрантностью, из-за которой слабо выраженные мутантные фенотипы визуально не фиксируются.

Ключевые слова: полидактилия; многопалость; латеральное и медиальное положение; мини-свиньи ИЦиГ СО РАН; рецессивное наследование; неполная пенетрантность.

Для цитирования: Никитин С.В., Князев С.П., Трифонов В.А., Проскурякова А.А., Шмидт Ю.Д., Шатохин К.С., Запорожец В.И., Башур Д.С., Коршунова Е.В., Ермолаев В.И. Необычная врожденная полидактилия мини-свиней селекционной группы ИЦиГ СО РАН. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):652-660. DOI 10.18699/VJ21.074

Unusual congenital polydactyly in mini-pigs from the breeding group of the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia)

S.V. Nikitin¹, S.P. Knyazev², V.A. Trifonov³, A.A. Proskuryakova³, Yu.D. Shmidt², K.S. Shatokhin²✉, V.I. Zaporozhets¹, D.S. Bashur¹, E.V. Korshunova¹, V.I. Ermolaev^{1,2}

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

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ true_genetic@mail.ru

Abstract. The article describes a new phenomenon in the breeding group of mini-pigs at the Institute of Cytology and Genetics (ICG, Novosibirsk): polydactyly (extra digits), which is unusual because the additional digits are situated at the lateral surface of legs or at the lateral and medial ones. This anomaly was first found here in 2017 in adult animals intended for culling due to incorrect positioning of the legs caused by flexor tendon laxity and resulting in weight-bearing on the palmar surface of the proximal phalanges ("bear's paw"). Therefore, the polydactyly of mini-pigs has a pronounced negative

selection effect. A visual survey of the livestock was conducted, and a description of the detected anomaly was compiled. The polydactyly in mini-pigs is a stand-alone trait and is not part of any syndromes. Individuals with polydactyly may have extra digits either on pectoral or on pectoral and pelvic limbs. On thoracic limbs, there may be either one lateral digit or a lateral digit and a medially located rudimentary hooflet. On pelvic limbs, only lateral extra digits can occur. Anatomical and morphological analyses showed that the lateral extra digit is an anatomically complete ("mature") structure, whereas the medial rudimentary digit consists of only a hooflet without other structures characteristic of normal digits. Cytological examination revealed no specific karyotypic features, except for Robertsonian translocation Rb 16;17 previously reported for the mini-pigs of the same livestock. Cytological findings indicated that the polydactyly and Robertsonian translocation are not linked genetically. Genealogical analysis and results of crosses are consistent with a working hypothesis of recessive inheritance of the trait. Overall, the study shows that this type of polydactyly is anatomically and morphologically unique and not typical of *Sus scrofa*. In this species, only polydactyly types with medial accessory toes have been described and are usually inherited as a dominant trait with incomplete penetrance. In our case, the results of test crosses indicate recessive inheritance of the trait with varying expression and incomplete penetrance, because of which poorly expressed phenotypes are not visually detectable.

Key words: polydactyly; multi-fingeredness; lateral and medial position; mini-pigs of ICG SB RAS; recessive inheritance; incomplete penetrance.

For citation: Nikitin S.V., Knyazev S.P., Trifonov V.A., Proskuryakova A.A., Shmidt Yu.D., Shatokhin K.S., Zaporozhets V.I., Bashur D.S., Korshunova E.V., Ermolaev V.I. Unusual congenital polydactyly in mini-pigs from the breeding group of the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):652-660. DOI 10.18699/VJ21.074

Введение

Селекционная группа мини-свиней Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН малочисленна. Соответственно, в ней присутствует систематический инбридинг на родоначальников, результатом которого должно быть «выщепление» гомозигот по рецессивным мутациям (Никитин и др., 2014). Во второй половине 2017 г. у мини-свиней ИЦиГ было зарегистрировано новое для них явление – полидактилия (многопалость). Эта аномалия давно привлекала внимание исследователей, и уже в XVII в. был установлен ее наследственный характер (Lange, Muller, 2017). Полидактилия может иметь как атавистический, так и тератологический характер. В первом случае – это полное или частичное восстановление пальца (пальцев), утраченного видом в процессе эволюции; во втором – результат нарушений нормального онтогенеза (Визнер, Виллер, 1979). Дополнительные пальцы могут быть на одной или нескольких конечностях, а их отделение от остальных пальцев может быть полным или неполным (Lange, Muller, 2017). Показано, что нет конкретного гена, определяющего развитие нормального набора пальцев или возникновение дополнительных, а имеет место действие плейотропных и полигенных механизмов, а также различных мутаций в генных сетях, регулирующих формирование конечностей (Lange, Muller, 2017). Полидактилия может быть единственным проявлением аномального развития (изолированная полидактилия) или одним из элементов какого-либо синдрома (синдромная полидактилия) (Gorbach et al., 2010).

Выделяют следующие изолированные формы полидактилии:

1. Преаксиальная. Дополнительные пальцы находятся перед медиальной осью конечности, т. е. перед первым (большим) пальцем (медиальное положение дополнительного пальца).
2. Постаксиальная. Дополнительные пальцы находятся после медиальной оси, т. е. после пятого пальца (мизинца) (латеральное положение дополнительного пальца).
3. Центральная. Наиболее редкая, не пре- и не постаксиальная.

У свиней вида *Sus scrofa* полидактилия впервые была описана более ста лет назад (Gorbach et al., 2010). В настоящее время у этого вида, в том числе и у дикого кабана, известно несколько форм преаксиальной полидактилии с неполным доминированием (Ptak, 1963; Malynicz, 1982; Gorbach et al., 2010). Относительно недавно описана преаксиальная полидактилия с возможным рецессивным типом наследования (Gorbach et al., 2010). Было предположено, что эту форму могут контролировать гены *LMBR1*, *EN2*, *HOXA10–13*, *GLI3*, *WNT2*, *WNT16*, *SHH*, локализованные на 18-й хромосоме свиньи (Gorbach et al., 2010). Интересно отметить, что на Кубе и соседних островах распространены одичавшие многопалые свиньи, у которых второй палец разделен на два или три (пяти- или шестипалость). Этой аномалии сопутствует так называемая медвежья лапа, когда животное опирается не на два (как должно быть в норме), а на четыре пальца (Иванчук, 2011). Кроме того, многопалость встречалась и у кубанских плавниевых свиней (Кудрявцев, 1948).

Цель настоящей публикации состоит в описании полидактилии, обнаруженной в 2017 г. в селекционной группе мини-свиней ИЦиГ.

Материал и методы

Использованы данные о 82 особях из селекционной группы мини-свиней ИЦиГ:

- 1) 9 взрослых особей и 14 новорожденных поросят для описания внешних проявлений полидактилии;
- 2) 2 особи – половозрелая свиноматка и пятидневный поросенок – для анатомо-морфологических исследований;
- 3) 36 взрослых особей и 44 новорожденных поросенка из семи пометов с проявлением полидактилии – для построения генеалогической схемы.

При визуальном обследовании поросят с полидактилией ее наличие определялось по числу копыт на передних и задних конечностях особей. Анатомические исследования проводили по общепринятым методикам (Глаголев, Ипполитова, 1977; Лебедев, Зеленевский, 1995). При построении генеалогической схемы исходили из пред-

положения о существовании единого источника полидактилии – общего предка: для каждой пары носителей полидактилии, двигаясь по родословным в направлении ранних генераций, находили ближайшего общего предка. Статистическую обработку результатов скрещиваний выполнили общепринятым методом (Лакин, 1990).

Для цитогенетического анализа у четырех особей осуществлены биопсии ткани ушных раковин размером 8–10 мм. Из материала биопсии получили клеточные культуры фибробластов по методикам А.С. Графодатского с коллегами (1988) с модификациями (Beklemisheva et al., 2016). Из активно делящейся культуры фибробластов приготовили суспензии метафазных клеток методом, опубликованным ранее (Stanyon, Galleni, 1991). GTG-дифференциальную окраску провели по стандартной методике (Seabright, 1971).

Результаты

Визуальный анализ

В норме свиньи вида *Sus scrofa* имеют четыре пальца, 2, 3, 4 и 5-й, и, соответственно, четыре копыта, два из которых (3-е и 4-е) опорные (Соколов, 1979). При полидактилии пальцев (копыт) на ноге свиньи должно быть более четырех. У мини-свиней ИЦиГ полидактилия имеет следующие фенотипические характеристики (рис. 1):

1. Не сопровождается какими-либо другими аномалиями, т. е. является изолированной.
2. Число дополнительных копыт на отдельной конечности 1 или 2. Соответственно, общее число копыт на одной конечности 5 или 6.
3. Дополнительные копыта присутствуют либо на двух грудных конечностях, либо на всех четырех.
4. Симметрична на паре конечностей. Число дополнительных копыт на обеих грудных конечностях либо 1 и 1, либо 2 и 2; на тазовых – либо 1 и 1, либо отсутствуют.
5. При двух дополнительных копытах на передних конечностях более крупное когтеобразное расположено на наружной – латеральной стороне, значительно меньшее копыто – на внутренней (медиальной).
6. В случае двух дополнительных копыт на обеих грудных конечностях, на тазовых присутствует по одному латеральному дополнительному копыту. При одном дополнительном копыте на грудных конечностях до-

полнительные копыта на тазовых конечностях отсутствуют.

7. Сопровождается «медвежьей лапой», когда животное, имеющее дополнительный палец, опирается не на два центральных пальца (3-й и 4-й), как в норме у свиней, а на все четыре (2, 3, 4, 5-й). При дополнительных пальцах на тазовых конечностях их неправильная постановка приводит к разрастанию копытного рога и хромоте. Для полидактилии мини-свиней ИЦиГ характерна вариабельность одновозрастных особей в размерах дополнительных латеральных пальцев, длина которых визуальнo различается в 2–3 раза. В целом вариация признака представлена тремя дискретными фенотипами (см. рис. 1):

1. Дополнительные латеральные копыта на грудных конечностях, длина которых у новорожденных поросят составляет около 1 мм.
2. Дополнительные латеральные когтеобразные копыта на грудных конечностях, длина которых у новорожденных может достигать 3 и более мм.
3. Дополнительные латеральные копыта 3 и более мм на грудных конечностях и дополнительные медиальные копыта у новорожденных в виде рогового бугорка около 1 мм высотой. При этом имеются дополнительные латеральные копыта на тазовых конечностях.

Полидактилия мини-свиней ИЦиГ не типична для вида *Sus scrofa*, у которого описаны преаксиальные формы (Malynicz, 1982; Gorbach et al., 2010). Мини-свиньи ИЦиГ с первыми двумя фенотипами полидактилии имеют латеральные добавочные копыта, что может рассматриваться как изолированная постаксиальная полидактилия. Для третьего фенотипа характерно одновременное присутствие латеральных и зачаточных медиальных добавочных копыт, т. е. полидактилия с двумя добавочными пальцами является и пре-, и постаксиальной.

Анатомо-морфологический анализ

При осмотре анатомического материала, взятого от половозрастной свиноматки с полидактилией третьего фенотипического варианта, в дистальном отделе каждой из четырех конечностей четко визуализируются дополнительные пальцы. Они хорошо развиты, имеют выраженный роговой слой и анатомическую конфигурацию, соответствующую обычным развитым у свиней пальцам, но с элементами дисфункциональной атрофии: на втором



Рис. 1. Иллюстрация фенотипов полидактилии у поросят мини-свиней ИЦиГ СО РАН.

Красными кружками обведены дополнительные латеральные пальцы, синими – медиальные. Фенотипы: а – первый; б – второй; в – третий (передние конечности).



Рис. 2. Конечности взрослой свиноматки 3-го фенотипа полидактилии с дополнительными пальцами.

Красным цветом выделены латеральные пальцы; синим (а–в) – медиальные пальцы.

а – фотография конечностей: FL – передняя левая, FR – передняя правая, HL – задняя левая, HR – задняя правая; б–г – рентгенограммы конечностей: передних (левой слева и правой справа соответственно) в дорсовентральной проекции (б), передних (в) и задних (г) в латерально-медиальной проекции.

пальце левой задней ноги хорошо видно разросшееся деформированное копыто, остальные копыта с дополнительными пальцами демонстрируют патологическую форму из-за нарушения постава конечностей (рис. 2, а).

Рентгенограмма дистального отдела грудных конечностей отражает его предрасположенность к обеспечению функции дополнительной опоры (см. рис. 2, б–г). Вызывает внимание топографическое взаиморасположение фаланг дополнительных пальцев обеих грудных конечностей. Они находятся на дистальных концах пятых пястных костей, проксимальнее первого межфалангового сустава пятого пальца кисти. С латеральной поверхности на рентгенограмме отмечается (особенно четкое изображение левой кисти) наличие фаланг дополнительного латерального пальца с подтвержденными анатомическими основами для обеспечения функции опоры, кровоснабжения, иннервации и других трофических функций.

При осмотре рассеченного участка над дополнительным латеральным пальцем на всех конечностях отмечена хорошо сформированная соединительнотканная связка (сухожилие), характерная для анатомо-топографических структур дистального отдела конечностей свиньи (рис. 3). Связки дополнительного пальца представлены гладковолокнистой соединительной тканью с характерными морфологическими признаками, свойственными типичной конечности свиньи. Отмечается развитие фаланги с нормально сформированным пястно-фаланговым суставом, обладающим необходимыми компонентами истинного сустава (синовиальная жидкость, связка сустава, кон-

груэнтность суставных поверхностей). Препарат демонстрирует наличие структурных единиц (сустав, сухожилие), определяющих возможное функциональное предназначение добавочного пальца.

Внешний осмотр пятидневного поросенка показывает присутствие в дистальном отделе грудных конечностей на латеральной поверхности дополнительных пальцев, имеющих вид шиповидных выпячиваний со сформированными роговыми слоями (см. рис. 1, а и 4, а). Дополнительные латеральные пальцы обладают выраженной опорной функцией, о чем свидетельствует то, что уже через пять дней после рождения отмечается заметная степень мацерации (стертости) поверхностного рогового слоя. Аналогичная стертость копытного рога дополнительных пальцев имеет место и на конечностях взрослой свиноматки (см. рис. 3, а). Присутствует ярко выраженная каудальная направленность дополнительных пальцев, противоположная направленности четырех нормальных, как это наблюдается и на тазовых конечностях взрослой свиноматки (см. рис. 2, а). Дополнительный палец на латеральной стороне конечности и в первом, и во втором случае оканчивается когтевидным копытцем, у взрослой свиноматки – стертым и затупленным на конце (см. рис. 3, а, в), а у поросенка – еще острым (рис. 4, д). То есть добавочный латеральный палец служит в качестве дополнительной опоры при «медвежьей лапе».

Препарированные пальцы, в том числе и дополнительный латеральный, имеют у пятидневного поросенка костную основу (см. рис. 4, б). На освобожденной от кожного

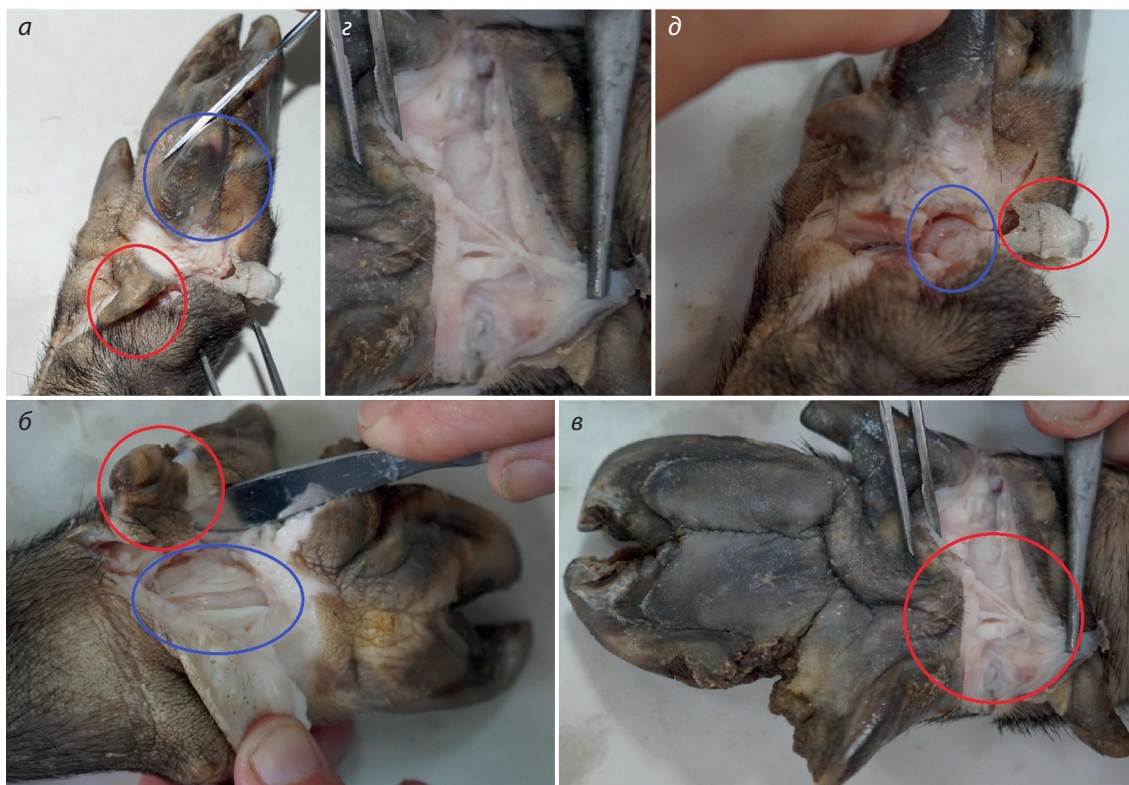


Рис. 3. Препарирование дополнительного пальца на грудной конечности взрослой самки.

a – первая стадия препарирования с отделением пальца; видна стертость копытного рога на нормальном боковом (обведено синим) и добавочном (обведено красным) пальцах; *б* – вторая стадия препарирования, видна гистологическая основа (обведено синим) дополнительного пальца (обведено красным); *в* – третья стадия препарирования, видно сухожилие (в красном круге) соединения добавочного пальца; *г* – увеличенное изображение сухожилия; *д* – препарирование сустава (в синем круге) добавочного пальца без рогового чехла (в красном круге).

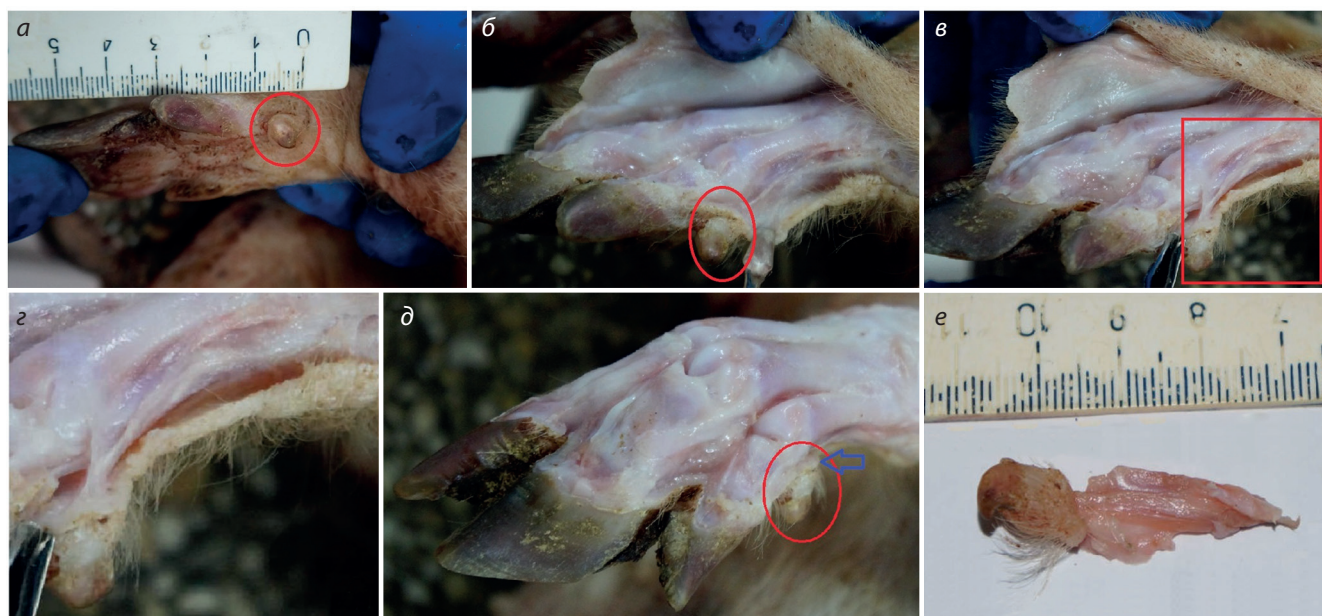


Рис. 4. Анатомио-морфологический анализ грудных конечностей с дополнительным латеральным пальцем пятидневного поросенка мини-свиней ИЦиГ СО РАН.

a – сравнение размеров нормальных и добавочного пальцев (выделено красным); *б* – снятие кожи с препарата конечности мини-свиньи с полидактилией (добавочный латеральный палец обведен красным); *в* – демонстрация сухожилий (обведено красным), образующих крепление добавочного пальца к костям пясти и фаланге нормального пальца; *г* – увеличенная фотография тех же самых сухожилий; *д* – демонстрация костной основы добавочного пальца на препарированной конечности мини-свиньи (синей стрелкой обозначен сустав); *е* – препарат добавочного пальца.

покрова латеральной поверхности видны фаланги дополнительного пальца и грубоволокнистая соединительнотканная связка, являющаяся структурно-функциональной единицей добавочного пальца. На препарате дистального отдела конечности видны межфаланговые суставы всех пальцев, в том числе дополнительного (см. рис. 4, в, д). Четко обозначен межфаланговый сустав дополнительного пальца (см. рис. 4, з). Отделенный препарированный дополнительный палец грудной конечности пятидневного поросенка имеет все характерные морфологические признаки (см. рис. 4, е).

Анатомический анализ дополнительного латерального пальца мини-свиней ИЦиГ показывает, что в этой селекционной группе обнаружена сформировавшаяся потенциально функциональная структура дополнительного латерального пальца, обладающего выраженной опорной костной основой, которая позволяет предполагать при возможной нагрузке конечности на него образование в онтогенезе качественных опорных показателей. А дополнительный медиальный палец, напротив, не имеет такой опорной костной основы и представлен только копытцем. Его положение на месте утраченного в процессе эволюции

первого (большого) пальца допускает неполную реализацию второго дополнительного пальца там, где у свиней дополнительные пальцы «замещают» утраченный первый.

Генеалогический и генетический анализ

Для выяснения источника полидактилии в селекционной группе мини-свиней ИЦиГ была построена генеалогическая схема, основанная на принципе ближайшего общего предка пары особей. Схема показывает, что все восходящие вероятные линии наследования полидактилии сходятся на общем предке – хряке № 207 (рис. 5). Имеющихся в настоящее время данных недостаточно для объективной достоверной оценки гипотез наследования признака, так как только в 2018 г. после обнаружения в 2017 г. в репродуктивном ядре особей с полидактилией начали осматривать всех новорожденных поросят для регистрации присутствия этой аномалии.

За период с 2018 по 2020 г. получено 8 пометов с полидактилией: всего 51 новорожденная особь, из них 14 – с дополнительными пальцами. В двух пометах, где оба родителя имели нормальный фенотип (см. рис. 5), родилось по шесть поросят, и в каждом один был с полидактилией.

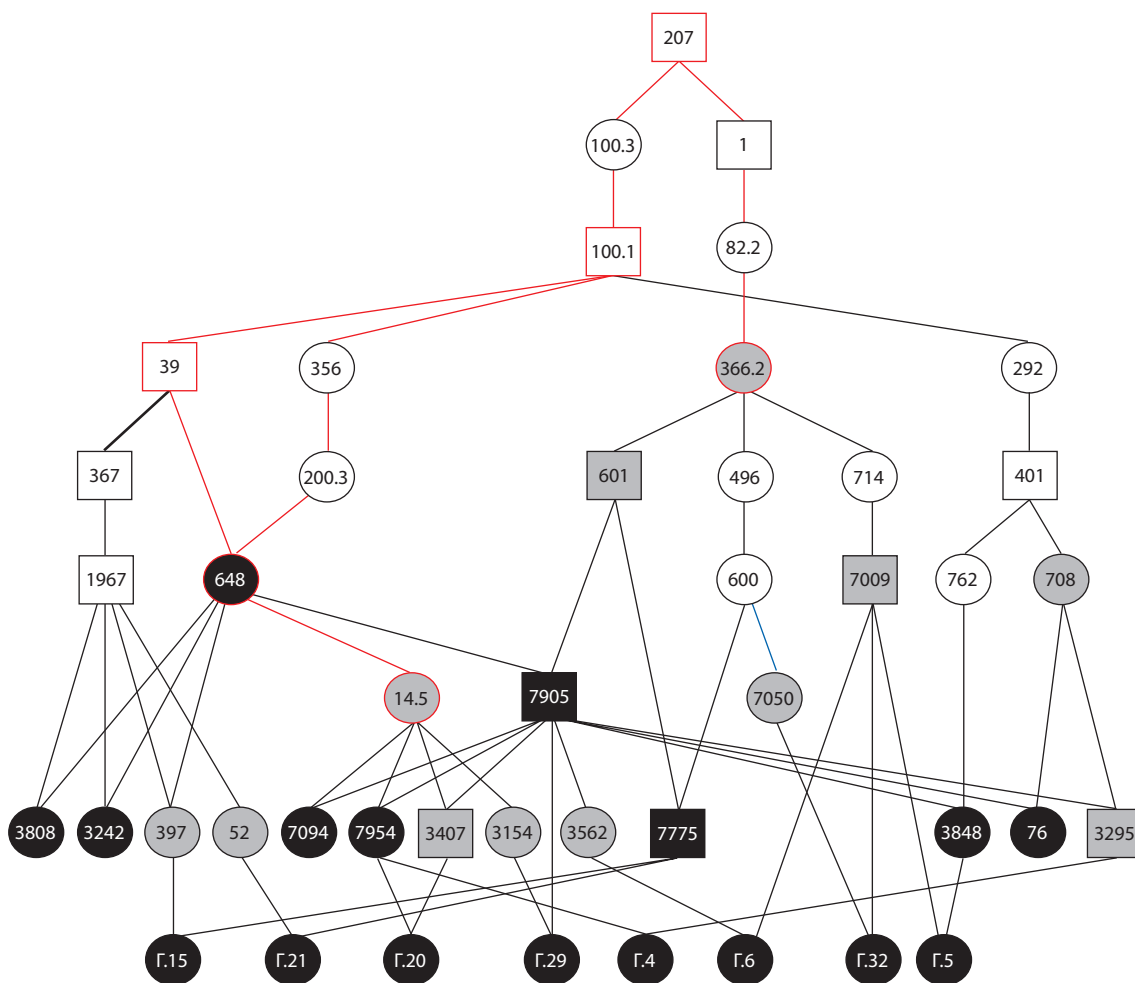


Рис. 5. Схема путей передачи полидактилии в селекционной группе мини-свиней ИЦиГ СО РАН.

Квадраты – самцы, круги – самки; черные фигуры – особи с полидактилией; серые фигуры – нормальный фенотип; носительство фактора признака подтверждено скрещиваниями; белые фигуры – носительство признака не подтверждено скрещиваниями. Красным цветом отмечены предки, на которых замыкаются родословные особей с проявлением полидактилии, и пути между этими предками.

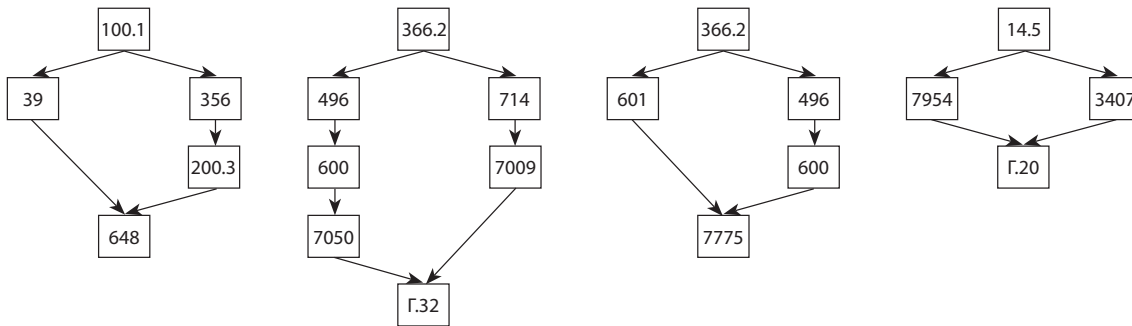


Рис. 6. Фрагменты родословных особей с проявлением полидактилии.

Номера помещены в квадраты вне зависимости от пола особи. Вверху родословных – ближайший общий родоначальник, внизу – пробанд с полидактилией.

Результаты анализирующих скрещиваний свиней с дополнительными пальцами и свиней фенотипически нормальных, но гетерозиготных по фактору полидактилии

Число потомков	Всего	Нормальные	С полидактилией
Фактическое	39.0	27.0	12.0
Ожидаемое		19.5	19.5

В шести пометах один из родителей был с полидактилией, другой – нормальный, но один из его родителей был с полидактилией (см. рис. 5). В них родилось 39 поросят, 12 из которых имели дополнительные пальцы. Генеалогическая схема показывает, что во всех 16 случаях полидактилии имело место замыкание родословных изученных особей на общего как для отца, так и для матери предка (см. рис. 5). На основании родословных (рис. 6), не прибегая к статистическому анализу, уже можно предположить рецессивное наследование полидактилии в селекционной группе мини-свиней ИЦиГ.

Более информативное представление о генетической природе этой аномалии дал материал анализирующих скрещиваний между свиньями, фенотипически нормальными, но гетерозиготными по фактору (факторам) полидактилии с животными, обладающими дополнительными пальцами. Статистическая оценка результатов анализирующего скрещивания (см. таблицу) показала, что предположение о моногенном наследовании (при котором ожидалось расщепление потомства по фенотипу в соотношении 1:1) отвергается ($\chi^2 = 5.76$, d.f. = 1). Вероятно, имеет место рецессивное полигенное (возможно, майоргенное) наследование, хотя нельзя исключить и моногенное наследование с неполной пенетрантностью, которое может обуславливать визуально не определяемую слабую экспрессию признака. Однако, так как численность потомков в двух классах оказалась относительно невелика, необходима постановка дополнительных скрещиваний для более точной оценки на выборке большего объема.

Цитогенетический анализ

Для выявления особенностей кариотипов селекционной группы мини-свиней ИЦиГ проведено цитогенетическое исследование для четырех индивидуумов. Кариотипы по-

лучены для следующих мини-свиней: двух с обычным фенотипом (самка № 14.5 и самец № 3407) и двух с полидактилией (самка № 3808 и самец № 7905) (рис. 7).

На основании данных GTG-бэндинга установлено, что кариотипы трех исследованных особей, 14.5, 3407, 3808, не отличаются от ранее опубликованных обычных кариотипов *Sus scrofa*: как количеством ($2n = 38$) и морфологией хромосом, так и рисунком GTG-бэндов (Graphodatsky et al., 2020) (см. рис. 7). Для самца № 7905 с полидактилией показано наличие робертсоновской транслокации хромосом Rb 16;17, $2n = 37$, встречаемость которой среди мини-свиней ИЦиГ была отмечена ранее (Тихонов и др., 2010), в том числе и для самца-родоначальника № 207 с полидактилией.

Обсуждение

Проявляющаяся в селекционной группе мини-свиней ИЦиГ полидактилия уникальна для вида *Sus scrofa*, так как сочетает в себе пре- и постаксиальную формы с заметным превалированием последней. С точки зрения микроэволюционных процессов, полидактилия мини-свиней ИЦиГ – явное новообразование, выражающееся в формировании практически полноценного дополнительного латерального пальца. При максимальной экспрессии признака наблюдается зачаточное медиальное дополнительное копытце на месте первого пальца. Вообще для *Sus scrofa* характерно именно медиальное расположение ранее обнаруженных у некоторых из них дополнительных пальцев (Malynicz, 1982; Gorbach et al., 2010), которые как бы «замещают» первый палец, хотя анатомически эти «замещения» могут весьма существенно различаться (Malynicz, 1982; Gorbach et al., 2010). В целом складывается впечатление, что сам генетический механизм формирования первого пальца в описанных ранее случаях разрушен, но информация о его местоположении сохранилась в геноме.

Напротив, у мини-свиней ИЦиГ с пятипалостью расположение дополнительного пальца с соответствующей полнотой сформированной анатомо-морфологической структурой генетически определено на месте шестого пальца – «второго» мизинца. При проявлении у мини-свиней еще одного варианта аномалии в виде «шестипалости», кроме дополнительного мизинца, на месте первого (большого) пальца находится зачаточное копытце, но здесь отсутствуют все остальные присущие обычным пальцам

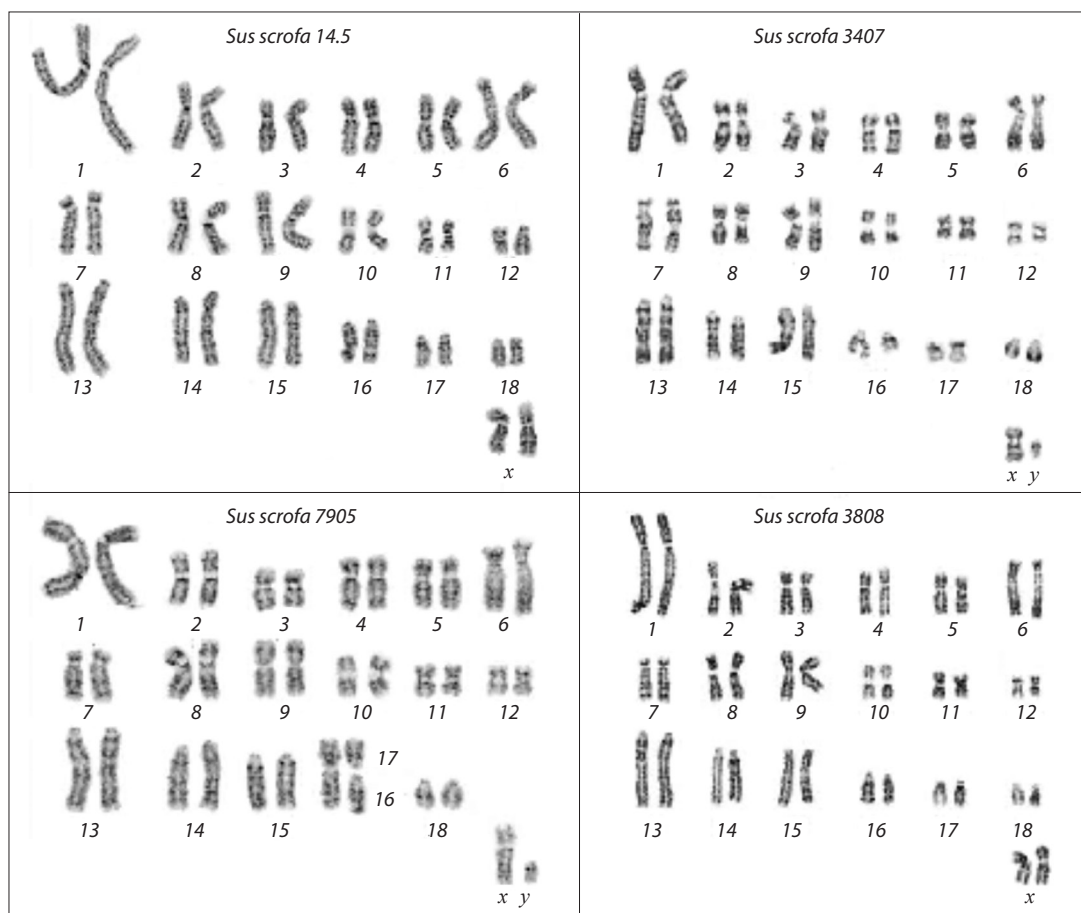


Рис. 7. GTG-окрашенные хромосомы четырех особей селекционной группы мини-свиней ИЦиГ СО РАН.

структуры. Как следствие, зачаточное копытце этого второго дополнительного пальца у шестипалой грудной конечности мини-свиньи расположено на месте первого (большого) пальца кисти. Мы полагаем, что это обстоятельство требует дальнейших анатомо-морфологических и молекулярно-генетических исследований.

Изучение кариотипов стандартными цитогенетическими методами не выявило особенностей аномальных мини-свиней с дополнительными пальцами, за исключением наличия в кариотипе одного из четырех исследованных животных робертсоновской транслокации Rb 16;17, ранее уже обнаруженной в этой популяции (Тихонов и др., 2010).

Гены-кандидаты, определяющие, возможно, полидактилию у свиней, располагаются на хромосоме 18 (Gorbach et al., 2010). Согласно полученным данным GTG-бэндинга, никаких меж- и внутрихромосомных перестроек с вовлечением этой хромосомы у мини-свиней не наблюдается.

Заключение

Результаты анализирующих скрещиваний указывают на рецессивное наследование признака с варьирующей экспрессией и неполной пенетрантностью, которая может быть и следствием того, что слабо выраженные фенотипы визуально не фиксируются. Не исключено, что «медвежья лапа» без дополнительных пальцев, не распознаваемая у новорожденных поросят, может быть у них фенотипом полидактилии. В заключение следует заметить, что по-



Рис. 8. Взрослая мини-свиноматка с полидактилией и неправильной постановкой ног («медвежья лапа»).

лидактилия мини-свиней ИЦиГ сопровождается явным селекционно-негативным эффектом. У животных с «медвежьей лапой» может происходить разрастание копытного рога на 3-м и 4-м пальцах, что приводит к хромоте (рис. 8). Собственно, при осмотре животных, выбраковываемых из племенного состава из-за неправильной постановки ног или хромоты, полидактилия и была впервые обнаружена среди мини-свиней ИЦиГ СО РАН.

Список литературы / References

- Визнер Э., Виллер З. Ветеринарная патогенетика. М.: Колос, 1979.
[Wiesner E., Wheller Z. Veterinärmedizinische Pathogenetik. Jena, 1974. (Russ. ed.: Wizner E., Wheller Z. Veterinary Pathogenetics. Moscow: Kolos Publ., 1979. (in Russian))]
- Глаголев П.А., Ипполитова В.И. Анатомия сельскохозяйственных животных с основами гистологии и эмбриологии. М.: Колос, 1977.
[Glagolev P.A., Ippolitova V.I. Anatomy of Farm Animals with the Basics of Histology and Embryology. Moscow: Kolos Publ., 1977. (in Russian)]
- Графодатский А.С., Раджабли С.И., Баранов О.К. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих: Атлас. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988.
[Graphodatsky A.S., Radzhabli S.I., Baranov O.K. Chromosomes of Farm and Laboratory Mammals: Atlas. Novosibirsk: Nauka Publ., 1988. (in Russian)]
- Иванчук В.А. Биогенетические особенности редких и исчезающих пород свиней. *Ветеринария с.-х. животных*. 2011;2:55-60.
[Ivanchuk V.A. Biogenetic characteristics of rare and endangered breeds of pigs. *Veterinariya Sel'skokhozyaystvennykh Zhivotnykh = Veterinary Medicine of Farm Animals*. 2011;2:55-60. (in Russian)]
- Кудрявцев П.Н. Племенное дело в свиноводстве. М.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1948.
[Kudryavtsev P.N. Breeding Business in Pig Husbandry. Moscow: OGIZ-Selkhozgiz Publ., 1948. (in Russian)]
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990.
[Lakin G.F. Biometrics. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1990. (in Russian)]
- Лебедев М.И., Зеленецкий Н.В. Практикум по анатомии сельскохозяйственных животных. СПб.: Агропромиздат, 1995.
[Lebedev M.I., Zelenevsky N.V. Tutorial on the Anatomy of Farm Animals. St. Petersburg: Agropromizdat Publ., 1995. (in Russian)]
- Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С. Миниатюрные свиньи ИШИГ – модельный объект для изучения формообразовательного процесса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014; 18(2):279-293.
[Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S. Miniature pigs of ICG as a model object for morphogenetic research. *Rus. J. Genet. Appl. Res.* 2014;4(6):511-522].
- Соколов В.Е. Систематика млекопитающих. Т. 3. М.: Высш. шк., 1979.
[Sokolov V.E. Taxonomy of Mammals. Pt. 3. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1979. (in Russian)]
- Тихонов В.Н., Кочнева М.Л., Бобович В.Е. Интродукция кариотипического полиморфизма ($2n = 36, 37, 38$) в геном домашних свиней *Sus scrofa domestica*. *Информационный вестник ВОГиС*. 2010;14(4):647-653.
[Tickhonov V.N., Kochneva M.L., Bobovich V.E. Introduction of karyotypic polymorphism ($2n = 36, 37, 38$) in genome of domestic pigs *Sus scrofa domestica*. *Informatcionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2010;14(4):647-653. (in Russian)]
- Beklemisheva V.R., Perelman P.L., Lemskaya N.A., Kulemzina A.I., Proskuryakova A.A., Burkanov V.N., Graphodatsky A.S. The ancestral carnivore karyotype as substantiated by comparative chromosome painting of three pinnipeds, the walrus, the Steller sea lion and the Baikal seal (Pinnipedia, Carnivora). *PLoS One*. 2016;11(1): e0147647. DOI 10.1371/journal.pone.0147647.
- Gorbach D., Mote B., Totir L., Fernando R., Rothschild M. Polydactyl inheritance in the pig. *J. Hered.* 2010;101(4):469-475. DOI 10.1093/jhered/esq037.
- Graphodatsky A.S., Perelman P.L., O'Brien S.J. Atlas of Mammalian Chromosomes. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA, 2020.
- Lange A., Muller G.B. Polydactyly in development, inheritance, and evolution. *Q. Rev. Biol.* 2017;92(1):1-38. DOI 10.1086/690841.
- Malynicz G.L. Complete polydactylism in Papua New Guinea village pig, with otocephalic homozygous monsters. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 1982;14(3):415-420. DOI 10.1186/1297-9686-14-3-415.
- Ptak W. Polydactyly in wild boar. *Acta Theriologica*. 1963;6:312-314.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971;2:971-972. DOI 10.1016/s0140-6736(71)90287-x.
- Stanyon R., Galleni L. A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes. *Ital. J. Zool.* 1991;58:81-83. DOI 10.1080/11250009109355732.

ORCID ID

S.V. Nikitin orcid.org/0000-0002-8239-5450
S.P. Knyazev orcid.org/0000-0002-4767-0795
V.A. Trifonov orcid.org/0000-0003-0454-8359


A.A. Proskuryakova orcid.org/0000-0003-3812-4853
K.S. Shatokhin orcid.org/0000-0002-0885-2772
V.I. Zaporozhets orcid.org/0000-0002-1337-5093
D.S. Bashur orcid.org/0000-0001-9725-3888

Благодарности. Работа поддержана бюджетным финансированием по проекту № 0259-2021-0015.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.02.2021. После доработки 15.04.2021. Принята к публикации 19.04.2021.

Negative heterosis for meiotic recombination rate in spermatocytes of the domestic chicken *Gallus gallus*


L.P. Malinovskaya^{1, 2}, K.V. Tishakova^{2, 3}, T.I. Bikchurina^{1, 2}, A.Yu. Slobodchikova^{1, 2}, N.Yu. Torgunakov^{1, 2}, A.A. Torgasheva^{1, 2}, Y.A. Tsepilov^{1, 2}, N.A. Volkova⁴, P.M. Borodin^{1, 2} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, Moscow region, Russia


 borodin@bionet.nsc.ru

Abstract. Benefits and costs of meiotic recombination are a matter of discussion. Because recombination breaks allele combinations already tested by natural selection and generates new ones of unpredictable fitness, a high recombination rate is generally beneficial for the populations living in a fluctuating or a rapidly changing environment and costly in a stable environment. Besides genetic benefits and costs, there are cytological effects of recombination, both positive and negative. Recombination is necessary for chromosome synapsis and segregation. However, it involves a massive generation of double-strand DNA breaks, erroneous repair of which may lead to germ cell death or various mutations and chromosome rearrangements. Thus, the benefits of recombination (generation of new allele combinations) would prevail over its costs (occurrence of deleterious mutations) as long as the population remains sufficiently heterogeneous. Using immunolocalization of MLH1, a mismatch repair protein, at the synaptonemal complexes, we examined the number and distribution of recombination nodules in spermatocytes of two chicken breeds with high (Pervomai) and low (Russian Crested) recombination rates and their F₁ hybrids and backcrosses. We detected negative heterosis for recombination rate in the F₁ hybrids. Backcrosses to the Pervomai breed were rather homogenous and showed an intermediate recombination rate. The differences in overall recombination rate between the breeds, hybrids and backcrosses were mainly determined by the differences in the crossing over number in the seven largest macrochromosomes. The decrease in recombination rate in F₁ is probably determined by difficulties in homology matching between the DNA sequences of genetically divergent breeds. The suppression of recombination in the hybrids may impede gene flow between parapatric populations and therefore accelerate their genetic divergence.

Key words: recombination; heterosis; macrochromosomes; synaptonemal complexes; MLH1.

For citation: Malinovskaya L.P., Tishakova K.V., Bikchurina T.I., Slobodchikova A.Yu., Torgunakov N.Yu., Torgasheva A.A., Tsepilov Y.A., Volkova N.A., Borodin P.M. Negative heterosis for meiotic recombination rate in spermatocytes of the domestic chicken *Gallus gallus*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):661-668. DOI 10.18699/VJ21.075

Отрицательный гетерозис по частоте мейотической рекомбинации в сперматоцитах домашней курицы *Gallus gallus*

Л.П. Малиновская^{1, 2}, К.В. Тишакова^{2, 3}, Т.И. Бикчурина^{1, 2}, А.Ю. Слободчикова^{1, 2}, Н.Ю. Торгунаков^{1, 2}, А.А. Торгашева^{1, 2}, Я.А. Цепилов^{1, 2}, Н.А. Волкова⁴, П.М. Бородин^{1, 2} 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, Московская область, Россия

 borodin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Преимущества и издержки мейотической рекомбинации являются предметом дискуссий. Поскольку рекомбинация разрушает комбинации аллелей, уже проверенные естественным отбором, и порождает новые с непредсказуемой приспособленностью, высокая частота рекомбинации обычно выгодна для популяций, живущих в быстро меняющейся среде, но не выгодна в стабильной среде. Помимо генетических преимуществ и издержек, существуют цитологические эффекты рекомбинации, как положительные, так и отрицательные. Рекомбинация необходима для синапсиса и сегрегации хромосом. Однако она сопряжена с образованием множества двухцепочечных разрывов ДНК, ошибочная репарация которых может привести к гибели половых клеток или к различным мутациям и перестройкам хромосом. Таким образом, преимуще-

ства рекомбинации (генерация новых комбинаций аллелей) будут преобладать над ее издержками (возникновение вредных мутаций), пока популяция остается достаточно гетерогенной. Используя иммунолокализацию MLH1 белка мисматч-репарации, мы исследовали количество и распределение рекомбинационных узлов в сперматоцитах двух пород кур с высокой (Первомайская) и низкой (Русская хохлатая) частотой рекомбинации и их гибридов F_1 и беккроссов. У гибридов F_1 мы наблюдали отрицательный гетерозис по частоте рекомбинации. Беккроссы на Первомайскую породу были достаточно однородными и имели промежуточную частоту рекомбинации. Различия в общей частоте рекомбинации между породами, гибридами и беккроссами в основном определялись различиями по макрохромосомам. Снижение частоты рекомбинации в F_1 , вероятно, обусловлено трудностями в поиске гомологии между последовательностями ДНК генетически дивергентных пород. Подавление рекомбинации у гибридов может препятствовать потоку генов между парапатрическими популяциями и, следовательно, ускорять их генетическую дивергенцию.

Ключевые слова: рекомбинация; гетерозис; макрохромосомы; синаптонемные комплексы; MLH1.

Introduction

Benefits and costs of meiotic recombination are a favorite subject of theoretical discussions and mathematical models (Kondrashov, 1993; Otto, Lenormand, 2002; Hartfield, Keightley, 2012; Rybnikov et al., 2020). They are mostly focused on the population genetic effects of recombination, i.e. its contribution to genetic and phenotypic variability. Crossing over reduces linkage disequilibrium by breaking old allele combinations already tested by natural selection and generating new ones of unpredictable fitness. Therefore, a high recombination rate is generally beneficial for populations living in fluctuating or rapidly changing environments and costly in a stable environment (Otto, Michalakis, 1998; Lenormand, Otto, 2000). Besides genetic benefits and costs, there are cytological effects of recombination, both positive and negative. Recombination is necessary for chromosome synapsis and segregation. However, it involves a massive generation of double-strand DNA breaks. Insufficient or erroneous repair of the breaks leads to the death of the affected germ cells or various mutations and chromosome rearrangements (Zickler, Kleckner, 2015).

Crossing over distribution along the chromosomes is another important variable affecting both genetic and cytological benefits and costs of recombination. Two crossing overs positioned too close to each other do not affect the linkage phase (Gorlov, Gorlova, 2001; Berchowitz, Copenhaver, 2010). Similarly, crossing overs located too close to a centromere of an acrocentric chromosome or to telomere do not produce new allele combinations. In these cases, the cost of recombination is paid, but no benefit is gained. Cytological costs of crossing overs that are too distal or too proximal should also be taken into account. They often lead to incorrect chromosome segregation and generation of chromosomally unbalanced gametes (Koehler et al., 1996; Hassold, Hunt, 2001). Thus, the benefits of recombination (generation of new allele combinations) would prevail over its costs (occurrence of deleterious mutations) as long as the population remains sufficiently heterogeneous.

The heritability of recombination rate was estimated as 0.30 in humans, 0.22 to 0.26 in cattle and 0.15 in sheep (Kong et al., 2004; Sandor et al., 2012; Johnston et al., 2016). Interbreed variation in recombination rate was detected in rams (Davenport et al., 2018) and roosters (Malinovskaya et al., 2019). The most intriguing finding of the latter study was a correspondence between the age of the breed and its recombination rate. Relatively young breeds created by crossing

several local breeds showed high recombination rates, while ancient local breeds displayed a low recombination rate. The decrease in recombination rate with breed age might be a correlative response to a decrease in genetic heterogeneity within each breed with time due to inbreeding and artificial selection (Lipinski et al., 2008; Gibbs et al., 2009). Early stages of conscious selection for economic traits were probably accompanied by unconscious selection for a high recombination rate. A reduction of genetic variability, an inevitable result of inbreeding and selection, leads to a decrease in recombination efficiency and therefore reduces selective advantages of high recombination rate.

In this paper, we examine the inheritance of the recombination rate in male F_1 hybrids and backcrosses of the chicken breeds showing the highest (Pervomai) and lowest (Russian Crested) level of recombination among the six breeds examined by L.P. Malinovskaya et al. (2019). The Pervomai breed was produced in 1930–1960 by a complex reproductive crossing of three crossbred breeds: White Wyandotte (derived from crosses between Brahmas and Hamburgs), Rhode Island (derived from crosses between Malays and brown Italian Leghorns) and Yurlov Crower (derived from crosses of Chinese meat chicken, gamecocks and landraces). Russian Crested is an ancient local breed described in the European part of Russia in the early XIX century (Paronyan, Yurchenko, 1989).

We estimated the number and distribution of recombination nodules in spermatocytes using immunolocalization of MLH1, a mismatch repair protein of mature recombination nodules, at the synaptonemal complexes (SCs). This method has proved to produce reliable estimates of the overall recombination frequency and the distribution of recombination events along individual chromosomes (Anderson et al., 1999; Froenicke et al., 2002; Segura et al., 2013; Pigozzi, 2016).

Material and methods

Animals. Thirty-four adult five-month-old roosters were used in this study. Eight of them were Pervomai breed, nine – Russian Crested breed, three – F_1 hybrids between Pervomai dams and Russian Crested sires, fourteen – backcrosses of F_1 sires to Pervomai dams.

The roosters were bred, raised and maintained at the poultry farm of the L.K. Ernst Federal Research Centre for Animal Husbandry under conventional conditions. Maintenance, handling and euthanasia of animals were carried out in accordance with the approved national guidelines for the care and use of laboratory animals. All experiments were approved by the

Ethics Committee on Animal Care and Use at the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (approval No. 35 of October 26, 2016 and 45/2 of January 10, 2019).

Synaptonemal complex spreading and immunostaining.

Chromosome spreads were prepared from the right testes by a drying-down method (Peters et al., 1997). Then the slides were subjected to immunostaining according to L.K. Anderson et al. (1999). The slides were incubated overnight in a humid chamber at 37 °C with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-SYCP3 (1:500; Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-MLH1 (1:30; Abcam, Cambridge, UK) and human anticentromere (ACA) (1:70; Antibodies Inc., Davis, USA). Secondary antibody incubations were carried out for 1 h at 37 °C. The secondary antibodies used were Cy3-conjugated goat anti-rabbit (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse (1:30; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) and aminomethylcoumarin (AMCA)-conjugated donkey anti-human (1:40; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA).

Antibodies were diluted in PBT (3 % bovine serum albumin and 0.05 % Tween 20 in PBS). A solution of 10 % PBT was used for blocking non-specific binding of antibodies. Vectashield antifade mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used to reduce fluorescence fading. The preparations were visualized with an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a CCD camera (CV M300, JAI Corporation, Yokohama, Japan), CHROMA filter sets and ISIS4 image-processing package (MetaSystems GmbH, Altlußheim, Germany). The location of each imaged immunolabeled SC spread was recorded so that it could be relocated on the slide after FISH.

Fluorescence *in situ* hybridization with BAC probes.

After the acquisition of the immunofluorescence signals, the slides were subjected to FISH with universal bird BAC probes CHORY-261 (Damas et al., 2017). Table shows a list of BAC-clones used in this study. BAC DNA was isolated using the Plasmid DNA Isolation Kit (BioSilica, Novosibirsk, Russia) and amplified with GenomePlex Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). BAC DNA was labeled using GenomePlex WGA Reamplification Kit (Sigma-Aldrich Co.) by incorporating biotin-16-dUTP (Roche, Basel, Switzerland).

FISH on SCs was performed following the standard procedure (Liehr et al., 2017). Briefly, 16 µl of hybridization mix contained 0.2 µg of the labeled BAC-probe, 2 µg of Cot-2 DNA of *Gallus gallus* (Trifonov et al., 2009), 50 % formamide in 2xSSC (saline-sodium citrate buffer), 10 % dextran sulfate. Probes were denatured for 5 min at 95 °C and reannealed for 1 h at 42 °C. Synaptonemal complexes spreads were denatured in 70 % formamide in 2xSSC for 3 min at 72 °C. Hybridization was made overnight at 42 °C. Posthybridization washes included 2xSSC, 0.4xSSC, 0.2xSSC (5 min each, 60 °C) followed by 20-min incubation in 4 % dry milk in 4xSSC/0.05 % Triton X-100. All washes were performed at 42 °C in 4xSSC/0.05 % Triton X-100 3 times (5 min each). Hybridization signals were detected with fluorescein avidin DCS and biotinylated anti-avidin D (Vector Laboratories, Inc.).

List of BAC clones used for FISH

BAC clone	<i>Gallus gallus</i> chromosome	Arm
CH261-184E5	1	q
CH261-44D16	2	p
CH261-169K18	3	q
CH261-83E1	4	p
CH261-2I23	5	q
CH261-49F3	6	q

Image analysis. We measured the length of each SC and the total SC length in µm, scored the number of MLH1 signals localized on SCs and recorded their positions relative to the centromere using MicroMeasure 3.3 software (Reeves, 2001). For the seven largest macroSCs identified by relative lengths and centromeric indices, we visualized the pattern of MLH1 foci distribution. We divided the average length of SC by intervals and plotted the relative number (the proportion) of MLH1 foci within each interval. To make the intervals on chromosomes of different lengths comparable, we set the number of intervals for each SC proportional to the average SC length, being ~1 µm.

The Statistica 6.0 software package (StatSoft) was used for descriptive statistics. Mann–Whitney U-test was used to estimate the differences between the genotypes in the average number of MLH1 foci per cell and each macrochromosome, $p < 0.01$ was considered to be statistically significant. Values in the text and figures are presented as means ± S.D.

Results

We analyzed the number and distribution of MLH1 foci at 52650 SC in 1350 spermatocytes of 34 roosters. The rooster pachytene karyotype contained 38 autosomal SCs and a ZZ pair. We identified the seven largest macroSCs by their relative lengths and centromeric indices. SC1, SC2 and SCZZ were large metacentrics. They differed from each other in length and centromeric indices ($p < 0.001$). SC3 and SC5 were large and medium-sized acrocentrics, while SC4 and SC7 were medium-sized submetacentrics, which also differed from each other in their relative lengths and centromeric indices. The macroSCs 6, 8–10 and all microSCs were acrocentric, with gradually decreasing chromosomal sizes (Fig. 1). All chromosomes showed orderly synapsis. No SCs with asynapsis were detected at pachytene spreads of the specimens of the parental breeds and their F₁ hybrids and backcrosses.

In order to test the reliability of the morphological identification of macrochromosomes, we performed FISH with universal BAC probes obtained from the CHORY-261 library, marking chicken macrochromosomes, on SC preparations after immunolocalization of SYCP3 and centromeric proteins (Fig. 2). Comparison of the FISH results with the results of identification by relative sizes and centromeric indices showed good agreement for all chromosomes. We correctly identified the first seven macrochromosomes and chromosome Z. Chromosomes 6 and 7 are of similar SC lengths and are acrocentric and subacrocentric, respectively.

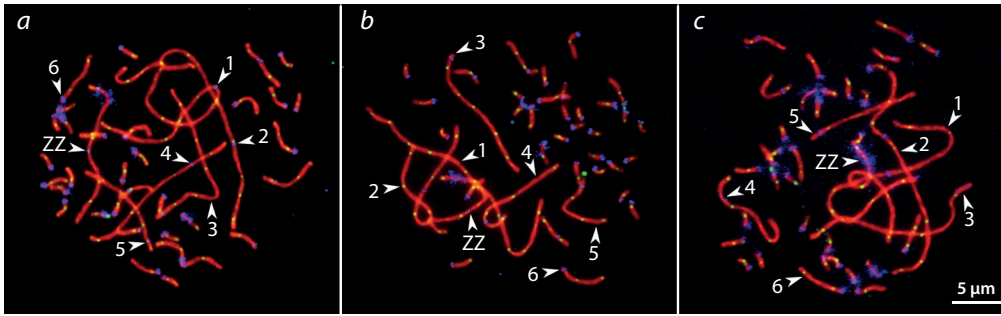


Fig. 1. Pachytene spermatocytes of Pervomai (a) and Russian Crested (b) and backcross (c) roosters after immunolocalization of SYCP3 (red), centromeric proteins (blue) and MLH1 (green). Arrowheads point to the SCs of the macrochromosomes identified by their lengths and centromeric indices.

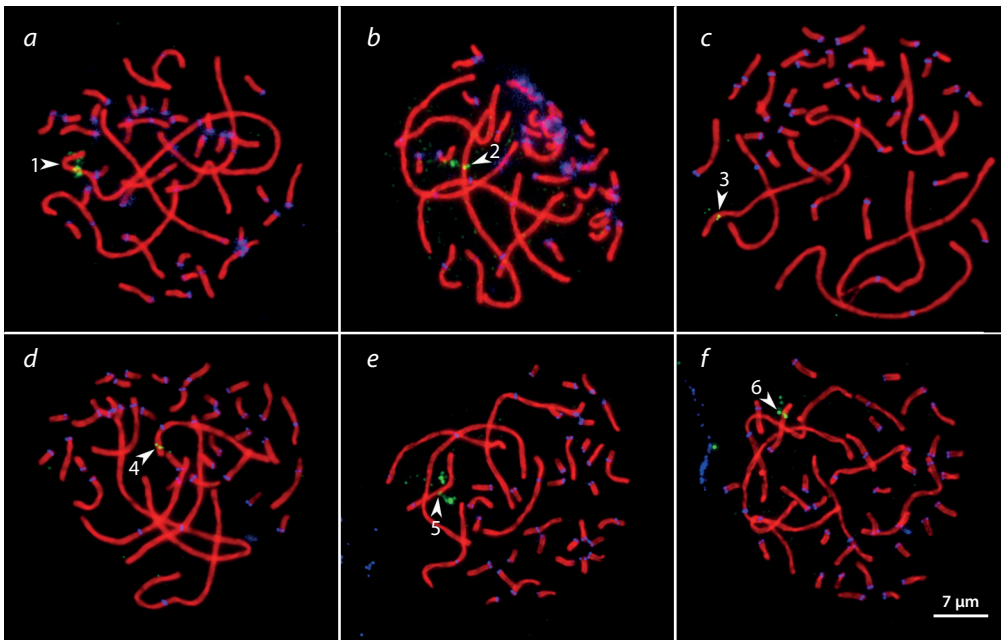


Fig. 2. Pachytene spermatocytes of Pervomai roosters after immunolocalization SYCP3 (red), centromeric proteins (blue) and FISH with universal BAC probes (green) 184E5 (a), 44D16 (b), CH261-169K18 (c), CH261-83E1 (d), CH261-2I23 (e), CH261-49F3 (f).

Arrowheads point to the SCs of the macrochromosomes identified by their sizes and centromeric indices.

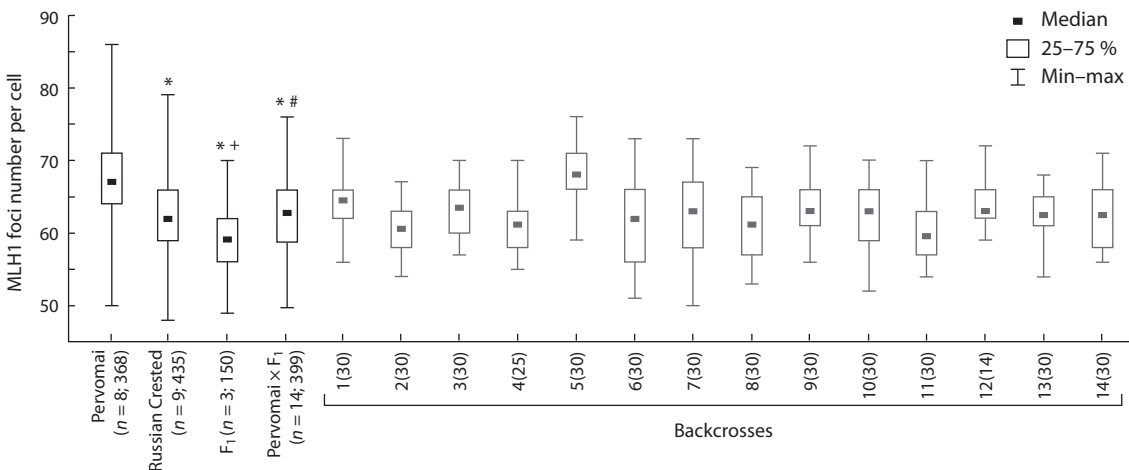


Fig. 3. The number of MLH1 foci per spermatocyte in the roosters of two parental breeds, their F₁ hybrids and backcrosses.

The numbers in parentheses indicate the number of studied individuals and cells. Average values of genotypes are shown in black, individual values of backcrosses are shown in gray. “***” – differences with Pervomai, Mann–Whitney test, $p < 0.01$; “+” – differences with Russian Crested, Mann–Whitney test, $p < 0.01$; “#” – differences with F₁, Mann–Whitney test, $p < 0.01$.

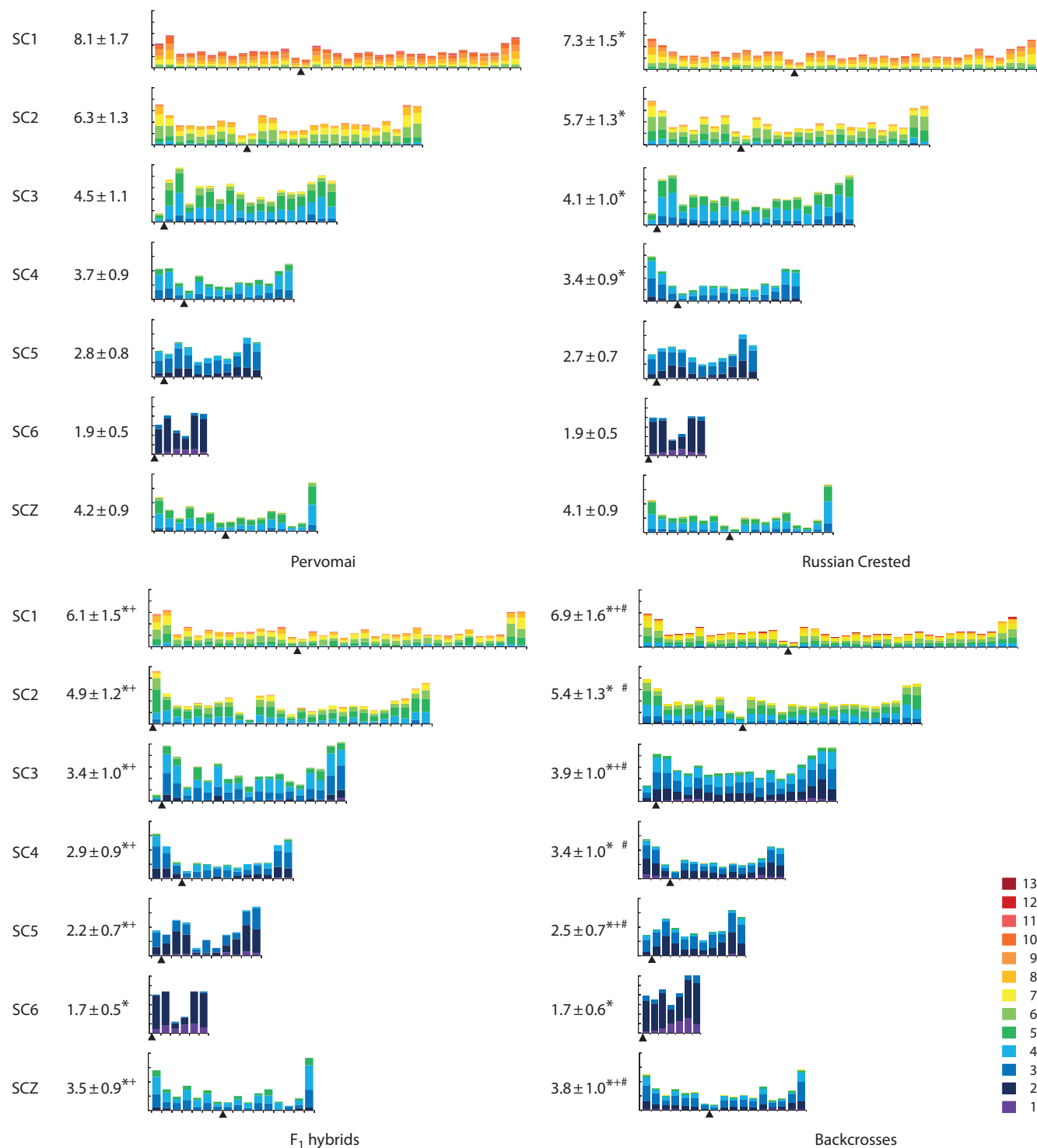


Fig. 4. Average number and distribution of MLH1 foci along the macroSCs of Pervomai, Russian Crested roosters and their F₁ hybrids and backcrosses. The X-axis reflects the position of the foci in the bivalent relative to the centromere (indicated by a triangle). Each interval is equivalent to approximately 1 μm of the SC length. The Y-axis reflects the proportion of nodules in each interval. Marks at the Y-axis in SC1–SC3 are equal to 0.02, in SC4–SC6, SCZ are equal to 0.05. The colors represent the proportion of bivalents with 1 to 13 MLH1 foci per chromosome. “*” – differences with Pervomai, Mann–Whitney test, $p < 0.01$; “+” – differences with Russian Crested, Mann–Whitney test, $p < 0.01$; “#” – differences with F₁, Mann–Whitney test, $p < 0.01$.

The average number of MLH1 foci per spermatocyte in the first generation hybrids (58.9 ± 0.3) was lower than in both parental breeds: Pervomai (67.3 ± 0.3) and Russian Crested (62.6 ± 0.3). The differences between hybrids and both parental breeds are significant (Mann–Whitney U-test is 11.4 and 14.2,

respectively; $p < 10^{-6}$). The backcrosses were homogeneous for the number of MLH1 foci (Fig. 3). They demonstrated a low average MLH1 foci number (62.6 ± 0.5), typical for the Russian Crested ($p = 0.80$), although they exceeded F₁ hybrids in this trait ($p < 10^{-6}$). These results indicate negative

heterosis of the recombination rate measured as MLH1 foci number per pachytene cell.

These differences between parental breeds were mainly determined by the four largest macrochromosomes (Mann–Whitney test, $p < 0.01$) (Fig. 4). SCZZ, SC5 and SC6 of the F_1 hybrids contained fewer MLH1 foci than the corresponding macroSCs of the parental breeds, Pervomai and Russian Crested (Mann–Whitney test, $p < 0.01$). In the backcrosses to Pervomai, the number of MLH1 foci on the SC of ZZ and the six largest autosomes remained significantly smaller than on the corresponding SCs of Pervomai (Mann–Whitney test, $p < 0.01$). However, it was significantly higher on all SCs but SC6 than in the F_1 hybrids (Mann–Whitney test, $p < 0.01$) (see Fig. 4).

Despite these differences in the number of MLH1 foci per particular macrochromosome between the parental breeds, F_1 and backcrosses, each of them showed almost the same chromosome-specific pattern of MLH1 foci distribution along the SC (see Fig. 4). On most chromosomes, an increase in the frequency of recombination was observed in the distal regions.

Discussion

The most important and surprising result of our study is a discovery of overdominance of low recombination rate in F_1 hybrids, measured as the number of MLH1 foci per pachytene cell. Backcrosses of the F_1 hybrids to the parental breed with high recombination rate were rather homogenous and showed an intermediate recombination rate. Thus, the model of inheritance of recombination rate in roosters can be formally described as negative heterosis in F_1 and additive inheritance in backcrosses.

The differences in overall recombination rate between the breeds, hybrids and backcrosses were mainly determined by the differences in the crossing over number in the large macrochromosomes. They are characterized by a high (up to 13!) and variable number of crossing overs, while small macrochromosomes have one or two chiasmata and each microchromosome contains only a single obligate chiasma necessary for orderly chromosome segregation.

Generally, crossbreeds are expected to show positive heterosis for productivity traits (hybrid vigor) (Chen, 2013). This expectation contradicts the negative heterosis for the recombination rate observed in this study. Interestingly, the rate of dilution of heterosis for recombination rate in backcrosses is higher than the rate of dilution of positive heterosis for economic traits, at least in plants (Fridman, 2015). The decrease in recombination rate in F_1 is probably determined by difficulties in homology matching between the DNA sequences of genetically divergent breeds (which we shall discuss below), rather than by dominant/overdominant genetic effects. With further level of backcrossing, the recombination rate acts like a regular complex trait with additive heritable component and environmental influence.

Our finding poses at least three interesting questions. How common is the negative heterosis for the recombination rate? What might be its molecular mechanism? What are its population genetic implications?

The first question is difficult to answer because we are aware of only a few prior studies in which recombination rates have

been compared between parental breeds or species and their hybrids. There were no significant differences in autosomal recombination rate between two species of dwarf hamsters diverged about 1 MYA and their F_1 female and male hybrids (Bikchurina et al., 2018). On the other hand, recombination in female hybrids between *Microtus arvalis* and *M. levis* diverged from 0.2 to 0.4 MYA and differing by a series of chromosomal rearrangements was significantly reduced compared to the parental species (Torgasheva, Borodin, 2016). Interspecific hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* demonstrated low frequencies of genetic recombination (Hunter et al., 1996). Genome-wide introgression between two closely related nematode species *Caenorhabditis briggsae* and *C. nigoni* also revealed substantial suppression of recombination in the hybrids (Bi et al., 2015).

The molecular mechanism of negative heterosis for recombination rate is probably linked with the initial stages of chromosome synapsis and recombination, which includes scheduled generation of multiple double-strand DNA breaks (DSB), RAD51-mediated strand invasion and sequence homology matching (Zickler, Kleckner, 2015). Reduced recombination in interspecies hybrids may occur due to a significant decrease in homology between parent species accompanied by serious impairments of the chromosome synapsis in meiosis. However, even a minor decrease in homology at the early stages of divergence can apparently affect recombination due to decreased sequence identity. Comparison of recombination boundary sequences suggests that recombination in hybrids may require a region of high sequence identity of several kilobases in length (Ren et al., 2018).

Similarly, the study of recombination rate in hybrids between *S. cerevisiae* strains using high-throughput method showed a positive correlation of its level with sequence similarity between homologs at different scales (Raffoux et al., 2018). This is consistent with the finding that sequence divergence greater than about 1 % leads to the suppression of recombination due to heteroduplex rejection by the mismatch repair machinery (Chen, Jinks-Robertson, 1999). An anti-recombination activity of the mismatch repair system during meiosis might contribute towards a decrease in recombination rate in hybrids between diverging breeds, populations and species (Radman, Wagner, 1993). At relatively low genetic distances it decreases the recombination rate in the hybrids, at greater genetic distances it impairs chromosome synapsis and might lead to hybrid sterility due to meiotic silencing of unpaired chromatin (Turner, 2015).

Conclusion

There might be interesting evolutionary and population genetic implications of our findings. The negative heterosis for recombination in the hybrids may play an important role in speciation. Suppression of recombination impedes gene flow between parapatric populations and therefore accelerates their genetic divergence (Rieseberg et al., 1999; Baack, Rieseberg, 2007). A possibility of negative heterosis for recombination may also be taken into account in the calculations of the introgression time based on the size of linkage disequilibrium blocks (Payseur, 2010). They are based on the assumption that global and local recombination rates are constant over the

generations. Our data indicate that it might not be the case. We detected a decrease in recombination in the macrochromosomes of the hybrids, while the microchromosomes retained the same recombination rate because it had already been the minimal required for orderly segregation.

References

- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics*. 1999;151(4):1569-1579.
- Baack E.J., Rieseberg L.H. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007;17(6):513-518.
- Berchowitz L.E., Copenhaver G.P. Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr. Genom.* 2010;11(2):91.
- Bi Y., Ren X., Yan C., Shao J., Xie D., Zhao Z. A genome-wide hybrid incompatibility landscape between *Caenorhabditis briggsae* and *C. nigoni*. *PLoS Genet.* 2015;11(2):1-26. DOI 10.1371/journal.pgen.1004993.
- Bikchurina T., Tishakova K., Kizilova E., Romanenko S., Serdyukova N., Torgasheva A., Borodin P. Chromosome synapsis and recombination in male-sterile and female-fertile interspecies hybrids of the dwarf hamsters (Phodopus, Cricetidae). *Genes (Basel)*. 2018;9(5):227. DOI 10.3390/genes9050227.
- Chen W., Jinks-Robertson S. The role of the mismatch repair machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in yeast. *Genetics*. 1999;151(4):1299-1313. DOI 10.1093/genetics/151.4.1299.
- Chen Z.J. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nat. Rev. Genet.* 2013;14(7):471-482. DOI 10.1038/nrg3503.
- Damas J., O'Connor R., Farré M., Lenis V.P.E., Martell H.J., Mandawala A., Fowler K., Joseph S., Swain M.T., Griffin D.K., Larkin D.M. Upgrading short-read animal genome assemblies to chromosome level using comparative genomics and a universal probe set. *Genome Res.* 2017;27(5):875-884. DOI 10.1101/gr.213660.116.
- Davenport K.M., McKay S., Fahey A.G., Gill C., Murdoch B.M. Meiotic recombination differences in rams from three breeds of sheep in the US. *Cytogenet. Genome Res.* 2018;156(2):106-116. DOI 10.1159/000493175.
- Fridman E. Consequences of hybridization and heterozygosity on plant vigor and phenotypic stability. *Plant Sci.* 2015;232:35-40. DOI 10.1016/j.plantsci.2014.11.014.
- Froenicke L., Anderson L.K., Wienberg J., Ashley T. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71(6):1353-1368.
- Gibbs R.A., Taylor J.F., Van Tassel C.P., Barendse W., Eversole K.A., Gill C.A., Green R.D., ..., Bradley D.G., Da Silva M.B., Lau L.P.L., Liu G.E., Lynn D.J., Panzitta F., Dodds K.G. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*. 2009;324(5926):528-532. DOI 10.1126/science.1167936.
- Gorlov I.P., Gorlova O.Y. Cost-benefit analysis of recombination and its application for understanding of chiasma interference. *J. Theor. Biol.* 2001;213(1):1-8.
- Hartfield M., Keightley P.D. Current hypotheses for the evolution of sex and recombination. *Integr. Zool.* 2012;7(2):192-209. DOI 10.1111/j.1749-4877.2012.00284.x.
- Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(4):280-291. DOI 10.1038/35066065.
- Hunter N., Chambers S.R., Louis E.J., Borts R.H. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO J.* 1996;15(7):1726-1733. DOI 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00518.x.
- Johnston S.E., Bérénos C., Slate J., Pemberton J.M. Conserved genetic architecture underlying individual recombination rate variation in a wild population of soay sheep (*Ovis aries*). *Genetics*. 2016;203(1):583-598. DOI 10.1534/genetics.115.185553.
- Koehler K.E., Hawley R.S., Sherman S., Hassold T. Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5(Suppl_1):1495-1504. DOI 10.1093/hmg/5.Supplement_1.1495.
- Kondrashov A.S. Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *J. Hered.* 1993;84(5):372-387. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111358.
- Kong A., Barnard J., Gudbjartsson D.F., Thorleifsson G., Jonsdottir G., Sigurdardottir S., Richardsson B., Jonsdottir J., Thorgeirsson T., Frigge M.L., Lamb N.E., Sherman S., Gulcher J.R., Stefansson K. Recombination rate and reproductive success in humans. *Nat. Genet.* 2004;36:1203. DOI 10.1038/ng1445.
- Lenormand T., Otto S.P. The evolution of recombination in a heterogeneous environment. *Genetics*. 2000;156(1):423-438.
- Liehr T., Kreskowski K., Ziegler M., Piaszinski K., Rittscher K. The standard FISH procedure. In: Liehr T. (Ed.) Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Application Guide. Berlin; Heidelberg: Springer, 2017;109-118. DOI 10.1007/978-3-662-52959-1_9.
- Lipinski M.J., Froenicke L., Baysac K.C., Billings N.C., Leutenegger C.M., Levy A.M., Longeri M., Niini T., Ozpinar H., Slater M.R., Pedersen N.C., Lyons L.A. The ascent of cat breeds: Genetic evaluations of breeds and worldwide random-bred populations. *Genomics*. 2008;91(1):12-21. DOI 10.1016/j.ygeno.2007.10.009.
- Malinovskaya L.P., Tishakova K.V., Volkova N.A., Torgasheva A.A., Tsepilov Y.A., Borodin P.M. Interbreed variation in meiotic recombination rate and distribution in the domestic chicken *Gallus gallus*. *Arch. Anim. Breed.* 2019;62(2):403.
- Otto S.P., Lenormand T. Resolving the paradox of sex and recombination. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3(4):252-261.
- Otto S.P., Michalakis Y. The evolution of recombination in changing environments. *Trends Ecol. Evol.* 1998;13(4):145-151. DOI 10.1016/S0169-5347(97)01260-3.
- Paronyan I.A., Yurchenko O.P. Domestic fowl. In: USSR Dmitriev N.G., Ernst L.K. (Eds.). Animal Genetic Resources of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. FAO Animal Production and Health. 1989; Paper 65, Ch. 13:437-468.
- Payseur B.A. Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation. *Mol. Ecol. Resour.* 2010;10(5):806-820. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02883.x.
- Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J., de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 1997;5(1):66-68.
- Pigozzi M.I. The chromosomes of birds during meiosis. *Cytogenet. Genome Res.* 2016;150(2):128-138. DOI 10.1159/000453541.
- Radman M., Wagner R. Mismatch recognition in chromosomal interactions and speciation. *Chromosoma*. 1993;102(6):369-373. DOI 10.1007/BF00360400.
- Raffoux X., Bourge M., Dumas F., Martin O.C., Falque M. Role of cis, trans, and inbreeding effects on meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2018;210(4):1213-1226. DOI 10.1534/genetics.118.301644.
- Reeves A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*. 2001;44(3):439-443.
- Ren X., Li R., Wei X., Bi Y., Ho V.W.S., Ding Q., Xu Z., Zhang Z., Hsieh C.L., Young A., Zeng J., Liu X., Zhao Z. Genomic basis of recombination suppression in the hybrid between *Caenorhabditis briggsae* and *C. nigoni*. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(3):1295-1307. DOI 10.1093/nar/gkx1277.
- Rieseberg L.H., Whitton J., Gardner K. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics*. 1999;152:713-727.
- Rybnikov S., Frenkel Z., Korol A.B. The evolutionary advantage of fitness-dependent recombination in diploids: A deterministic mutation-selection balance model. *Ecol. Evol.* 2020;10(4):2074-2084. DOI 10.1002/ece3.6040.
- Sandor C., Li W., Coppeters W., Druet T., Charlier C., Georges M. Genetic variants in REC8, RNF212, and PRDM9 influence male

- recombination in cattle. *PLoS Genet.* 2012; 8(7):e1002854. DOI 10.1371/journal.pgen.1002854.
- Segura J., Ferretti L., Ramos-Onsins S., Capilla L., Farré M., Reis F., Oliver-Bonet M., Fernández-Bellón H., Garcia F., Garcia-Caldés M., Robinson T.J., Ruiz-Herrera A. Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc. Biol. Sci.* 2013; 280(1771):20131945. DOI 10.1098/rspb.2013.1945.
- Torgasheva A.A., Borodin P.M. Cytological basis of sterility in male and female hybrids between sibling species of grey voles *Microtus arvalis* and *M. levis*. *Sci. Rep.* 2016;6:36564. DOI 10.1038/srep36564.
- Trifonov V.A., Vorobieva N.N., Rens W. FISH with and without COT1 DNA. In: Liehr T. (Ed.). *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide*. Berlin; Heidelberg: Springer, 2009; 99-109. DOI 10.1007/978-3-540-70581-9_9.
- Turner J.M.A. Meiotic silencing in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 2015; 49:395-412. DOI 10.1146/annurev-genet-112414-055145.
- Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(6):a016626. DOI 10.1101/cshperspect.a016626.

ORCID ID

L.P. Malinovskaya orcid.org/0000-0002-1519-3226
K.V. Tishakova orcid.org/0000-0001-7358-3612
T.I. Bikchurina orcid.org/0000-0003-0921-7970
A.Yu. Slobodchikova orcid.org/0000-0003-1785-1939

N.Yu. Torgunakov orcid.org/0000-0003-2493-0731
A.A. Torgasheva orcid.org/0000-0002-8933-8336
Y.A. Tsepilov orcid.org/0000-0002-4931-6052
N.A. Volkova orcid.org/0000-0002-7784-2201
P.M. Borodin orcid.org/0000-0002-6717-844X

Acknowledgements. We thank Drs. A. Proskuryakova and N. Serdyukova for help with FISH. Data collection and analysis were funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant No. 0259-2021-0011 and 2019-0546 (FSUS-2020-0040)). Breeding experiments were supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No.17-29-08019). Microscopy was carried out at the Core Facility for Microscopy of Biologic Objects, SB RAS, Novosibirsk, Russia (regulation No. 3054). The funding bodies play no role in the design of the study and collection, analysis and interpretation of data and in writing the manuscript.

Author contributions. PMB and NAV designed the experiment, NAV carried out breeding experiments, LPM, KVT, AYS, NYT, prepared and analyzed chromosome preparations, PMB performed statistical analysis, PMB, AAT, and YAT wrote and edited the paper.

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

Received April 23, 2021. Revised June 15, 2021. Accepted June 16, 2021.


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

Влияние введения лептина беременным самкам мышей на развитие ожирения, вкусовые предпочтения и экспрессию генов в печени и мышцах у потомства разного пола

Е.И. Денисова¹ , М.М. Савинкова², Е.Н. Макарова¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 melomande91@gmail.com

Аннотация. Потребление сладкой и жирной пищи способствует развитию ожирения. Условия пренатального развития влияют на вкусовые предпочтения и метаболизм в зрелости, и это может по-разному проявляться в зависимости от пола. Показано, что повышение уровня лептина в крови беременных самок снижает риск развития ожирения и инсулинорезистентности у потомства, однако механизмы его действия на чувствительность к инсулину у потомства не установлены. Неизвестно также, влияет ли материнский лептин на вкусовые предпочтения. Задачей настоящего исследования было изучение влияния введения лептина беременным самкам мышей на развитие ожирения, индуцированного диетой, вкусовые предпочтения и экспрессию генов в печени и мышцах у потомства в зависимости от пола. Оценивали влияние введения лептина самкам мышей на 11, 12 и 13-й день беременности на рост и потребление пищи в стандартных условиях, развитие ожирения, выбор компонентов пищи и экспрессию генов в печени и мышцах при содержании на высококалорийной диете (стандартный корм, свиное сало, сладкое печенье) у потомства разного пола. Введение лептина беременным самкам снижало вес тела у женского потомства на стандартной диете. При содержании потомства на высококалорийной диете введение лептина тормозило развитие ожирения и снижало потребление печенья только у самцов, а также повышало потребление стандартного корма и уровень мРНК генов инсулинового рецептора и переносчика глюкозы четвертого типа в мышцах у потомства обоего пола. Результаты демонстрируют, что повышение лептина в крови беременных самок оказывает зависящее от пола влияние на метаболизм потомства, увеличивает устойчивость к развитию ожирения только у потомства мужского пола и механизм этого влияния включает в себя смещение вкусовых предпочтений в пользу сбалансированного корма и поддержание чувствительности мышц к инсулину. Ключевые слова: лептин; вкусовые предпочтения; ожирение; программирование развития.


Для цитирования: Денисова Е.И., Савинкова М.М., Макарова Е.Н. Влияние введения лептина беременным самкам мышей на развитие ожирения, вкусовые предпочтения и экспрессию генов в печени и мышцах у потомства разного пола. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):669-676. DOI 10.18699/VJ21.076

Influence of leptin administration to pregnant female mice on obesity development, taste preferences, and gene expression in the liver and muscles of their male and female offspring

E.I. Denisova¹ , M.M. Savinkova², E.N. Makarova¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 melomande91@gmail.com

Abstract. The consumption of food rich in sugar and fat provokes obesity. Prenatal conditions have an impact on taste preferences and metabolism in the adult offspring, and this impact may manifest differently in different sexes. An increase in blood leptin level in pregnant females reduces the risk of obesity and insulin resistance in the offspring, although the mechanisms mediating this effect are unknown. Neither is it known whether maternal leptin affects taste preferences. In this study, we investigated the effect of leptin administration to pregnant mice on the development of diet-induced obesity, food choice, and gene expression in the liver and muscles of the offspring with regard to sex. Leptin was administered to female mice on days 11, 12, and 13 of pregnancy. In male and female offspring, growth rate and intake of standard chow after weaning, obesity development, gene expression in the liver and muscles, and food choice when kept on a high-calorie diet (standard chow, lard, sweet cookies) were recorded. Leptin administration to pregnant females reduced body weight in the female offspring fed on the standard diet. When the offspring were given a high-calorie diet, leptin administration inhibited obesity development and reduced the consumption of cookies only in males. It also increased the consumption of standard chow

and the mRNA levels of genes for the insulin receptor and glucose transporter type 4 in the muscles of both male and female offspring. The results demonstrate that an increase in blood leptin levels in pregnant females has a sex-specific effect on the metabolism of the offspring increasing resistance to obesity only in male offspring. The mechanism underlying this effect includes a shift in food preference in favor of a balanced diet and maintenance of insulin sensitivity in muscle tissues.

Key words: leptin; taste preferences; obesity; developmental programming.

For citation: Denisova E.I., Savinkova M.M., Makarova E.N. Influence of leptin administration to pregnant female mice on obesity development, taste preferences, and gene expression in the liver and muscles of their male and female offspring. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):669-676. DOI 10.18699/VJ21.076

Введение

В настоящее время одна из основных причин широкого распространения ожирения и связанных с ним заболеваний – потребление высококалорийной пищи (Astrup et al., 2008). Выбор продуктов в значительной степени определяется вкусовыми предпочтениями (Duffy et al., 2009), и склонность к потреблению «вкусной» жирной и сладкой пищи вносит свой вклад в эпидемическое распространение ожирения (May, Dus, 2021; Spinelli, Monteleone, 2021).

Вкусовые предпочтения и предрасположенность к развитию метаболических нарушений определяются генотипом (Chmurzynska, Mlodzik, 2017; Diószegi et al., 2019) и условиями раннего развития особей (Mezei et al., 2020). Недоедание, переизбыток, ожирение и диета матерей в период беременности и лактации могут оказывать отсроченное воздействие на выбор пищи и метаболический фенотип особей в зрелости и, таким образом, повышать или уменьшать риск развития ожирения (Barker, Osmond, 1986; Ong et al., 2012; Gabory et al., 2013; Bale, 2015). Изучение факторов материнской среды, программирующих развитие потомства, и молекулярно-физиологических механизмов, которые служат мишенью для действия этих факторов, – актуальная задача, решение которой может способствовать разработке методов коррекции развития для снижения риска возникновения метаболических нарушений.

В качестве программирующего фактора материнской среды рассматривается гормон жировой ткани лептин. На лабораторных моделях продемонстрировано, что повышенный уровень лептина у матерей во время беременности снижает вес тела, повышает чувствительность к инсулину и улучшает метаболические показатели у потомства в зрелости как при сбалансированной, так и при высококалорийной диете, причем это влияние может по-разному проявляться у особей разного пола (Pennington et al., 2012; Makarova et al., 2013; Pollok et al., 2015; Talton et al., 2016; Denisova et al., 2020). Однако молекулярные механизмы программирующего действия материнского лептина остаются неизвестными.

Возможно, материнский лептин оказывает отсроченное влияние на метаболические процессы в печени и мышцах у потомства. Программирование развития связывают с изменением экспрессии генов у потомства под влиянием эпигенетических модификаций, вызванных факторами материнской среды (Laker et al., 2014). Не установлено, влияет ли материнский лептин на экспрессию генов, кодирующих регуляторные факторы и ферменты углеводного и жирового обмена в печени и мышцах у потомства. Кроме того, материнский лептин может вносить свой вклад в

снижение склонности к развитию алиментарного ожирения у потомства через влияние на выбор пищи (Pollock et al., 2015), но этот вопрос мало изучен. Неизвестно, на потребление каких компонентов пищи (жиры, белки, сахара) может влиять материнский лептин, зависит ли программирующее влияние материнского лептина от пола потомства и каковы механизмы, опосредующие программирующее влияние материнского лептина на выбор пищи у потомства.

Задачей нашего исследования было изучение влияния введения лептина беременным самкам мышей на метаболические показатели, вкусовые предпочтения и экспрессию генов в печени и мышцах у потомства в зависимости от пола.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты проводили в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами (DIRECTIVE 2004/10/EC) и российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными (ГОСТ 33215-2014).

Настоящая работа выполнена на мышах линии C57BL/6J из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали в условиях 12-часового светового дня и свободного доступа к воде и специализированному корму для грызунов для конвенционального содержания и разведения (АО «БиоПро», Новосибирск, Россия). Половозрелых самок скрещивали с самцами той же линии, покрытие регистрировали по наличию вагинальной пробки. День обнаружения пробки считали днем 0 беременности. На 11, 12 и 13-й день беременности самкам мышей вводили рекомбинантный мышинный лептин (recombinant murine leptin, Reprotech, Великобритания) подкожно в область холки в дозе 2 мг/кг либо физиологический раствор в соответствующем объеме. Самок ежедневно взвешивали и оценивали количество съеденного корма. Регистрировали дату родов и размер помета. В больших пометах (больше 7 особей) количество детенышей доводили до 7 в первый день после рождения (день 0), из пометов выводили новорожденных мышат наименьшего веса. Самку и детенышей взвешивали в день 0, 7, 14, 21, 28 после родов. На 28-й день жизни потомство отсаживали от матерей.

Для оценки влияния материнского лептина на метаболические показатели потомства в постнатальный период жизни одного самца и одну самку из каждого помета переводили на одиночное содержание. Женское потомство самок, получавших физиологический раствор, составляло 6, мужское потомство – 5 мышей, женское

потомство самок, получавших лептин, – 8, мужское потомство – 8 мышей. Животных еженедельно взвешивали, определяли количество съеденного за неделю корма. По достижении 10-недельного возраста в рацион мышей была введена сладко-жирная пища: к стандартному корму добавили сладкое сдобное печенье и свиное сало. Мышей содержали на такой диете в течение 10 нед, еженедельно взвешивали, меняли в неделю: стандартный корм один раз, сало и печенье – три раза. Подсчитывали: количество съеденных за сутки стандартного корма, сала и печенья, количество потребленной с этими видами пищи энергии (сало – 8 ккал/г, стандартный корм – 2.5 ккал/г, печенье – 4.58 ккал/г), общее количество энергии, отнесенное к весу тела, долю энергии, потребленную с каждым видом пищи, от общей энергии в процентах.

По окончании эксперимента мышей умерщвляли декапитацией, образцы мышц и печени помещали в жидкий азот для дальнейшей оценки экспрессии генов в этих тканях.

Диета. Стандартный корм АО «БиоПро» (Новосибирск, Россия). Состав: двухкомпонентная зерновая смесь, молочные компоненты, высокобелковые компоненты (растительные и животные белки), масло растительное, аминокислоты, органические кислоты, витаминно-минеральный комплекс, клетчатка. Сырой протеин – 22 %. Энергетическая ценность – 2500 ккал.

Свиное сало и печенье были куплены в продуктовом магазине. Пищевая ценность печенья на 100 г продукта: белки – 6.9 г, жиры – 18.4 г, углеводы – 71.8 г, энергетическая ценность – 458 ккал. Свиное сало – подкожный слой жира – на 100 г продукта: жиры – 94.2 г, белки – 1.8 г, углеводы – 0 г, энергетическая ценность продукта – 800 ккал.

Оценка уровня мРНК генов. Уровень мРНК генов оценивали методом относительной оценки с помощью обратной транскрипции и полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Из образцов тканей выделяли РНК с использованием реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA («Евроген», Москва, Россия) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV обратной транскриптазы («Евроген») и олиго(dT) праймера по протоколу производителя.

Полимеразно-цепную реакцию осуществляли согласно инструкции с использованием готовой реакционной смеси qPCRmix-HS LowROX («Евроген») и реагентов фирмы Applied Biosystems: TaqMan Gene Expression Assay для генов мыши: *Insr*, Mm01211875_m1; *Fgf21*, Mm00840165_g1; *G6pc*, Mm00839363_m1; *Gck*, Mm00439129_m1; *Ppargc1a*, Mm01208835_m1; *Pklr*, Mm00443090_m1; *Acaca*, Mm01304257_m1; *Pnpla2*, Mm00503040_m1; *Igf*, Mm00439560_m1; *Slc2a4*, Mm00436615_m1; *Actb*, Mm00607939_s1.

В печени оценивали экспрессию генов инсулинового рецептора (*InsR*), глюкокиназы (*Gck*), пируваткиназы (*Pklr*), глюкозо-6-фосфатазы (*G6pc*), липазы триглицеридов (ATGL – *Pnpla2*), ацетил-Ко-А-карбоксилазы (*Acaca*), коактиватора 1-альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, гамма (PPARGC1A) (*Pgc1*), фактора роста фибробластов 21 (*Fgf21*), инсулиноподобного фактора роста 1 (*Igf1*), в мышцах – переносчика глюкозы

GLUT4 (*Slc2a4*) и *InsR*. В качестве референсного гена был бета-актин (*Actb*).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Для определения групповых средних и ошибки среднего использовали описательную статистику. Данные по весу тела и потреблению пищи у беременных самок и их потомства изучали с применением дисперсионного анализа с повторными измерениями (repeated measures ANOVA) с оценкой влияния факторов «экспериментальное воздействие» (введение лептина или физиологического раствора) и «день беременности» для беременных самок; факторов «пол» (самцы или самки), «эксперимент» (введение беременным матерям лептина или физиологического раствора) и «возраст» (с 4-й по 10-ю нед) для потомства при содержании на стандартной диете, факторов «пол», «эксперимент» и «возраст» (с 10-й по 20-ю нед) – для потомства при содержании на сладко-жирной диете с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью апостериорного критерия (post-hoc) Newman–Keuls. Для оценки влияния пола и пренатального воздействия на экспрессию генов в печени и мышцах использовали двухфакторный дисперсионный анализ с градациями факторов «пол» и «эксперимент». Межгрупповые различия оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Результат на графиках представлен в виде средних значений ± ошибка среднего.

Результаты

Влияние введения лептина на потребление пищи и вес тела самок в период беременности

Введение лептина самкам мышей на 11, 12 и 13-й день беременности не оказало достоверного влияния на вес их тела (рис. 1, а), но снизило потребление пищи на 20 % ($p < 0.001$, repeated measures ANOVA, взаимодействие факторов «эксперимент» × «день беременности») (см. рис. 1, б). Анорексигенное действие лептина длилось не более суток, так как на вторые сутки после последнего введения потребление пищи у самок, получавших лептин или физиологический раствор, выровнялось.

Влияние введения лептина самкам мышей на вес тела и потребление стандартного корма у потомства разного пола

В период лактации потомки мужского и женского пола не отличались друг от друга по весу, введение лептина беременным самкам не оказало достоверного влияния на вес потомства (данные не приведены).

Динамика изменения веса после отъема от матерей в период содержания на стандартном корме различалась у самцов и самок. За первую неделю содержания на стандартном корме самцы обогнали самок по весу тела и весили больше на протяжении всего эксперимента ($p < 0.0001$, $F_{1,24} = 30.32$, «пол», «пол» × «возраст» $p < 0.00001$, $F_{6,144} = 8.23$, repeated measures ANOVA). В связи с этим был проведен анализ repeated measures ANOVA с градациями факторов «эксперимент» и «возраст» (недели 4–10) по отдельности у самцов и самок. У самцов анализ не выявил влияния фактора «эксперимент», тогда как у самок установлено достоверное взаимодействие факторов

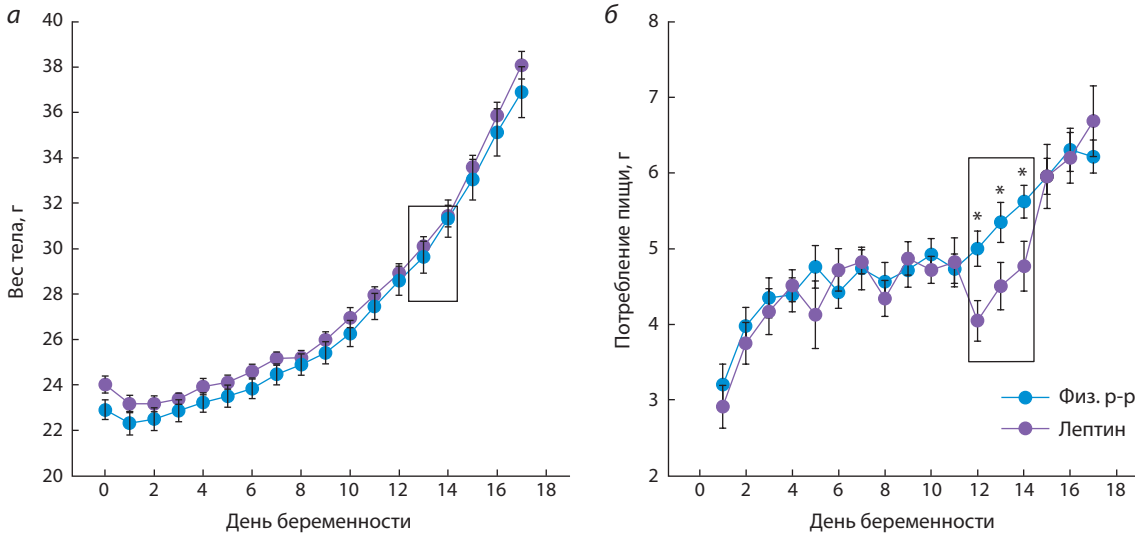


Рис. 1. Влияние введения лептина самкам мышей на 11, 12 и 13-й день беременности на вес тела (а) и потребление пищи (б). Здесь и далее данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. * $p < 0.05$, *t*-тест Стьюдента.

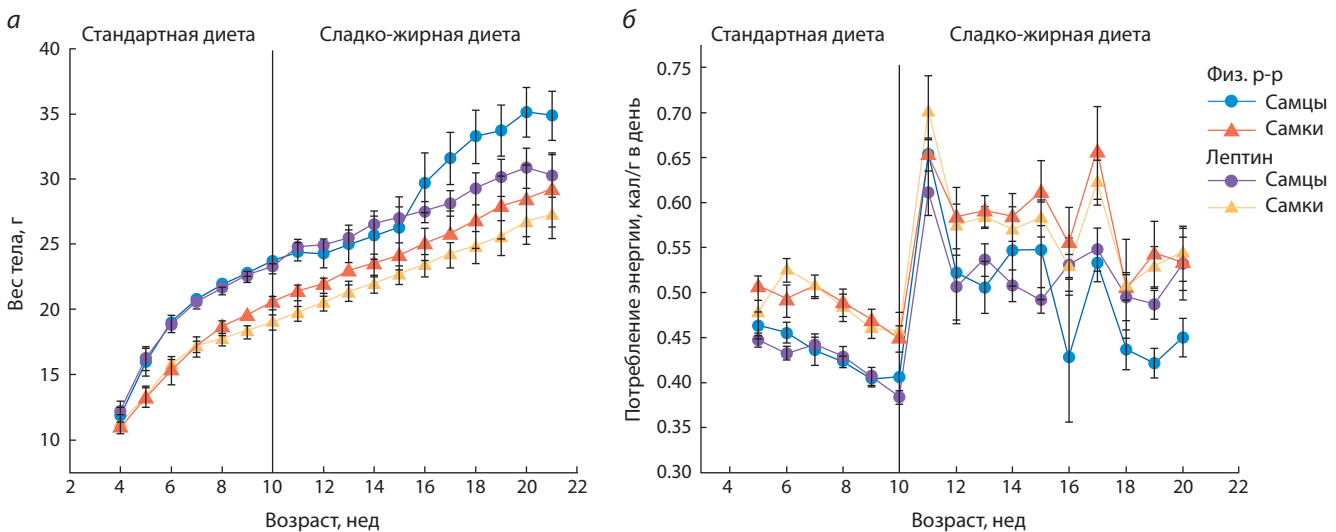


Рис. 2. Влияние введения лептина беременным самкам мышей на вес тела (а) и отношение потребленной энергии к весу тела (б) у потомства мужского и женского пола при содержании на стандартной и сладко-жирной диете.

«возраст» \times «эксперимент» ($p < 0.05$, $F_{6,72} = 2.35$, repeated measures ANOVA).

Потомство мужского пола, матерям которых вводили лептин, не отличалось по весу от потомков мужского пола контрольных матерей при одиночном содержании на стандартной диете (в возрасте 4–10 нед). Самки, матерям которых вводили лептин, не отличались по весу от потомства женского пола контрольных матерей вплоть до возраста достижения половой зрелости (8 нед), а затем начали отставать по весу от самок, рожденных в контрольной группе, и эта тенденция сохранялась на протяжении всего эксперимента (рис. 2, а). Самки потребляли с пищей больше энергии на единицу массы тела, чем самцы ($p < 0.0001$, $F_{1,24} = 34.1$, фактор «пол», repeated measures ANOVA), введение лептина матерям в период беременности не оказало влияния на этот показатель (см. рис. 2, б).

Вес тела и потребление пищи у потомства разного пола при содержании на сладко-жирной пище

При анализе данных по весу тела по отдельности у самцов и самок, получавших сладко-жирную пищу в течение 10 нед, repeated measures ANOVA не выявляет влияния фактора «эксперимент» у женского потомства, но показывает достоверное взаимодействие факторов «возраст» \times «эксперимент» ($p < 0.01$, $F_{9,90} = 2.82$, repeated measures ANOVA) у мужского потомства. В течение первых пяти недель содержания на сладко-жирной пище мужское потомство самок, получавших физиологический раствор либо лептин, не различалось по весу тела, но затем самцы, рожденные в контрольной группе, стали резко набирать вес и обогнали по весу тела самцов, рожденных в группе самок, получавших лептин во время беременности (см. рис. 2, а). У самок, рожденных в группах контрольных и

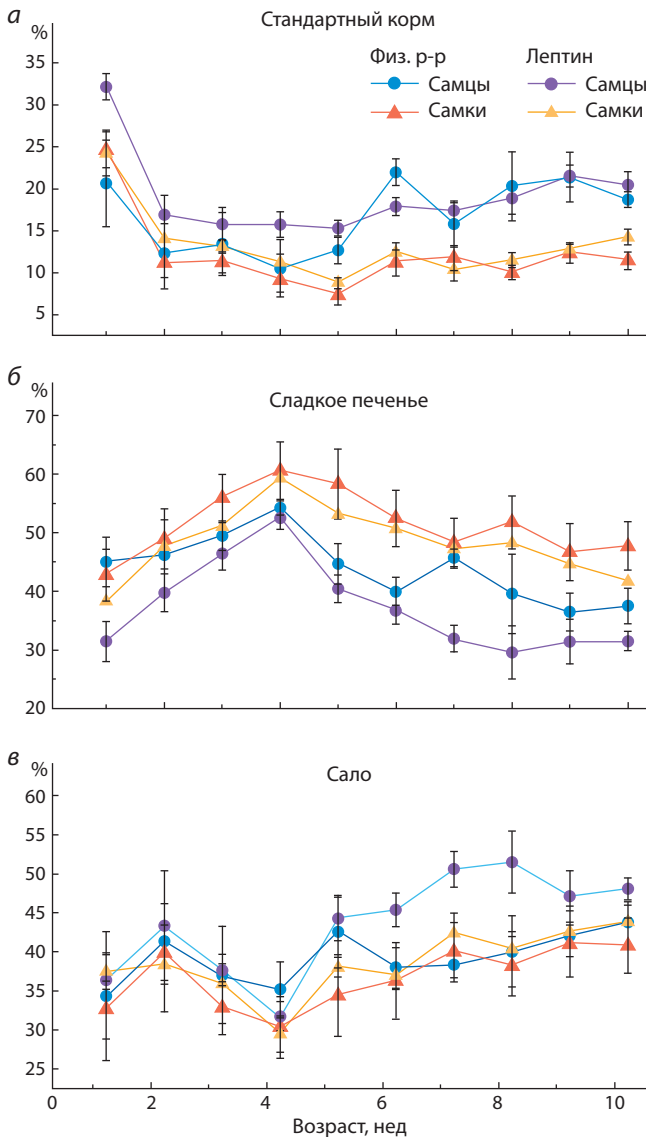


Рис. 3. Влияние введения лептина беременным самкам мышей на долю энергии (%), потребленной со стандартным кормом, печеньем и салом, у потомства мужского и женского пола при содержании на сладко-жирной диете.

получавших лептин матерей, различия в весе, возникшие при содержании на стандартной диете, сохранились и при содержании на сладко-жирной пище (см. рис. 2, а).

Потребление энергии, отнесенное к весу тела, резко возросло при добавлении сала и печени к стандартному корму (см. рис. 2, б) и оставалось повышенным у самок по сравнению с самцами ($p < 0.01$, $F_{1,22} = 9.06$, фактор «пол», repeated measures ANOVA).

Для оценки влияния материнского лептина на вкусовые предпочтения у потомства оценивали вклад каждого из компонентов потребленной пищи (стандартный корм, сало, печень) в общее потребление энергии. Наблюдались выраженные половые различия по потреблению стандартного корма (у самцов выше, чем у самок, $p < 0.001$, $F_{1,22} = 34$, фактор «пол») и печени (у самцов ниже, чем у самок, $p < 0.01$, $F_{1,22} = 12.2$, фактор «пол»). По потреблению сала самцы и самки достоверно не различались (рис. 3).

Введение лептина беременным самкам мышей оказало влияние на вкусовые предпочтения у потомства, и это влияние было более выражено у самцов. Материнский лептин повысил вклад стандартного корма в общее потребление энергии у мышей обоего пола в первые пять недель содержания на сладко-жирной пище ($p < 0.05$, $F_{1,22} = 4.03$, фактор «эксперимент», repeated measures ANOVA), но у самцов в большей степени, чем у самок (см. рис. 3, а), понизил вклад печени в общее потребление энергии только у самцов в течение всего периода содержания на сладко-жирной пище ($p < 0.05$, $F_{1,22} = 5.3$, фактор «эксперимент», repeated measures ANOVA, см. рис. 3, б), но не оказал влияния на потребление сала вне зависимости от пола (см. рис. 3, в).

Экспрессия генов, участвующих в углеводно-жировом обмене, в печени и мышцах

В печени оценивали экспрессию генов, влияющих на чувствительность к инсулину (*InsR*), генов ферментов гликолиза (*Gck*, *Pklr*), глюконеогенеза (*G6pc*), липолиза (adipose triglyceride lipase – *Pnpla2*), липогенеза (*Acaca*), а также генов, кодирующих регуляторные факторы, влияющие на метаболические процессы в печени (*Pgc1*) или

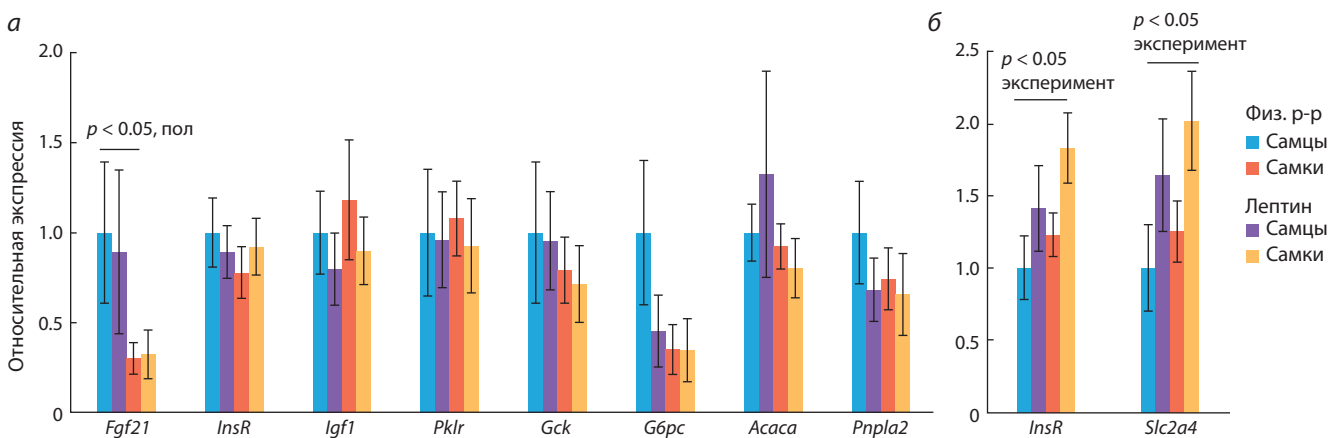


Рис. 4. Влияние введения лептина беременным самкам мышей на экспрессию генов в печени (а) и мышцах (б) у потомства мужского и женского пола при содержании на сладко-жирной диете.

Влияние введения лептина беременным самкам мышей на вес печени и биохимические показатели крови у потомков мужского и женского пола при содержании на сладкой-жирной диете

Показатель	Самцы		Самки	
	Контроль	Лептин	Контроль	Лептин
Холестерин, мМ	8.16 ± 1.18	8.07 ± 0.69	4.27 ± 0.43	3.55 ± 0.19
Глюкоза, мМ	15.47 ± 2.80	11.13 ± 1.23	10.42 ± 1.10	11.99 ± 1.43
Триглицериды, мМ	0.34 ± 0.07	0.50 ± 0.13	0.37 ± 0.07	0.20 ± 0.04
Вес печени, г	1.39 ± 0.03	1.42 ± 0.02	1.35 ± 0.05	1.26 ± 0.05

Холестерин, $p < 0.001$, самцы по сравнению с самками, 2-way ANOVA.

вовлеченные в регуляцию углеводно-жирового обмена на уровне целого организма (*Fgf21*, *Igf1*). Введение лептина беременным самкам мышей не оказало влияния на экспрессию исследованных генов в печени. Обнаружено достоверное влияние пола на экспрессию гена фактора роста фибробластов 21 (*Fgf21*): у самок был более низкий уровень мРНК *Fgf21* по сравнению с самцами ($p < 0.05$, $F_{1,18} = 5.4$, 2-way ANOVA, рис. 4, а).

В мышцах у мышей обоего пола введение лептина матерям сопровождалось повышением экспрессии генов инсулинового рецептора (*Insr*) и инсулин-зависимого переносчика глюкозы *Slc2a4* ($p < 0.05$, 2-way ANOVA, для обоих случаев, см. рис. 4, б), что свидетельствует о повышении чувствительности мышц к инсулину.

Метаболические показатели

Самки, по сравнению с самцами, обладали меньшим весом печени ($p = 0.051$, $F_{1,18} = 4.35$, ANOVA 2-way) и сниженными концентрациями холестерина в крови ($p < 0.001$, $F_{1,18} = 49.82$, ANOVA 2-way) и не отличались от самцов по концентрациям глюкозы и триглицеридов в плазме крови (см. таблицу). Введение лептина матерям в период беременности не оказало влияния на изученные метаболические показатели.

Обсуждение

В исследованиях, проведенных ранее на мышах и крысах, показано, что повышение уровня лептина в крови беременных самок увеличивает устойчивость к развитию алиментарного ожирения у потомства и программирующее действие материнского лептина может зависеть от пола потомства (Stocker et al., 2007; Makarova et al., 2013). В данной работе проверяли предположение о том, не связано ли влияние материнского лептина на склонность к развитию алиментарного ожирения у потомства с его влиянием на вкусовые предпочтения и экспрессию генов в печени и мышечной ткани. Для проверки этого предположения самкам мышей вводили лептин в минимальной дозе, вызывающей физиологический ответ (Enrigi et al., 2007), в период с 11-го по 13-й день беременности и оценивали вкусовые предпочтения, метаболические признаки и экспрессию генов в печени и мышцах у потомства обоего пола. Этот период беременности был выбран потому, что между 11-м и 12-м днями начинается процесс половой дифференцировки у мышей (Hacker et al., 1995) и на 12-й день приходится пик пролиферации

предшественников тех нейронов гипоталамуса, которые в дальнейшем будут регулировать потребление и расход энергии (Ishii, Bouret, 2012).

Ранее мы обнаружили, что однократное введение лептина самкам мышей на 12-й день беременности оказывает программирующее полоспецифическое влияние на метаболизм потомства (Denisova et al., 2020). Результаты работы показывают, что в этот период беременные мыши чувствительны к лептину, о чем свидетельствует снижение в потреблении пищи при введении лептина. На более поздних стадиях беременности чувствительность к лептину у мышей может понижаться в связи со значительным ростом уровня лептина в крови в последней трети беременности (Makarova et al., 2010).

Введение лептина беременным самкам замедлило развитие алиментарного ожирения у потомства мужского пола, что согласуется с предыдущими исследованиями, в которых было продемонстрировано, что введение лептина самкам крыс с 14-го дня беременности и в течение всего периода лактации (Stocker et al., 2007) и самкам мышей – в конце беременности (Makarova et al., 2013) предотвращало у мужского потомства развитие алиментарного ожирения на высококалорийной диете. Однократное введение лептина на 12-й день беременности устраняло наличие гипергликемии у потомков с ожирением и на уровне тенденции снижало темпы развития алиментарного ожирения у мужского потомства (Denisova et al., 2020). Однако, в отличие от данных, полученных в этой работе, однократное введение лептина самкам мышей на 12-й день беременности не оказывало влияния на темпы роста потомства женского пола на стандартной диете. Возможно, при введении лептина только на 12-й день беременности не были захвачены начальные периоды половой дифференцировки, которые могут быть чувствительными к его действию.

Результаты исследования показывают, что материнский лептин может влиять на вкусовые предпочтения у потомства и это влияние может быть одной из причин повышения устойчивости мужского потомства к развитию алиментарного ожирения при свободном выборе между разными компонентами высококалорийной диеты. Это новые, впервые полученные данные. Самки потребляли больше печенья и меньше стандартного корма, чем самцы. Данные согласуются с хорошо установленным на разных видах животных фактом о половых различиях в потреблении сладкого (Valenstein et al., 1967; Zucker et al., 1972;

Buczek et al., 2020). Причины этих различий ищут во влиянии пола на центральные системы регуляции энергетического гомеостаза и на системы вознаграждения (Sinclair et al., 2017; Buczek et al., 2020).

Наши результаты впервые указывают на то, что гормон печени FGF21 может быть вовлечен в зависящую от пола регуляцию вкусовых предпочтений. У самок экспрессия *Fgf21* в печени была существенно ниже, чем у самцов, что совпадает с полученными ранее данными (Bazhan et al., 2019). Уровень FGF21 в крови коррелирует с интенсивностью экспрессии его гена в печени и при ожирении повышен у самцов (Bazhan et al., 2019). Показано, что FGF21 увеличивает потребление белков (Larson et al., 2019) и уменьшает потребление сахаров (Talukdar et al., 2016), и повышенный уровень FGF21 у самцов, по сравнению с самками, может быть причиной возросшего потребления стандартного белкового корма и пониженного потребления сладкого печенья у самцов по отношению к самкам.

Введение лептина беременным самкам снизило потребление печенья и увеличило потребление стандартного корма у потомства. Сходные результаты были получены К.Е. Pollock с коллегами (2015), обнаружившими на мышцах, что гиперлептинемия у матерей в период беременности сдвигает вкусовые предпочтения у потомства в пользу большего потребления стандартной диеты по отношению к сладкой.

Механизмы этих материнских воздействий неизвестны, и наши результаты свидетельствуют, что они не связаны с влиянием на экспрессию *Fgf21* в печени, поскольку введение лептина беременным самкам не повлияло на уровень мРНК FGF21 в печени у потомства. Возможно, механизм программирующего действия материнского лептина связан с влиянием на системы мотивации и вознаграждения, а также системы регуляции пищевого поведения у потомства.

Установлено, что факторы материнской среды во время беременности и лактации могут воздействовать на системы мотивации и вознаграждения у потомства, представленные эндогенными опиоидами, дофамином и серотонином (Grissom et al., 2014). Характер влияния лептина на становление систем регуляции пищевого поведения требует дальнейшего изучения, и наши результаты указывают на то, что период эмбрионального развития с 11-го по 13-й день представляет собой пластическое окно для воздействия факторов материнской среды на формирование этих систем.

Ранее было выявлено, что повышенный уровень лептина во время беременности у мышшей повышает чувствительность потомства к инсулину, независимо от рациона (Talton et al., 2016). Мы не обнаружили влияния материнского лептина на экспрессию генов печени, участвующих в метаболизме глюкозы (*InsR*, *Igf1*), в окислении жирных кислот (*Fgf21*), гликолизе (*Gck*) и глюконеогенезе (*Pklr*, *G6pc*), а также генов липолиза (*Atgl*) и липогенеза (*Acaca*). Полученные результаты демонстрируют, что сенситизирующее влияние материнского лептина к действию инсулина может осуществляться через воздействие на экспрессию генов, регулирующих метаболизм глюкозы в мышцах у потомства. Экспрессия генов инсулинового рецептора (*Insr*) и инсулинозависимого переносчика

глюкозы (*Slc2a4*) в мышцах была выше у потомства самок, получавших лептин, по сравнению с потомством контрольных самок. По-видимому, материнский лептин способствует поддержанию чувствительности к инсулину при потреблении сладко-жирной пищи у потомства, что также может противодействовать развитию ожирения.

Молекулярные механизмы, опосредующие программирующее действие материнского лептина, не изучены. Неизвестно, проникает ли материнский лептин через плаценту в кровотоки плодов. Однако при значительном повышении уровня лептина в крови беременных самок, он, по-видимому, может попадать через плаценту, поскольку ранее мы обнаружили многократное повышение уровня лептина в плазме крови как у самок, так и у плодов через один час после его введения мышам в конце беременности (Denisova, Makarova, 2018). Кроме того, установлено, что у мышшей введение лептина снижает вес плодов и плацент (Yamashita et al., 2001; Denisova et al., 2020), причем плаценты плодов мужского и женского пола по-разному отвечают на введение лептина: у плодов мужского пола снижается вес плацент, у плодов женского пола – экспрессия переносчиков глюкозы в плацентах (Denisova et al., 2020). Полоспецифическое программирующее влияние материнского лептина на метаболизм потомства может быть опосредовано его неодинаковым воздействием на функцию плацент у плодов разного пола. Механизмы, опосредующие программирующее действие лептина на развитие плодов, требуют дальнейшего изучения.

Заключение

Таким образом, в работе показано, что трехкратное введение лептина матерям на 11, 12 и 13-й день беременности замедлило развитие алиментарного ожирения у самцов, сдвинуло вкусовые предпочтения в пользу потребления сбалансированного корма и повысило экспрессию генов инсулинового рецептора и инсулинозависимого переносчика глюкозы в мышцах у мышшей обоего пола. Полученные результаты позволяют предполагать, что материнский лептин увеличивает устойчивость к развитию алиментарного ожирения у потомства через влияние на вкусовые предпочтения и чувствительность мышц к инсулину.

Список литературы / References

- Astrup A., Dyerberg J., Sellen M., Stender S. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes. Rev.* 2008;9(1):48-52. DOI 10.1111/j.1467-789X.2007.00438.x.
- Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16(6):332-344. DOI 10.1038/nrn3818.
- Barker D.J., Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 1986;1(8489):1077-1081. DOI 10.1016/s0140-6736(86)91340-1.
- Bazhan N., Jakovleva T., Balybina N., Dubinina A., Denisova E., Feofanova N., Makarova E. Sex dimorphism in the *Fgf21* gene expression in liver and adipose tissues is dependent on the metabolic condition. *OnLine J. Biol. Sci.* 2019;19(1):28-36. DOI 10.3844/ojbsci.2019.28.36.
- Buczek L., Migliaccio J., Petrovich G.D. Hedonic eating: sex differences and characterization of orexin activation and signaling. *Neuroscience.* 2020;436:34-45. DOI 10.1016/j.neuroscience.2020.04.008.

- Chmurzynska A., Młodzik M.A. Genetics of fat intake in the determination of body mass. *Nutr. Res. Rev.* 2017;30(1):106-117. DOI 10.1017/S0954422417000014.
- Denisova E.I., Kozhevnikova V.V., Bazhan N.M., Makarova E.N. Sex-specific effects of leptin administration to pregnant mice on the placenta and the metabolic phenotypes of offspring. *FEBS Open Bio.* 2020;10(1):96-106. DOI 10.1002/2211-5463.12757.
- Denisova E., Makarova E. Sex-specific effect of leptin on gene expression in placentas and fetal tissues in mice. In: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2018) The Eleventh International Conference (20–25 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia); Abstracts/Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. DOI 10.18699/BGRSSB-2018-174.
- Diószegi J., Llanaj E., Ádány R. Genetic background of taste perception, taste preferences, and its nutritional implications: a systematic review. *Front. Genet.* 2019;10:1272. DOI 10.3389/fgene.2019.01272.
- Duffy V.B., Hayes J.E., Sullivan B.S., Faghri P. Surveying food and beverage liking: a tool for epidemiological studies to connect chemosensation with health outcomes. *Ann. NY Acad. Sci.* 2009;1170:558-568. DOI 10.1111/j.1749-6632.2009.04593.x.
- Enriori P.J., Evans A.E., Sinnayah P., Jobst E.E., Tonelli-Lemos L., Billes S.K., Glavas M.M., Grayson B.E., Perello M., Nillni E.A., Grove K.L., Cowley M.A. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab.* 2007;5(3):181-194. DOI 10.1016/j.cmet.2007.02.004.
- Gabory A., Roseboom T.J., Moore T., Moore L.G., Junien C. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol. Sex Differ.* 2013;4(1):5. DOI 10.1186/2042-6410-4-5.
- Grissom N.M., Lyde R., Christ L., Sasson I.E., Carlin J., Vitins A.P., Simmons R.A., Reyes T.M. Obesity at conception programs the opioid system in the offspring brain. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(4):801-810. DOI 10.1038/npp.2013.193.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P., Lovell-Badge R. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development.* 1995;121(6):1603-1614.
- Ishii Y., Bouret S.G. Embryonic birthdate of hypothalamic leptin-activated neurons in mice. *Endocrinology.* 2012;153(8):3657-3667. DOI 10.1210/en.2012-1328.
- Laker R.C., Lillard T.S., Okutsu M., Zhang M., Hoehn K.L., Connelly J.J., Yan Z. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the *Pgc-1 α* gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes.* 2014;63(5):1605-1611. DOI 10.2337/db13-1614.
- Larson K.R., Chaffin A.T., Goodson M.L., Fang Y., Ryan K.K. Fibroblast growth factor-21 controls dietary protein intake in male mice. *Endocrinology.* 2019;160(5):1069-1080. DOI 10.1210/en.2018-01056.
- Makarova E.N., Chepeleva E.V., Panchenko P.E., Bazhan N.M. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;305(11):R1268-R1280. DOI 10.1152/ajpregu.00162.2013.
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Shevchenko A.Y., Bazhan N.M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in A(y)/a mice. *Acta Physiol. (Oxf.).* 2010;198(2):169-177. DOI 10.1111/j.1748-1716.2009.02046.x.
- May C.E., Dus M. Confection confusion: interplay between diet, taste, and nutrition. *Trends Endocrinol. Metab.* 2021;32(2):95-105. DOI 10.1016/j.tem.2020.11.011.
- Mezei G.C., Ural S.H., Hajnal A. Differential effects of maternal high fat diet during pregnancy and lactation on taste preferences in rats. *Nutrients.* 2020;12(11):3553. DOI 10.3390/nu12113553.
- Ong Z.Y., Gugusheff J.R., Muhlhausler B.S. Perinatal overnutrition and the programming of food preferences: pathways and mechanisms. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2012;3(5):299-308. DOI 10.1017/S204017441200030X.
- Pennington K.A., Harper J.L., Sigafos A.N., Beffa L.M., Carleton S.M., Phillips C.L., Schulz L.C. Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice. *Endocrinology.* 2012;153(9):4556-4567. DOI 10.1210/en.2012-1119.
- Pollock K.E., Stevens D., Pennington K.A., Thaisrivongs R., Kaiser J., Eilersieck M.R., Miller D.K., Schulz L.C. Hyperleptinemia during pregnancy decreases adult weight of offspring and is associated with increased offspring locomotor activity in mice. *Endocrinology.* 2015;156(10):3777-3790. DOI 10.1210/en.2015-1247.
- Sinclair E.B., Hildebrandt B.A., Culbert K.M., Klump K.L., Sisk C.L. Preliminary evidence of sex differences in behavioral and neural responses to palatable food reward in rats. *Physiol. Behav.* 2017;176:165-173. DOI 10.1016/j.physbeh.2017.03.042.
- Spinelli S., Monteleone E. Food preferences and obesity. *Endocrinol. Metab. (Seoul).* 2021;36(2):209-219. DOI 10.3803/EnM.2021.105.
- Stocker C.J., Wargent E., O'Dowd J., Cornick C., Speakman J.R., Arch J.R., Cawthorne M.A. Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292(5):1810-1818. DOI 10.1152/ajpregu.00676.2006.
- Talton O.O., Pennington K.A., Pollock K.E., Batesa K., Mad L., Eilersieck M.R., Schulz L.C. Maternal hyperleptinemia improves offspring insulin sensitivity in mice. *Endocrinology.* 2016;157(7):2636-2648. DOI 10.1210/en.2016-1039.
- Talukdar S., Owen B.M., Song P., Hernandez G., Zhang Y., Zhou Y., Scott W.T., Paratala B., Turner T., Smith A., Bernardo B., Müller C.P., Tang H., Mangelsdorf D.J., Goodwin B., Kliever S.A. FGF21 Regulates sweet and alcohol preference. *Cell Metab.* 2016;23(2):344-349. DOI 10.1016/j.cmet.2015.12.008.
- Valenstein E.S., Cox V.C., Kakolewski J.W. Further studies of sex differences in taste preferences with sweet solutions. *Psychol. Rep.* 1967;20(3):1231-1234. DOI 10.2466/pr0.1967.20.3c.1231.
- Yamashita H., Shao J., Ishizuka T., Klepcyk P.J., Muhlenkamp P., Qiao L., Hoggard N., Friedman J.E. Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous *Lepr(db/+)* mice: effects on placental leptin and fetal growth. *Endocrinology.* 2001;142(7):2888-2897. DOI 10.1210/endo.142.7.8227.
- Zucker I., Wade G.N., Ziegler R. Sexual and hormonal influences on eating, taste preferences, and body weight of hamsters. *Physiol. Behav.* 1972;8(1):101-111. DOI 10.1016/0031-9384(72)90135-7.

ORCID ID

E.I. Denisova orcid.org/0000-0001-8696-8781
M.M. Savinkova orcid.org/0000-0002-6557-553X
E.N. Makarova orcid.org/0000-0002-6417-9893

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-315-90071) и бюджетного проекта № 0259-2021-0014.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.02.2021. После доработки 24.05.2021. Принята к публикации 17.06.2021.

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

Генотипирование образцов картофеля коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН с применением ДНК-маркеров генов устойчивости к фитопатогенам

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

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

² Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, пос. Краснообск, Новосибирская область, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
✉ totsky@bionet.nsc.ru

Аннотация. Значительный ущерб урожаю картофеля наносят рак картофеля (болезнь, вызываемая патогенным грибом *Synchytrium endobioticum*) и золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis*), паразитирующая на корнях растения-хозяина. Оба этих фактора являются объектами внешнего и внутреннего карантина в Российской Федерации, и каждый сорт, регистрируемый в РФ, проходит проверку на устойчивость к наиболее распространенным их расам и патотипам. Основным методом борьбы с подобными заболеваниями – выведение устойчивых сортов. Важным этапом в этом процессе является отбор устойчивых генотипов из популяции и оценка устойчивости гибридов, полученных при скрещиваниях во время селекционного процесса. Проведение постоянной фенотипической оценки связано с рядом трудностей, а именно: не всегда есть возможность работать с патогенами, сама фенотипическая оценка очень затратная и трудоемкая. Однако применение ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости, может значительно ускорить и удешевить процесс. Целью исследования было проведение скрининга коллекции картофеля «ГенАгро» (ИЦиГ СО РАН) с использованием ПЦР-маркеров, разработанных для диагностики устойчивости к золотистой картофельной нематоде и раку картофеля. Семьдесят три образца из коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН были генотипированы ДНК-маркерами 57R, CP113, Gro1-4, сцепленными с устойчивостью к нематоде, и маркером NL25 для устойчивости к раку. Результаты генотипирования сопоставлены с уровнем восприимчивости образцов к болезням. Высокий уровень корреляции (коэффициент корреляции Спирмена Spearman $R = 0.722008$, $p = 0.000000$, $p < 0.05$) между устойчивостью и наличием диагностического фрагмента был показан только для маркера 57R. Диагностическая эффективность маркера 57R составила 86.11 %. Данный маркер можно успешно использовать для поиска устойчивых генотипов и проведения маркер-ориентированной селекции. Для остальных маркеров достоверных корреляций не выявлено. Диагностическая эффективность применения маркера CP113 равнялась всего 44.44 %, а коэффициент корреляции Спирмена (Spearman $R = -0.109218$, $p = 0.361104$, $p < 0.05$) показывал отсутствие значимой корреляции между устойчивостью и ДНК-маркером. Диагностическая эффективность маркера NL25 составила 61.11 %. Значимой корреляции между маркером NL25 и устойчивостью не обнаружено (Spearman $R = -0.017946$, $p = 0.881061$, $p < 0.05$). Использование этих маркеров для поиска устойчивых образцов нецелесообразно. Ключевые слова: золотистая картофельная нематода; рак картофеля; картофель; ДНК-маркеры 57R; NL25; CP113; Gro1-4.

Для цитирования: Тоцкий И.В., Розанова И.В., Сафонова А.Д., Батов А.С., Гуреева Ю.А., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В. Генотипирование образцов картофеля коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН с применением ДНК-маркеров генов устойчивости к фитопатогенам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):677-686. DOI 10.18699/VJ21.077

Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens

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

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

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

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

Abstract. Wart (a disease caused by *Synchytrium endobioticum*) and golden cyst potato nematode (*Globodera rostochiensis*), which parasitize the roots of the host plant, cause significant damage to potato crop. Both of these disease factors are quarantined in the Russian Federation, and each registered variety is tested for resistance to their most common races and pathotypes. The main method of opposing such diseases is by the development of resistant varie-

ties. An important step in this process is the selection of resistant genotypes from the population and the estimation of the resistance of hybrids obtained by crosses during the breeding process. Conducting a permanent phenotypic evaluation is associated with difficulties, for example, it is not always possible to work with pathogens, and phenotypic evaluation is very costly and time consuming. However, the use of DNA markers linked to resistance genes can significantly speed up and reduce the cost of the breeding process. The aim of the study was to screen the GenAgro potato collection of ICG SB RAS using known diagnostic PCR markers linked to golden potato cyst nematode and wart resistance. Genotyping was carried out on 73 potato samples using three DNA markers 57R, CP113, Gro1-4 associated with nematode resistance and one marker, NL25, associated with wart resistance. The genotyping data were compared with the data on the resistance of the collection samples. Only the 57R marker had a high level of correlation (Spearman $R = 0.722008$, $p = 0.000000$, $p < 0.05$) between resistance and the presence of a diagnostic fragment. The diagnostic efficiency of the 57R marker was 86.11 %. This marker can be successfully used for screening a collection, searching for resistant genotypes and marker-assisted selection. The other markers showed a low correlation between the presence of the DNA marker and resistance. The diagnostic efficiency of the CP113 marker was only 44.44 %. Spearman's correlation coefficient (Spearman $R = -0.109218$, $p = 0.361104$, $p < 0.05$) did not show significant correlation between resistance and the DNA marker. The diagnostic efficiency of the NL25 marker was 61.11 %. No significant correlation was found between the NL25 marker and resistance (Spearman $R = -0.017946$, $p = 0.881061$, $p < 0.05$). The use of these markers for the search for resistant samples is not advisable.

Key words: golden potato cyst nematode; wart; potato; DNA markers 57R; NL25; CP113; Gro1-4.

For citation: Totsky I.V., Rozanova I.V., Safonova A.D., Batov A.S., Gureeva Yu.A., Khlestkina E.K., Kochetov A.V. Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):677-686. DOI 10.18699/VJ21.077

Введение

Картофель – одна из наиболее важных сельскохозяйственных культур, занимающая пятое место в мире по объему продукции среди основных продовольственных культур (FAO Statistical Pocketbook, 2019). Одной из причин, которые могут привести к снижению урожая, является поражение картофеля различными факторами. Особенно опасны золотистая картофельная цистообразующая нематода (*Globodera rostochiensis*) и рак картофеля (возбудитель – *Synchytrium endobioticum*). Они относятся к карантинным объектам в Российской Федерации. Данные об устойчивости к *G. rostochiensis* и *S. endobioticum* обязательны при регистрации сорта картофеля в «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию» (Государственный реестр..., 2019; <https://gossortrf.ru/>).

Золотистая картофельная нематода (ЗКН) может нанести значительный ущерб урожаю картофеля (до 80–90 %) (Клименко и др., 2017; Хютти и др., 2017). В настоящее время в мире известно пять патотипов данного вредителя: Ro1, Ro2, Ro3, Ro4, Ro5 (Kort et al., 1977; Хютти и др., 2017), при этом на территории России на данный момент обнаружен только патотип Ro1 ЗКН (Limantseva et al., 2014).

Рак картофеля поражает от 35 (Корецкий, 1970) до 100 % (Hampson, 1993) урожая. В Европе сегодня насчитывается 43 патотипа возбудителя рака (Ваауен et al., 2006). В «Государственном реестре селекционных достижений...» зарегистрировано всего несколько сортов, поражаемых этой болезнью (Государственный реестр..., 2019; <https://gossortrf.ru/>).

Один из основных методов борьбы с данными вредителями – выведение устойчивых сортов картофеля. Соответственно, важно обнаружить гены, отвечающие за устойчивость к ЗКН, изучить их наследуемость, создать ДНК-маркеры, сцепленные с этими генами, и использовать гены в схемах маркер-ориентированной селекции.

У картофеля обнаружено семь локусов устойчивости к ЗКН на хромосомах III (*Gro1.4*-QTL (Kreike et al., 1996)), V (*Grp1*-QTL (Roupe van der Voort et al., 1998), *H1* (Gebhardt et al., 1993), *GroVI* (Pineda et al., 1993)), VII (*Gro1* (Barone et al., 1990; Leister et al., 1996)), X (*Gro1.2*-QTL (Kreike et al., 1993)) и XI (*Gro1.3*-QTL (Kreike et al., 1993)). Четыре локуса (*Gro1.4*, *Grp1*, *Gro1.2*, *Gro1.3*) обеспечивают частичное сопротивление, а три других (*H1*, *GroVI*, *Gro1*) – придают высокую устойчивость к одному или более патотипам (Gebhardt, Valkonen, 2001; Bakker et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2015). ДНК-маркеры позволили идентифицировать сложные локусы, содержащие несколько *R*-генов, в том числе локус с двумя генами устойчивости к ЗКН (*H1*, *GroVI*), который у двух разных видов картофеля идентифицирован на хромосоме V (Gebhardt, Valkonen, 2001).

Ген устойчивости *H1* интрогрессирован в селекционные сорта из *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* и *S. vernei* (Тохорейс, Huijsman, 1953). Это доминантный ген, определяющий устойчивость к патотипам Ro1 и Ro4 *G. rostochiensis* (Jones et al., 1981; Gebhardt, Valkonen, 2001; Bakker et al., 2004). По другим данным, он определяет устойчивость к патотипам Ro5 и Ro6 (Pajerowska-Mukhtar et al., 2009; Milczarek et al., 2011; Lopez-Pardo et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2015). Данный ген локализован на дистальном конце длинного плеча хромосомы V (Gebhardt et al., 1993; Pineda et al., 1993) и кодирует белок CC-NBS-LRR (coiled coil/nucleotide-binding/leucine-rich repeat). *H1* – единственный ген устойчивости к нематоде, для которого с помощью классического генетического анализа была подтверждена концепция Флора взаимодействия «ген-на-ген» (Flor, 1971; Janssen et al., 1991; Gebhardt, Valkonen, 2001). Гену устойчивости *H1* соответствовал ген *Avr* золотистой картофельной цистообразующей нематоды *G. rostochiensis*.

Ген *GroVI* происходит от дикого вида картофеля *S. vernei*, сцеплен с локусом *H1* (Jacobs et al., 1996) и отвечает

за устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* (Jacobs et al., 1996; Milczarek et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2015).

Локус *Grol* локализован на хромосоме VII и содержит целое семейство генов: *Grol-1*, *Grol-2*, *Grol-3*, *Grol-4*, *Grol-5*, *Grol-6*, *Grol-8*, *Grol-10*, *Grol-11*, *Grol-12* и *Grol-14*, а также ряд псевдогенов (Barone et al., 1990; Leister et al., 1996; Paal et al., 2004). J. Paal с коллегами показали, что ген *Grol-4* является моногенным доминантным геном, отвечающим за устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*, и кодирует белок, относящийся к классу TIR-NB-LRR белков. *Grol-4* привнесен в *S. tuberosum* из дикого вида картофеля *S. spegazzinii* (Ballvora et al., 1995; Gebhardt, Valkonen, 2001; Gebhardt et al., 2004; Paal et al., 2004; Kuhl, 2011; Milczarek et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2015).

Ряд локусов количественных признаков, ассоциированных с устойчивостью к цистообразующим нематодам, был картирован в геноме картофеля: *Grol.2*, *Grol.3* и *Grol.4*, детерминирующие устойчивость к *G. rostochiensis*, были локализованы на хромосомах X, XI и III. Источником устойчивости в данном случае выступал *S. spegazzinii* (Kreike et al., 1993, 1996).

Обнаружен локус *Grp1*, обеспечивающий широкий спектр устойчивости к обоим видам цистообразующих нематод – *G. rostochiensis* и *G. pallida*. Он был картирован на хромосоме V (Roupe van der Voort et al., 1998, 2000) и обеспечивает устойчивость к патотипу Ro5 *G. rostochiensis* (Finkers-Tomczak et al., 2009; Milczarek et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2015).

Значительное число диагностических ДНК-маркеров было создано для гена *H1*. Среди них маркеры CD78 (Pineda et al., 1993), TG689 (Milczarek et al., 2011; Lopez-Pardo et al., 2013), N146, N195 (Mori et al., 2011; Asano et al., 2012), CP113 (Gebhardt et al., 1993; Niewöhner et al., 1995; Skupinová et al., 2002; Milczarek et al., 2011), TG689/TG689indel12 (Galek et al., 2011), 239E4left (Bakker et al., 2004; Pajerowska-Mukhtar et al., 2009; Milczarek et al., 2011), EM15 (repulsion) и CMI (coupling) (Bakker et al., 2004), 57R (Finkers-Tomczak et al., 2011; Schultz et al., 2012; Milczarek et al., 2014). Для других генов и QTL также подобраны маркеры. Например, для гена *GroV1* разработаны маркеры TG69 (Pineda et al., 1993), SCAR-U14 и SCAR-X02 (Jacobs et al., 1996; Milczarek et al., 2011); для локуса *Grol* подобраны маркеры CP56 и St3.3.2 (Barone et al., 1990; Leister et al., 1996), CP56, CP51(c), GP516(c) (Ballvora et al., 1995; Kuhl, 2011). Для гена *Grol-4* созданы маркеры Gro1-4 (Gebhardt et al., 2004; Paal et al., 2004; Milczarek et al., 2011), Gro1-4-1 (Asano et al., 2012). Для *Grp1*-QTL разработаны маркеры GP21 и GP179 (Roupe van der Voort et al., 1998), TG432 (Finkers-Tomczak et al., 2009; Milczarek et al., 2011). Для *Grol.2*-QTL подобран маркер TG63 (Kreike et al., 1993). Для *Grol.3*-QTL созданы маркеры Ssp75 и TG30 (Kreike et al., 1993), а для *Grol.4*-QTL-маркер Ssp8 (Kreike et al., 1996).

У картофеля обнаружен ряд генов устойчивости к раку (*S. endobioticum*), а именно: *Sen1*, расположенный на хромосоме XI (Hehl et al., 1999); ген *Sen1-4*, картированный на хромосоме IV (Brugmans et al., 2006); локус *Sen18-IX*, локализованный на хромосоме IX; локус *Sen2/6/18-I*,

находящийся на хромосоме I (Ballvora et al., 2011); локус *Xla-TNL* на хромосоме XI (Bartkiewicz et al., 2018); локус *Sen2*, который был картирован на хромосоме XI (Plich et al., 2018). Локус *Sen3* был картирован на хромосоме XI в том же регионе, что и ген *Sen1* (Prodhomme et al., 2019); авторы высказали мнение, что *Sen3* может быть как паралогом *Sen1* из того же кластера, так и аллельным вариантом гена *Sen1*.

QTL, отвечающие за устойчивость к расам 1, 2, 6 и 18 рака, найдены на других хромосомах: хромосома I (к расе 2), хромосома II (расы 6, 18), хромосома VI (расы 1, 2, 6, 18), хромосома VII (расы 2, 6, 18), хромосома VIII (расы 1, 2, 6, 18), хромосома X (расы 2, 6, 18), хромосома XI (расы 2, 6, 18) (Groth et al., 2013). J.E. Obidiegwu с коллегами обнаружили также на хромосомах I, IV, X, XI и XII дополнительные локусы устойчивости к раку, которые имели меньшее влияние, чем основные гены (Obidiegwu et al., 2015). На устойчивость к расе 18 рака дополнительно влияют второстепенные QTL, расположенные на хромосоме X (Bartkiewicz et al., 2018).

Гены *Sen1* и *Sen1-4* определяют устойчивость к расе 1 возбудителя рака картофеля, в обоих случаях устойчивость детерминируется доминантными аллелями генов. Ген *Sen1* локализован на дистальном конце длинного плеча хромосомы XI (Hehl et al., 1999; Obidiegwu et al., 2014). Однако следует отметить, что J.E. Obidiegwu с коллегами с использованием метода полногеномного анализа ассоциаций (genome-wide association studies – GWAS) идентифицировали мультиаллельный локус *Sen1/RSe-XIa* на хромосоме XI картофеля как главный фактор устойчивости к четырем расам *S. endobioticum* (расы 1, 2, 6 и 18) (Obidiegwu et al., 2015). Ген *Sen1-4* находится на длинном плече хромосомы IV на расстоянии 5 см от центромеры (Brugmans et al., 2006).

Локус *Xla-TNL* на хромосоме XI картофеля сцеплен с устойчивостью к расам 18 и 6 и может рассматриваться как один из главных факторов ракоустойчивости (Bartkiewicz et al., 2018).

Локус *Sen2* картирован на хромосоме XI и представляет собой доминантный моногенный локус, который обеспечивает высокий уровень устойчивости одновременно к восьми расам *S. endobioticum*: 1 (D1), 2 (G1), 6 (O1), 8 (F1), 18 (T1), 2 (Ch1), 3 (M1) и 39 (P1). Генетические и физические расстояния между локусами *Sen1* и *Sen2* были косвенно оценены в 63 см и 32 Мbp соответственно (Plich et al., 2018).

Sen3 описывается как доминантный моногенный локус устойчивости к расам 2, 6 и 18 (Prodhomme et al., 2019). Локус *Sen18-IX* (хромосома IX) определяет устойчивость к расе 18 *S. endobioticum*, а локус *Sen2/6/18-I* (хромосома I) – к расам 2, 6 и 18. A. Ballvora с коллегами (2011) отмечают, что устойчивости к расам 2, 6 и 18 коррелируют друг с другом, но наследуются независимо от устойчивости к расе 1.

Для обнаружения доминантного аллеля гена *Sen1* были разработаны несколько маркеров: CP58, GP125 (Hehl et al., 1999), NL25 (Hehl et al., 1999; Bormann et al., 2004; Gebhardt et al., 2006), Sti046, St_At5g16710, GP125 и GP259 (Ballvora et al., 2011). Также с помощью полногеномного

поиска ассоциаций был идентифицирован гаплотип-специфичный маркер PotVar0067008, связанный с *Sen1* (Prodhomme et al., 2020).

Для выявления локуса *Sen18-IX* можно использовать маркеры GP129, GP101 и STM3023b. Диагностику локуса *Sen2/6/18-I* можно проводить с помощью маркеров STM2030, SC176, GP192, GP124 и GP194 (Ballvora et al., 2011). Маркеры Kc8103 и RK36, расположенные на хромосоме XI и сцепленные с локусом *Xla-TNL*, показали потенциальную диагностическую ценность при определении устойчивости к расам 18 и 6 *S. endobioticum* (Bartkiewicz et al., 2018). Созданы три маркера 5450_3, 2502_1 и 2502_3, сцепленные с локусом *Sen2* (Plich et al., 2018). Для обнаружения *Sen3* возможно применять маркеры chr11_1259552 и chr11_1772869 (Prodhomme et al., 2019).

Целью исследования было проведение скрининга коллекции картофеля «ГенАгро» Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН с использованием известных диагностических ПЦР-маркеров, сцепленных с устойчивостью к золотистой картофельной нематоде и раку картофеля.

Материалы и методы

Растительный материал. Материалом исследований послужили 73 сорта и гибрида картофеля (*Solanum tuberosum*) из коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН (Приложение 1)¹. Растения выращивали в полевых условиях на территории пос. Мичуринский Новосибирской области с мая по август 2017 г.

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

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

Большая часть сведений по устойчивости к ЗКН и раку картофеля была взята из литературных источников, а именно из базы данных «Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию» (Государственный реестр..., 2019; <https://gossortrf.ru/>) и из Европейской базы данных культурного картофеля (<https://www.europotato.org/>). Образцы и гибриды, для которых отсутствовали опубликованные данные по устойчивости, были оценены в экспериментальных условиях. Определение устойчивости к ЗКН проводили в соответствии с методикой, рекомендованной ОЕПП/ЕРРО (2006), во Всероссийском НИИ защиты растений (ВИЗР). Устойчивость к раку картофеля оценивали по методу Глинна–Леммерцала, согласно Диагностическому протоколу ЕРРО для *S. endobioticum* (ОЕПП/ЕРРО, 2004), в Федеральном исследовательском центре картофеля им. А.Г. Лорха (ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха).

¹ Приложения 1–4 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx11.pdf>

Выделение ДНК и проведение ПЦР-анализа. ДНК выделяли из кожуры клубней картофеля с использованием набора DNeasy Plant Mini (Qiagen, США) согласно протоколу. Концентрацию и чистоту тестируемых образцов определяли с помощью двух методов: гель-электрофореза и с применением аппарата Nanodrop 2000.

Для генотипирования выбрали несколько диагностических маркеров (табл. 1), наиболее часто применяемых в селекционных программах. Эти маркеры были ассоциированы с *R*-генами, обеспечивающими устойчивость к расе 1 рака картофеля (*S. endobioticum*) и к патотипу Ro1 золотистой картофельной цистообразующей нематоды (*G. rostochiensis*).

Для выявления генов устойчивости к ЗКН были выбраны маркеры 57R и CP113, ассоциированные с геном устойчивости *H1*, и маркер Gro1-4, ассоциированный с геном устойчивости *Gro1-4* (см. табл. 1). SCAR ПЦР-маркер CP113-5'2/CP113-3'2, созданный на основе RFLP-маркера CP113, описан в работе (Niewöhner et al., 1995). При амплификации ДНК резистентных генотипов с использованием этого маркера образуется продукт длиной 760 п. н. Маркер 57R предложен L. Schultz с коллегами (Schultz et al., 2012). При амплификации ДНК резистентных генотипов образуется продукт длиной 450 п. н. SCAR ПЦР-маркер Gro1-4 разработан на основе RFLP-маркера Gro1 (Paal et al., 2004). При амплификации ДНК резистентных генотипов образуется продукт длиной 602 п. н.

Маркер NL25, предложенный при картировании гена *Sen1* (Hehl et al., 1999), использовался для маркер-ориентированной селекции (Bormann et al., 2004; Gebhardt et al., 2006) (см. табл. 1). При амплификации образуются один или два фрагмента длиной 1200 или 1400 п. н. Наличие доминантного аллеля *Sen1* определяется присутствием фрагмента размером 1400 п. н.

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 100 нг ДНК, 67 мМ трис-НСl (рН 8.8), 1.8 мМ MgCl₂, 0.01 % Tween 20, по 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq.

Температурно-временной профиль ПЦР был представлен двумя типами программ для амплификации: SSR55 и SSR60. SSR55: первый цикл: 94 °С – 2 мин; последующие 45 циклов: 94 °С – 1 мин, 55 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; затем один цикл 5 мин при 72 °С (Gro1-4). SSR60: первый цикл: 94 °С – 2 мин; последующие 45 циклов: 94 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; далее один цикл 5 мин при 72 °С (NL25, CP113, 57R).

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2%-м агарозном геле. Результаты документировали с помощью Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad) с использованием УФ-излучения.

Статистическую обработку данных проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена, для расчетов использовали программу STATISTICA. Диагностическую эффективность, чувствительность и прогностическую ценность рассчитывали с помощью программы MedCalc (<https://www.medcalc.org/>). Диагностическую эффективность определяли как долю правильных результатов тестирования в общем количестве результатов (или же как сумму истинноположительных и истинноотрица-

Таблица 1. ДНК-маркеры, используемые для проведения скрининга коллекции

Ген	Признак	Название маркера и праймера	Последовательность нуклеотидов от 5' к 3' концу	Локализация гена	Размер диагностического фрагмента, п. н.	Литературный источник
<i>H1</i>	Устойчивость к золотистой картофельной нематоды (<i>G. rostochiensis</i>)	CP113F	GCGTTACAGTCGCCGTAT	Хромосома V	760	Niewöhner et al., 1995
		CP113R	GTTGAAGAAATATGGAATCAAA			
		57R-F	TGCCTGCCTCTCCGATTCT		450	Schultz et al., 2012
		57R-R	GGTTCAGCAAAGCAAGGACGTG			
<i>Gro1-4</i>		Gro1-4F	TCTTTGGAGATACTGATTCTCA	Хромосома VII	602	Paal et al., 2004
		Gro1-4R	CGACCTAAAATGAAAAGCATCT			
<i>Sen1</i>	Устойчивость к раку картофеля (возбудитель – <i>S. endobioticum</i>)	NL25F	TATTGTTAATCGTTACTCCCTC	Хромосома XI	1400	Hehl et al., 1999; Bormann et al., 2004; Gebhardt et al., 2006
		NL25R	AGAGTCGTTTACCGACTCC			

тельных результатов теста, деленную на общее количество результатов). Чувствительность рассчитывали как число устойчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленное на общее число устойчивых образцов; специфичность – как число восприимчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленное на общее число восприимчивых образцов. Прогностическую ценность положительного результата определяли как долю правильных положительных результатов диагностического теста.

Результаты

Среди 73 образцов, отобранных для генотипирования, 35 образцов были устойчивы к золотистой картофельной цистообразующей нематоды (ЗКН), 37 – восприимчивы, у одного образца устойчивость к нематоды была неизвестна (табл. 2). Устойчивыми к раку оказались 69 образцов, восприимчивыми к заболеванию – 3 образца, устойчивость одного образца была неизвестна (см. табл. 2).

Генотипирование сортов и гибридов с применением маркеров, разработанных для устойчивости к ЗКН

Маркер 57R встречается у 85.7 % устойчивых образцов, а также у 13.5 % восприимчивых (табл. 3; Приложение 2, рис. 1–6; Приложение 3). Некоторые несовпадения могут наблюдаться из-за отсутствия сцепления маркера 57R с геном устойчивости *H1* у ряда образцов либо из-за наличия других генов устойчивости у образцов, не несущих маркера 57R. Диагностическая эффективность маркера 57R, которая выражается процентным отношением истинных (и положительных, и отрицательных) результатов теста к общему числу полученных результатов, составила 86.11 %. Диагностическая чувствительность применяемого маркера, которая показывает число устойчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленное на общее число устойчивых образцов, оказалась равна 85.71 %, а диагностическая специфичность, являющаяся числом восприимчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленным на общее число восприимчивых образцов, составила 86.48 %. Прогностическая ценность

положительного результата, показывающая долю правильных положительных результатов диагностического теста, равнялась 85.71 %. Расчет коэффициента корреляции Спирмена (Spearman $R = 0.722008$, $p = 0.000000$, $p < 0.05$) показал, что наблюдается значимая корреляция между устойчивостью и маркером 57R.

Маркер CP113 встречается лишь у 48.6 % устойчивых образцов, при этом маркер присутствует у 62.9 % восприимчивых генотипов (см. табл. 3; Приложение 2, рис. 7; Приложение 3). Такие результаты можно расценивать как отсутствие сцепления маркера с геном устойчивости *H1* во многих образцах коллекции картофеля. Диагностическая эффективность применения маркера CP113 равнялась всего 44.44 %. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность составляли 48.57 и 40.54 % соответственно. Прогностическая ценность положительного результата, показывающая вероятность наличия устойчивости при положительном результате теста с использованием маркера, оказалась равна 43.58 %. Коэффициент корреляции Спирмена (Spearman $R = -0.109218$, $p = 0.361104$, $p < 0.05$) в данном случае показывал отсутствие значимой корреляции между устойчивостью и ДНК-маркером. Использование такого маркера при скрининге популяции для поиска устойчивых образцов нецелесообразно.

Выборка из 29 образцов анализировалась с помощью маркера Gro1-4. Диагностический фрагмент амплифицировался только у 5 образцов. Соответствие наличия маркера у устойчивого образца наблюдалось лишь в одном случае из пяти. В остальных случаях маркер встречался у образцов, восприимчивых к заболеванию.

Полученные данные показывают, что при проведении скрининга популяций на устойчивость к ЗКН целесообразно использовать маркер 57R.

Генотипирование сортов и гибридов с применением маркеров, сцепленных с устойчивостью к раку картофеля

Маркер NL25 встречается у 62.3 % устойчивых образцов, однако при этом следует заметить, что маркер присутствует у двух из трех восприимчивых генотипов

Таблица 2. Устойчивость сортов и гибридов картофеля к болезням

№ п/п	Сорт/гибрид	Устойчивость		№ п/п	Сорт/гибрид	Устойчивость	
		к ЗКН	к раку			к ЗКН	к раку
1	Fregata	+ ²	+ ²	38	Ломоносовский	- ¹	+ ¹
2	Агата	+ ²	+ ²	39	Любава	- ¹	+ ¹
3	Алёна	- ¹	+ ¹	40	Люкс	+ ¹	+ ¹
4	Антонина	- ¹	+ ¹	41	Марет	+ ¹	NA
5	Ароза	+ ¹	+ ¹	42	Матушка	- ¹	+ ¹
6	Божедар	NA	+ ¹	43	Метеор	+ ¹	+ ¹
7	Браво	+ ¹	+ ¹	44	Монализа	- ¹	+ ¹
8	Василёк	- ¹	+ ¹	45	Накра	- ¹	+ ¹
9	Великан	- ¹	+ ¹	46	Наяда	+ ¹	+ ¹
10	Виращ	+ ¹	+ ¹	47	Невский	- ¹	+ ¹
11	Вымпел	+ ¹	+ ¹	48	Никулинский	- ¹	+ ¹
12	Гала	+ ¹	+ ¹	49	Памяти Осиповой	- ¹	+ ¹
13	Голубизна	- ¹	+ ¹	50	Памяти Рогачёва	- ¹	+ ¹
14	Горняк	- ¹	+ ¹	51	Пикассо	+ ¹	+ ¹
15	Гранат	- ²	+ ²	52	Регги	- ¹	+ ¹
16	Гранола	+ ²	- ²	53	Ред Скарлет	+ ¹	+ ¹
17	Гулливер	+ ¹	+ ¹	54	Сафо	+ ¹	+ ¹
18	Гусар	+ ¹	+ ¹	55	Фаворит	+ ¹	+ ¹
19	Дебрянск	- ¹	+ ¹	56	Фиолетовый	- ¹	+ ¹
20	Диамант	+ ²	+ ²	57	Фрителла	- ¹	+ ¹
21	Жигулёвский	- ¹	+ ¹	58	Юна	+ ¹	+ ¹
22	Жуковский ранний	+ ¹	+ ¹	59	1-7-5А	- ³	+ ⁴
23	Загадка	+ ¹	+ ¹	60	(1-9-2)	- ³	+ ⁴
24	Зекура	+ ¹	+ ¹	61	2-5-4Б	- ³	+ ⁴
25	Златка	- ¹	+ ¹	62	1-14-2А	+ ³	+ ⁴
26	Ильинский	- ¹	+ ¹	63	1014/3-1	+ ³	+ ⁴
27	Импала	+ ¹	+ ¹	64	821/1-5	+ ³	+ ⁴
28	Ирбитский	+ ¹	+ ¹	65	419/8-1	- ³	+ ⁴
29	Кемеровчанин	+ ¹	+ ¹	66	1014/8-1	+ ³	+ ⁴
30	Клада	- ²	+ ²	67	1013/3-1	+ ³	+ ⁴
31	Колдовская	- ³	- ⁴	68	790/1-5	- ³	+ ⁴
32	Колобок	- ¹	+ ¹	69	(2-5-2)	+ ³	+ ⁴
33	Кортни	+ ¹	+ ¹	70	785/8-5	- ³	+ ⁴
34	Крепыш	+ ¹	+ ¹	71	999/1-1	- ³	+ ⁴
35	Кузнечанка	- ¹	+ ¹	72	597/4-1	- ³	- ⁴
36	Ладожский	+ ¹	+ ¹	73	417/2	- ³	+ ⁴
37	Лина	- ¹	+ ¹				

Примечание. «+» и «-» – соответственно устойчивость и восприимчивость к заболеванию; NA – данные неизвестны. ¹ Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию; ² Европейская база данных культурного картофеля; ³ Всероссийский НИИ защиты растений; ⁴ ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха.

(см. табл. 3; Приложение 4). Вероятно, это обусловлено процессами кроссинговера и тем, что у ряда образцов не наблюдается сцепления маркера и гена устойчивости, тем не менее малое количество чувствительных образцов не позволяет в достаточной степени оценить применимость маркера для селекции. Маркер отсутствует у 27 образцов, и только один из них является неустойчивым, остальные 26 образцов относятся к устойчивым. Это можно объяс-

нить наличием другого гена устойчивости, который не сцеплен с маркером NL25.

Диагностическая эффективность оценки устойчивости с применением маркера NL25 составила 61.11 %. Диагностическая чувствительность маркера оказалась на уровне 62.31 %, тогда как диагностическая специфичность составила лишь 33.33 %. Однако прогностическая ценность положительного результата, показывающая

Таблица 3. Результаты скрининга коллекции сортов и гибридов картофеля на устойчивость к ЗКН с использованием маркера 57R и на устойчивость к раку с использованием маркера NL25

Устойчивость к заболеванию	Маркер присутствует	Маркер отсутствует	Диагностическая эффективность, %
Маркер 57R			
Устойчивый к ЗКН образец	30	5	86.11
Восприимчивый к ЗКН образец	5	32	
Маркер CP113			
Устойчивый к ЗКН образец	17	18	44.44
Восприимчивый к ЗКН образец	22	15	
Маркер NL25			
Устойчивый к раку образец	43	26	61.11
Восприимчивый к раку образец	2	1	

долю правильных положительных результатов диагностического теста, при применении маркера NL25 равнялась 95.55 %. Такие результаты связаны с тем, что в выборке присутствовали только три неустойчивых образца и у двух из них наблюдалось наличие маркера NL25. Коэффициент корреляции Спирмена (Spearman $R = -0.017946$, $p = 0.881061$, $p < 0.05$) в такой ситуации показывал отсутствие значимых корреляций.

Несмотря на то что маркер NL25 часто используется в скрининге и маркерной селекции, исследование на нашей выборке показало, что его применение не гарантирует надежного результата.

Обсуждение

В нашем исследовании встречается 13 устойчивых к золотистой картофельной нематоде образцов, имеющих оба маркера (57R и CP113), сцепленных с геном *HI* устойчивости к нематоде. Помимо этого, имеется 8 генотипов, устойчивых к нематоде и раку и несущих как маркеры 57R и CP113, сцепленные с геном *HI* устойчивости к нематоде, так и маркер NL25, сцепленный с геном *Sen1* устойчивости к раку. Также в популяции встречается один образец (Сафо), устойчивый к раку и нематоде и несущий все три маркера 57R, CP113, Gro1-4, сцепленные с устойчивостью к нематоде, и маркер NL25, сцепленный с устойчивостью к раку.

ДНК-маркеры устойчивости к раку

Маркер NL25, сцепленный с геном *Sen1*, обеспечивающим устойчивость к патотипу 1 рака картофеля, успешно применяют в практике маркер-ориентированной селекции. Так С. Gebhardt с коллегами, проведя скрининг 17 растений в двух семействах расщепляющихся популяций с использованием маркера NL25, идентифицировали 14 генотипов, имевших маркер. Все эти растения оказались устойчивы к патотипу 1 *S. endobioticum*. Некоторые были устойчивы также к патотипу 2 и/или патотипу 6 (Gebhardt et al., 2006).

Об эффективности данного маркера сообщают и О.Ю. Антонова с коллегами (2016), проанализировавшие 98 сортов с помощью маркера NL25. У 95 исследованных ракустойчивых сортов был выявлен диагностический компонент, а у трех восприимчивых сортов его не обна-

ружено. Это показывает высокий уровень корреляции наличия или отсутствия маркера и устойчивости/чувствительности генотипа к раку соответственно (Антонова и др., 2016).

Однако А. Khiutti с коллегами при скрининге 52 генотипов с использованием маркера NL25 обнаружили, что 39 образцов (как чувствительные, так и устойчивые генотипы) имели одинаковый недиагностический фрагмент, 12 генотипов не имели амплификации фрагментов маркера NL25. И только пять из 52 генотипов обладали диагностическим фрагментом, указывающим на наличие гена устойчивости. Четыре из этих пяти образцов были устойчивыми, а один генотип оказался чувствительным. Большинство устойчивых генотипов не имели диагностического фрагмента 1400 п. н., прогнозирующего устойчивый фенотип (Khiutti et al., 2012).

Проведенный нами анализ также не позволил говорить о надежности применения маркера NL25 для скрининга устойчивых сортов.

ДНК-маркеры устойчивости к ЗКН

Используя в расщепляющейся популяции маркер Gro1-4, С. Gebhardt с коллегами обнаружили, что все 45 растений, несущих данный маркер, сцепленный с геном *Gro1*, устойчивы к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* (Gebhardt et al., 2006).

В более раннем исследовании расщепляющейся популяции маркер CP113 был сцеплен с геном *HI* настолько сильно, что имел нулевую рекомбинацию (Gebhardt et al., 1993). Однако D. Milczarek с коллегами сообщал, что маркер CP113 был амплифицирован для всех тестируемых сортов – устойчивых и чувствительных – и оказался непригодным для отбора устойчивых клонов (Milczarek et al., 2011). В нашей работе наблюдается схожая картина.

SCAR-маркер 57R был протестирован в картирующей популяции, где он показал сцепление с локусом *HI* и устойчивостью к нематоде (Finkers-Tomczak et al., 2011). Позже L. Schultz с коллегами (Schultz et al., 2012) сообщили, что провели анализ двух независимых популяций из 281 и 122 образцов картофеля с известной устойчивостью/чувствительностью с использованием SCAR-маркера 57R. При скрининге первой популяции маркер 57R выявил соответствие между генотипом и

фенотипом: 89 из 90 устойчивых сортов дали аллель, связанный с устойчивостью; исключением стал лишь один устойчивый сорт, у которого не наблюдалась амплификация маркера. Ни один из 191 восприимчивого к ЗКН сорта не имел аллеля, прогнозирующего устойчивость. Затем был проведен скрининг другой независимой популяции из 122 сортов. Все сорта продемонстрировали полное соответствие между устойчивостью к *G. rostochiensis* и наличием/отсутствием аллеля 57R, сцепленного с геном устойчивости (Schultz et al., 2012).

О.Ю. Антонова с коллегами (2016) выявили маркер 57R у 33 (30.3 %) из 109 исследуемых ими селекционных сортов. Большинство сортов с диагностированным фрагментом 57R были устойчивыми или слабо поражались нематодой. Соответствие между устойчивостью и присутствием диагностического фрагмента было высоким – 93.5 %. При этом выявлено всего четыре генотипа с маркером Gro1-4: два устойчивых сорта, один слабопоражаемый сорт и один восприимчивый. Все эти четыре сорта наряду с маркером Gro1-4 обладали и маркерами гена *H1* – 57R, TG689, N146, N195 (Антонова и др., 2016).

В работе Н.С. Клименко с коллегами (2017) маркер 57R выявлен у 24 из 103 образцов, при этом маркер встречался у 15 устойчивых и 2 неустойчивых образцов. Показано, что корреляция между наличием хотя бы одного маркера гена *H1* и данными о нематодоустойчивости сортов составила +0.92 (Клименко и др., 2017).

Т.А. Гавриленко с коллегами (2018) показали, что из 39 образцов исследуемой выборки у 15 образцов присутствовал доминантный аллель гена *H1* (на основе ряда ДНК-маркеров), а у двух сортов – доминантные аллели обоих генов, *H1* и *Gro1-4*. В то же время у оставшихся 22 генотипов ни один из маркеров не был выявлен. Сопоставление данных результатов с устойчивостью к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) показало, что все образцы с маркерами гена *H1* относятся к нематодоустойчивым; у сортов, поражаемых *G. rostochiensis*, эти маркеры отсутствовали (Гавриленко и др., 2018). Такая высокая корреляция говорит о надежности примененных в исследовании маркеров, которые могут быть использованы для отбора устойчивых образцов.

Следует отметить, что насыщение генотипа генами устойчивости к нематоду не влияет на его хозяйственно ценные признаки. При этом сохраняется сильная связь между присутствием маркера и устойчивостью. Так, в исследовании (Milczarek et al., 2014) представлена взаимосвязь между наличием маркеров TG689 и 57R, сцепленных с геном *H1*, придающим устойчивость к нематоду *G. rostochiensis*, и ценными сельскохозяйственными признаками. Клоны с этими маркерами отличались более высоким общим выходом клубней и крахмала по сравнению с клонами без маркеров. Отрицательной связи между наличием маркера и качеством не наблюдалось. Все 347 проростков, полученных в ходе трех скрещиваний, были прогенотипированы с использованием обоих маркеров и прошли фенотипическую оценку устойчивости к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*. Из них 316 (91 %) и 325 (94 %) клонов были устойчивы и несли маркеры TG689 или 57R (Milczarek et al., 2014).

Заключение

В целом полученные нами данные по маркеру 57R близки к описанным выше результатам и подтверждают высокую надежность работы этого маркера, что позволяет говорить о необходимости его применения при отборе устойчивых к ЗКН образцов.

Список литературы / References

- Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181.
- [Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and its neighboring countries based on the polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance R-genes. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017; 7(5):489-500. DOI 10.1134/S2079059717050021.]
- Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеяева Н.М., Мамадобкирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329.
- [Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (офиц. изд.). М.: Росинформагротех, 2019.
- [State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotech Publ., 2019. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамадобкирова Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоду (патотип Ro1). *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75.
- [Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-assisted selection of Russian potato varieties with markers of genes for resistance to potato golden nematode (pathotype Ro1). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selekcii* = *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75. (in Russian)]
- Корецкий П.М. Вредоносность рака картофеля на приусадебных участках в районах широкого распространения болезни на Украине. *Микология и фитопатология*. 1970;4(4):366-369.
- [Koretsky P.M. Harmfulness of potato wart in household plots in areas of widespread of the disease in Ukraine. *Mikologiya i Fitopatologiya* = *Mycology and Phytopathology*. 1970;4(4):366-369. (in Russian)]
- Хюйти А.В., Антонова О.Ю., Мироненко Н.В., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость картофеля к карантинным болезням. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223.
- [Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(8):833-844. DOI 10.1134/S2079059717050094.]

- Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breed. Sci.* 2012;62(2):142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.
- Baayen R.P., Cochius G., Hendriks H., Meffert J.P., Bakker J., Bekker M., van den Boogert P.H.J.F., Stachewicz H., van Leeuwen G.C.M. History of potato wart disease in Europe – a proposal for harmonisation in defining pathotypes. *Eur. J. Plant Pathol.* 2006;116(1):21-31. DOI 10.1007/s10658-006-9039-y.
- Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Bakker J., Govere A. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(1):146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z. Epub 2004 Feb 25.
- Ballvora A., Flath K., Lubeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.-R., Gebhardt C. Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes 1, 2, 6 and 18. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123(8):1281-1292. DOI 10.1007/s00122-011-1666-9. Epub 2011 Aug 6.
- Ballvora A., Hesselbach J., Niewöhner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. General Genet.* 1995;249:82-90. DOI 10.1007/BF00290239.
- Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F., Gebhardt C. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. General Genet.* 1990;224(2):177-182. DOI 10.1007/BF00271550.
- Bartkiewicz A., Chilla F., Terefe-Ayana D., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hoferbert H.-R., Flath K., Linde M., Debener T. Improved genetic resolution for linkage mapping of resistance to potato wart in monoparental dihaploids with potential diagnostic value in tetraploid potato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:2555-2566. DOI 10.1007/s00122-018-3172-9.
- Bormann C.A., Rickert A.M., Ruiz R.A.C., Paal J., Lübeck J., Strahwald J., Buhr K., Gebhardt C. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2004;17(10):1126-1138. DOI 10.1094/MPMI.2004.17.10.1126.
- Brugmans B., Hutten R.G.B., Rookmaker N., Visser R.G.F., van Eck H.J. Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112(2):269-277. DOI 10.1007/s00122-005-0125-x.
- Finkers-Tomczak A., Bakker E., Boer J., Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Govere A. Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus *H1* reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.). *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:595-608. DOI 10.1007/s00122-010-1472-9.
- Finkers-Tomczak A., Danan S., van Dijk T., Beyene A., Bouwman L., Overmars H., van Eck H., Govere A., Bakker J., Bakker E. A high-resolution map of the *Gro1* locus on chromosome V of potato harbouring broad-spectrum resistance to the cyst nematode species *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(1):165-173. DOI 10.1007/s00122-009-1026-1.
- Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971;9:275-296. DOI 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Food and Agriculture – Statistical pocketbook 2019. Rome: FAO, 2019. Available at: <http://www.fao.org/3/ca6463en/ca6463en.pdf>.
- Galek R., Rurek M., De Jong W.S., Pietkiewicz G., Augustyniak H., Sawicka-Sienkiewicz E. Application of DNA markers linked to the potato *H1* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of *Globodera rostochiensis*. *J. Appl. Genet.* 2011;52(4):407-411. DOI 10.1007/s13353-011-0056-y.
- Gebhardt C., Ballvora A., Walkemeier B., Oberhagemann P., Schüler K. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol. Breed.* 2004;13:93-102. DOI 10.1023/B:MOLB.0000012878.89855.df.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112(8):1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8. Epub 2006 Mar 15.
- Gebhardt C., Mugniery D., Ritter E., Salamini F., Bonnel E. Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1993;85:541-544. DOI 10.1007/BF00220911.
- Gebhardt C., Valkonen J.P.T. 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.
- Groth J., Song Y., Kellermann A., Schwarzfischer A. Molecular characterisation of resistance against potato wart races 1, 2, 6 and 18 in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *J. Appl. Genet.* 2013;54(2):169-178. DOI 10.1007/s13353-013-0141-5. Epub 2013 Feb 24.
- Hampson M.C. History, biology and control of potato wart disease in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 1993;15(4):223-244. DOI 10.1080/07060669309501918.
- Hehl R., Faurie E., Hesselbach J., Salamini F., Whitham S., Baker B., Gebhardt C. TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:379-386. DOI 10.1007/s001220051083.
- Jacobs J.M.E., Eck H.J., Horsman K., Arens P.F.P., Verkerk-Bakker B., Jacobsen E., Pereira A., Stiekema W.J. Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. *Mol. Breed.* 1996;2:51-60. DOI 10.1007/BF00171351.
- Janssen R., Bakker J., Gommers F.J. Mendelian proof for a gene-for-gene relationship between virulence of *Globodera rostochiensis* and the *H1* resistance gene in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 1673. *Rev. de Nematol.* 1991;14(2):207-211.
- Jones F.G.W., Parrott D.M., Perry J.N. The gene-for-gene relationship and its significance for potato cyst nematodes and their solanaceous hosts. In: Zuckerman B.M., Rohde R.A. (Eds.). *Plant Parasitic Nematodes*. Vol. 3. New York: Acad. Press, 1981;23-36.
- Khiutti A., Afanasenko O., Antonova O., Shuvalov O., Novikova L., Krylova E., Chalaya N., Mironenko N., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Synchytrium endobioticum* in cultivated potato accessions from the collection of Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breed.* 2012;131(6):744-750. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.02005.x.
- Kort J., Stone A.R., Rumpfenhorst H.J., Ross H. An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica*. 1977;23(3):333-339. DOI 10.1163/187529277x00057.
- Kreike C.M., De Koning J.R.A., Vinke J.H., Van Ooijen J.W., Stiekema W.J. Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. *Theor. Appl. Genet.* 1993;87:464-470. DOI 10.1007/BF00215092.
- Kreike C.M., Kok-Westeneng A.A., Vinke J.H., Stiekema W.J. Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development. *Theor. Appl. Genet.* 1996;92:463-470. DOI 10.1007/BF00223694.
- Kuhl J.C. Mapping and tagging of simply inherited traits. In: Braeden J.M., Chittaranjan K. (Eds.). *Genetics, Genomics and Breeding of Potato*. Enfield, New Hampshire: Sci. Publishers, 2011;90-112.
- Leister D., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.* 1996;14:421-429. DOI 10.1038/ng1296-421.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Charac-

- terization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breed.* 2014;133(5):660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- Lopez-Pardo R., Barandalla L., Ritter E., de Galarreta J.I.R. Validation of molecular markers for pathogen resistance in potato. *Plant Breed.* 2013;132:246-251. DOI 10.1111/pbr.12062.
- Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J. Potato Res.* 2011;88:245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.
- Milczarek D., Przetakiewicz A., Kaminski P., Flis B. Early selection of potato clones with the *H1* resistance gene – the relation of nematode resistance to quality characteristics. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2014;50(4):278-284. DOI 10.17221/114/2014-CJGPB.
- Mori K., Sakamoto Y., Mukojima N., Tamiya S., Nakao T., Ishii T., Hosaka K. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica.* 2011;180:347-355. DOI 10.1007/s10681-011-0381-6.
- Niewöhner J., Salamini F., Gebhardt C. Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *Gro1* and *H1*, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol. Breed.* 1995;1:65-78. DOI 10.1007/BF01682090.
- Obidiegwu J.E., Flath K., Gebhardt C. Managing potato wart: a review of present research status and future perspective. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(4):763-780. DOI 10.1007/s00122-014-2268-0.
- Obidiegwu J.E., Sanetomo R., Flath K., Tacke E., Hoferbert H.-R., Hofmann A., Walkemeier B., Gebhardt C. Genomic architecture of potato resistance to *Synchytrium endobioticum* disentangled using SSR markers and the 8.3 k SolCAP SNP genotyping array. *BMC Genet.* 2015;16:38. DOI 10.1186/s12863-015-0195-y.
- OEPP/EPPO Standards PM 7/28. Diagnostic protocols for regulated pests: *Synchytrium endobioticum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2004;34:213-218. DOI 10.1111/j.1365-2338.2004.00722.x.
- OEPP/EPPO Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2006;36:419-420. DOI 10.1111/j.1365-2338.2006.01032.x.
- Paal J., Henselewski H., Muth J., Meksem K., Menéndez C.M., Salamini F., Ballvora A., Gebhardt C. Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J.* 2004;38(2):285-297. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02047.x.
- Pajerowska-Mukhtar K., Stich B., Achenbach U., Ballvora A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hoferbert 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.
- Pineda O., Bonnierbale M.W., Plaisted R.L., Brodie B.B., Tanksley S.D. Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome.* 1993;36(1):152-156. DOI 10.1139/g93-019.
- Plich J., Przetakiewicz J., Śliwka J., Flis B., Wasilewicz-Flis I., Zimnoch-Guzowska E. Novel gene *Sen2* conferring broad-spectrum resistance to *Synchytrium endobioticum* mapped to potato chromosome XI. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:2321-2331. DOI 10.1007/s00122-018-3154-y.
- Prodhomme C., Esselink D., Borm T., Visser R.G.F., van Eck H.J., Vossen J.H. Comparative Subsequence Sets Analysis (CoSSA) is a robust approach to identify haplotype specific SNPs; mapping and pedigree analysis of a potato wart disease resistance gene *Sen3*. *Plant Methods.* 2019;15:60. DOI 10.1186/s13007-019-0445-5.
- Prodhomme C., Peter G.V., Paulo M.J., Visser R.G.F., Vossen J.H., van Eck J.H. Distribution of P1(D1) wart disease resistance in potato germplasm and GWAS identification of haplotype-specific SNP markers. *Theor. Appl. Genet.* 2020;133:1859-1871. DOI 10.1007/s00122-020-03559-3.
- Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., Blas Sevillano R.H., Riseman A. Review of potato molecular markers to enhance trait selection. *Am. J. Potato Res.* 2015;92(4):455-472. DOI 10.1007/s12230-015-9455-7.
- Roupe van der Voort J., Lindeman W., Folkertsma R., Hutten R., Overmars H., van der Vossen E., Jacobsen E., Bakker J. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1998;96:654-661. DOI 10.1007/s001220050785.
- Roupe van der Voort J., van der Vossen E., Bakker E., Overmars H., van Zandvoort P., Hutten R., Klein Lankhorst R., Bakker J. Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:1122-1130. DOI 10.1007/s001220051588.
- Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Breed.* 2012;131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.
- Skupinová S., Vejl P., Sedlák P., Domkářová J. Segregation of DNA markers of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) resistance against Ro1 pathotype *Globodera rostochiensis* in selected F₁ progeny. *Rostlinná Výroba.* 2002;48(11):480-485. DOI 10.17221/4399-PSE.
- Toxopeus H.J., Huijsman C.A. Breeding for resistance to potato root eelworm. I. Preliminary data concerning the inheritance and the nature of resistance. *Euphytica.* 1953;2(3):180-186. DOI 10.1007/BF00053725.

ORCID ID

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

Благодарности. Изучение биоресурсной коллекции картофеля на наличие генов устойчивости к *Globodera rostochiensis* проводилось в рамках работ по гранту РНФ 16-16-04073П. Изучение биоресурсной коллекции картофеля на наличие генов устойчивости к *Synchytrium endobioticum* выполнено в рамках Комплексного плана научных исследований «Развитие селекции и семеноводства картофеля». Размножение и поддержание коллекции сортов и гибридов картофеля осуществлялись в рамках государственного задания ИЦиГ СО РАН (проект № 0259-2019-0011).

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР Ольге Сильвестровне Афанасенко и Александру Валерьевичу Хютти за определение устойчивости гибридов картофеля к ЗКН и заведующему Всероссийским пунктом по испытанию картофеля на устойчивость к раку и нематоды ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха Владимиру Вячеславовичу Мананкову.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.11.2020. После доработки 25.06.2021. Принята к публикации 25.06.2021.

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/

платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour

платформе Научной электронной библиотеки – 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

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 07.10.2021. Выход в свет 29.10.2021. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 9.76.

Уч.-изд. л. 11.6. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.) Заказ № 53. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

