

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2022 • 26 • 2



Молекулярная и клеточная биология / Генетика и биотехнология растений / Физиологическая генетика /
Медицинская генетика / Актуальные технологии

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/VJGB-22-14

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/VJGB-22-14

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

- 121 **ОБЗОР**
Репликационно-транскрипционный комплекс коронавируса: функции индивидуальных вирусных неструктурных субъединиц, свойства и архитектура их комплексов.
Е.Л. Мищенко, В.А. Иванисенко

Генетика и биотехнология растений

- 128 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Система молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы. *И.В. Поротников, О.П. Митрофанова, О.Ю. Антонова*
- 139 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Андрогенетическая реакция амфидиплоидов *Triticum durum-Dasyurum villosum* и их родительских форм. *Х. Стоянов, И. Белчев (на англ. языке)*
- 146 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Соответствие морфологии бутонных и пыльников стадиям развития мужского гаметофита дыни (*Cucumis melo* L.).
М.Л. Нгуен, Т.Н.Б.Т. Хуен, Д.М. Чинь, А.В. Воронина
- 153 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Регуляция дельта-орнитинамино-трансферазы *Arabidopsis thaliana* в развитии и в ответ на гормоны.
А.А. Егорова, С.В. Герасимова, А.В. Кочетов (на англ. языке)

Физиологическая генетика

- 159 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Зависимые и независимые от уровня эстрадиола эффекты FGF21 у самок мышей с ожирением. *Т.В. Яковлева, А.Ю. Казанцева, А.Д. Дубинина, Н.Ю. Балыбина, К.О. Баранов, Е.Н. Макарова, Н.М. Бажан*

169

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние продукта гена *Hsp67Bc* на продолжительность жизни, плодовитость и устойчивость *Drosophila melanogaster* к кратковременному тепловому стрессу. *Д.А. Малькева, С.А. Фёдорова, Е.В. Киселева (на англ. языке)*

Медицинская генетика

179

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Роль генов воспалительного ответа организма в формировании индивидуальных различий в уровне невербального интеллекта. *Р.Ф. Еникеева, А.В. Казанцева, Ю.Д. Давыдова, Р.Н. Мустафин, З.Р. Тахирова, С.Б. Малых, Ю.В. Ковас, Э.К. Хуснутдинова*

188

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм гена *TCF7L2* в популяциях пяти этносов Сибири.
Л.Э. Табиханова, Л.П. Осипова, Т.В. Чуркина, Е.Н. Воронина, М.Л. Филипенко

Актуальные технологии

196

ОБЗОР

Показатель снижения температуры растительного полога в селекции пшеницы на засухоустойчивость и жаростойкость. *С.Б. Лепехов*

202

ОБЗОР

Обзор современных методов обнаружения и идентификации болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений. *А.Ф. Чешкова*

214

ОБЗОР

Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*.
Н.Б. Рудометова, Д.Н. Щербаков, А.П. Рудометов, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко

Molecular and cell biology

- 121 **REVIEW**
Replication-transcription complex of coronaviruses: functions of individual viral non-structural subunits, properties and architecture of their complexes.
E.L. Mishchenko, V.A. Ivanisenko

Plant genetics and biotechnology

- 128 **ORIGINAL ARTICLE**
A system of molecular markers to identify alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes controlling reduced height in bread wheat.
I.V. Porotnikov, O.P. Mitrofanova, O.Yu. Antonova
- 139 **ORIGINAL ARTICLE**
Androgenic response of *Triticum durum-Dasypyrum villosum* amphidiploids and their parental forms. *H. Stoyanov, I. Belchev*
- 146 **ORIGINAL ARTICLE**
Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo* L.).
M.L. Nguyen, T.N.B.T. Huyen, D.M. Trinh, A.V. Voronina
- 153 **ORIGINAL ARTICLE**
Developmental and hormonal regulation of *Arabidopsis thaliana* ornithine-delta-aminotransferase. *A.A. Egorova, S.V. Gerasimova, A.V. Kochetov*

Physiological genetics

- 159 **ORIGINAL ARTICLE**
Estradiol-dependent and independent effects of FGF21 in obese female mice.
T.V. Jakovleva, A.Yu. Kazantseva, A.D. Dubinina, N.Yu. Balybina, K.O. Baranov, E.N. Makarova, N.M. Bazhan

- 169 **ORIGINAL ARTICLE**
The impact of the *Hsp67Bc* gene product on *Drosophila melanogaster* longevity, fecundity, and acute heat stress tolerance.
D. Malkeyeva, S.A. Fedorova, E. Kiseleva

Medical genetics

- 179 **ORIGINAL ARTICLE**
The role of inflammatory system genes in individual differences in nonverbal intelligence. *R.F. Enikeeva, A.V. Kazantseva, Yu.D. Davydova, R.N. Mustafin, Z.R. Takhirova, S.B. Malykh, Y.V. Kovas, E.K. Khusnutdinova*
- 188 **ORIGINAL ARTICLE**
TCF7L2 gene polymorphism in populations of five Siberian ethnic groups. *L.E. Tabikhanova, L.P. Osipova, T.V. Churkina, E.N. Voronina, M.L. Filipenko*


Mainstream technologies

- 196 **REVIEW**
Canopy temperature depression for drought- and heat stress tolerance in wheat breeding. *S.B. Lepekhov*
- 202 **REVIEW**
A review of hyperspectral image analysis techniques for plant disease detection and identification. *A.F. Cheshkova*
- 214 **REVIEW**
Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1. *N.B. Rudometova, D.N. Shcherbakov, A.P. Rudometov, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko*

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

Репликационно-транскрипционный комплекс коронавирусов: функции индивидуальных вирусных неструктурных субъединиц, свойства и архитектура их комплексов

Е.А. Мищенко , В.А. Иванисенко

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


Аннотация. Коронавирусы относятся к семейству Coronaviridae подсемейства Orthocoronavirinae и представляют собой оболочечные (+) РНК-вирусы с необычно длинным геномом. В настоящее время часто идентифицируются, вызывая продолжающуюся пандемию во всем мире, коронавирусы Severe Acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV) и новый коронавирус (2019-nCoV, SARS-CoV-2). Для сдерживания быстро распространяющейся, острой и часто тяжело протекающей инфекции широко применяются прошедшие клинические испытания вакцины, однако эффективных лекарств по-прежнему нет. Геномы SARS-CoV-2 и SARS-CoV идентичны на ~80 %, а SARS-CoV-2 и MERS-CoV – на ~50 %. Это свидетельствует об общих механизмах патогенеза коронавирусов и одних и тех же потенциальных терапевтических мишенях. Ферменты и эффекторные белки, входящие в состав репликационно-транскрипционного комплекса (РТК) коронавирусов, кодируются весьма крупным геном репликазы и представляют собой перспективные мишени действия потенциальных эффективных лекарств. Эти мишени включают папаин- и 3С-подобные цистеиновые протеиназы, осуществляющие процессинг двух больших вирусных полипротеинов, РНК-зависимую РНК-полимеразу, РНК-хеликазу, ферменты, модифицирующие вирусный геном, ферменты, обладающие 3'-5'-экзорибонуклеазной и уридилат-специфичной эндонуклеазной активностью, а также важные эффекторные белки. В настоящее время изучение сложных молекулярных механизмов сборки и функционирования РТК находится на пике изучения. Обзор посвящен актуальным и современным исследованиям свойств индивидуальных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов и включает изучение структур индивидуальных субъединиц РТК коронавирусов, доменной организации субъединиц и их функций, белок-белковых взаимодействий, свойств и архитектуры комплексов субъединиц, влияния мутаций, а также выявления мутаций, влияющих на жизнеспособность вируса в клеточной культуре.

Ключевые слова: неструктурные белки коронавирусов (CoVs); субъединицы репликазы CoVs; репликационно-транскрипционный комплекс CoVs; архитектура комплексов неструктурных белков CoVs.

Для цитирования: Мищенко Е.А., Иванисенко В.А. Репликационно-транскрипционный комплекс коронавирусов: функции индивидуальных вирусных неструктурных субъединиц, свойства и архитектура их комплексов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):121-127. DOI 10.18699/VJGB-22-15

Replication-transcription complex of coronaviruses: functions of individual viral non-structural subunits, properties and architecture of their complexes

E.L. Mishchenko , V.A. Ivanisenko

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

Abstract. Coronaviruses (CoVs) belong to the subfamily Orthocoronavirinae of the family Coronaviridae. CoVs are enveloped (+) RNA viruses with unusually long genomes. Severe acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV), and the novel coronavirus (2019-nCoV, SARS-CoV-2) have been identified as causing global pandemics. Clinically tested vaccines are widely used to control rapidly spreading, acute, and often severe infections; however, effective drugs are still not available. The genomes of SARS-CoV-2 and SARS-CoV are approximately 80 % identical, while the genomes of SARS-CoV-2 and MERS-CoV are approximately 50 % identical. This indicates that there may be common mechanisms of coronavirus pathogenesis and, therefore, potential therapeutic targets for each virus may be the same. The enzymes and effector proteins that make up the replication-transcription complex (RTC) of coronaviruses are encoded by a large replicase gene. These enzymes and effector proteins represent promising targets for potential therapeutic drugs. The enzyme targets include papain- and 3C-like cysteine proteinases that process two large viral polyproteins, RNA-dependent RNA polymerase, RNA helicase, viral genome-modifying enzymes, and enzymes with 3'-5' exoribonuclease or uridylylate-specific endonuclease activity.

Currently, there are many studies investigating the complex molecular mechanisms involved in the assembly and function of the RTC. This review will encompass current, modern studies on the properties and complexes of individual non-structural subunits of the RTC, the structures of individual coronavirus RTC subunits, domain organization and functions of subunits, protein-protein interactions, properties and architectures of subunit complexes, the effect of mutations, and the identification of mutations affecting the viability of the virus in cell culture.

Key words: non-structural proteins CoVs; subunits of replicase CoVs; replication-transcription complex of CoVs; architecture of non-structural protein complexes CoVs.

For citation: Mishchenko E.L., Ivanisenko V.A. Replication-transcription complex of coronaviruses: functions of individual viral non-structural subunits, properties and architecture of their complexes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):121-127. DOI 10.18699/VJGB-22-15

Введение

Новая коронавирусная инфекция внезапно распространилась по всему миру, часто вызывая тяжелые респираторные, кишечные и системные заболевания. Коронавирусы (CoVs) относятся к семейству Coronaviridae подсемейства Orthocoronavirinae, которое разделяется на α -, β -, γ - и δ -коронавирусы. Severe Acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome CoV (MERS-CoV), новый коронавирус (2019-nCoV, SARS-CoV-2), вирус гепатита мышей (MHV), бычий коронавирус (BCoV) относятся к β -коронавирусам (Malik et al., 2020). Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы с необычно длинным одноцепочечным (+) РНК-геномом (26–32 тыс. оснований). Геном SARS-CoV-2 близок к геному SARS-CoV (идентичность последовательности ~80 %), геномы SARS-CoV-2 и MERS-CoV менее близки (идентичность последовательности ~50 %) (Lu et al., 2020). Известно, что структура и функции белков сохраняются даже при 30 % уровне идентичности их аминокислотных последовательностей (Rost, 1999). Это свидетельствует об общих механизмах патогенеза CoVs и одних и тех же потенциальных терапевтических мишенях. 5'-проксимальные районы геномов CoVs включают кэп, 5'-нетранслируемый район (UTR) и довольно протяженный (включающий 2/3 генома) ген репликазы, кодирующий 16 неструктурных белков. 3'-области геномов CoVs кодируют структурные белки (S – спайковый, E – поверхностный, M – мембранный, N – нуклеокапсид), вспомогательные белки, количество которых варьирует у разных коронавирусов, а также 3'-UTR и поли(А)-тракт.

Репликационно-транскрипционный комплекс (РТК) CoVs представляет собой сложный ансамбль вирусных и, вероятно, клеточных белков, нарабатывающий (+) РНК-геном, а также набор субгеномных РНК CoVs в инфицированных клетках. Ген репликазы CoVs имеет две перекрывающиеся открытые рамки считывания, ORF1a и ORF1b, которые кодируют вирусные компоненты РТК. Экспрессия гена ведет к образованию полипротеина pp1a, кодируемого ORF1a, а рибосомальный сдвиг рамки на –1 перед кодоном терминации трансляции ORF1a и переключение на ORF1b приводят к полипротеину pp1ab, являющемуся продолжением pp1a. Полипротеины pp1a и pp1ab подвергаются процессингу, осуществляемому двумя вирусными цистеиновыми протеиназами, папаин-подобной протеиназой PL^{pro} и 3С-подобной протеиназой 3CL^{pro} (M^{pro}), с выходом промежуточных предшественников и 16 зрелых высококонсервативных неструктурных белков

(nsp), способных ассоциировать между собой и являющихся субъединицами РТК. Полипротеин pp1a включает белки nsp1–nsp11, а полипротеин pp1ab – все белки pp1a, а также nsp12–nsp16 (Naqvi et al., 2020).

Структурные и функциональные свойства консервативных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов

Молекулярные механизмы сборки и функционирования РТК не изучены. Однако структурные и функциональные свойства консервативных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов находятся сейчас на пике исследований и чрезвычайно важны для идентификации ключевых мишеней действия эффективных лекарств против коронавирусов:

nsp1 взаимодействует с 40S-субъединицей рибосом и подавляет инициацию трансляции хозяйских белков, в том числе факторов интерферонного ответа. Взаимодействие nsp1 с рибосомами ведет также к деградации хозяйских РНК. Таким образом, nsp1 подавляет клеточные защитные антивирусные механизмы (Kamitani et al., 2006; Narayanan et al., 2008);

nsp2 не входит в состав РТК в клеточной культуре. Но отсутствие nsp2 в клетках, инфицированных делеционными мутантами MHV Δ nsp2 или SARS-CoV Δ nsp2, снижает наработку вируса и вирусной РНК (Graham et al., 2005);

nsp3 и **nsp5** – протеиназы, осуществляющие процессинг полипротеинов pp1a и pp1ab с выходом индивидуальных компонент РТК. Домен(ы) папаин-подобной цистеиновой протеиназы (PL^{pro}) nsp3 осуществляют процессинг N-проксимальных районов pp1a и pp1ab. MHV nsp3 имеет два таких домена – PL1^{pro} (PL1P) и PL2^{pro} (PL2P). Домен PL1^{pro} расщепляет сайты nsp1/nsp2 и nsp2/nsp3, а домен PL2^{pro} – сайт nsp3/nsp4 (Hughes et al., 1995; Kanjanahaluethai et al., 2000). SARS-CoV nsp3 имеет единственный PL2^{pro} (PLP)-домен, расщепляющий все три сайта, nsp1/nsp2, nsp2/nsp3 и nsp3/nsp4 (Thiel et al., 2003). SARS-CoV PLP является антагонистом внутриклеточного иммунного ответа. Так, домен PLP блокирует активацию транскрипционных факторов IRF3 и NF- κ B, индуцирующих экспрессию IFN(I) и антивирусных генов, путем непосредственного ингибирования IKK α - и TBK1-киназ, которые активируют IRF3, а также посредством стабилизации I κ B α – ингибитора NF- κ B (Frieman et al., 2009). Домен PLP также эффективно гидролизует элементы убиквитина и продукта интерферон-стимулирующего гена 15 убиквитин-подобного белка, блокируя тем самым клеточный механизм посттрансляционного убиквитинирования и

усиливая вирусную репликацию (Daczowski et al., 2017). Однако nsp3 стабилизирует хозяйскую E3 убиквитинлигазу RCHY1 через взаимодействие своих SUD- и PL^{pro}-доменов с RCHY1 и активирует RCHY1-опосредованную деградацию p53-эффективного клеточного ингибитора репликации SARS-CoV (Ma-Lauer et al., 2016). SARS-CoV nsp3 взаимодействует с nsp5, nsp6, nsp12, nsp13, nsp14 и nsp16 в дрожжевой двугибридной (Y2H) системе и, вероятно, служит каркасом для сборки РТК (Imbert et al., 2008).

Протеиназа nsp5 является 3С-подобной цистеиновой протеиназой (3CL^{pro}, M^{pro}). Протеиназа M^{pro} играет ключевую роль в процессинге полипротеинов pp1a/1ab, расщепляя центральный и С-проксимальный районы pp1ab в 11 высококонсервативных сайтах с выходом зрелых белков nsp4–nsp16 (Ziebuhr et al., 2000; Thiel et al., 2003; Goyal B., Goyal D., 2020). Протеиназа M^{pro} активна только в виде димера. Самовыщепление MERS-CoV M^{pro} в nsp4/nsp5- и nsp5/nsp6-сайтах происходит в результате лиганд-индуцированного образования «незрелого димера» при сближении доменов III M^{pro} в составе двух полипротеинов (Tomar et al., 2015). Структурный анализ комплексов SARS-CoV-2 M^{pro} с известными противовирусными ингибиторами Восерпревир (пептидомиметик NS3/4A протеазы вируса гепатита С) и GC376 (ингибитор репликации CoVs) выявил взаимодействия между M^{pro} и данными ингибиторами на атомном уровне. Эти исследования важны для оптимизации и дизайна эффективных лекарств в борьбе с коронавирусами (Fu et al., 2020);

nsp6 взаимодействует с nsp2, nsp8, nsp9 в Y2H-системе (Brunn et al., 2007). Шесть из предсказанных гидрофобных доменов MHV nsp6 и SARS-CoV nsp6 являются трансмембранными доменами (Oostra et al., 2008). MHV nsp6 и SARS-CoV nsp6 локализованы в мембранах эндоплазматического ретикула (ЭР), индуцируют образование аутофагосом от мембран ЭР и активируют аутофагию (Cottam et al., 2011). Котрансфекция nsp3, nsp4 и nsp6, содержащих трансмембранные домены, индуцирует изменение внутренних мембран хозяйской клетки с образованием двухмембранных везикул, подобных везикулам, индуцированным SARS-CoV (Angelini et al., 2013);

nsp7 и **nsp8** взаимодействуют между собой. SARS-CoV nsp7 и nsp8 кокристаллизуются с образованием гексадекамерного суперкомплекса nsp7/8. Сборка суперкомплекса включает образование двух разных nsp7/8 гетеродимеров, D1 и D2, различающихся конформацией nsp8. Каждый из D1 и D2 димеризуется с образованием гетеротетрамеров T1 и T2, а взаимодействие двух T1 и двух T2 в порядке T1–T2–T1'–T2' с замыканием кольца через взаимодействие T1–T2' приводит к полной конструкции суперкомплекса с уникальной архитектурой: 16 молекул (8 молекул nsp7 и 8 – nsp8) тесно взаимодействуют друг с другом, образуя полую цилиндрическую структуру, в которой сосуществуют две конформации nsp8. Положительный заряд внутреннего канала цилиндра, а также его диаметр (30 Å) указывают на способность суперкомплекса nsp7/8 окружать и взаимодействовать с двуцепочечной РНК (дцРНК) (Zhai et al., 2005). Гексадекамерный суперкомплекс SARS-CoV nsp7/8 образуется также в растворе при эквимольном nsp7:nsp8 отношении (Zhai et al., 2005; Velthuis et al., 2012).

В растворе гексадекамер SARS-CoV nsp8/7 ассоциирует с дцРНК (Kd ~1.2 мкМ). Ассоциацию nsp8/7 с дцРНК обеспечивает nsp8, тогда как nsp7 ее усиливает (Velthuis et al., 2012). Индивидуальный SARS-CoV nsp8 обладает праймер-независимой РНК-зависимой РНК-полимеразной (RdRp) активностью и иницирует с низкой точностью синтез *de novo* коротких (менее 6 нуклеотидов) комплементарных олигомеров (праймеров) на матрицах одноцепочечных РНК (оцРНК) (Imbert et al., 2006). SARS-CoV nsp8 и nsp8/7 комплексы обладают также праймер-зависимой RdRp-активностью (Velthuis et al., 2012). FCoV (кошачий коронавирус) nsp7/8-комплекс представляет собой 2:1 гетеротример, состоящий из двух молекул nsp7 и одной молекулы nsp8 без образования полой структуры как в кристаллическом виде, так и в растворе. FCoV nsp7/8 обладает праймер-независимой RdRp-активностью (Xiao et al., 2012);

nsp9 является оцРНК-связывающим белком (Egloff et al., 2004; Miknis et al., 2009). В экспериментах *in vitro* в растворе обнаружены как мономерная, так и димерная формы PDCoV (свиной δ-коронавирус) nsp9 и PEDV (вирус свиной эпидемической диареи, относящийся к α-коронавирусам) nsp9 (Zeng et al., 2018), а также димерная форма SARS-CoV nsp9 (Miknis et al., 2009). Исследование кристаллических структур SARS-CoV nsp9 (Egloff et al., 2004; Miknis et al., 2009), PDCoV nsp9 и PEDV nsp9 (Zeng et al., 2018) выявило димерные формы nsp9. Мономер SARS-CoV nsp9 характеризуется новой структурой среди белков репликативных комплексов РНКовых вирусов, особенностью которой сходны со структурами олигосахарид/олигонуклеотид-связывающих белков (Egloff et al., 2004). Мутации, влияющие на димеризацию SARS-CoV nsp9, ослабляют взаимодействие этого белка с оцРНК и летальны для репликации SARS-CoV в клеточной культуре (Miknis et al., 2009);

nsp10 с микромолярной аффинностью взаимодействует с дцРНК, дцДНК и оцРНК (Joseph et al., 2006). Исследования кристаллической структуры SARS-CoV nsp10 показали, что структура мономера включает два цинковых пальца и является новой среди структур белков с цинковыми пальцами. Идентифицированы мотивы цинк-связывающих последовательностей nsp10. Двенадцать идентичных мономеров образуют уникальную сферическую додекамерную архитектуру, которая, предположительно, может быть функциональной формой nsp10 (Joseph et al., 2006; Su et al., 2006). С помощью двугибридного анализа в клетках млекопитающих выявлены взаимодействия SARS-CoV nsp10 с nsp14 и nsp16 (Pan et al., 2008);

nsp11 представляет собой короткий пептид, появляющийся в результате расщепления полипротеина pp1a протеиназой 3CL^{pro}/M^{pro} в сайте nsp10/nsp11. Пептид nsp11 кодирован областью геномной РНК, где происходит трансляционный сдвиг рамки считывания (смена ORF1a на ORF1b), который дает начало белкам 12nsp–nsp16 в более длинном, чем pp1a, полипротеине pp1ab. SARS-CoV-2 nsp11 включает всего 13 аминокислотных остатков и имеет неупорядоченную конформацию, динамика которой исследована в присутствии липидов – миметиков мембран. Мицеллы лаурилсульфата натрия вызывают

трансформацию неупорядоченной конформации nsp11 в α -спираль (Gadhav et al., 2021);

nsp14 бифункционален. N-конечный домен nsp14 обладает 3'-5'-экзорибонуклеазной активностью (ExoN), а его C-конечный домен проявляет (гуанин-N7)-метилтрансферазную активность (N7-МТаз). ExoN корректирует низкую точность синтеза комплементарной цепи вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) nsp12 и катализирует удаление 3'-конечных ошибочных нуклеотидов в дцРНК. N7-МТаз катализирует метилирование кэпа вирусной РНК по N7 гуанина в присутствии S-аденозилметионина (донора метильных групп). N7-МТаз имеет S-аденозилметионин-связывающий мотив, узнает кэп вирусной GpppРНК и метилирует N7 гуанина GpppРНК с образованием ⁷MeGpppРНК (кэп-0). Кэп-0 выполняет важную роль в блокировании деградации вирусной РНК 5'-3'-экзорибонуклеазами, инициации трансляции и ускользании от контроля иммунной системы (Chen et al., 2009; Tahir, 2021). Мутанты каталитического мотива MERS-CoV ExoN и SARS-CoV-2 ExoN не жизнеспособны в клеточной культуре (Ogando et al., 2020). SARS-CoV nsp10 ассоциирует с ExoN-доменом SARS-CoV nsp14, усиливая ExoN-активность nsp14 более чем в 35 раз, не влияя на N7-МТазную активность nsp14 (Bouvet et al., 2012). Структурные исследования SARS-CoV nsp10/14-комплекса показали, что одна молекула nsp10 ассоциирует с ExoN-доменом nsp14, стабилизируя и усиливая активность ExoN. Определена архитектура nsp10/14-комплекса, включающая два района контактов молекулы nsp10 с ExoN-доменом nsp14 (Ma et al., 2015);

nsp16 обладает (нуклеозид-2'О)-метилтрансферазной активностью (2'О-МТаз). 2'О-МТаз узнает кэп-0 вирусной РНК и катализирует перенос метильной группы с S-аденозилметионина на 2'ОН группу рибозы первого после N7-метилированного гуанина нуклеотида с образованием ⁷MeGpppN₂'OMe-RNA (превращение кэп-0 в кэп-1). SARS-CoV nsp10 ассоциирует с nsp16 и стимулирует 2'О-МТазную активность nsp16 (Bouvet et al., 2010). Картирование с помощью мутагенеза поверхностных аминокислотных остатков SARS-CoV nsp10, вовлеченных во взаимодействие nsp10 с nsp14 и структурный анализ nsp10/16-комплекса, выявили перекрытие поверхностей nsp10, взаимодействующих с nsp14 и nsp16. Nsp10 может служить платформой, рекрутирующей nsp14 или nsp16 к РТК, стимулируя ExoN-активность nsp14 или 2'О-МТазную активность nsp16, и быть важным регулятором РТК. Идентифицированы мутации, нарушающие nsp10–nsp14 и nsp10–nsp16 взаимодействия. Некоторые из них приводят к нежизнеспособному фенотипу вируса в клеточной культуре (Bouvet et al., 2014);

nsp12 (RdRp) катализирует синтез комплементарных цепей РНК на (+) и (–) матрицах вирусной РНК и представляет собой ключевой фермент РТК. CoVs nsp12 инициирует *de novo* с 3'-конца вирусного генома синтез полноразмерной (–) цепи РНК, а также субгеномных (–) РНК-транскриптов, имеющих 3'-концы разной длины. В свою очередь, полноразмерные (–) а также субгеномные (–) цепи РНК служат матрицами для синтеза нового РНК-генома, а также субгеномных (+) РНК-транскриптов. Субгеномные (+) РНК важны для экспрессии структурных

и вспомогательных белков, кодируемых генами 3'-проксимальной области вирусного генома, не доступными для рибосом, транслирующих вирусный геном (Pasternak et al., 2006). Полноразмерный рекомбинантный SARS-CoV nsp12 ассоциирует с короткими (длиной 20–30 нуклеотидов) дцРНК и оцРНК (Kd 0.13 и 0.1 мкМ соответственно), а также инициирует праймер-зависимый синтез РНК как на гомо-, так и гетерополимерных РНК-матрицах аналогичной длины (Velthuis et al., 2010). Однако рекомбинантный SARS-CoV nsp12 практически не ассоциирует с праймер-матрицей, имитирующей 3'-конечные UTR SARS-CoV-генома, и не проявляет RdRp-активность на данной праймер-матрице (Subissi et al., 2014).

Методом криоэлектронной микроскопии определена структура мономера CoV-19 nsp12, которая включает нидовирус-специфичный N-концевой домен RdRp-ассоциированной нуклеотидилтрансферазы (NiRAN), интерфейсный домен и C-концевой RdRp-домен. C-концевой RdRp-домен имеет консервативную среди семейства вирусных полимераз архитектуру, подобную правой руке, которая включает три субдомена: пальцев, ладони и большого пальца. Активный центр сформирован консервативными мотивами аминокислотных остатков, локализованными в субдомene ладони. Определены мотивы канала входа нуклеотидтрифосфатов, входа праймер-матрицы и выхода образующейся цепи РНК, которые сходятся в центральной полости, где эти мотивы осуществляют матрично-зависимый синтез РНК (Gao et al., 2020).

Ассоциация nsp7/8-комплекса с nsp12 приводит к образованию nsp7/8/12-комплекса, обладающего высокой РНК-связывающей способностью, полимеразной активностью и процессивностью: этот комплекс способен инициировать *de novo* синтез РНК на матрице 3'-UTR-района SARS CoV генома с элонгацией РНК-продукта более 300 нуклеотидов. Для осуществления nsp7/8/12-комплексом процессивного синтеза РНК три аминокислотных остатка nsp7 (K7, H36, N37) и один аминокислотный остаток nsp8 (K58) необходимы для взаимодействия nsp7/8/12 с РНК-матрицей, а четыре аминокислотных остатка nsp8 (D99, P116, P183, R190) вовлечены во взаимодействие с nsp12 (Subissi et al., 2014). Более того, nsp7/8/12 способен ассоциировать с nsp14 с образованием уникального мультикомплекса nsp7/8/12/14. Этот ансамбль неструктурных белков обладает высокой РНК-полимеразной активностью, а также активностью, вовлеченной в 5'-РНК-кэпинг, но практически не обладает ExoN-активностью (Subissi et al., 2014). Методом криоэлектронной микроскопии определена структура CoV-19 и SARS-CoV nsp12/7/8-комплексов. Эти комплексы, включающие мономеры nsp12, nsp8 и гетеродимер nsp7/nsp8, имеют подобную архитектуру: nsp8-1 взаимодействует с субдоменом пальцев RdRp, а субъединицы nsp7 и nsp8-2 – с субдоменом большого пальца RdRp (Gao et al., 2020);

nsp13 обладает хеликазной и нуклеозидтрифосфатазной (НТРаза) активностью; взаимодействует с nsp7, nsp8 и nsp12 в Y2H-системе (Brunn et al., 2007; Pan et al., 2008). Определена кристаллическая структура MERS-CoV nsp13. Эта структура включает N-конечный цинк-связывающий домен (ZBD), богатый Cys/His-остатками, координирующими три иона цинка, а также C-конечные хеликазные

RecA1- и RecA2-домены, содержащие параллельные β -цепи (Hao et al., 2017). nsp13-хеликаза разделяет цепи дцРНК и дцДНК со свисающими (длиной 5–20 нуклеотидов) 5'-концами. При этом nsp13 взаимодействует с одноцепочечным 5'-концом частичного дуплекса нуклеиновых кислот обоих типов и раскручивает его в 5'–3'-направлении, используя энергию гидролиза 5'-дезоксидрибонуклеотидтрифосфатов (Ivanov et al., 2004; Adedeji et al., 2012, 2016). РНК-5'-трифосфатазная активность nsp13 катализирует отщепление γ -фосфата от 5'-концевого нуклеотида РНК и, возможно, вовлечена в кэпирование вирусных РНК (Ivanov et al., 2004). Исследования SARS-CoV nsp13 показали, что раскручивание дуплексов ДНК происходит дискретными интервалами длиной ~9.3 пар оснований (п. о.) со скоростью 30 интервалов/с, т. е. скорость раскручивания дуплексов ДНК ~280 п. о./с.

Хеликазная активность nsp13 усиливается в ~2 раза при взаимодействии nsp13 с nsp12, что позволяет предполагать взаимодействие этих белков в функциональных РТК (Adedeji et al., 2012). При взаимодействии SARS-CoV-2 nsp13 с РТК, включающим nsp7/2nsp8/nsp12: РНК, образуются стабильные комплексы 2nsp13-РТК (67 %), nsp13-РТК (20 %), а также димер (2nsp13-РТК)₂ (13 %). С помощью электронной криомикроскопии определена архитектура доминирующего комплекса 2nsp13-РТК, которая включает взаимодействие ZBD первой молекулы nsp13 с N-концом nsp8b и субдоменом большого пальца nsp12, а также взаимодействие ZBD второй молекулы nsp13 с N-концом nsp8a. При этом каталитический RecA1 хеликазный домен первой молекулы nsp13 фиксирован против nsp7 и головы nsp8b (Chen et al., 2020);

nsp15 – нидовирусная уридилат-специфичная эндорибонуклеаза (NendoU), расщепляет РНК по 3'-уридилату в неспаренных, одноцепочечных и петлевых районах (Bhardwaj et al., 2006; Zhang et al., 2018). Кристаллические структуры SARS-CoV-2, SARS- и MERS-CoVs nsp15 гомологичны и представляют собой функционально активные гексамеры, образованные димеризацией тримеров. Каждый из протомеров гексамера включает три домена: N-конечный, средний и C-конечный каталитический NendoU-домен. При сборке тримера N-конечный домен одного протомера упакован в щель между центральным и C-конечными доменами соседнего протомера. При сборке гексамера N-конечные домены протомеров двух тримеров упакованы «спина к спине» и находятся в центре гексамерной структуры, в то время как C-конечные домены, содержащие активные центры, расположены вовне, в вершинах клеверного листа. Такая архитектура обеспечивает nsp15 шестью функционально активными центрами (Zhang et al., 2018; Kim et al., 2020).

Содержание уридилата в РНК, Mn^{+2} и в меньшей степени Mg^{+2} увеличивает аффинность nsp15 к РНК. Гексамерная структура SARS-CoV и MERS-CoV nsp15 критична для взаимодействия с субстратом и каталитической активности: исследование серии мутантов этого белка в моно-, три- и гексамерной формах выявило для мономеров и тримеров как слабое взаимодействие с РНК (rU_{16-20}), так и низкую каталитическую активность по сравнению с гексамерами, а также nsp15 дикого типа (Bhardwaj et al., 2006; Zhang et al., 2018). Более того, nsp8, а также

комплекс nsp7/nsp8 взаимодействуют с MERS-CoV nsp15, усиливая связывающую способность гексамера nsp15 к РНК и его каталитическую активность (Zhang et al., 2018). NendoU-активность nsp15 является антагонистом IFN-индуцированного противовирусного ответа клетки, а также стимулирует инициацию трансляции вирусной РНК (Deng et al., 2018, 2019).

Для CoVs характерно большое количество неструктурных субъединиц и их комплексов в составе РТК. Важной особенностью является также то, что некоторые субъединицы имеют домены, обладающие разной ферментативной активностью (nsp14, EхoN и N7-МТазная активность; nsp13, хеликазная и нуклеозидтрифосфатазная активность). Неструктурные белки CoVs имеют как универсальный для (+) РНК-вирусов набор активностей: протеиназную, РНК-зависимую РНК-полимеразную (nsp12), РНК-хеликазную (nsp13), так и редкие и даже уникальные домены, вовлеченные в мРНК-кэпирование, кэп-модификацию (nsp14, nsp16), регулирующие надежность репликации РНК-генома и обладающие 3'–5'-экзорибонуклеазной активностью (nsp14), а также уридилат-специфичной эндонуклеазной активностью (nsp15). Многие белки служат кофакторами для важнейших ферментов (nsp7, nsp8, nsp10), а также влияют на клеточные процессы, в частности подавляют противовирусный клеточный ответ (nsp1, nsp3, nsp6, nsp15). Структуры nsp9 и nsp10 – новые среди структур белков репликативных комплексов РНК-вирусов. Субъединицы CoVs и их комплексы имеют сложную архитектуру. Так, nsp7 и nsp8 образуют функциональный уникальный гексадекамерный суперкомплекс, nsp10 включает 12 идентичных субъединиц, а nsp15 представляет собой функционально активный гексамер. Сложная архитектура РТК определена на модели 2 nsp13/2 nsp8/1 nsp7/1 nsp12.

Заключение

Отсутствие эффективных лекарств против новой коронавирусной инфекции является вызовом нашего времени. РТК CoVs реплицирует (+) РНК-геном CoVs и определяет наработку вируса в инфицированных клетках с помощью пока неизученных молекулярных механизмов. Большие усилия исследователей направлены на создание структурно-функциональной сети взаимодействий протеома CoVs, а также его взаимодействий с хозяйской клеткой, которая представляла бы масштабную панель терапевтических мишеней. Определение структур индивидуальных неструктурных субъединиц РТК и их комплексов, идентификация ключевых взаимодействующих аминокислотных остатков и типов связей между ними позволяют осуществить дизайн селективных и эффективных ингибиторов. Исследования с помощью биохимических методов, а также мутационный анализ дают возможность выявлять факторы, влияющие на эффективность наработки вирусного РНК-генома и вируса в инфицированной клетке, множественные эффекты вирусных белков на хозяйскую клетку и потенциальные ключевые мишени действия лекарств.

Список литературы / References

Adedeji A.O., Lazarus H. Biochemical characterization of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *mSphere*. 2016;1(5): e00235-16. DOI 10.1128/mSphere.00235-16.

- Adedeji A.O., Marchand B., Velthuis A.J.W., Snijder E.J., Weiss S., Eoff R.L., Singh K., Sarafianos S.G. Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One*. 2012;7(5):e36521. DOI 10.1371/journal.pone.0036521.
- Angelini M.M., Akhlaghpour M., Neuman B.W., Buchmeier M.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*. 2013;4(4):e00524-13. DOI 10.1128/mBio.00524-13.
- Bhardwaj K., Sun J., Holzenburg A., Guarino L.A., Kao C.C. RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J. Mol. Biol.* 2006;361(2):243-256. DOI 10.1016/j.jmb.2006.06.021.
- Bouvet M., Debarnot C., Imbert I., Selisko B., Snijder E.J., Canard B., Decroly E. *In vitro* reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000863. DOI 10.1371/journal.ppat.1000863.
- Bouvet M., Imbert I., Bissis L., Gluais L., Canard B., Decroly E. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(24):9372-9377. DOI 10.1073/pnas.1201130109.
- Bouvet M., Lugari A., Posthuma C.C., Zevenhoven J.C., Bernard S., Betzi S., Imbert I., Canard B., Guillemot J.-C., Lécine P., Pfefferle S., Drosten C., Snijder E.J., Decroly E., Morelli X. Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J. Biol. Chem.* 2014;289(37):25783-25796. DOI 10.1074/jbc.M114.577353.
- Brunn A., Teepe C., Simpson J.C., Pepperkok R., Friedel C.C., Zimmer R., Roberts R., Baric R., Haas J. Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome. *PLoS One*. 2007;2(5):e459. DOI 10.1371/journal.pone.0000459.
- Chen J., Malone B., Llewellyn E., Grasso M., Shelton P.M.M., Olinares P.D.B., Maruthi K., Eng E.T., Vatandaslar H., Chait B.T., Kapoor T.M., Darst S.A., Campbell E.A. Structural basis for helicase-polymerase coupling in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. *Cell*. 2020;182(6):1560-1573.e13. DOI 10.1016/j.cell.2020.07.033.
- Chen Y., Cai H., Pan J., Xiang N., Tien P., Ahola T., Guo D. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106(9):3484-3489. DOI 10.1073/pnas.0808790106.
- Cottam E.M., Maier H.J., Manifava M., Vaux L.C., Chandra-Schoenfelder P., Gemer W., Britton P., Ktistakis N.T., Wileman T. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegaosome intermediate. *Autophagy*. 2011;7(11):1335-1347. DOI 10.4161/auto.7.11.16642.
- Daczkowski C.M., Dzimianski J.V., Clasman J.R., Goodwin O., Mesecar A.D., Pegan S.D. Structural insights into the interaction of coronavirus papain-like proteases and interferon-stimulated gene product 15 from different species. *J. Mol. Biol.* 2017;429(11):1661-1683. DOI 10.1016/j.jmb.2017.04.011.
- Deng X., Baker S.C. An "Old" protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. *Virology*. 2018;517:157-163. DOI 10.1016/j.virol.2017.12.024.
- Deng X., Geelen A., Buckley A.C., O'Brien A., Pillatzki A., Lager K.M., Faaberg K.S., Baker S.C. Coronavirus endoribonuclease activity in porcine epidemic diarrhea virus suppresses type I and type III interferon responses. *J. Virol.* 2019;93(8):e02000-18. DOI 10.1128/JVI.02000-18.
- Egloff M.-P., Ferron F., Campanacci V., Longhi S., Rancurel C., Dutarte H., Snijder E.J., Gorbalenya A.E., Cambillau C., Canard B. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(11):3792-3796. DOI 10.1073/pnas.0307877101.
- Frieman M., Ratia K., Johnston R.E., Mesecar A.D., Baric R.S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* 2009;83(13):6689-6705. DOI 10.1128/JVI.02220-08.
- Fu L., Ye F., Feng Y., Yu F., Wang Q., Wu Y., Zhao C., Sun H., Huang B., Niu P., Song H., Shi Y., Li X., Tan W., Qi J., Gao G.F. Both Beceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease. *Nat. Commun.* 2020;11(1):4417. DOI 10.1038/s41467-020-18233-x.
- Gadhave K., Kumar P., Kumar A., Bhardwaj T., Garg N., Giri R. Conformational dynamics of 13 amino acids long NSP11 of SARS-CoV-2 under membrane mimetics and different solvent conditions. *Microb. Pathog.* 2021;158:105041. DOI 10.1016/j.micpath.2021.105041.
- Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L., Ge J., Zheng L., Zhang Y., Wang H., Zhu Y., Zhu C., Hu T., Hua T., Zhang B., Yang X., Li J., Yang H., Liu Z., Xu W., Guddat L.W., Wang Q., Lou Z., Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020;368(6492):779-782. DOI 10.1126/science.abb7498.
- Goyal B., Goyal D. Targeting the dimerization of the main protease of coronaviruses: a potential broad-spectrum therapeutic strategy. *ACS Comb. Sci.* 2020;22(6):297-305. DOI 10.1021/acscombsci.0c00058.
- Graham R.L., Sims A.C., Brockway S.M., Baric R.S., Denison M.R. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* 2005;79(21):13399-13411. DOI 10.1128/JVI.79.21.13399-13411.2005.
- Hao W., Wojdyla J.A., Zhao R., Han R., Das R., Zlatev I., Manoharan M., Wang M., Cui S. Crystal structure of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006474. DOI 10.1371/journal.ppat.1006474.
- Hughes S.A., Bonilla P.J., Weiss S.R. Identification of the murine coronavirus p28 cleavage site. *J. Virol.* 1995;69(2):809-813. DOI 10.1128/JVI.69.2.809-813.1995.
- Imbert I., Guillemot J.-C., Bourhis J.-M., Bussetta C., Coutard B., Egloff M.-P., Ferron F., Gorbalenya A.E., Canard B. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* 2006;25(20):4933-4942. DOI 10.1038/sj.emboj.7601368.
- Imbert I., Snijder E.J., Dimitrova M., Guillemot J.-C., Lécine P., Canard B. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* 2008;133(2):136-148. DOI 10.1016/j.virusres.2007.11.017.
- Ivanov K.A., Thiel V., Dobbe J.C., Meer Y., Snijder E.J., Ziebuhr J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* 2004;78(11):5619-5632. DOI 10.1128/JVI.78.11.5619-5632.2004.
- Joseph J.S., Saikatendu K.S., Subramanian V., Neuman B.W., Brooun A., Griffith M., Moy K., Yadav M.K., Velasquez J., Buchmeier M.J., Stevens R.C., Kuhn P. Crystal structure of nonstructural protein 10 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus reveals a novel fold with two zinc-binding motifs. *J. Virol.* 2006;80(16):7894-7901. DOI 10.1128/JVI.00467-06.
- Kamitani W., Narayanan K., Huang C., Lokugamage K., Ikegami T., Ito N., Kubo H., Makino S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(34):12885-12890. DOI 10.1073/pnas.0603144103.
- Kanjanahaluethai A., Baker S.C. Identification of mouse hepatitis virus papain-like proteinase 2 activity. *J. Virol.* 2000;74(17):7911-7921. DOI 10.1128/jvi.74.17.7911-7921.2000.
- Kim Y., Jedrzejczak R., Maltseva N.I., Wilamowski M., Endres M., Godzik A., Michalska K., Joachimiak A. Crystal structure of Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2. *Protein Sci.* 2020;29(7):1596-1605. DOI 10.1002/pro.3873.
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and

- epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-574. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- Ma Y., Wu L., Shaw N., Gao Y., Wang J., Sun Y., Lou Z., Yan L., Zhang R., Rao Z. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(30):9436-9441. DOI 10.1073/pnas.1508686112.
- Ma-Lauer Y., Carbajo-Lozoya J., Hein M.Y., Müller M.A., Deng W., Lei J., Meyer B., Kusov Y., von Brunn B., Bairad D.R., Hünten S., Drosten C., Hermeking H., Leonhardt H., Mann M., Hilgenfeld R., von Brunn A. p53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PL^{pro} via E3 ubiquitin ligase RCHY1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(35):E5192-E5201. DOI 10.1073/pnas.1603435113.
- Malik Y.S., Sircar S., Bhat S., Sharun K., Dhama K., Dadar M., Tiwari R., Chaicumpa W. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV) – current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet. Q.* 2020;40(1):68-76. DOI 10.1080/01652176.2020.1727993.
- Miknis Z.J., Donaldson E.F., Umland T.C., Rimmer R.A., Baric R.S., Schultz L.W. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J. Virol.* 2009; 83(7):3007-3018. DOI 10.1128/JVI.01505-08.
- Naqvi A.A.T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I.K., Singh A., Atif S.M., Hariprasad G., Hasan G.M., Hassan M.I. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(10):165878. DOI 10.1016/j.bbdis.2020.165878.
- Narayanan K., Huang C., Lokugamage K., Kamitani W., Ikegami T., Tseng C.-T.K., Makino S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J. Virol.* 2008;82(9):4471-4479. DOI 10.1128/JVI.02472-07.
- Ogando N.S., Zevenhoven-Dobbe J.C., Meer Y., Bredenbeek P.J., Posthuma C.C., Snijder E.J. The enzymatic activity of the nsp14 exoribonuclease is critical for replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *J. Virol.* 2020;94(23):e01246-20. DOI 10.1128/JVI.01246-20.
- Oostra M., Hagemeijer M.C., Gent M., Bekker C.P.J., Lintelo E.G., Rottier P.J.M., Haan C.A.M. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J. Virol.* 2008;82(24):12392-12405. DOI 10.1128/JVI.01219-08.
- Pan J., Peng X., Gao Y., Li Z., Lu X., Chen Y., Ishaq M., Liu D., Dediego M.L., Enjuanes L., Guo D. Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication. *PLoS One*. 2008;3(10):e3299. DOI 10.1371/journal.pone.0003299.
- Pasternak A.O., Spaan W.J.M., Snijder E.J. Nidovirus transcription: how to make sense...? *J. Gen. Virol.* 2006;87(6):1403-1421. DOI 10.1099/vir.0.81611-0.
- Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 1999;12(2):85-94. DOI 10.1093/protein/12.2.85.
- Su D., Lou Z., Sun F., Zhai Y., Yang H., Zhang R., Joachimiak A., Zhang X.C., Bartlam M., Rao Z. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J. Virol.* 2006;80(16):7902-7908. DOI 10.1128/JVI.00483-06.
- Subissi L., Posthuma C.C., Collet A., Zevenhoven-Dobbe J.C., Gorbalenya A.E., Decroly E., Snijder E.J., Canard B., Imbert I. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(37):E3900-E3909. DOI 10.1073/pnas.1323705111.
- Tahir M. Coronavirus genomic nsp14-ExoN, structure, role, mechanism, and potential application as a drug target. *J. Med. Virol.* 2021; 93(7):4258-4264. DOI 10.1002/jmv.27009.
- Thiel V., Ivanov K.A., Putics Á., Hertzog T., Schelle B., Bayer S., Weißbrich B., Snijder E.J., Rabenau H., Doerr H.W., Gorbalenya A.E., Ziebuhr J. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* 2003;84(9):2305-2315. DOI 10.1099/vir.0.19424-0.
- Tomar S., Johnston M.L., John S.E.St., Osswald H.L., Nyalapatla P.R., Paul L.N., Ghosh A.K., Denison M.R., Mesecar A.D. Ligand-induced dimerization of Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus nsp5 protease (3CLpro): implications for nsp5 regulation and the development of antivirals. *J. Biol. Chem.* 2015;290(32):19403-19422. DOI 10.1074/jbc.M115.651463.
- Velthuis A.J.W., Arnold J.J., Cameron C.E., Worm S.H.E., Snijder E.J. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(1):203-214. DOI 10.1093/nar/gkp904.
- Velthuis A.J.W., Worm S.H.E., Snijder E.J. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both *de novo* initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(4):1737-1747. DOI 10.1093/nar/gkr893.
- Xiao Y., Ma Q., Restle T., Shang W., Svergun D.I., Ponnusamy R., Sczakiel G., Hilgenfeld R. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity. *J. Virol.* 2012;86(8):4444-4454. DOI 10.1128/JVI.06635-11.
- Zeng Z., Deng F., Shi K., Ye G., Wang G., Fang L., Xiao S., Fu Z., Peng G. Dimerization of coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity. *J. Virol.* 2018;92(17):e00692-18. DOI 10.1128/JVI.00692-18.
- Zhai Y., Sun F., Li X., Pang H., Xu X., Bartlam M., Rao Z. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7–nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005;12(11):980-986. DOI 10.1038/nsmb999.
- Zhang L., Li L., Yan L., Ming Z., Jia Z., Lou Z., Rao Z. Structural and biochemical characterization of endoribonuclease nsp15 encoded by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2018; 92(22):e00893-18. DOI 10.1128/JVI.00893-18.
- Ziebuhr J., Snijder E.J., Gorbalenya A.E. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(4):853-879. DOI 10.1099/0022-1317-81-4-853.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.10.2021. После доработки 24.11.2021. Принята к публикации 25.11.2021.

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

Система молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы

И.В. Поротников , О.П. Митрофанова, О.Ю. Антонова


Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
 i.v.porotnikov@gmail.com

Аннотация. Мутантные аллели генов *Rht-B1* и *Rht-D1* (*Reduced height*) широко используют для создания короткостебельных сортов мягкой пшеницы интенсивного типа. Эти гены и фланкирующие их области секвенированы, в последовательностях описаны ассоциированные с изменением высоты растения однонуклеотидные замены, приводящие к образованию нонсенс-кодонов (аллели *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b*), и различные инсерции (аллели *Rht-B1c*, *Rht-B1h* и *Rht-B1i-1*). Для идентификации такого типа однонуклеотидных мутаций разработаны ДНК-маркеры, основанные на принципе аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако идентификация аллелей этим методом предъявляет повышенные требования к соблюдению условий реакции, а получаемые результаты не всегда однозначны. Альтернативой может быть CAPS-технология, детектирующая различия в последовательностях путем рестрикции ПЦР-продуктов. В случае отсутствия рестриктаз, способных расщеплять ДНК в месте локализации точечной мутации, рестрикционные сайты могут быть искусственно внесены в последовательность праймера (derived CAPS). Цель настоящей работы – разработать CAPS- и dCAPS-маркеры для выявления замен оснований, подобрать по литературным источникам STS-маркеры для детекции инсерций и тем самым предложить систему молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности, часто используемых и перспективных для селекции. Разработано три CAPS-маркера для выявления аллелей *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1p* и два dCAPS-маркера для *Rht-B1b* и *Rht-B1e*, предложены программы для их амплификации. По литературным источникам подобраны STS-маркеры аллелей *Rht-B1c*, *Rht-B1h*, *Rht-B1i-1*, содержащих инсерции. Предложенная система маркеров апробирована при генотипировании 11 образцов мягкой пшеницы из коллекции ВИР, несущих вышеуказанные мутантные аллели генов короткостебельности и аллели дикого типа *Rht-B1a* и *Rht-D1a*. Наличие нонсенс-мутаций подтверждено также при помощи аллель-специфичной ПЦР. Эта система маркеров наряду с уже существующими может быть использована для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы с целью генетического скрининга образцов *ex situ* коллекций и/или в маркер-ориентированной селекции.
Ключевые слова: *Triticum aestivum*; аллели *Rht*-генов; AS-PCR; CAPS; dCAPS; генотипирование.

Для цитирования: Поротников И.В., Митрофанова О.П., Антонова О.Ю. Система молекулярных маркеров для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* у мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):128-138. DOI 10.18699/VJGB-22-16

A system of molecular markers to identify alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes controlling reduced height in bread wheat

I.V. Porotnikov , O.P. Mitrofanova, O.Yu. Antonova

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
 i.v.porotnikov@gmail.com

Abstract. Mutant alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* (*Reduced height*) genes are widely used in bread wheat breeding for the development of intensive-type cultivars. These genes and their flanking regions have been sequenced and the point mutations leading to the nonsense codons (*Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* and *Rht-D1b* alleles) and various insertions (*Rht-B1c*, *Rht-B1h* and *Rht-B1i-1*) associated with a change in plant height have been described. DNA-markers based on the allele-specific PCR have been developed to identify single-nucleotide changes. However, the use of such technique imposes stringent PCR conditions, and the resulting data are not always unambiguous. An alternative can be found in the CAPS technology: it detects differences in sequences by digesting PCR products. In the absence of restrictases capable of digesting DNA at the point mutation site, restriction sites can be introduced into the primer sequence (derived CAPS). The aim of this study was to propose a system of CAPS-, dCAPS- and STS-markers for identifying alleles of the reduced height genes frequently used in breeding programs. Three CAPS have been developed to identify the *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1p* alleles, as well as two dCAPS for *Rht-B1b*, *Rht-B1e*. STS-markers for the insertion-containing alleles *Rht-B1c*, *Rht-B1h* and *Rht-B1i-1* have been selected from publications. The proposed markers were tested during the genotyping of 11 bread wheat accessions from the VIR collection with the abovementioned mutant

alleles and the wild-type *Rht-B1a* and *Rht-D1a*. The presence of nonsense mutations was also confirmed by the results of allele-specific PCR. This marker system, along with the existing ones, can be used to identify dwarfing alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes in bread wheat for genetic screening of accessions from *ex situ* collections and/or for marker-assisted selection.

Key words: *Triticum aestivum*; alleles of *Rht*-genes; AS-PCR; CAPS; dCAPS; genotyping.

For citation: Porotnikov I.V., Mitrofanova O.P., Antonova O.Yu. A system of molecular markers to identify alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes controlling reduced height in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):128-138. DOI 10.18699/VJGB-22-16

Введение

Одним из значимых факторов успеха в селекции мягкой пшеницы, прежде всего в реализации программы «зеленой революции» в развивающихся странах мира, считают создание короткостебельных сортов интенсивного типа (Hedden, 2003; Sukhikh et al., 2021). Снижение высоты растений не только сопровождалось повышением их устойчивости к полеганию, что благоприятно сказывалось на эффективности механизированной уборки, но и увеличивало число зерен в колосе и число зерен на 1 м², а все вместе приводило к повышению урожайности (Gale et al., 1985; Youssefian et al., 1992; Evans, 1998).

У мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и родственных ей видов описано по меньшей мере 25 генов, контролирующих признак «высота растения» и обозначенных как *Reduced height*, *Rht1–Rht25*. Все гены так или иначе связаны с фитогормоном роста гиббереллином (McIntosh et al., 2013, 2016, 2018). Одни из них, так называемые GA-чувствительные гены *Rht4–Rht9*, *Rht12–Rht20* и *Rht25*, по-видимому, участвуют в процессах синтеза или распада гибберелловой кислоты (ГК = GA). Другие, GA-нечувствительные гены *Rht-A1*, *Rht-B1* и *Rht-D1*, детерминируют ответ на нее. Для некоторых генов (*Rht22*, *Rht23* и *Rht24*) характер реакции пока не определен (Sukhikh et al., 2021).

Наиболее широкое распространение среди GA-чувствительных генов получил ген *Rht8*, переданный в начале 20-го века вместе с тесно сцепленным с ним аллелем гена нечувствительности к фотопериоду *Ppd-D1a* (response to photoperiod) от японского сорта Акакомуги сначала в итальянские, а затем во многие восточно- и южноевропейские сорта (Vorojevic K., Vorojevic Ks., 2005). Этот ген не оказывает существенного влияния на уменьшение длины coleoptile и, как следствие, позволяет проводить посев на большую глубину, что играет решающую роль для сохранения жизнеспособности проростков в условиях дефицита воды или высоких температур (Korzun et al., 1998; Ellis et al., 2004; Divashuk et al., 2013; Grover et al., 2018).

Более детально изучены GA-нечувствительные гены, они расположены на коротких плечах хромосом 4-й гомеологической группы (Gale, Marshall, 1976; Börner et al., 1996). Доминантные аллели этих генов (дикий тип) кодируют DELLA-белки, принадлежащие семейству GRAS белков – регуляторов транскрипции; на их C-конце находится консервативный домен, который может связываться с другими транскрипционными факторами и тем самым блокировать их функцию. Поэтому наличие в клетках большого количества DELLA-белков замедляет рост растений. На вариабельном N-конце имеется DELLA-домен, способный образовывать комплекс GA-GID1 (gibberellin insensitive

dwarf 1 – рецептор к GA). Этот комплекс подвергается полиубиквитинации и деградации протеасомами. Соответственно, уменьшение количества DELLA-белков в клетках в присутствии GA снижает их негативное влияние на рост растений (Peng et al., 1999; Bazhenov et al., 2015; Thomas, 2017; Sukhikh et al., 2021).

Для генов *Rht-B1* и *Rht-D1* описано довольно большое число мутантных рецессивных и частично доминантных аллелей, которые по-разному изменяют длину стебля. Последовательности этих аллелей секвенированы, наиболее изученные из них приведены в Приложении 1¹. Показано, что аллели *Rht-B1b* (= *Rht1*), *Rht-B1e* (= *Rht11*, = *Rht Krasnodari 1*), *Rht-B1p* (= *Rht17*) и *Rht-D1b* (= *Rht2*) ассоциированы с однонуклеотидными заменами, приводящими к образованию преждевременных стоп-кодонов (Peng et al., 1999; Ellis et al., 2002; Pearce et al., 2011; Divashuk et al., 2012; Li et al., 2012; Bazhenov et al., 2015). Фенотипический эффект таких нонсенс-мутаций варьирует от умеренного (снижение высоты растения на 20–24 % у аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b*) до сильного (на 33 и 40 % у *Rht-B1p* и *Rht-B1e* соответственно) (Gale et al., 1985; Sukhikh et al., 2021).

Аллели *Rht-B1h* и *Rht-B1i-1* имеют крупные (более 100 п.о.) вставки в промоторной зоне, в то время как *Rht-B1c* (= *Rht3*) характеризуется наличием инсерции в промоторной зоне, идентичной таковой у *Rht-B1h*, и одновременно присутствием ретротранспозона *Vej* в кодирующей области (Wu et al., 2011; Li et al., 2013; Wen et al., 2013; Lou et al., 2016). Подобные вставки могут приводить к образованию белков, которые не подвергаются деградации, и, таким образом, у мутантных растений конститутивно репрессируется рост, причем более существенно, чем при нонсенс-мутациях в N-концевом кодирующем участке (Wu et al., 2011; Wen et al., 2013). Так, аллель *Rht-B1c* снижает высоту растений примерно на 60 % (Flintham, Gale, 1983; Sukhikh et al., 2021). Однако вставки могут не только уменьшать, но и увеличивать высоту растений относительно дикого типа на 10–15 %, как, например, в случае аллеля *Rht-B1i-1* (Lou et al., 2016). Кроме того, у гена *Rht-D1* идентифицированы аллели «сильной карликовости» *Rht-D1c* (*Rht10*) и *Rht-D1d* (*Rht Ai-bian 1a*), уменьшающие высоту на 60–70 %, они оказались множественными копиями мутантного аллеля *Rht-D1b* (Pearce et al., 2011). Известны также и другие аллели генов *Rht-B1h-o* и *Rht-D1e-j*, связанные с нуклеотидными заменами (миссенс-мутации) либо с инделями. Они выявлены у большого числа китайских сортов методом EcoTILLING, однако их фенотипический эффект не описан. У китайских

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx3.pdf>

сортов также впервые идентифицированы мутантные аллели гена *Rht-A1* (Li et al., 2013).

В селекционных программах наиболее часто используют аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, источником которых был японский сорт Norin 10. По состоянию на конец 20-го века эти аллели содержали более 70 % возделываемых сортов мягкой пшеницы в мире (Gale et al., 1985; Evans, 1998). Но позднее было показано, что встречаемость их зависит от региона мира. У сортов мягкой пшеницы из Китая аллель *Rht-B1b* был выявлен в 36,2 %, а аллель *Rht-D1b* – в 53,4 % случаев (Zhang et al., 2006). Однако при генотипировании 247 сортов из США и Канады эти аллели были идентифицированы более чем у 90 % из них (Guedira et al., 2010). В генотипах европейских сортов преимущественно присутствует аллель *Rht-D1b*, при этом его встречаемость у сортов, зарегистрированных после 1990 г., составляет 49 % (Würschum et al., 2017).

В России широко распространены сорта с аллелем *Rht-B1e*, который получен путем мутагенеза у сорта Безостая 1, мутантная форма – Краснодарский Карлик 1 (Лукьяненко, Жогин, 1974; Рабинович, 1986). В настоящее время короткостебельные сорта (Крошка, Победа 50, Фишт, Палпич, Восторг, Дока, Таня, Есаул, Калым, Первица, Гром), гомозиготные по аллелям *Rht-B1e*, возделывают на площади более 4 млн га не только в России, но и в странах СНГ (Divashuk et al., 2012, 2013).

Перспективным для селекции является также аллель *Rht-B1p*, у которого за счет замены цитозина на тимин в позиции 178 от стартового кодона возникает стоп-кодон в DELLA-домене, эта мутация обуславливает до 30 см уменьшения высоты растений у мягкой пшеницы, особенно нижнего междоузлия, но при этом не уменьшает длину колоса (Bazhenov et al., 2015).

Благодаря секвенированию ДНК последовательно аллелей генов *Rht-B1* и *Rht-D1* у различных сортов мягкой пшеницы созданы молекулярные маркеры для их идентификации. Так, для определения аллелей *Rht-B1c*, *Rht-B1h*, *Rht-B1i-1*, содержащих инсерции, разработаны STS-маркеры (Pearce et al., 2011; Li et al., 2013; Lou et al., 2016); для выявления аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b*, несущих однонуклеотидные замены, применяют маркеры на основе аллель-специфичной ПЦР (AS-PCR), в том числе AS-PCR в реальном времени (Ellis et al., 2002; Pearce et al., 2011; Li et al., 2012; Bazhenov et al., 2015, 2019).

Идентификацию широко распространенных аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, а также аллелей гена *Rht24* проводят на основе конкурентной аллель-специфичной ПЦР (kompetitive allele-specific PCR, KASP), позволяющей оценивать большие количества образцов мягкой пшеницы с малыми временными затратами (Rasheed et al., 2016; Würschum et al., 2017). Вместе с тем следует отметить, что результаты AS-PCR значительно зависят от условий реакции, требуют проведения анализа в нескольких повторностях, а также строгого соблюдения авторского протокола, что не всегда возможно. В свою очередь, применение KASP-анализа связано с использованием сложной приборной базы и дорогостоящих реактивов, которых зачастую нет в небольших ориентированных на практику лабораториях.

Альтернативой для AS-PCR может послужить использование CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) маркеров, основанных на наличии в районе с точковой мутацией сайта рестрикции, которого нет у дикого типа, или, наоборот, на исчезновении у мутантного варианта сайта, характерного для дикого типа (Shavrukov, 2016). В случае отсутствия рестрикционных сайтов в местах расположения анализируемых мутаций их можно создать целенаправленно путем дизайна модифицированных праймеров – методом derived CAPS, dCAPS (Neff et al., 1998, 2002).

В отличие от AS-PCR, техника CAPS- и dCAPS-маркирования обладает хорошей воспроизводимостью, не требует жестких условий для проведения ПЦР, а результаты анализа легко интерпретировать в агарозных гелях. Генерирование маркеров возможно на базовом ПЦР-оборудовании. Ранее такого рода маркеры были созданы для гена короткостебельности *Rht24* (Tian et al., 2017).

Цель нашего исследования – разработать CAPS- и dCAPS-маркеры для анализа однонуклеотидных замен в генах *Rht-B1* и *Rht-D1*, апробировать STS-маркеры для выявления инсерций в этих генах и в итоге предложить систему маркеров для идентификации аллелей, наиболее часто используемых в селекции мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 11 образцов мягкой пшеницы из коллекции ВИР с известными аллелями генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* (табл. 1). Источниками аллелей дикого типа *Rht-B1a* и *Rht-D1a* были сорта Chinese Spring и Hongdongmai. При генотипировании каждый изученный образец был представлен двумя-тремя индивидуальными растениями, а также суммарно 10–20 генотипами (проростками), из которых получена ДНК в виде bulk-пробы.

Выделение ДНК осуществляли из 10-дневных проростков модифицированным методом СТАВ-экстракции (Антонова и др., 2020).

Выравнивание последовательностей разных аллелей генов *Rht-B1* и *Rht-D1* проводили при помощи программ MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) и BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Поиск рестрикционных сайтов выполняли посредством GenScript Restriction Enzyme Map Analysis Tools (<https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>).

Разработку праймеров для вложенной ПЦР (Nested-ПЦР) и CAPS-анализа осуществляли в программе Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). Качество праймеров (число шпилек, гомо- и гетеродимеров) контролировали при помощи интернет-ресурса OligoAnalyzer от Integrated DNA Technologies, Inc. (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Праймеры для dCAPS-маркеров генерировали с использованием программы dCAPS Finder 2.0 (Neff et al., 2002). Праймеры, созданные в нашей работе, а также привлеченные из литературных источников, приведены в табл. 2 и 3, а места их локализации – на рис. 1, а, б.

Проведение ПЦР: а) вложенная ПЦР. Для большей специфичности dCAPS-анализа применяли метод вло-

Таблица 1. Используемые в работе образцы мягкой пшеницы с известными аллелями генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1*

Аллели генов	№ по каталогу ВИР «К»	Название образца	Происхождение	Литературный источник
<i>Rht-B1a, Rht-D1a</i>	44435	Chinese Spring	Китай	Peng et al., 1999
	61292	Hongdongmai	»	Li et al., 2013
<i>Rht-B1b, Rht-D1a</i>	63045	Княжна	Россия, Краснодарский край	Divashuk et al., 2013
	64312	Красота	»	»
<i>Rht-B1c, Rht-D1a</i>	40699	Tom Thumb	Китай	Pearce et al., 2011
<i>Rht-B1e, Rht-D1a</i>	64583	Веда	Россия, Краснодарский край	Divashuk et al., 2013
	65223	Гром	»	»
<i>Rht-B1h, Rht-D1a</i>	44977	Atlas 66	США	Li et al., 2013
<i>Rht-B1h, Rht-D1b</i>	65711	Zheng 9023	Китай	»
<i>Rht-B1i-1, Rht-D1a</i>	10152	Триумф	СССР, Украинская ССР	»
<i>Rht-B1p, Rht-D1a</i>	54848	Chris Mutant	Россия, Краснодарский край	Bazhenov et al., 2015

женной ПЦР – первую ПЦР осуществляли с праймерами, фланкирующими участок локализации точковых мутаций в гене *Rht-B1* (BF/VIR.B1R), после чего полученный амплификат использовали в качестве матрицы для второй ПЦР с dCAPS-праймерами (B1bF/R, B1eF/B1eR) и CAPS-праймерами B1eF/B1eR. Первый этап Nested-ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 40 нг тотальной ДНК пшеницы; 1× реакционный буфер; 1.5 мМ MgCl₂; 0.6 мМ каждого из dNTP's; по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат, Россия, <http://dialat.ru>). Для большей специфичности программа ПЦР содержала функцию Touchdown: исходная температура отжига была на 4 градуса выше расчетной и понижалась на 0.5 градусов на цикл на протяжении 8 циклов (см. табл. 3).

По 2 мкл полученных амплификатов отбирали в чистые пробирки, разводили водой в 50 раз и использовали в качестве матрицы во втором этапе ПЦР. Еще по 10 мкл отбирали для контроля успешности ПЦР путем электрофореза в агарозном геле (рис. 2, а). Остаток (около 12 мкл) обрабатывали рестриктазой *Bst*VII (СибЭнзим, Россия, <http://russia.sibenzyme.com>), генерируя тем самым CAPS-маркер-аллели *Rht-B1b*.

Второй этап Nested-ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 4 мкл матрицы; 1× реакционный буфер; 2.5 мМ MgCl₂; 0,3 мМ каждого из dNTP's; по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат), программы для каждой пары праймеров также указаны в табл. 3. По 12 мкл амплификационной смеси отбирали для рестрикционного анализа, а остаток использовали для контроля ПЦР методом электрофореза;

б) стандартная ПЦР. В случае CAPS-маркеров аллеля *Rht-D1b* и маркеров, выявляющих ретротранспозон в кодирующей области гена и вставки в промоторной области, ПЦР проводили в стандартных условиях. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 40 нг ДНК; 1× реакционный буфер; 2.5 мМ MgCl₂; 0.3 мМ каждого из dNTP's; по 0.25 мкМ каждого из праймеров и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат); программы указаны в табл. 2 и 3;

в) аллель-специфичная ПЦР. Условия и программы для AS-PCR соответствовали рекомендованным авторами праймерам (Ellis et al., 2002; Bazhenov et al., 2015).

Рестрикционный анализ. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами фирмы «СибЭнзим» с использованием протокола фирмы-изготовителя (<http://russia.sibenzyme.com>).

Разделение фрагментов проводили в горизонтальных агарозных гелях в буфере 1× TBE при напряжении 5В/см. Гели окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Для разработки CAPS- и dCAPS-маркеров из баз данных NSBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) были взяты сиквенсы кодирующих участков следующих аллелей генов короткостебельности: *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b*, а также последовательности аллелей дикого типа *Rht-A1a*, *Rht-B1a* и *Rht-D1a*. Номера последовательностей приведены в Приложении 1. Выравнивание последовательностей подтвердило наличие нонсенс-мутаций у этих аллельных форм, что позволило приступить к разработке CAPS- и dCAPS-маркеров (см. рис. 1).

Для каждой нонсенс-мутации был проведен поиск сайтов рестрикции, которые позволили бы отличить целевой аллель от всех остальных аллелей, в том числе аллелей дикого типа. Для *Rht-B1b* была подобрана рестриктаза *Bst*VII (GCAGC), не способная расщеплять мутантный сайт GTAGC. Аналогично для аллеля *Rht-B1p* (мутантный сайт GCGT) такой рестриктазой стала *Bst*HNI (GCGC). Напротив, рестриктаза *Bst*SFI (CTRYAG) расщепляла исключительно мутантный сайт (CTGTAG), имеющийся у *Rht-D1b*. Таким образом, для идентификации аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* удалось создать CAPS-маркеры CB1b/*Bst*VII, CB1p/*Bst*HNI и CD1b/*Bst*SFI соответственно.

У аллеля *Rht-B1e* мы не смогли выявить сайты рестрикции в месте локализации нонсенс-мутации. Поэтому для него разработали dCAPS-маркер dCB1e/*Hinf*I, последовательность обратного праймера была модифицирована таким образом, чтобы анализируемый нуклеотид вместе

Таблица 2. Использованные в исследовании праймеры для идентификации аллелей гена *Rht-B1*

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Название маркера	Комбинация праймеров	Целевая область последовательности	Способ идентификации целевого аллеля	Литературный источник
Nested-PCR						
BF	ggtaggaggcagagggcgag	–	BF/VIR.B1R	–	338 п. о. – все аллели; <i>Rht-B1c</i> – фрагмент отсутствует	Ellis et al., 2002
VIR.B1R	tcgaccaggaggagaggtcg					Настоящее исследование
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 69 °C (↓0.5 °C на 1 цикл) – 150 с, 72 °C – 60 с); 30 циклов (94 °C – 45 с, 65 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
Идентификация <i>Rht-B1b</i>						
BF	ggtaggaggcagagggcgag	–	BF/MR1	190 C→T	237 п. о.	Ellis et al., 2002
MR1	catccccatggccatctcgagcta					
WR1	catccccatggccatctcgagctg	–	BF/WR1	190 C→T	Фрагмент отсутствует	
VIR.B1R	tcgaccaggaggagaggtcg	CB1b	BF/VIR.B1R	<i>Bst</i> V11 ¹ : GCGC ²	Сайт отсутствует	Настоящее исследование
B1bF	caagatgatggtgctggggtcgg	dCB1b	B1bF/R ³	Acc361 ¹ : ACCTGC ²	Сайт отсутствует	
B1bR	cctccccatggccatctcact ⁴					
Программа (для маркера dCB1b/Acc361): 94 °C – 3 мин 30 с; 37 циклов (94 °C – 45 с, 68 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
Идентификация <i>Rht-B1e</i>						
MR3	ggccatctccagctgctccagcta	–	BF/MR3	181 A→T	228 п. о.	Pearce et al., 2011
WR3	ggccatctccagctgctccagctt		BF/WR3		Фрагмент отсутствует	
B1epF	acaagatgatggtgctggggtc	dCB1e	B1epF/B1eR ³	<i>Hinf</i> I – GANTC ²	Сайт отсутствует	Настоящее исследование
B1eR	ggccatctccagctgctccagat ⁴					
Программа (для маркера dCB1e/ <i>Hinf</i> I): 94 °C – 3 мин 30 с; 37 циклов (94 °C – 45 с, 61 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
Идентификация <i>Rht-B1p</i>						
Rht-B1p-F	acatggcggagctggtgt	–	Rht-B1p-F/ Rht-B1-R1	178 C→T	425 п. о.	Bazhenov et al., 2015
Rht-B1-R1	gccgagagaggacgat					
B1pR	catctccagctgctccagcttc	CB1p	B1epF/B1pR ³	<i>Bst</i> HNI ¹ : GCGC ²	Сайт отсутствует	Настоящее исследование
Программа (для маркера CB1p/ <i>Bst</i> HNI): 94 °C – 3 мин 30 с; 30 циклов (94 °C – 45 с, 62 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
Идентификация <i>Rht-B1c</i>						
Rht-B1c-F1	ggcaactcccaggacgc	–	Rht-B1c-F1/ Rht-B1c-R1	150 G ^{↓2026 п.о.} C	256 п. о.	Pearce et al., 2011
Rht-B1c-R1	gctctcgaccaggaggag					
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 61 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 45 с, 57 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
Идентификация <i>Rht-B1h</i>						
Rht-B1h.F	gaggcaaatcacgaagtact	–	Rht-B1h.F/ Rht-B1h.1R	–592 T ^{↓197 п.о.} C	247 п. о.	Li et al., 2013
Rht-B1h.1R	taccaaggatattcattccgtagga					
Rht-B1h.2R	cttatggcaaatggattccaaga	–	Rht-B1h.F/ Rht-B1h.2R		331 (остальные аллели – 134 п. о.)	
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 63 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 45 с, 59 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
Идентификация <i>Rht-B1i-1</i>						
B1i-MF1	cagacgatattaactggccgattga	–	B1i-MF1/ B1i-MR1	–366 A ^{↓160 п.о.} T	330 п. о.	Lou et al., 2016
B1i-MR1	gggagcggcagcgtagtagttga					
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 37 циклов (94 °C – 45 с, 56 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						
B1i-MF2	ctctaattggcgggatttc	–	B1i-MF2/ B1i-MR2	–366 A ^{↓160 п.о.} T	586 п. о. (остальные аллели – 426 п. о.)	Lou et al., 2016
B1i-MR2	cgtcctggactcgcgctcat					
Программа: 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 66 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 60 с, 62 °C – 60 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин						

¹ Вместо этих рестриктаз могут быть использованы их изоизомеры: *Bst*V11 (*Bse*XI, *Bbv*I), *Acc*361 (*Bve*I, *Bsp*MI), *Bst*HNI (*Asp*LEI, *Cfo*I, *Hin*6I, *Hin*P11, *Hsp*AI).² В селективной области жирным шрифтом выделены те нуклеотиды в сайтах рестрикции, вариация которых позволяет выявлять необходимые аллели.³ Для этих комбинаций праймеров в качестве матрицы использованы продукты первого раунда Nested-PCR (разведение в 50 раз).⁴ Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены модифицированные нуклеотиды в праймерах для dCAPS маркеров.

Таблица 3. Используемые в исследовании праймеры для идентификации аллелей гена *Rht-D1*

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Название маркера	Комбинация праймеров	Селективная область	Способ идентификации целевого аллеля	Литературный источник
Идентификация <i>Rht-D1b</i>						
DF	cgcgcaattattggccagagatag	–	DF/MR2	181 G→T	254	Ellis et al., 2002
MR2	ccccatggccatctcgagctgcta					
DF2	ggcaagcaaaagcttcgcg	–	DF2/WR2		Фрагмент отсутствует	
WR2	ggccatctcgagctgcac					
VIR.D1R	tgctctgacccaagacgacag	CD1b	DF/VIR.D1b	<i>Bst</i> SFI ¹ : CTRYAG ²	Сайт присутствует	Настоящее исследование

Программа (для маркера CD1b/*Bst*SFI): 94 °C – 3 мин 30 с; 8 циклов (94 °C – 45 с, 68 °C с понижением на 0.5 °C на 1 цикл – 1 мин 30 с, 72 °C – 1 мин); 30 циклов (94 °C – 45 с, 64 °C – 45 с, 72 °C – 45 с); 72 °C – 7 мин

Примечание. ¹ Изоизомеры для рестриктазы *Bst*SFI: *Bfml*, *Sfcl*.

² В селективной области жирным шрифтом выделены те нуклеотиды в сайтах рестрикции, вариация которых позволяет выявлять необходимые аллели.

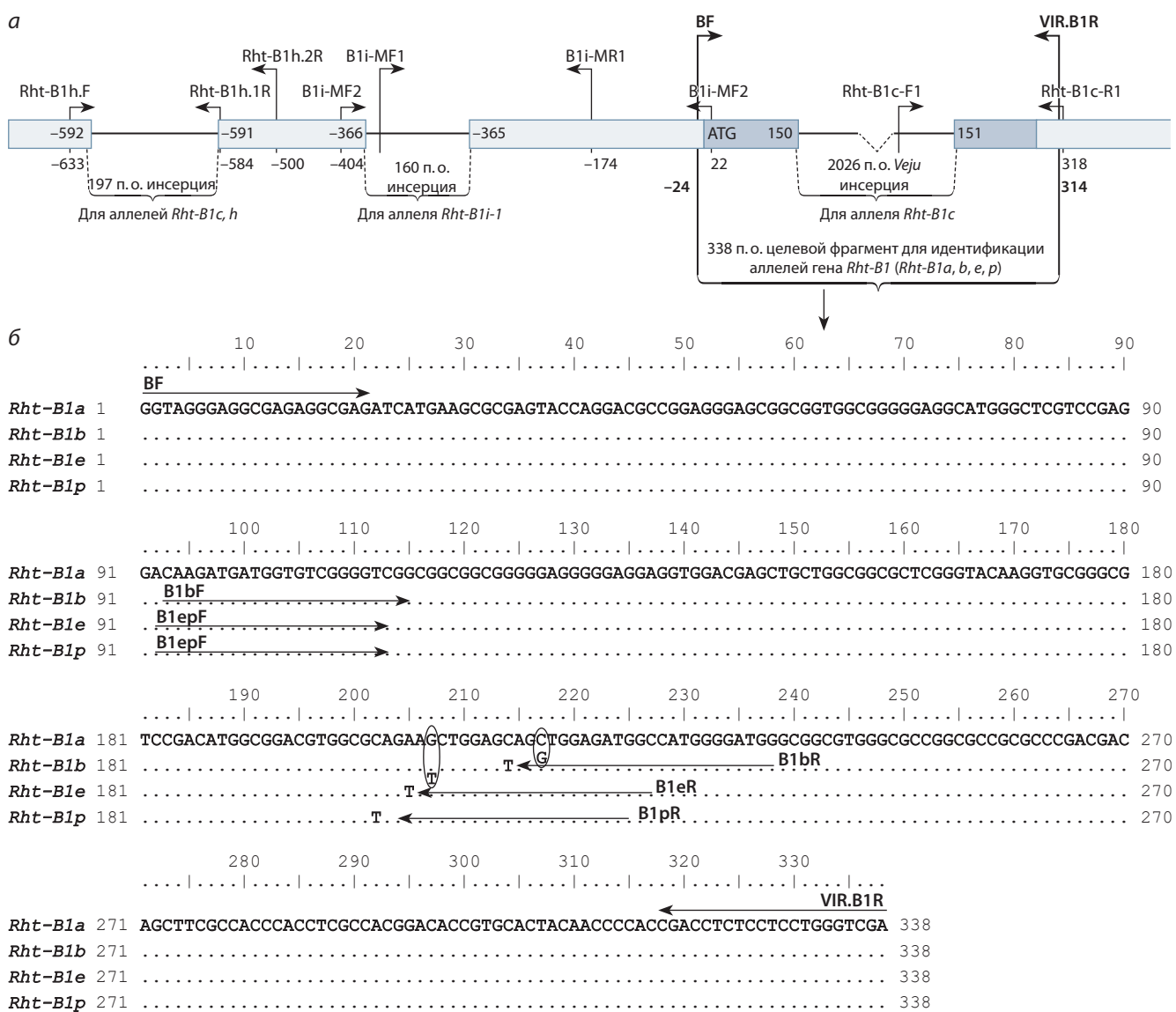


Рис. 1. Локализация праймеров для определения основных аллелей гена *Rht-B1*.

а – схема гена и соседних регионов с обозначенными местами локализации праймеров для первого раунда Nested-PCR и выявления инсерций у аллелей *Rht-B1c*, *Rht-B1h* и *Rht-B1i-1*; *б* – результаты выравнивания последовательностей, ограниченных праймерами BF/VIR.B1R (первый раунд Nested-PCR), и праймеры для идентификации точечных мутаций у аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* методом CAPS/dCAPS-анализа.

Границы вставки 197 п.о. и ретротранспозона *Veju* приведены согласно работе (Wen et al., 2013); границы вставки 160 п.о. взяты из (Lou et al., 2016). Кодированная область гена выделена темной заливкой, тонкими линиями обозначены ретротранспозон *Veju* и инсерции в 5'-фланкирующей области. Овалами на рис. 1, б отмечены замены нуклеотидов в dCAPS-праймерах.

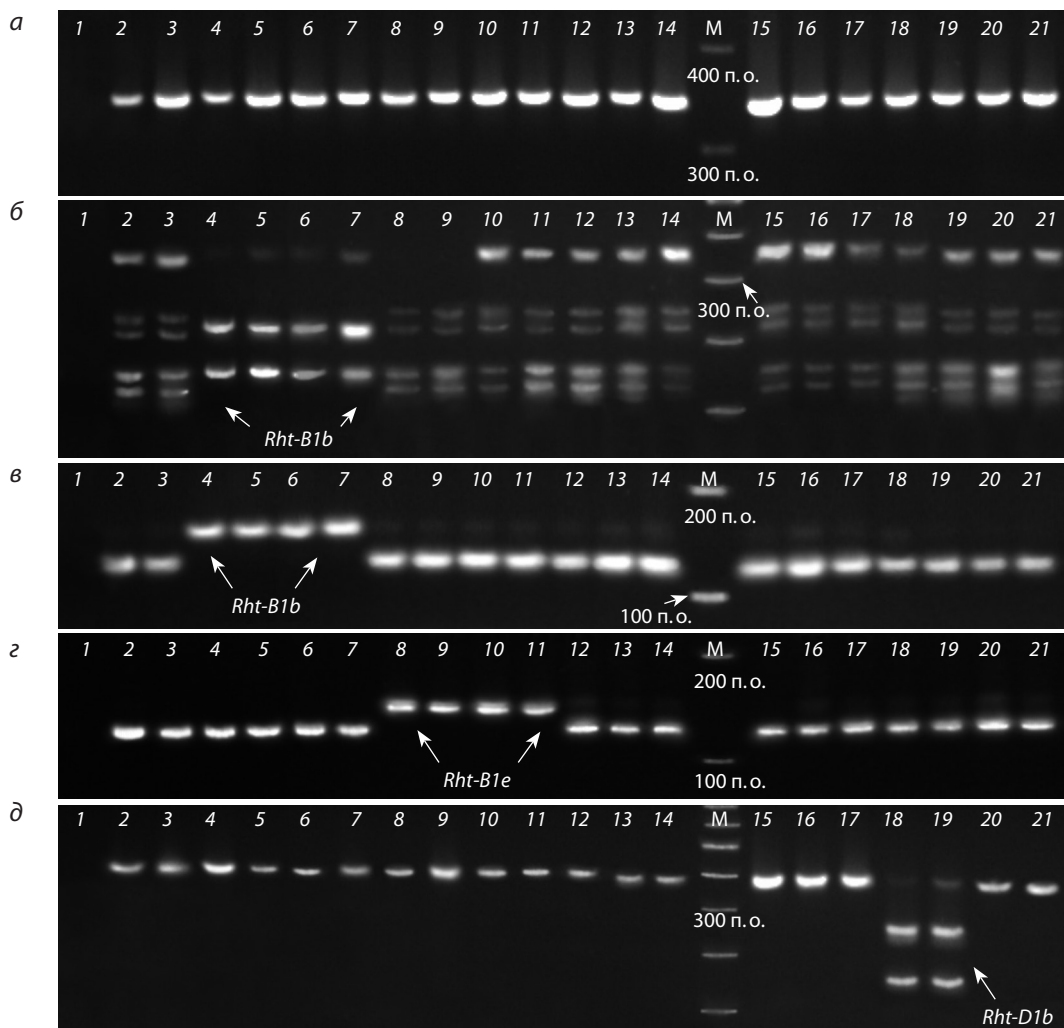


Рис. 2. Идентификация нонсенс-мутаций в генах *Rht-B1* и *Rht-D1* с использованием разработанных нами CAPS- и dCAPS-маркеров.

a – амплификаты, полученные с праймерами BF/VIR.B1R, служащие матрицей для второго раунда вложенной ПЦР (Nested-PCR); *б* – идентификация аллелей: *Rht-B1b* – CAPS-маркер CB1b/BstV11; *в* – *Rht-B1b* – dCAPS-маркер dCB1b/Acc361; *г* – *Rht-B1e* – dCAPS-маркер dCB1e/HinfI; *д* – *Rht-D1b* – CAPS-маркер CD1b/BstSFI.

Цифрами обозначены образцы с различными аллелями *Rht-B1* и *Rht-D1*: 1 – отрицательный контроль (H_2O); 2, 3 – Hongdongmai (дикий тип); 4, 5 – Красота (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 6, 7 – Княжна (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 8, 9 – Гром (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 10, 11 – Веда (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 12, 13 – Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Rht-D1a*); 14, 15 – Триумф (*Rht-B1i-1*, *Rht-D1a*); 16, 17 – Chinese Spring (дикий тип); 18, 19 – Zheng 9023 (*Rht-B1h*, *Rht-D1b*); 20, 21 – Atlas 66 (*Rht-B1h*, *Rht-D1a*). М – маркер молекулярного веса 100 п.о. (СибЭнзим).

с 3'-концом праймера образовывал рестрикционный сайт GATTC, позволяющий отличить данную мутацию от всех остальных аллелей путем рестрикции *HinfI*. Для идентификации аллеля *Rht-B1b* был дополнительно сконструирован dCAPS-маркер dCB1b/Acc361 (см. рис. 1).

При проведении ПЦР в обычных условиях с использованием в качестве матрицы геномной ДНК мягкой пшеницы нам не удалось получить четких фрагментов для dCAPS-маркеров и CAPS-маркера CB1p/BstHNI (данные не представлены). Поэтому мы применили метод вложенной ПЦР – в качестве матрицы для второго раунда использовали продукты амплификации праймеров BF/VIR.B1R, которые фланкировали область локализации всех анализируемых точковых мутаций в гене *Rht-B1* (см. рис. 1).

В ходе апробации на выборке образцов мягкой пшеницы с известными аллелями генов короткостебельности

все разработанные маркеры с высокой эффективностью дифференцировали дикий тип *Rht-B1a*, *Rht-D1a* и мутантные варианты *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* (см. рис. 2 и 3).

Параллельно для определения нонсенс-мутаций у *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* в сравнении с диким типом были использованы аллель-специфичные праймеры, взятые из литературных источников (Ellis et al., 2002; Pearse et al., 2011; Bazhenov et al., 2015). При этом для идентификации каждой мутации брали две пары праймеров, одна из них детектировала мутантный вариант, другая – дикий тип и все остальные аллели. Показано, что для *Rht-B1b*, *Rht-B1e* и *Rht-D1b* результаты аллель-специфичной ПЦР в целом совпадают с данными CAPS- и dCAPS-анализа. Однако идентификация аллелей дикого типа *Rht-B1a* и *Rht-D1a* при помощи праймеров

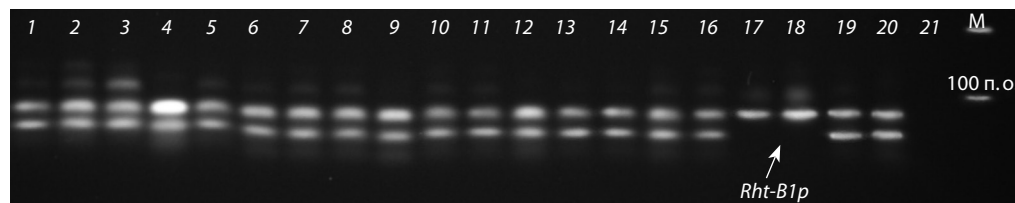


Рис. 3. Идентификация аллеля *Rht-B1p* при помощи CAPS-маркера CB1p/BstHNI.

Стрелкой указаны генотипы с аллелем *Rht-B1p*, ПЦР-продукты которых не подверглись рестрикции. Цифрами обозначены образцы с различными аллелями генов *Rht-B1* и *Rht-D1*: 1, 2 – Hongdongmai (дикий тип); 3, 4 – Красота (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 5, 6 – Княжна (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 7, 8 – Гром (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 9, 10 – Веда (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 11, 12 – Триумф (*Rht-B1i-1*, *Rht-D1a*); 13, 14 – Chinese Spring (дикий тип); 15, 16 – Zheng 9023 (*Rht-B1h*, *Rht-D1b*); 17, 18 – Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Rht-D1a*); 19, 20 – Atlas 66 (*Rht-B1h*, *Rht-D1a*); 21 – отрицательный контроль (H₂O). М – маркер молекулярного веса 100 п.о. (СибЭнзим).

Таблица 4. Маркерные профили для идентификации аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* при помощи системы, предлагаемой в настоящем исследовании

Аллель (старое название гена)	Целевая мутация	CAPS/dCAPS-маркеры для выявления нонсенс-мутаций (0 – отсутствие сайта рестрикции, 1 – присутствие)					Комбинации STS-праймеров для выявления инсерций (размер продуктов амплификации указан в п. о.)				
		CB1b /BstV11	dCB1b /Acc361 ¹	dCB1e /Hinfl ¹	CB1p /BstHNI ¹	CD1b /BstSFI	B1i-MF1 /MR1	B1i-MF2 /MR2	Rht-B1c-F1 /R1	Rht-B1h.F /1R	Rht-B1h.F /2R
<i>Rht-B1a</i>	Дикий тип	1	1	1	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1b</i> (<i>Rht1</i>)	190 C→T	0 ²	0 ²	1	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1e</i> (<i>Rht11</i>)	181 A→T	1	1	0 ²	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1p</i> (<i>Rht17</i>)	178 C→T	1	1	1	0 ²	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-B1c</i> (<i>Rht3</i>)	Инсерция 150 G ^{12026 п.о.С}	Нет ПЦР	Нет ПЦР	Нет ПЦР	Нет ПЦР	–	Нет ПЦР	426	256 ²	247 ²	331 ²
<i>Rht-B1h</i>	Инсерция –592 T ^{1197 п.о.С}	1	1	1	1	–	Нет ПЦР	426	Нет ПЦР	247 ²	331 ²
<i>Rht-B1i-1</i>	Инсерция –366 A ^{1160 п.о.С}	1	1	1	1	–	330 ²	586 ²	Нет ПЦР	Нет ПЦР	134
<i>Rht-D1a</i>	Дикий тип	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
<i>Rht-D1b</i> (<i>Rht2</i>)	181 G→T	–	–	–	–	1 ²	–	–	–	–	–

¹ Для этих маркеров в качестве матрицы использованы продукты первого раунда Nested-PCR (разведение в 50 раз).

² Жирным выделены те продукты амплификации, наличие/отсутствие которых позволяет выявлять целевые аллели генов *Rht-B1* и *Rht-D1*.

BF/WR и DF2/WR2 соответственно (Ellis et al., 2002) была сопряжена с определенными трудностями: плохой воспроизводимостью результатов и образованием слабо выраженных фрагментов у форм с *Rht-B1b* и/или *Rht-D1b* (Приложение 2). В случае *Rht-B1p* аллель-специфичная ПЦР в наших условиях оказалась неэффективной – при амплификации с праймерами Rht-B1p-F/R1 (Bazhenov et al., 2015) специфичный продукт образовывался и у форм с мутантными аллелями, и у форм с аллелями дикого типа (см. Приложение 2).

В исследовании также были привлечены пять пар STS-праймеров (Pearse et al., 2011; Li et al., 2013; Lou et al., 2016), позволяющие выявлять мутации, ассоциированные с наличием ретротранспозона в кодирующей области (аллель *Rht-B1c*), а также со вставками в промоторной зоне (*Rht-B1i-1*) и в 5'-фланкирующем участке (*Rht-B1h*).

Местоположение данных инсерций приведено на схеме гена *Rht-B1*, на ней также указаны праймеры для их детекции (см. рис. 1, а).

Для аллеля *Rht-B1i-1* использовали две пары праймеров (Lou et al., 2016), одна из которых (B1i-MF1/MR1) давала при наличии вставки специфичный фрагмент 330 п.о., а другая (B1i-MF2/MR2) амплифицировала фрагменты разных размеров у генотипов с инсерцией и без нее (см. табл. 2, 4, рис. 4, в). Для детекции аллеля *Rht-B1h* применяли праймеры Rht-B1h.F/R1, дающие специфичный продукт размером 247 п.о., и праймеры Rht-B1h.F/R2, генерирующие фрагменты разных размеров (см. табл. 2, 4, рис. 4, б) (Li et al., 2013). Поскольку этот аллель имеет общую вставку в 5'-фланкирующей области с аллелем *Rht-B1c*, для их дифференциации использовали специфичный к последовательности ретротранспозона прай-

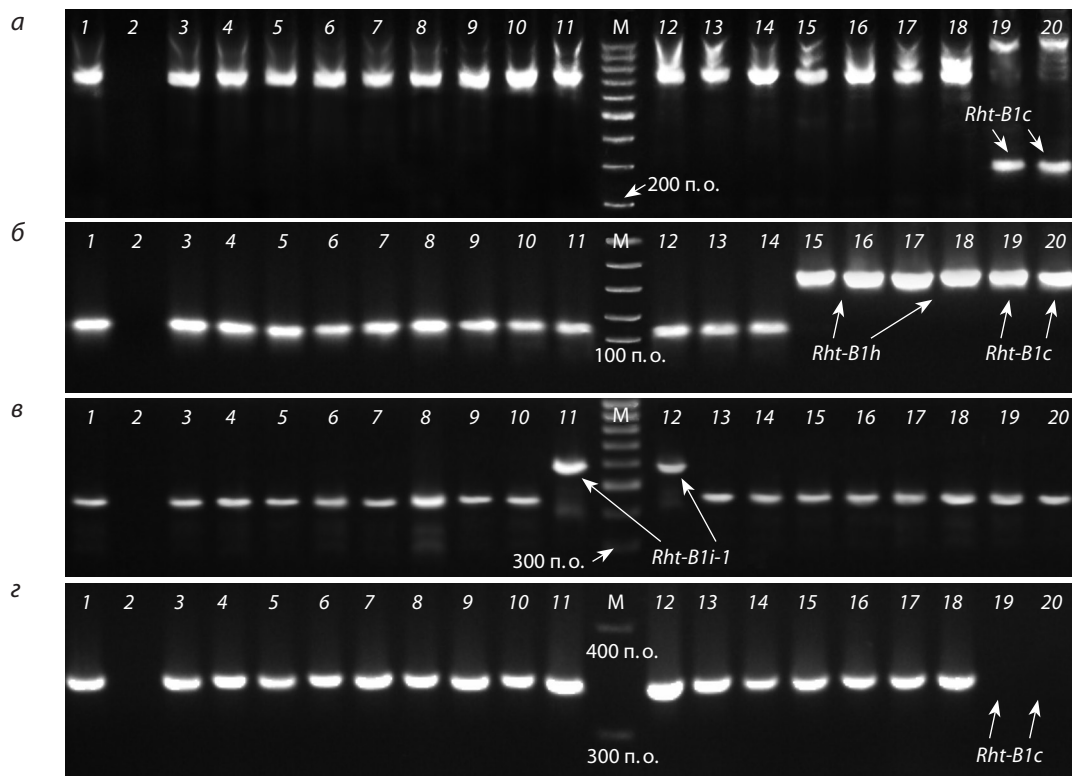


Рис. 4. Идентификация аллелей, несущих вставки, для гена *Rht-B1* с помощью STS-праймеров.

ПЦР-продукты праймеров: *Rht-B1c-F1/R1*, специфичных для *Rht-B1c*; *Rht-B1h-MF1/MR2*, специфичных для *Rht-B1h* и *Rht-B1c*; *B1i-MF2/MR2*, специфичных для *Rht-B1i-1*.

Отсутствие ПЦР-продуктов праймеров *BF/VIR.B1R* у генотипов с аллелем *Rht-B1c*, несущих вставку в 2026 п. о.

Цифрами обозначены образцы с различными аллелями генов *Rht-B1* и *Rht-D1*: 1 – Красота (аллель *Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 2 – отрицательный контроль (H_2O); 3, 4 – Княжна (*Rht-B1b*, *Rht-D1a*); 5, 6 – Гром (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 7, 8 – Веда (*Rht-B1e*, *Rht-D1a*); 9, 10 – Chris Mutant (*Rht-B1p*, *Rht-D1a*); 11, 12 – Триумф (*Rht-B1i-1*, *Rht-D1a*); 13, 14 – Chinese Spring (дикий тип); 15, 16 – Zheng 9023 (*Rht-B1h*, *Rht-D1b*); 17, 18 – Atlas 66 (*Rht-B1h*, *Rht-D1a*); 19, 20 – Tom Thumb (*Rht-B1c*, *Rht-D1a*). М – маркер молекулярного веса 100 п. о. + 1.5 т. п. о. (СибЭнзим).

мер *Rht-B1c-F1/R1* (см. табл. 2, 4, рис. 4, а) (Pearce et al., 2011). Дополнительным доказательством присутствия ретротранспозона может служить тот факт, что у генотипов с этой инсерцией при проведении первого раунда Nested-PCR с праймерами *BF/VIR.B1R* не происходит образования ПЦР-продуктов, что можно объяснить большим расстоянием между праймерами (см. рис. 4, з).

Проведенная нами апробация STS-маркеров показала полное соответствие между присутствием их диагностических фрагментов и составом аллелей, имеющихся у изученных генотипов (см. рис. 4). У образцов Atlas 66 и Zheng 9023, содержащих *Rht-B1h*, присутствовали продукты амплификации, указывающие на наличие инсерции в 5'-фланкирующей области. У образца Триумф, несущего аллель *Rht-B1i-1*, увеличивающий высоту растения, с помощью молекулярных маркеров выявлена вставка в области промотора, а у сорта Tom Thumb (*Rht-B1c*) – ретротранспозона в кодирующей последовательности и вставка в 5'-фланкирующей области. Следует отметить, что при идентификации ретротранспозона при помощи праймеров *Rht-B1c-F1/R1* наряду с образованием фрагмента ожидаемого размера наблюдали и у Tom Thumb (*Rht-B1c*), и у всех остальных генотипов появление неспецифичных продуктов большего размера (см. рис. 4, а).

Рассматривая в целом систему предложенных молекулярных маркеров, нужно отметить, что с ее помощью можно составить маркерный профиль для каждого из изученных нами аллелей генов *Rht-B1* и *Rht-D1*, т. е. получить однозначный ответ о присутствии одного из перечисленных выше аллелей генов короткостебельности, *Rht-B1* и *Rht-D1*, в том или ином генотипе. Маркерные профили аллелей представлены в табл. 4.

Заключение

В результате исследований предложена система молекулярных маркеров для идентификации наиболее часто используемых в селекции мягкой пшеницы аллелей генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1*. Ее основу составляют разработанные нами CAPS- и dCAPS-маркеры нонсенс-мутаций этих генов, которые ранее определяли при помощи аллель-специфической ПЦР (Ellis et al., 2002; Pearce et al., 2011; Bazhenov et al., 2015, 2019). Для идентификации инсерций использовано пять STS-маркеров, подобранных по литературным источникам (Pearce et al., 2011; Li et al., 2013; Lou et al., 2016).

Апробация CAPS- и dCAPS-маркеров при генотипировании образцов мягкой пшеницы из коллекции ВИР, содержащих мутантные аллели *Rht-B1b*, *Rht-B1c*,

Rht-B1e, *Rht-B1h*, *Rht-B1i-1*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* и аллели дикого типа, показала полное соответствие полученных результатов ожидаемым. Наличие аллелей *Rht-B1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht-D1b* также подтверждено при помощи аллель-специфичной ПЦР с праймерами, широко применяемыми в научных исследованиях и селекционных программах (Куркиев и др., 2008; Pestsova et al., 2008; Divashuk et al., 2013; Li et al., 2013; Lou et al., 2016).

Основное преимущество нашей системы молекулярных маркеров заключается в хорошей воспроизводимости результатов и однозначной их интерпретации. При проведении CASP/dCAPS-анализа не возникает проблем с контролем успешности протекания ПЦР-реакции, так как продукты амплификации образуются у всех генотипов, а различия между аллелями выявляются уже после обработки рестриктазами. Кроме того, несмотря на высокую стоимость рестриктаз, CASP/dCAPS-анализ менее затратен, поскольку для детекции каждого аллеля нет необходимости проводить две независимые ПЦР в нескольких повторностях. Исследования осуществляют на стандартном оборудовании для ПЦР и с использованием электрофореза в агарозных гелях. Они могут быть реализованы в небольших ориентированных на практику лабораториях. При появлении сведений о новых точковых мутациях в генах короткостебельности *Rht-B1* и *Rht-D1* для их идентификации может быть применен аналогичный подход по разработке CAPS/dCAPS-маркеров.

Список литературы / References

Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А., Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(4):77-96. DOI 10.30901/2658-6266-2020-4-o2. [Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. SSR analysis of modern russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Biotekhnologiya i Seleksiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. DOI 10.30901/2658-6266-2020-4-o2. (in Russian)]

Куркиев К.У., Тырышкин Л.Г., Колесова М.А., Куркиев У.К. Идентификация генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8* у образцов гексаплоидного тритикале с помощью ДНК маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2008;12(3):372-377. [Kurkiev K.U., Tyryshkin L.G., Kolesova M.A., Kurkiev U.K. Identification of *Rht2* and *Rht8* genes for semidwarfness in hexaploid triticale with use of DNA markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2008; 12(3):372-377. (in Russian)]

Лукьяненко П.П., Жогин А.Ф. Использование индуцированных карликовых мутантов в селекции озимой пшеницы. *Селекция и семеноводство*. 1974;1:13-17. [Lukyanenko P.P., Zhogin A.F. Use of induced dwarf mutants in winter wheat breeding. *Seleksiya i Semenovodstvo = Breeding and Seed Industry*. 1974;1:13-17. (in Russian)]

Рабинович С.В. Селекционная ценность мутанта Краснодарский карлик 1. В: Химический мутагенез в создании сортов с новыми свойствами. М.: Наука, 1986;88-92. [Rabinovich S.V. The breeding value of the Krasnodarskiy karlik 1 mutant. In: Chemical Mutagenesis in the Creation of Varieties with New Properties. Moscow: Nauka Publ., 1986;88-92. (in Russian)]

Bazhenov M.S., Divashuk M.G., Amagai Y., Watanabe N., Karlov G.I. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the

development of an allele-specific PCR marker. *Mol. Breed.* 2015; 35(11):1-8. DOI 10.1007/s11032-015-0407-1.

Bazhenov M.S., Nazarova L.A., Chernook A.G., Divashuk M.G. Improved marker for the *Rht-B1p* dwarfing allele in wheat. In: Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: Proc. of the Fifth International Scientific Conference PlantGen2019 June 24–29, 2019. Novosibirsk, Russia. Novosibirsk: ICG SB RAS. 2019;190-192. DOI 10.18699/ICG-PlantGen2019-61.

Borojevic K., Borojevic Ks. The transfer and history of “reduced height genes” (*Rht*) in wheat from Japanto Europe. *J. Hered.* 2005;96(4): 455-459. DOI 10.1093/jhered/esi060.

Börner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A.J. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye. *Euphytica*. 1996;89(1): 69-75. DOI 10.1007/BF00015721.

Divashuk M.G., Bepalova L.A., Vasilyev A.V., Fesenko I.A., Puzyrnaya O.Y., Karlov G.I. Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia. *Euphytica*. 2013; 190(1):137-144. DOI 10.1007/s10681-012-0789-7.

Divashuk M.G., Vasilyev A.V., Bepalova L.A., Karlov G.I. Identity of the *Rht-11* and *Rht-B1e* reduced plant height genes. *Russ. J. Genet.* 2012;48(7):761-763. DOI 10.1134/S1022795412050055.

Ellis M.H., Rebetzke G.J., Chandler P., Bonnett D., Spielmeier W., Richards R.A. The effect of different height reducing genes on the early growth of wheat. *Funct. Plant Biol.* 2004;31(6):583-589. DOI 10.1071/FP03207.

Ellis M.H., Spielmeier W., Gale K., Rebetzke G., Richards R. “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(6-7):1038-1042. DOI 10.1007/s00122-002-1048-4.

Evans L.T. Feeding the Ten Billion: Plants and Population Growth. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

Flintham J.E., Gale M.D. The Tom Thumb dwarfing gene *Rht3* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1983;66(3-4):249-256. DOI 10.1007/BF00251155.

Gale M.D., Marshall G.A. The chromosomal location of *Gai 1* and *Rht 1*, genes for gibberellin insensitivity and semi-dwarfism, in a derivative of Norin 10 wheat. *Heredity*. 1976;37(2):283-289. DOI 10.1038/hdy.1976.88.

Gale M.D., Youssefian S., Russell G.E. Dwarfing genes in wheat. In: Russel G.E. (Ed.). Progress in Plant Breeding. London: Butterworths-Heinemann, 1985;1-35.

Grover G., Sharma A., Gill H.S., Srivastava P., Bains N.S. *Rht8* gene as an alternate dwarfing gene in elite Indian spring wheat cultivars. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199330. DOI 10.1371/journal.pone.0199330.

Guedira M., Brown-Guedira G., Van Sanford D., Sneller C., Souza E., Marshall D. Distribution of *Rht* genes in modern and historic winter wheat cultivars from the Eastern and Central USA. *Crop Sci.* 2010; 50(5):1811-1822. DOI 10.2135/cropsci2009.10.0626.

Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999;41:95-98.

Hedden P. The genes of the green revolution. *Trends Genet.* 2003; 19(1):5-9. DOI 10.1016/S0168-9525(02)00009-4.

Korzun V., Röder M.S., Ganai M.W., Worland A.J., Law C.N. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998;96(8):1104-1109. DOI 10.1007/s001220050845.

Li A., Yang W., Guo X., Liu D., Sun J., Zhang A. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-B1e*, and development of an allele-specific PCR marker. *Mol. Breed.* 2012;30(3):1443-1451. DOI 10.1007/s11032-012-9730-y.

Li A., Yang W., Lou X., Liu D., Sun J., Guo X., Wang J., Li Y., Zhan K., Ling H.Q., Zhang A. Novel natural allelic variations at the *Rht-1* loci in wheat. *J. Integr. Plant Biol.* 2013;55(11):1026-1037. DOI 10.1111/jipb.12103.

- Lou X., Li X., Li A., Pu M., Shoaib M., Liu D., Sun J., Zhang A., Yang W. The 160 bp insertion in the promoter of *Rht-B1i* plays a vital role in increasing wheat height. *Front. Plant Sci.* 2016;7(307): 1-13. DOI 10.3389/fpls.2016.00307.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2015–2016 supplement. 2016. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2015.pdf>.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of gene symbols for wheat: 2018 supplement. 2018. Available at: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/sites/default/files/Catalogue%20of%20Gene%20Symbols%20for%20Wheat%20-%20supplement2018-2019.pdf>.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>.
- Neff M.M., Neff J.D., Chory J., Pepper A.E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* 1998;14(3):387-392. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1998.00124.x.
- Neff M.M., Turk E., Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 2002;18(12):613-615. DOI 10.1016/s0168-9525(02)02820-2.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat. *Plant Physiol.* 2011; 157(4):1820-1831. DOI 10.1104/pp.111.183657.
- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sadhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 1999;400(6741):256-261. DOI 10.1038/22307.
- Pestsova E., Korzun V., Börner A. Validation and utilisation of *Rht* dwarfing gene specific. *Cereal Res. Commun.* 2008;36(2):235-246. DOI 10.1556/CRC.36.2008.2.4.
- Rasheed A., Wen W., Gao F., Zhai S., Jin H., Liu J., Guo Q., Zhang Y., Dreisigacker S., Xia X., He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2016;129(10):1843-1860. DOI 10.1007/s00122-016-2743-x.
- Shavrukov Y.N. CAPS markers in plant biology. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(3):279-287. DOI 10.1134/S2079059716030114.
- Sukhikh I.S., Vavilova V.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Diversity and phenotypical effect of the allele variants of dwarfing *Rht* genes in wheat. *Russ. J. Genet.* 2021;57(2):127-138. DOI 10.1134/S1022795421020101.
- Thomas S.G. Novel *Rht-1* dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* 2017; 68(3):354-358. DOI 10.1093/jxb/erw509.
- Tian X., Wen W., Xie L., Fu L., Xu D., Fu C., Wang D., Chen X., Xia X., Chen Q., He Z., Cao S. Molecular mapping of reduced plant height gene *Rht24* in bread wheat. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1-9. DOI 10.3389/fpls.2017.01379.
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):71-74. DOI 10.1093/nar/gkm306.
- Wen W., Deng Q., Jia H., Wei L., Wei J., Wan H., Yang L., Cao W., Ma Z. Sequence variations of the partially dominant DELLA gene *Rht-B1c* in wheat and their functional impacts. *J. Exp. Bot.* 2013; 64(11):3299-3312. DOI 10.1093/jxb/ert183.
- Wilhelm E.P., Mackay I.J., Saville R.J., Korolev A.V., Balfourier F., Greenland A.J., Boulton M.I., Powell W. Haplotype dictionary for the *Rht-1* loci in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(7):1733-1747. DOI 10.1007/s00122-013-2088-7.
- Wu J., Kong X., Wan J., Liu X., Zhang X., Guo X., Zhou R., Zhao G., Jing R., Fu X., Jia J. Dominant and pleiotropic effects of a *GAI* gene in wheat results from a lack of interaction between DELLA and GID1. *Plant Physiol.* 2011;157(4):2120-2130. DOI 10.1104/pp.111.185272.
- Würschum T., Langer S.M., Longin C.F.H., Tucker M.R., Leiser W.L. A modern Green Revolution gene for reduced height in wheat. *Plant J.* 2017;92(5):892-903. DOI 10.1111/tpj.13726.
- Youssefian S., Kirby E.J.M., Gale M.D. Pleiotropic effects of the GA-insensitive *Rht* dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Res.* 1992;28(3):191-210. DOI 10.1016/0378-4290(92)90040-G.
- Zhang X., Yang S., Zhou Y., He Z., Xia X. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. *Euphytica.* 2006;152(1): 109-116. DOI 10.1007/s10681-006-9184-6.

ORCID ID

I.V. Porotnikov orcid.org/0000-0001-5841-8803
O.P. Mitrofanova orcid.org/0000-0002-9171-2964
O.Yu. Antonova orcid.org/0000-0001-8334-8069

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР по проектам № 0481-2019-0002 и 0662-2019-0006.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.10.2021. После доработки 31.10.2021. Принята к публикации 03.11.2021.

Androgenic response of *Triticum durum*-*Dasypyrum villosum* amphidiploids and their parental forms

H. Stoyanov , I. Belchev

Dobrudzha Agricultural Institute, General Toshevo, Bulgaria
 hpstoyanov@abv.bg

Abstract. Wide hybridization in cereal crops is one of the most efficient tools for the enrichment of genetic variability and addressing a number of breeding problems related to resistance and tolerance to biotic and abiotic stresses. Therefore, a large number of amphidiploids between species possessing different morphological, genetic and physiological properties have been developed. One of the most valuable species with regard to the possibilities for introducing valuable traits and properties into wheat species is the wild *Dasypyrum villosum*. With the aim to study the androgenic response of the *Triticum durum*-*D. villosum* amphidiploids, two accessions and their parental forms – the durum wheat cultivars Gergana and Argonavt and a landrace of the *D. villosum* – were studied. The following parameters were determined: callus induction, plant regeneration, yield of albino and green regenerants. It was found that the callus induction of the two studied amphidiploids differed significantly from that of the parental forms (2.1–7.2 %), being significantly higher, 30.7 and 16.5 %, respectively. Regardless of the difference in callus induction, the amphidiploids did not significantly differ from the parental forms in their regeneration ability. The yield of albino plants exceeded the yield of green regenerants and followed the tendency observed in callus induction. Green plants were found only in the amphidiploid Gergana-*D. villosum* and in the parental form durum wheat Gergana. Plants were regenerated from the species *D. villosum*, although they were only albinos, showing its good responsiveness to anther culture. The established characteristics of the amphidiploids and their parental forms make their practical use highly valuable for the improvement of different types of cereal crops.

Key words: anther culture; androgenic response; amphidiploid; *Dasypyrum villosum*; parental forms.

For citation: Stoyanov H., Belchev I. Androgenic response of *Triticum durum*-*Dasypyrum villosum* amphidiploids and their parental forms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2): 139-145. DOI 10.18699/VJGB-22-17

Андрогенетическая реакция амфидиплоидов *Triticum durum*-*Dasypyrum villosum* и их родительских форм

Х. Стоянов , И. Белчев

Добруджанский сельскохозяйственный институт, г. Генерал Тошево, Болгария
 hpstoyanov@abv.bg

Аннотация. Отдаленная гибридизация злаков является одним из самых эффективных способов обогащения генетического разнообразия и решения множества селекционных задач в отношении устойчивости и толерантности к биотическому и абиотическому стрессу. Поэтому создано большое количество амфидиплоидов между отдельными видами, которые наделены разными морфологическими, генетическими и физиологическими характеристиками. Дикий вид *Dasypyrum villosum* – один из самых ценных видов с точки зрения возможности интродуцирования ценных качеств и свойств в разные сорта пшеницы. Для изучения реакции амфидиплоидов *Triticum durum*-*D. villosum* исследованы два образца, их родительские формы – сорта твердой пшеницы Гергана и Аргонавт, а также местная популяция вида *D. villosum*. Установлены следующие параметры: индукция каллусов, частота всех проростков к 100 эмбриоподобным структурам, частота альбиносных проростков и частота зеленых проростков. По полученным результатам выявлено, что индукция каллусов двух амфидиплоидов статистически достоверно отличается от родительских форм (2.1–7.2 %), будучи значительно выше, 30.7 и 16.5 % соответственно. Несмотря на разницу в индукции каллусов, амфидиплоиды практически не отличаются от родительских форм своей регенерирующей способностью. Частота альбиносных проростков значительно превышает частоту зеленых проростков, следуя тенденции, наблюдаемой в индукции каллусов. Зеленые проростки зарегистрированы только у амфидиплоида Гергана-*D. villosum* и у родительской формы твердой пшеницы Гергана. Растения вида *D. villosum* были регенерированы, и то, что были только альбиносные проростки, показывает хорошую отзывчивость вида на культивирование пыльников. Установленные характеристики испытанных амфидиплоидов и их родительских форм делают практическое использование этих амфидиплоидов особенно ценным для селекции различных видов злаков.

Ключевые слова: пыльниковая культура; андрогенетическая реакция; амфидиплоид; *Dasypyrum villosum*; родительские формы.

Introduction

The development of highly productive varieties of cultivated plants, which at the same time are characterized with stable yields and are resistant to different biotic and abiotic stress factors, is a primary task in plant breeding (Chahal, Gosal, 2000). However, the increase of yield within the genome of a given species is not limitless (Grassini et al., 2013). In this respect, there are different approaches to enrich the genome of the cultivated plants – wide hybridization, genetic engineering, genome editing technologies, etc. (Chahal, Gosal, 2000; Liu et al., 2014; Okada et al., 2019; Li, 2020; Wang et al., 2020).

Although contemporary science has reached high levels of use of the latter two technologies, wide hybridization remains a main conventional tool for achieving high genetic variability. There is a large amount of research on amphidiploids developed through wide hybridization among the cereal crops (Zhang et al., 2010; Ming et al., 2011; Babaiants et al., 2012; Stoyanov, 2013, 2014; Dai et al., 2015; Nemeth et al., 2015; Song et al., 2019; Klimushina et al., 2020; Zuo et al., 2020; Kiani et al., 2021). One of the most promising species for enrichment of the genome of common and durum wheat, however, is *Dasyphyrum villosum*. This species has been described in detail with regard to the possibility of being used in the improvement work on the wheat species in the researches of A. Grądzielewska (2006a) and C. De Pace et al. (2011). In another research, A. Grądzielewska (2006b) described in detail a large number of studies on the production of hybrids, natural hybrids, substitution and addition lines with wheat and other species. There are a number of studies on the possibility of using the hybrids and amphidiploids of the wheat species with *D. villosum* in practical breeding (De Pace et al., 2001; Vaccino et al., 2010; De Pace et al., 2011; Zhang et al., 2015, 2016a, b, 2018; Ando et al., 2019). A. Stefani et al. (1987) reported rather detailed morphological characteristics of the amphidiploid *Triticum durum*-*D. villosum*.

Since plant breeding is a rather dynamic process, when developing lines from the cereal species, the biotechnological method of anther culture is often used to accelerate the breeding process (Belchev, 2003; Lantos, 2009). Different researchers report that the efficiency of the process and the production of a high number of green plants is related to the response to anther culture of the parental forms involved in the cross (Zamani et al., 2003; Dagüstü, 2008; Yildirim et al., 2008; El-Hennawy et al., 2011). In this respect, the developed amphidiploids, substitution and addition lines with *D. villosum*, are specific parental forms, the reaction to anther culture of which has not been studied up to now. The possibility to apply anther culture to amphidiploids in principle has been little investigated. The response to anther culture in the amphidiploids has been studied in the amphidiploid *Aegilops variabilis*-*Secale cereale* (Ponitka et al., 2002), and the authors determined 0.1–13.4 % of regenerants obtained from 100 androgenic embryoids. D. Plamenov et al. (2009) determined 1.9–3.2 % of green regenerants from 100 cultured anthers in the amphidiploid *T. durum*-*T. monococcum* ssp. *aegilopoides*. In tritordeum (Barcelo et al., 1994), it was also found out that anther culture is an efficient process. The results from these researches showed that different amphidiploids are able to give positive response to anther culture.

The aim of this study was to determine the reaction of the amphidiploid *T. durum*-*D. villosum* to anther cultivation in comparison to its parental forms.

Materials and methods

Plant material. Two accessions of the amphidiploid *T. durum*-*D. villosum* (1dv (Gergana-*D. villosum*) and 2dv (Argonavt-*D. villosum*)), a part of the collection of Dobrudzha Agricultural Institute were used, as well the durum wheat parental forms (*T. durum* cv. Gergana and cv. Argonavt) and the wild species *D. villosum*.

The accession of *D. villosum* ($2n = 2x = 14$ (VV); family Poaceae, tribe Triticeae, subtribe Triticineae, genus *Dasyphyrum*) was collected in Dobrich region in 2011.

Crosses Gergana \times *D. villosum* and Argonavt \times *D. villosum* were made conventionally, without embryo rescue in 2012; the obtained seeds (Gergana \times *D. villosum* – 3 seeds and Argonavt \times *D. villosum* – 8 seeds) were germinated and at tillering stage the plants (Gergana \times *D. villosum* – 1 plant and Argonavt \times *D. villosum* – 3 plants) were treated with colchicine in 2013. The seeds from the two obtained primary amphidiploids were multiplied several times.

Anther culture. The experiment was carried out during 2016/2017. Anther donor plants were grown under greenhouse conditions. The seeds from the accessions were germinated in Petri dishes and then planted in plastic pots. Fifteen plants from each accession were grown in three pots, using 10 plants per genotype. Primary, seedling were vernalized at 4 °C (3000 lx, 16 h day/8 h night) for 45 days. After this period, the plants were transferred to a cold greenhouse (5–15 °C) for about three months, and the temperature was later increased to 15–20 (25) °C. Tillers bearing spikes containing anthers with microspores at mid- to late uninucleate stage were cut, put in a vessel with water and pretreated at 4 °C for 8–9 days. Ten spikes from each genotype were collected. Cold pretreated spikes were surface sterilized with 70 % ethanol under aseptic conditions. Sixty anthers from each spike were placed in test tubes with 20 ml P2 induction medium (Chuang et al., 1978). The anthers were cultured at 28 °C in darkness for about 60 days. After the 30th day, they were periodically checked for induction of embryogenic structures (calli and embryoids), which were transferred to test tubes with 10 ml regeneration medium (Zhuang, Jia, 1983) and cultured at 25 °C (3000 lx, 16 h day/8 h night). Green and albino regenerants were counted after 30 days.

The androgenic response was estimated by the following traits: callus induction (CI) (number of embryogenic structures induced per 100 cultured anthers, %), plant regeneration (PR) (number of regenerated green and albino plants per 100 embryogenic structures, %), frequency (yield) of green plants (YGR) (number of regenerated green plants per 100 cultured anthers, %) and frequency (yield) of albino plants (YAR) (number of regenerated albino plants per 100 cultured anthers, %).

Statistics. The obtained results were summarized over genotypes and parameters. One way ANOVA was carried out with the aim of determining the effect of the genotype on the studied parameters to estimate their androgenic response. Significant differences between the amphidiploids and their

parental forms were calculated based on the Duncan test. To process the data, software MS Office Excel 2003 was used, and to perform ANOVA and the Duncan test – IBM SPSS Statistics v.19.

Results

The results on the androgenic potential of the investigated amphidiploids and their parental forms (Table 1) showed that accession 1dv had the highest callus induction (30.7 %), and durum wheat Argonavt – the lowest (2.1 %). Between the parental forms, there were no significant differences (both between the durum wheat cultivars and between the species durum wheat and *D. villosum*). The two amphidiploids differed significantly by their callus induction, which was probably related to the effect of the maternal component.

The yield of green plants, averaged for the entire investigated set, was extremely low. In the entire experiment, only 5 green regenerants were produced, one of them being from the durum wheat cultivar Gergana, and the other 4 – from the amphidiploid 1dv (Gergana-*D. villosum*). No green regenerants were obtained from cultivar Argonavt and from the amphidiploid 2dv. Also, no green plants were produced from the wild species *D. villosum*. Although there was a rather small number of the obtained plants for formulating a general tendency for the effect of the parental forms, the presence of green plants in cultivar Gergana and the amphidiploid, in which it was involved, was probably due to genotypic specificity.

The albino plants considerably exceeded the green regenerants. In practice, they were predominant with regard to the total number of regenerants. The amphidiploid 1dv again had the highest yield of albino plants (10.3 %), and the lowest values were observed in cultivar Argonavt (0.4 %). The tendency in yield of obtained albinos largely followed the tendency of callus induction. The two amphidiploids significantly differed from the parental forms by their values, as well as between themselves (10.3 and 5.8 %, respectively). Meanwhile, significant differences between the two durum wheat cultivars and between the durum wheat and the wild species were not registered. The higher yield values of the albino plants in the amphidiploid 1dv may be related to the higher responsiveness of cultivar Gergana, which was the maternal component of this amphidiploid, although the difference between Gergana and Argonavt was not significant.

On the whole, plant regeneration, expressed as a number of regenerants per 100 embryogenic structures, was compara-

tively low. The highest values were read in the two investigated amphidiploids (35.9 and 35.4 %, respectively), and the lowest – in the wild species *D. villosum* (13.0 %). This parameter did not follow the tendency observed in the values of callus induction and yield of green and albino regenerants. There were no significant differences between any of the studied accessions. However, higher plant regeneration was registered in the amphidiploids, in comparison to cultivar Argonavt and the wild species, and the difference with cultivar Gergana was considerably lower. The differences not being significant was an indication that the regeneration potential of all studied accessions was practically identical, and the differences formed were entirely random. The total number of regenerants, however, expressly followed the tendency of callus induction and yield of albino plants. The higher responsiveness to anther culture of the two investigated amphidiploids in comparison to either of the parental forms could be clearly observed in this parameter.

The results from the analysis of the variance of the studied parameters (Table 2) showed that the genotype had a significant effect on the parameters callus induction and yield of albino regenerants. This allows supposing that the separate accessions gave specific responses and that there are significant differences between them, as determined by the Duncan test that was carried out. At the same time, the effect of the separate accessions on the plant regeneration and the yield of green plants was not significant. Worth mentioning are accessions Gergana and Gergana-*D. villosum*, in which higher responsiveness to anther culture was observed, in general. Nevertheless, these results do not give a definite answer to the question of whether the amphidiploids are different as a biologically distinct organism from the two parental forms with regard to their androgenic response.

When summarizing the results at the level of the species, a clear tendency of the amphidiploid *T. durum-D. villosum* having significantly higher callus induction and yield of albino regenerants was evident (Table 3).

Simultaneously, significant differences between the two parental forms were not observed, the values of both parameters being significantly lower in them. The yield of green plants from the parental forms and from the amphidiploid was extremely low and did not allow forming a clear tendency. In this case, the production of green regenerants was rather random, without observing significant differences between the investigated species. Plant regeneration, at the levels of

Table 1. Androgenic response of parental forms and durum wheat-*D. villosum* amphidiploids

Genotype	NCA	NOC	CI, %	NRC	PR, %	NAR	YAR, %	NGR	YGR, %
Gergana	600	43	7.2ab	13	30.2a	12	2ab	1	0.2ab
Argonavt	480	10	2.1a	2	20.0a	2	0.4a	0	0.0a
<i>D. villosum</i> (Dv)	540	23	4.3ab	3	13.0a	3	0.6a	0	0.0a
1dv (Gergana-Dv)	600	184	30.7c	66	35.9a	62	10.3c	4	0.7b
2dv (Argonavt-Dv)	480	79	16.5b	28	35.4a	28	5.8b	0	0.0a

Note. NCA – number of cultivated anthers; NOC – number of obtained calli; CI – callus induction; NRC – number of regenerative calli; PR – plant regeneration; NAR – number of albino regenerants; YAR – yield of albino regenerants; NGR – number of green regenerants; YGR – yield of green regenerants.

Table 2. ANOVA according to factor “accession” of the studied accessions

Parameters		Sum of squares	df	Mean square	F	Significance
CI	Between groups	0.51892	4	0.12973	8.693	0.000
	Within groups	0.59697	40	0.01492		
	Total	1.11589	44			
YAR	Between groups	0.06774	4	0.01694	7.799	0.000
	Within groups	0.08686	40	0.00217		
	Total	0.15460	44			
YGR	Between groups	0.00032	4	0.00008	2.159	0.091
	Within groups	0.00147	40	0.00004		
	Total	0.00179	44			
PR	Between groups	0.36055	4	0.09014	0.899	0.474
	Within groups	4.01134	40	0.10028		
	Total	4.37188	44			

Note. CI – callus induction; YAR – yield of albino regenerants; YGR – yield of green regenerants; PR – plant regeneration.

Table 3. Androgenic response of parental forms and durum wheat-*D. villosum* amphidiploid

Species	NCA	NOC	CI, %	NRC	PR, %	NAR	YAR, %	NGR	YGR, %
<i>T. durum</i> (Td)	1080	53	4.9a	15	28.3a	14	1.3a	1	0.1a
<i>D. villosum</i> (Dv)	540	23	4.3a	3	13.0a	3	0.6a	0	0.0a
Td-Dv	1080	263	24.4b	94	35.7a	90	8.3b	4	0.4a

Note. NCA – number of cultivated anthers; NOC – number of obtained calli; CI – callus induction; NRC – number of regenerative calli; PR – plant regeneration; NAR – number of albino regenerants; YAR – yield of albino regenerants; NGR – number of green regenerants; YGR – yield of green regenerants.

Table 4. ANOVA according to factor “species” of the studied accessions

Parameters		Sum of squares	df	Mean square	F	Significance
CI	Between groups	0.41771	2	0.20885	12.564	0.000
	Within groups	0.69818	42	0.01662		
	Total	1.11589	44			
YAR	Between groups	0.05763	2	0.02881	12.480	0.000
	Within groups	0.09698	42	0.00231		
	Total	0.15460	44			
YGR	Between groups	0.00011	2	0.00005	1.349	0.271
	Within groups	0.00168	42	0.00004		
	Total	0.00179	44			
PR	Between groups	0.31393	2	0.15696	1.625	0.209
	Within groups	4.05795	42	0.09662		
	Total	4.37188	44			

Note. CI – callus induction; YAR – yield of albino regenerants; YGR – yield of green regenerants; PR – plant regeneration.

both genotype and species, did not differ as a tendency. The observed differences were not significant (see Tables 3 and 4), which indicated that the studied amphidiploid did not differ from the parental forms by its regeneration capacity.

Discussion

Concerning the results obtained on the androgenic response of the used accessions, it should be emphasized, that no source

was found in world literature that would present data on the amphidiploid *T. durum*-*D. villosum* or the species *D. villosum*. An exception was the research of X. Chen et al. (1996), who suggested applying the anther culture method on hybrids (not amphidiploids) of the F_1 (*T. durum* × *D. villosum*). These authors reported successful production of amphidiploids, regenerated from colchicine-treated calli. At the same time, there are researches on the use of tissue cultures on three-

component hybrids *T. aestivum* × (*T. durum*-*D. villosum*). H. Li et al. (2005) reported lines with high powdery mildew resistance obtained from such hybrids through the method of embryo rescue and subsequent anther culture.

D. Plamenov et al. (2009), when investigating the androgenic response of accessions from the amphidiploid *T. durum*-*T. monococcum* ssp. *aegilopoides*, came up with results different from ours. The reported callus induction was 3.3–11.7 % for the two studied accessions, the plant regeneration was considerably higher, 33.8–68.4 %, respectively, and the albino regenerants yield was 1.9–3.2 %. At the same time, the yield of green plants (0.4–0.8 %) was a little higher than the data we obtained in our experiment (0.0–0.7 %). These authors reported a total of seven regenerated plants from both accessions, this parameter being significant, unlike the results we obtained. Using anther culture in the amphidiploid *Ae. variabilis*-*S. cereale*, and P2 medium, A. Ponitka et al. (2002) observed 1.4–15.7 % of callus induction, and on C17 medium – 20.0–65.2 %. Subsequently, the authors reported 0.1–13.4 % yield of green regenerants using 190-2 regeneration medium. It was found out that the androgenic response was strongly dependent on the genotype, similar to the results of the experiment we conducted. Successful regeneration of green plants through the method of anther culture has also been reported for an aneupolyhaploid of *Thynopyrum ponticum* (Wang et al., 1991), for the amphidiploid *Festuca pratensis-Lolium multiflorum* (Lesniewska et al., 2001; Zwierzykowski et al., 2001; Rapacz et al., 2005) and the amphidiploid *Cyclamen persicum*-*C. purpurascens* (Ishizaka, 1998).

In contrast to these results, the parental forms were characterized with much lower androgenic response. This was confirmed by the absence of callus induction in *Ae. variabilis* and rye, reported by A. Ponitka et al. (2002), and also in the species *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* in the research of D. Plamenov et al. (2009). Durum wheat is also characterized by weak androgenic response, in general. M. Doğramacı-Altuntepe et al. (2001), using 10 durum wheat genotypes, obtained only 248 green regenerants from 86,400 anthers (0.29 %). F. J'Aiti et al. (1999), investigating 15 durum wheat genotypes and 7500 cultivated anthers, obtained just three albino regenerants and one green plant.

L. Cistúe et al. (2006), on the other hand, reported significantly higher production of green plants, but including 6-benzylaminopurine or 6-furfurilaminopurine in the induction medium (C17). In more recent researches, the production of haploids, even by the method of isolated microspores, has been of extremely low efficiency in durum wheat (Slama-Ayed et al., 2019). These results entirely corresponded to the data we obtained with regard to the two cultivars Argonavt and Gergana. Clear genotypic specificity was observed in the better response of Gergana to anther culture as compared to Argonavt, although the difference was not statistically significant. It is probable that this tendency is the reason for the amphidiploid Gergana-*D. villosum* having better responsiveness to anther culture. In this respect, the amphidiploid *T. durum*-*D. villosum* we investigated, and the amphidiploids reported by A. Ponitka et al. (2002) and D. Plamenov et al. (2009) were closer by their androgenic response to the response of triticale (which is a typical amphidiploid crop) than to the response of the parental forms. J. Pauk et al. (2000), K. Marciniak et al.

(2003), C. Lantos et al. (2014) and H. Stoyanov et al. (2019) demonstrated that in triticale the albino regenerants are often predominant, similar to the amphidiploid we studied. The values of the green regenerants in triticale also varied (from 0.9 to 27.9 %, but more often within 3–6 %), according to data from various researches (Gonzales, Jouve, 2000; Marciniak et al., 2003; Banaszak, 2011; Lantos et al., 2014).

In contrast to the above responses of the parental forms *Ae. variabilis*, *S. cereale* and *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*, our study, although limited in volume, demonstrated the comparatively good responsiveness of the species *D. villosum* to anther culture. This is the first time when results on regenerants from this species (although only albinos) are being reported. At the same time, it should be emphasized that until this moment results from testing of the reaction of *D. villosum* to the anther culture method have never been reported. This is highly significant for the breeding of the wheat species since it would allow transferring genes from the wild species through the methods of wide hybridization and anther culture more easily, quickly and efficiently. X. Chen et al. (1996) and C. Li et al. (2000) reported common wheat lines resistant to powdery mildew, which were obtained by crossing common wheat to the amphidiploid *T. durum*-*D. villosum*, followed by embryo rescue and anther culture. Such results showed that the combination of wide hybridization with the method of anther culture is an efficient tool that can be used in the breeding of different cereal crops.

Conclusion

Based on the presented results, the following conclusions could be made:

1. For the first time, results on the androgenic response (callus induction, plant regeneration, yield of albino plants, yield of green plants) of the amphidiploid *T. durum*-*D. villosum* and of the parental component *D. villosum* are being reported.
2. The callus induction of the two studied amphidiploids differed significantly from that of the parental forms (2.1–7.2 %), being considerably higher – 30.7 and 16.5 %, respectively.
3. The plant regeneration of the investigated accessions varied within a certain range (13.0–35.9 %), the differences not being statistically significant. This indicated that in spite of the differences in the callus induction, the amphidiploids did not practically differ from the parental forms by their regeneration capacity.
4. Although plant regeneration was observed in all studied accessions, the yield of albino plants considerably exceeded the yield of green regenerants and followed the tendency observed in callus induction – the two amphidiploids had significantly higher values. At the same time, green plants were registered only in the amphidiploid Gergana-*D. villosum* and in the parental form durum wheat Gergana. Such results emphasized the genotypic specificity of the response to anther culture.
5. Plants were regenerated from the species *D. villosum*, although only albinos, which indicated its good responsiveness to anther culture. This, together with the good response of the amphidiploids with the participation of this species, makes their practical use, in combination with the anther culture method, highly valuable for improving the cereals.

References

- Ando K., Krishnan V., Rynearson S., Rouse M.N., Danilova T., Friebe B., See D., Pumphrey M.O. Introgression of a novel Ug99-effective stem rust resistance gene into wheat and development of *Dasypyrum villosum* chromosome-specific markers via genotyping-by-sequencing (GBS). *Plant Dis.* 2019;103:1068-1074. DOI 10.1094/PI-S-05-18-0831-RE.
- Babaiants O.V., Babaiants L.T., Horash A.F., Vasil'ev A.A., Trackovetskaia V.A., Paliash'iii V.A. Genetics determination of wheat resistance to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* deriving from *Aegilops cylindrica*, *Triticum erebuni* and amphidiploid 4. *Isitol. Genet.* 2012; 46(1):10-17. (in Ukrainian)
- Banaszak Z. Breeding of triticale in DANKO. In: Tagungsband der 61. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 23–25 November 2010. Raumberg-Gumpenstein. Irnding, 2011;65-68.
- Barceló P., Cabrera A., Hagel C., Lörz H. Production of doubled-haploid plants from tritordeum anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 1994; 87:741-745.
- Belchev I. Studies on Anther Culture of Common Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Application of Double Haploid Lines in Breeding. General Toshevo, 2003. (in Bulgarian)
- Chahal G.S., Gosal S.S. Principles and Procedures of Plant Breeding: Biotechnological and Conventional Approaches. New York: CRC Press, 2000.
- Chen X., Xu H.J., Du L.P., Shang L.M., Han B., Shi A., Xiao S. Transfer of gene resistant to powdery mildew from *H. villosa* to common wheat by tissue culture. *Sci. Agric. Sin.* 1996;29:1-8.
- Chuang C.C., Ouyang T.W., Chia H., Chou S.M., Ching C.K. A set of potato media for wheat anther culture. In: Proc. of Symposium on Plant Tissue Culture 1978. Peking: Science Press, 1978;51-56.
- Cistué L., Soriano M., Castillo A.M., Vallés M.P., Sanz J.M., Echávarri B. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 2006;25(4):257-264. DOI 10.1007/s00299-005-0047-8.
- Dagüstü N. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Afr. J. Adv. Biotechnol.* 2008;7(19):3419-3423.
- Dai S., Li Z., Xue X., Jia Y., Liu D., Pu Z., Zheng Y., Yan Z. Analysis of high-molecular-weight glutenin subunits in five amphidiploids and their parental diploid species *Aegilops umbellulata* and *Aegilops uniaristata*. *Plant Genet. Resour.* 2015;13(2):186-189. DOI 10.1017/S1479262114000719.
- De Pace C., Snidaro D., Ciaffi M., Vittori D., Ciofo A., Cenci A., Tanzarella O.A., Qualset C.O., Mugnozza G.T.S. Introgression of *Dasypyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. *Euphytica.* 2001;117(1):67-75. DOI 10.1023 A:1004095705460.
- De Pace C., Vaccino P., Cionini P.G., Pasquini M., Bizzarri M., Qualset C.O. *Dasypyrum*. Chapter 4. In: Kole C. (Ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Cereals*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2011;185-292. DOI 10.1007/978-3-642-14228-4_4.
- Doğramacı-Altuntepe M., Peterson T.S., Jauha P.P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. *J. Hered.* 2001;92(1):56-64.
- El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Ann. Agric. Sci.* 2012;56(2):63-72. DOI 10.1016/j.aos.2011.05.008.
- Gonzales J.M., Jouve N. Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Res. Commun.* 2000;28(1-2): 65-72.
- Grądzielewska A. The genus *Dasypyrum* – part 2. *Dasypyrum villosum* – a wild species used in wheat improvement. *Euphytica.* 2006a; 152:441-454.
- Grądzielewska A. The genus *Dasypyrum* – part 1. The taxonomy and relationships within *Dasypyrum* and with *Triticeae* species. *Euphytica.* 2006b;152:429-440.
- Grassini P., Eskridge K., Cassman K. Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends. *Nat. Commun.* 2013;4:2918. DOI 10.1038/ncomms3918.
- Ishizaka H. Production of microspore-derived plants by anther culture of an interspecific F1 hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1998;54:21-28.
- J'Aiti F., Benlhabib O., Sharma H.C., El Jaafari S., El Hadrami I. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary coculture in durum wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1999;59:71-76.
- Kiani R., Arzani A., Meibody S.A.M.M., Rahimmalek M., Razavi K. Morpho-physiological and gene expression responses of wheat by *Aegilops cylindrica* amphidiploids to salt stress. *bioRxiv.* 2021. DOI 10.1101/2020.06.07.139220.
- Klimushina M.V., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Divashuk M.G. Waxy gene-orthologs in wheat × *Thinopyrum* amphidiploids. *Agronomy.* 2020;10(7):963. DOI 10.3390/agronomy10070963.
- Lantos C. *In vitro* androgenesis induction in wheat (*Triticum aestivum* L.), Triticale (×*Triticosecale* Wittmack), spice pepper (*Capsicum annum* L.) and integration of the results into breeding: Thesis of the Ph.D. dissertation. Szent Istvan University, 2009.
- Lantos C., Bona L., Boda K., Pauk J. Comparative analysis of *in vitro* anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (×*Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica.* 2014; 197(1):27-37.
- Lesniewska A., Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A., Zwierzykowska E., Zwierzykowski Z., James A.R., Thomas H., Humphreys M.W. Androgenesis from *Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilize rare gene combinations for grass breeding. *Heredity.* 2001;86:167-176.
- Li C. Breeding crops by design for future agriculture. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2020;21(6):423-425. DOI 10.1631/jzus.B2010001.
- Li H., Chen X., Xin Z.Y., Ma Y.Z., Xu H.J., Chen X.Y., Jia X. Development and identification of wheat–*Haynaldia villosa* T6DL.6VS chromosome translocation lines conferring resistance to powdery mildew. *Plant Breed.* 2005;124:203-205. DOI 10.1111/j.1439-0523.2004.01062.x.
- Li H.J., Li Y.W., Zhang Y.M., Li H., Guo B.H., Wang Z.N., Wen Z.Y., Liu Z.Y., Zhu Z.Q., Jia X. Tissue culture induced translocation conferring powdery mildew resistance between wheat and *Dasypyrum villosum* and its marker-assisted selection. *Yi Chuan Xue Bao.* 2000;27(7):608-613.
- Liu D., Zhang H., Zhang L., Yuan Z., Hao M., Zheng Y. Distant hybridization: a tool for interspecific manipulation of chromosomes. In: Pratap A., Kumar J. (Eds.). *Alien Gene Transfer in Crop Plants*. Vol. 1. New York: Springer, 2014. DOI 10.1007/978-1-4614-8585-8_2.
- Marciniak K., Kaczmarek Z., Adamski T., Surma M. The anther-culture response of triticale line × tester progenies. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2003;8:343-351.
- Ming D., Xiuqin W., Fu Q., Zhao Q., Zhao F., Wang Y. Cytogenetical analysis of hybrid F1 from common wheat and *Aegilops ventricosa* × *Aegilops cyindrica* amphidiploid. *Agric. Sci. Technol. Hunan.* 2011;12(9):1298-1302.
- Nemeth C., Yang C.-y., Kasprzak P., Hubbart S., Scholefield D., Mehra S., Skipper E., King I., King J. Generation of amphidiploids from hybrids of wheat and related species from the genera *Aegilops*, *Secale*, *Thinopyrum*, and *Triticum* as a source of genetic variation for wheat improvement. *Genome.* 2015;58(2):71-79. DOI 10.1139/gen-2015-0002.
- Okada A., Arndell T., Borisjuk N., Sharma N., Watson-Haigh N.S., Tucker E.J., Baumann U., Langridge P., Whitford R. CRISPR/Cas9-mediated knockout of Ms1 enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17:1905-1913. DOI 10.1111/pbi.13106.
- Pauk J., Poulimatka M., Toth K.L., Monostori T. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2000;61(3):221-229. DOI 10.1023/A:1006416116366.

- Plamenov D., Belchev I., Spetsov P. Anther culture response of *Triticum durum* × *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* amphiploid. *Cereal Res. Commun.* 2009;37(2):255-259. DOI 10.1556/CRC.37.2009.2.13.
- Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A., Wojciechowska B. Production of haploids and doubled haploids of the amphiploids *Aegilops variabilis* × *Secale cereale*. *Cereal Res. Commun.* 2002;30(1):39-45. DOI 10.1007/BF03543387.
- Rapacz M., Gašior D., Humphreys M.W., Zwierzykowski Z., Płażek A., Lésniewska-Bocianowska A. Variation for winter hardiness generated by androgenesis from *Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars with different winter susceptibility. *Euphytica*. 2005;142:65-73.
- Slama-Ayed O., Bouhaouel I., Ayed S., De Buyser J., Picard E., Amara H.S. Efficiency of three haplomehtods in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum* Desf.): isolated microspore culture, gynogenesis and wheat × maize crosses. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2019;55(3):101-109. DOI 10.17221/188/2017-CJGPB.
- Song Z., Dai S., Jia Y., Zhao L., Kang L., Liu D., Wei Y., Zheng Y., Yan Z. Development and characterization of *Triticum turgidum*-*Aegilops umbellulata* amphidiploids. *Plant Genet. Resour.* 2019;17(1):24-32. DOI 10.1017/S1479262118000254.
- Stefani A., Meletti P., Onnis A. Morphological characteristics of the experimental allopolyploid *Triticum durum* × *Haynaldia villosa* (2n = 42). *Can. J. Bot.* 1987;65:1948-1951.
- Stoyanov H. Status of remote hybrids in the Poaceae: problems and prospects. *Agric. Sci. Technol.* 2013;5(1):3-12.
- Stoyanov H. Analysis and assessment of amphidiploids of *Triticum-Aegilops* group as a source of genetic diversity. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2014;20(Suppl. 1):173-178.
- Stoyanov H., Belchev I., Baychev V. Changes in the androgenic response of triticale (×*Triticosecale* Wittm.) as a result of the inclusion of sweet potato extract in the induction media. *Rastenievadni Nauki.* 2019;56(5):92-98. (in Bulgarian)
- Vaccino P., Banfi R., Corbellini M., De Pace C. Improving the wheat genetic diversity for end-use grain quality by chromatin introgression from the wheat wild relative *Dasypyrum villosum*. *Crop Sci.* 2010;50(2):528-540.
- Wang H., Sun S., Ge W., Zhao L., Hou B., Wang K., Lyu Z., Chen L., Xu S., Guo J., Li M., Su P., Li X., Wang G., Bo C., Fang X., Zhuang W., Cheng X., Wu J., Dong L., Chen W., Li W., Xiao G., Zhao J., Hao Y., Xu Y., Gao Y., Liu W., Liu Y., Yin H., Li J., Li X., Zhao Y., Wang X., Ni F., Ma X., Li A., Xu S.S., Bai G., Nevo E., Gao C., Ohm H., Kong L. Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Science.* 2020;368(6493):eaba5435. DOI 10.1126/science.aba5435.
- Wang R.R.C., Marburger J.E., Hu C.J. Tissue-culture-facilitated production of aneupolyhaploid *Thinopyrum ponticum* and amphidiploid *Hordeum violaceum* × *H. bogdanii* and their uses in phylogenetic studies. *Theor. Appl. Genet.* 1991;81:151-156. DOI 10.1007/BF00215716.
- Yildirim M., Bahar B., Genç İ., Hatipoğlu R., Altıntaş S. Reciprocal effects in anther cultures of wheat hybrids. *Biol. Plant.* 2008;52:779-782. DOI 10.1007/s10535-008-0152-y.
- Zamani I., Gouli-Vavdinoudi E., Kovacs G., Xynias I., Roupakias D., Barnabas B. Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F1 hybrids. *Plant Breed.* 2008;122(4):314-317. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00866.x.
- Zhang L.Q., Liu D.C., Zheng Y.L., Yan Z.H., Dai S.F., Li Y.F., Jiang Q., Ye Y.Q., Yen Y. Frequent occurrence of unreduced gametes in *Triticum turgidum*-*Aegilops tauschii* hybrids. *Euphytica.* 2010;172:285-294. DOI 10.1007/s10681-009-0081-7.
- Zhang R., Fan Y., Kong L., Wang Z., Wu J., Xing L., Cao A., Feng Y. Pm62, an adult-plant powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* chromosome arm 2VL into wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(12):2613-2620. DOI 10.1007/s00122-018-3176-5.
- Zhang R., Feng Y., Li H., Yuan H., Dai J., Cao A., Xing L., Li H. Cereal cyst nematode resistance gene *CreV* effective against *Heterodera filipjevi* transferred from chromosome 6VL of *Dasypyrum villosum* to bread wheat. *Mol. Breed.* 2016a;36:122. DOI 10.1007/s11032-016-0549-9.
- Zhang R., Sun B., Chen J., Cao A., Xing L., Feng Y., Lan C., Chen P. Pm55, a developmental-stage and tissue-specific powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* into common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2016b;129:1975-1984. DOI 10.1007/s00122-016-2753-8.
- Zhang R.Q., Hou F., Feng Y.G., Zhang W., Zhang M.Y., Chen P.D. Characterization of a *Triticum aestivum*-*Dasypyrum villosum* T2VS-2DL translocation line expressing a longer spike and more kernels traits. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(12):2415-2425. DOI 10.1007/s00122-015-2596-8.
- Zhuang J.J., Jia X. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Beijing: Science Press, 1983.
- Zuo Y., Xiang Q., Dai S., Song Z., Bao T., Hao M., Zhang L., Liu G., Li J., Liu D., Wei Y., Zheng Y., Yan Z. Development and characterization of *Triticum turgidum*-*Aegilops comosa* and *T. turgidum*-*Ae. markgrafii* amphidiploids. *Genome.* 2020;63(5):263-273. DOI 10.1139/gen-2019-0215.
- Zwierzykowski Z., Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A., Zwierzykowska E., Lesniewska-Bocianowska A. Androgenesis in amphidiploid F1 hybrids and cultivars of *Festulolium*. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych (Poland).* 2001;474:47-54. (in Polish)

ORCID ID

H. Stoyanov orcid.org/0000-0003-0733-9077

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

Received August 2, 2021. Revised November 27, 2021. Accepted December 30, 2021.

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

Соответствие морфологии бутонов и пыльников стадиям развития мужского гаметофита дыни (*Cucumis melo* L.)

М.А. Нгуен¹✉, Т.Н.Б.Т. Хуен¹, Д.М. Чинь¹, А.В. Воронина²

¹ Университет Дананг – Университет образования и науки, Дананг, Вьетнам

² Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

✉ nmly@ued.udn.vn

Аннотация. Выявление корреляций между морфологическими признаками бутонов и стадиями развития мужского гаметофита представляет большой практический интерес, так как наличие надежного маркера ускоряет и упрощает отбор подходящего растительного материала для культуры изолированных микроспор. Культура изолированных микроспор позволяет в короткие сроки получать чистые линии многих овощных культур, однако для дыни (*Cucumis melo* L.) эта технология пока не получила распространения. Чтобы успешно применить данную технологию для новой культуры, необходимо оптимизировать множество ее элементов, прежде всего подобрать морфологические маркеры, позволяющие отбирать бутоны, которые содержат микроспоры определенных стадий развития. В нашей работе приведена оценка корреляции между длиной бутонов, диаметром бутонов, длиной видимой части венчика, длиной пыльников и стадиями развития мужского гаметофита дыни F₁ гибрида Kim Hong Ngoc. Наиболее сильная корреляция установлена для диаметра бутонов, коэффициент корреляции составил 0.885. Сильная корреляция выявлена также для длины бутона, коэффициент корреляции 0.880. Длина видимой части венчика являлась менее надежным признаком, а длину пыльников не следует использовать в качестве параметра для прогнозирования стадий развития мужского гаметофита дыни. Отмечено, что в одном пыльнике одновременно находились микроспоры и пыльцевые зерна разных стадий развития. В бутонах длиной менее 4.00 мм и диаметром до 1.51 ± 0.02 мм преобладали тетрады; в бутонах длиной 4.0–4.9 мм и диаметром 2.30 ± 0.02 мм обнаружена наибольшая доля ранних микроспор, при этом преобладали микроспоры средней стадии развития; в бутонах длиной 5.0–5.9 мм и диаметром 2.32 ± 0.00 мм преобладали средние и поздние вакуолизованные микроспоры; в бутонах длиной 6.0–8.9 мм и диаметром 2.96 ± 0.37 мм – поздние вакуолизованные микроспоры; в бутонах длиной 9.0 мм и более, диаметром 3.97 ± 0.34 мм и более – двухклеточная пыльца.

Ключевые слова: мужской гаметофит; стадии развития микроспор; тетрада; пыльца; бутон; пыльник; *Cucumis melo* L.; дыня.

Для цитирования: Нгуен М.А., Хуен Т.Н.Б.Т., Чинь Д.М., Воронина А.В. Соответствие морфологии бутонов и пыльников стадиям развития мужского гаметофита дыни (*Cucumis melo* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):146-152. DOI 10.18699/VJGB-22-18

Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo* L.)

M.L. Nguyen¹✉, T.N.B.T. Huyen¹, D.M. Trinh¹, A.V. Voronina²

¹ Da Nang University – University of Education and Science, Da Nang City, Vietnam

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

✉ nmly@ued.udn.vn

Abstract. Correlations between the morphological features of flower buds and the developmental stages of the male gametophyte are of great practical interest as a reliable marker that accelerates and simplifies the selection of appropriate plant material for isolated microspore culture. Microspore culture enables one to quickly obtain many pure lines of different vegetable crops, but it has not yet been widely applied in the melon (*Cucumis melo* L.). To successfully apply this technique in a new culture, one has to optimize many of its elements: first, find the biological markers for selecting the flower buds containing the microspores of certain development stages. The paper presents the results of research estimating the correlations between the length and diameter of the flower buds, the length of the visual part of the corolla, the length of the anthers and the development stages of the male gametophyte in the F₁ hybrid of the Kim Hong Ngoc melon. The strongest correlation (CC = 0.885) was found for the flower bed diameter and a strong correlation (CC = 0.880), for the bud length. The corolla's visual part was a less reliable morphological feature, and the anther's length should not be used as a parameter to predict the developmental stages of the melon's male gametophyte. It was also found that one anther could contain the microspores and pollen grains of different developmental stages. In the flower buds less than 4 mm in length and 1.51 ± 0.02 mm in diameter prevailed tetrads, and in the buds 4.0–4.9 mm in length and 2.30 ± 0.02 mm in diameter, early microspores. The micro-

spores of a middle stage of development prevailed in the flower buds 5.0–5.9 mm in length and 2.32 ± 0.00 mm in diameter; mid and late vacuolated microspores, in the buds 6.0–8.9 mm in length and 2.96 ± 0.37 mm in diameter; and two-celled pollen, in the buds more than 9 mm in length and more than 3.97 ± 0.34 mm in diameter.

Key words: male gametophyte; stages of microspore development; tetrad; pollen; flower bud; anther; *Cucumis melo* L.; melon.

For citation: Nguyen M.L., Huyen T.N.B.T., Trinh D.M., Voronina A.V. Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):146-152. DOI 10.18699/VJGB-22-18

Введение

Дыня (*Cucumis melo* L.) – важная с экономической точки зрения сельскохозяйственная культура (Sebastian et al., 2010), которая по состоянию на 2019 г. в мире занимала площадь более 1 млн га (FAOSTAT)¹. В настоящее время в производстве дыни распространены F₁ гибриды, отличающиеся выровненностью, более высокой урожайностью и обеспечивающие биологическую защиту авторских прав оригинаторов.

Удвоенные гаплоиды являются ценным материалом для генетических исследований и селекции, особенно при создании F₁ гибридов сельскохозяйственных культур (Шмыкова и др., 2015б; Abdollahi et al., 2016). На сегодняшний день технологии получения удвоенных гаплоидов разработаны более чем для 250 видов (Maluszynski et al., 2003), для многих из них этот метод используют с целью массового производства гомозиготных растений (Ferrie, Caswell, 2011).

Известны публикации, в которых описано успешное получение удвоенных гаплоидов дыни путем опыления облученной пылью (Sauton, 1988; Hooghorst et al., 2020) либо методом отдаленной гибридизации с последующим доразвиванием зародышей *in vitro* (Lotfi et al., 2003). Авторы других работ культивировали пыльники (Abdollahi et al., 2016), неоплодотворенные семяпочки (Шмыкова и др., 2015а) и изолированные микроспоры (Zhan et al., 2009; Chen et al., 2017) растений семейства Тыквенные.

Культура изолированных микроспор отличается высоким выходом регенерантов по сравнению с культурой неоплодотворенных семяпочек и культурой пыльников и получила широкое применение, особенно у Капустных (Дьячук и др., 2019; Козарь и др., 2020). К тому же культура микроспор подразумевает отсутствие на питательной среде соматических клеток донорного растения и, таким образом, позволяет исключить сомнения о происхождении растений-регенерантов. Однако данная технология не реализована для производства удвоенных гаплоидов растений семейства Тыквенные.

На эффективность технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор влияет множество факторов: стадия развития микроспор, генотип, состав питательной среды, плотность клеточной суспензии, особенности технологии введения в культуру, температурное воздействие и другие условия культивирования (Dunwell, 2010; Niazian, Shariatpanahi, 2020). Стадия развития микроспор является первым фактором, который необходимо учитывать при разработке технологии культивирования микроспор любой новой культуры. В зависимости от вида оптимальными могут быть разные

¹ <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (дата обращения 01.06.2021).

стадии развития микроспор – от тетрад до двухклеточной пыльцы (Touraev et al., 1996; Germanà, 2011). Так, для производства удвоенных гаплоидов моркови рекомендуют культивировать тетрады и ранние микроспоры (Goreska et al., 2010). Для индукции каллуса в культуре пыльников момордики наиболее эффективны средние и поздние микроспоры (Нгуен и др., 2019). У растений семейства Капустные высокой способностью к эмбриогенезу обладают поздние вакуолизованные микроспоры и двухклеточная пыльца (Telmer et al., 1992; Binarova et al., 1997; Custers et al., 2001; Babbar et al., 2004; Winarto, Teixeira da Silva, 2011).

Прямой отбор отдельных микроспор соответствующей стадии развития для культивирования *in vitro* представляется невыполнимой задачей. Как правило, отбор растительного материала выполняют по косвенным признакам с помощью морфологических характеристик бутонов или пыльников (Takahata, Keller, 1991; Parra-Vega et al., 2013). У рапса, сои, редиса, томата, момордики в качестве маркеров стадии развития микроспор используют длину и ширину цветочных бутонов (Weber et al., 2005; Han et al., 2014; Sumarmi et al., 2014; Adhikari, Kang, 2017; Нгуен и др., 2019). В нескольких исследованиях демонстрируется пригодность таких параметров, как размер и цвет чашечки, соотношение длин чашечки и венчика, размер пыльника (De Moraes et al., 2008; Parra-Vega et al., 2013; Zhang et al., 2013). Эти показатели видоспецифичны, поэтому для отбора растительного материала дыни необходимо разработать свой протокол.

В данной работе представлено изучение взаимосвязи между морфологическими характеристиками бутонов и пыльников и стадией развития микроспор дыни.

Материалы и методы

Отбор бутонов проводили с растений гибрида дыни F₁ Kim Hong Ngoc, произведенного компанией Chia Tai Seed, Таиланд. Бутоны длиной от 3.6 до 15.9 мм с интервалом 1 мм отбирали в 5:30–6:30 ч утра, перевозили на льду и хранили в течение 24 ч при 4 °С. Учитывали не менее десяти бутонов каждого интервала длины.

Характеристики бутонов и пыльников фиксировали с помощью стереомикроскопа Zeiss Stemi 2000-C (Suzhou Co., Ltd). Микроспоры каждого бутона выделяли из пыльника и помещали на предметное стекло в каплю смеси глицерина и дистиллированной воды в соотношении 1:1, затем в полученную суспензию добавляли 15 мкл 2 % раствора ацетокармина, накрывали покровным стеклом и микроскопировали. Для флуоресцентного окрашивания микроспоры извлекали из пыльников, трижды промывали буферным раствором PBS (8.00 г/л NaCl, 0.20 г/л KCl,

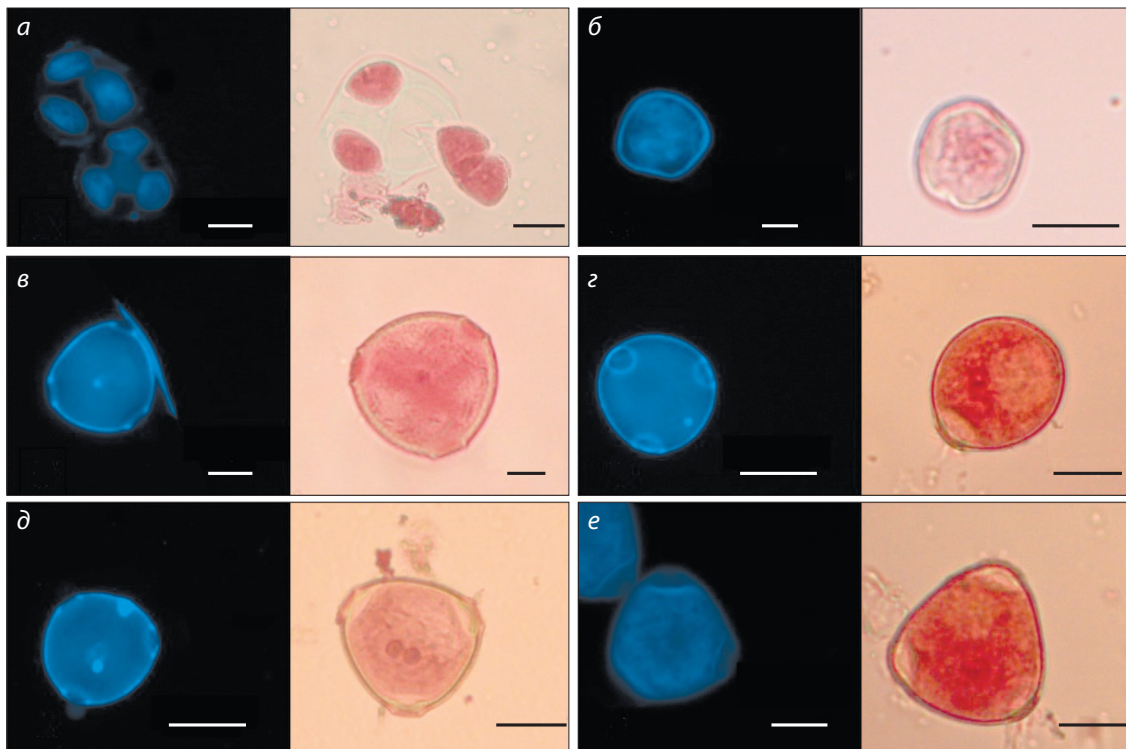


Рис. 1. Стадии развития микроспор *Cucumis melo* L., окрашенных DAPI и ацетокармином: а – тетрады; б – ранние микроспоры; в – средние микроспоры; з – поздние микроспоры; д – ранняя двухклеточная пыльца; е – поздняя двухклеточная пыльца.

Бар 20 мкм.

1.44 г/л Na_2HPO_4 , 0.24 г/л KH_2PO_4 растворяли в 3/4 требуемого объема дистиллированной воды, с помощью HCl и KOH доводили pH до значения 7.4, доливали дистиллированную воду до конечного объема), добавляли DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) и наблюдали под оптическим флуоресцентным микроскопом Zeiss Axio Lab1 (Suzhou Co., Ltd).

Стадии развития микроспор определяли по размеру и форме клеток, количеству ядер и их расположению (Vergne et al., 1987; Maluszynski et al., 2003; Blackmore et al., 2007; Zhang et al., 2013). В каждом препарате наблюдали стадии развития 100 микроспор. Отмечали наличие тетрад, ранних, средних и поздних микроспор, двухклеточной пыльцы. Процентную долю каждой стадии развития в конкретном препарате рассчитывали как отношение количества микроспор определенной стадии к общему количеству наблюдаемых микроспор, умноженное на 100 %.

Достоверность различий проверяли с помощью дисперсионного анализа ANOVA и теста Тьюки с $\alpha = 0.05$. Связь между параметрами измерения и стадиями развития микроспоры определяли с помощью коэффициента линейной регрессии и коэффициента корреляции. Статистическое описание и обработку данных проводили в программе R.

Результаты и обсуждение

При цитологическом анализе бутонов дыни наблюдали шесть стадий развития микроспор, включая тетрады, ранние, средние, поздние вакуолизованные микроспоры, раннюю двухклеточную и позднюю двухклеточную пыльцу (рис. 1).

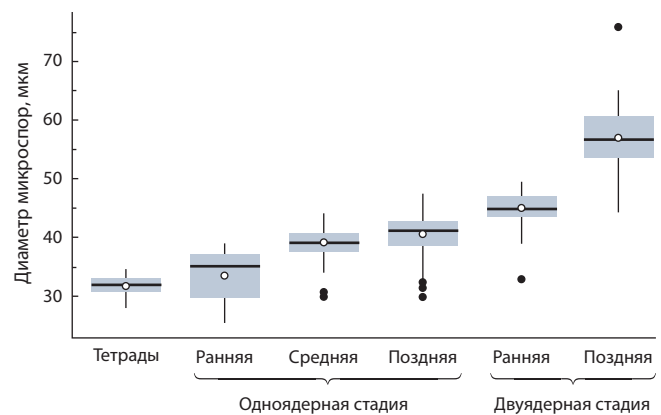


Рис. 2. Изменение диаметра клеток мужского гаметофита в зависимости от стадии их развития.

Диаметр микроспор увеличивался по мере их развития и достигал максимального значения у поздней двухклеточной пыльцы (рис. 2). Отмечено, что каждая стадия характеризовалась определенной формой и размером клеток. Ранние микроспоры, образовавшиеся после распада тетрад, имели диаметр 33.41 ± 4.34 мкм, отличались нестабильной округлой формой, тонкими клеточными стенками и крупными ядрами. Средние микроспоры были округлой формы, с центральным расположением ядра, их диаметр 39.06 ± 2.33 мкм. Поздние микроспоры имели округлую форму, диаметр 40.45 ± 3.26 мкм и характеризовались хорошо развитой трехлопастной стенкой экзины и

Соответствие размеров бутончика и длины пыльника стадиям развития мужского гаметофита

№ п/п	Длина бутончиков, мм	Диаметр бутончиков, мм	Длина пыльников, мм	Доля микроспор разных стадий развития, %					
				Тетрады	Ранняя	Средняя	Поздняя	Ранняя двухклеточная	Поздняя двухклеточная
1	<4	1.51 ± 0.02 ^{a*}	1.63 ± 0.19 ^a	48.00 ± 5.66	22.00 ± 8.49	6.00 ± 2.83	22.00 ± 2.83	2.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00
2	4.0–4.9	2.30 ± 0.02 ^b	1.83 ± 0.16 ^a	0	30.00 ± 14.14	46.00 ± 25.46	22.00 ± 14.14	2.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00
3	5.0–5.9	2.32 ± 0.00 ^b	2.50 ± 0.51 ^b	0	2.00 ± 2.83	50.00 ± 14.14	48.00 ± 11.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	6.0–8.9	2.96 ± 0.37 ^b	2.89 ± 0.23 ^c	0	0.40 ± 1.26	40.40 ± 24.91	56.80 ± 23.61	2.40 ± 6.31	0.00 ± 0.00
5	9.0–11.9	3.97 ± 0.34 ^c	2.96 ± 0.20 ^c	0	0	0.67 ± 1.63	14.67 ± 34.00	51.33 ± 50.62	33.33 ± 50.13
6	>12	5.16 ± 0.27 ^d	3.12 ± 0.22 ^c	0	0	0	0	0	100.00

* Значения, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются при уровне значимости $p = 0.05$.

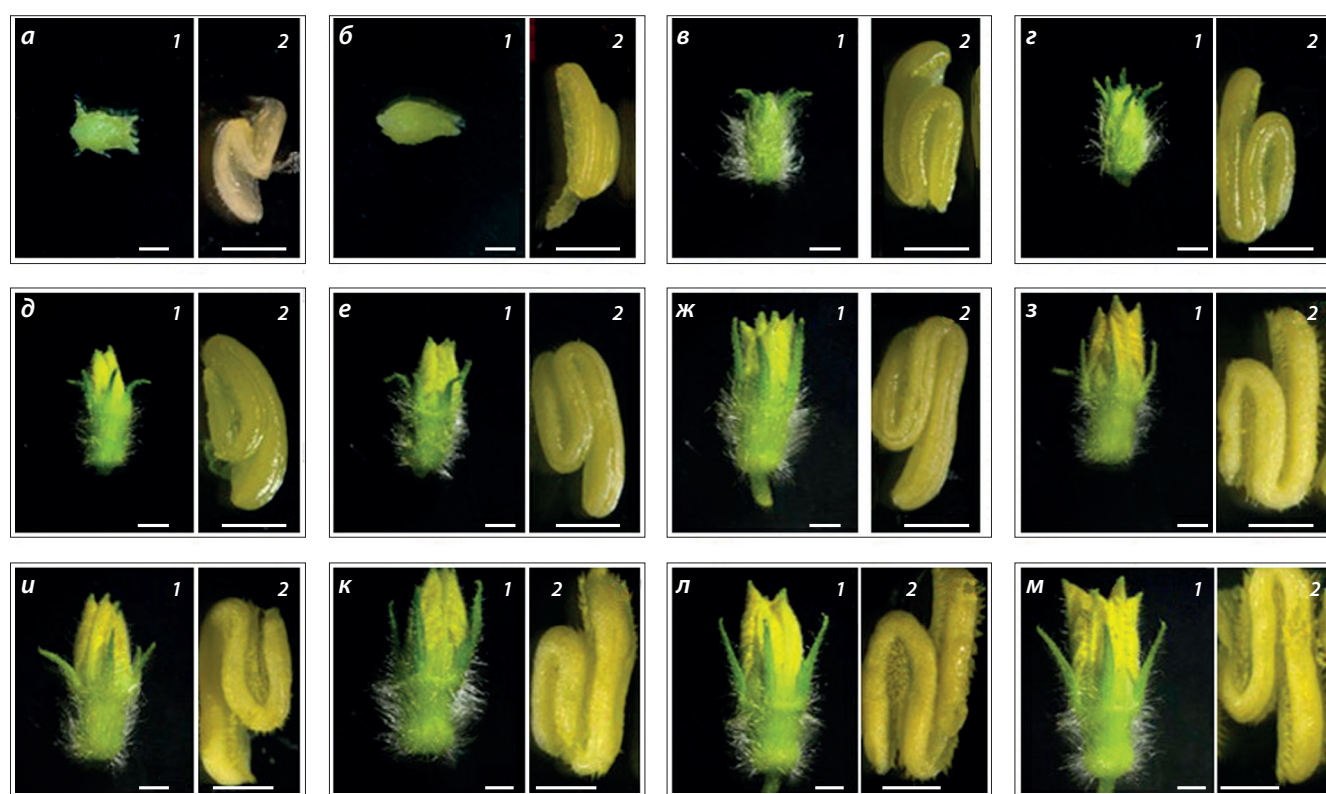


Рис. 3. Изменение морфологических характеристик бутончиков (1, бар 20 мкм) и пыльников (2, бар 10 мкм) дыни в зависимости от длины бутончиков: а – 3.6–4.0 мм; б – 4.0–4.9 мм; в – 5.0–5.9 мм; г – 6.0–6.9 мм; д – 7.0–7.9 мм; е – 8.0–8.9 мм; ж – 9.0–9.9 мм; з – 10.0–10.9 мм; и – 11.0–11.9 мм; к – 12.0–12.9 мм; л – 13.0–13.9 мм; м – более 14.0 мм.

смещенным от центра ядром, прижатым к стенке большой вакуолю. В клетках ранней двухклеточной пыльцы с диаметром клеток 44.94 ± 2.65 мкм при микроскопировании были четко видны два ядра: вегетативное (более крупное) и генеративное (более ярко окрашенное). Диаметр поздней двухклеточной пыльцы составлял 56.93 ± 4.81 мкм, форма клеток варьировала от округлых до овальных, причем в одном пыльнике можно было наблюдать пыльцевые зерна разной формы. Цитоплазма в пыльце становилась плотной и непрозрачной, ядро при этом было труднее различить.

В результате анализа соответствия морфологических признаков стадиям развития микроспор и существующих

изменений бутончики разделили на шесть групп. Каждая группа могла содержать микроспоры разных стадий развития, но при этом одна из них преобладала (см. таблицу). Отмечено также, что в одном пыльнике одновременно могли находиться микроспоры разных стадий развития. Это соответствует наблюдениям исследователей, изучавших данный вопрос на других культурах.

Тетрады были обнаружены в зеленых опушенных, полностью покрытых чашелистиками бутончиках овальной формы длиной менее 4 мм, диаметром до 1.85 мм (рис. 3, а). Пыльники при этом имели светло-бежевую окраску и длину 1.6–1.63 мм.

Ранние микроспоры были найдены в бутонах длиной от 3.8 до 7.0 мм, наибольшая их доля ($30 \pm 14.14\%$) обнаружена в бутонах длиной 4.0–4.9 мм. При этом пыльники становились зеленовато-желтыми, их длина составляла 1.63–2.74 мм (см. рис. 3, б). В целом количество микроспор ранней стадии было небольшим по сравнению с другими стадиями.

Микроспоры средней стадии развития содержались в бутонах длиной от 4.0 до 10.9 мм. Длина пыльников при этом достигала 2.15 ± 0.05 мм, их цвет был желтоватым с глянцевой поверхностью (см. рис. 3, в). Максимальное количество микроспор средней стадии ($50 \pm 14.14\%$) выявлено в бутонах длиной 5.0–5.9 мм, имевших четкое морфологическое отличие от более молодых бутонов – приоткрытые чашелистики, позволяющие видеть кончик венчика.

Микроспоры поздней вакуолизированной стадии преобладали в бутонах длиной 6.0–8.9 мм. На этом этапе бутоны продолжали увеличиваться в размерах, венчик удлинялся за пределом чашелистиков, однако морфология пыльников не изменялась (см. рис. 3, г–е). Статистически достоверного увеличения длины пыльников тоже не происходило.

Ранняя двухклеточная пыльца преобладала в бутонах длиной 9.0–12.0 мм (см. рис. 3, ж–и). При этом длина пыльников не изменилась по сравнению с предыдущей стадией. На поверхности пыльников можно было увидеть зрелую двухклеточную пыльцу.

В бутонах длиной более 12.0 мм была обнаружена только двухклеточная пыльца. Переход от поздней стадии к зрелой пыльце характеризовался небольшим увеличением размера бутона, лепестки начинали открываться (см. рис. 3, к–л). Пыльники увеличивались и вскрывались, так что на их поверхности можно было увидеть множество пыльцевых зерен.

В результате статистического анализа длины пыльника вычислен коэффициент линейной регрессии $R^2 = 0.52$, т. е. длину пыльников не следует использовать в качестве параметра для прогнозирования стадий развития микроспор. Это соответствует данным, полученным на некоторых других культурах, например томата и баклажана (Segui-Simarro, Nuez, 2005; Salas et al., 2012). Известна публикация, в которой похожий коэффициент ($R^2 = 0.59$) характеризовал связь между длиной пыльника и стадиями развития микроспор томата (Adhikari, Kang, 2017).

Часто исследователи рекомендуют измерять длину бутонов при отборе подходящего растительного материала для культивирования изолированных микроспор; это удобный и надежный показатель для многих культур. В качестве способа отбора бутонов советуют использовать также диаметр бутонов. Так, в 2019 г. наилучшие результаты эмбриогенеза в культуре микроспор люцерны были получены при культивировании поздних микроспор из бутонов длиной 6.02–6.20 мм и диаметром 1.50–1.72 мм (Yi et al., 2019). В 2017 г. была представлена корреляция между размером бутонов (длиной и диаметром), длиной пыльника и стадиями развития микроспор томата (Adhikari, Kang, 2017).

В нашем исследовании линейный регрессионный анализ показал четкую линейную зависимость ($p < 0.05$) между характеристиками бутонов и стадиями развития

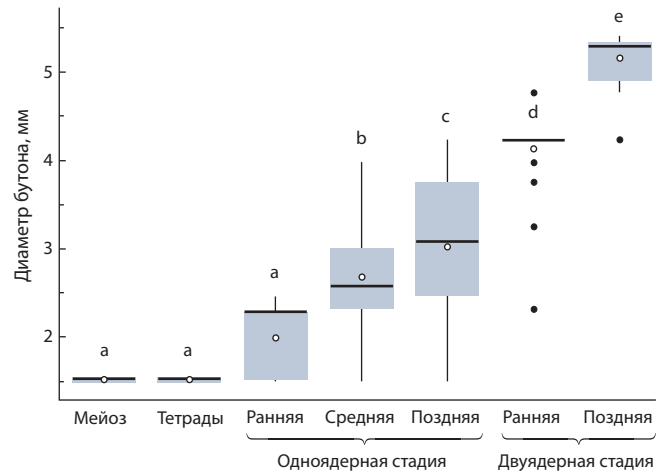


Рис. 4. Зависимость между диаметром бутонов и стадиями развития мужского гаметофита дыни.

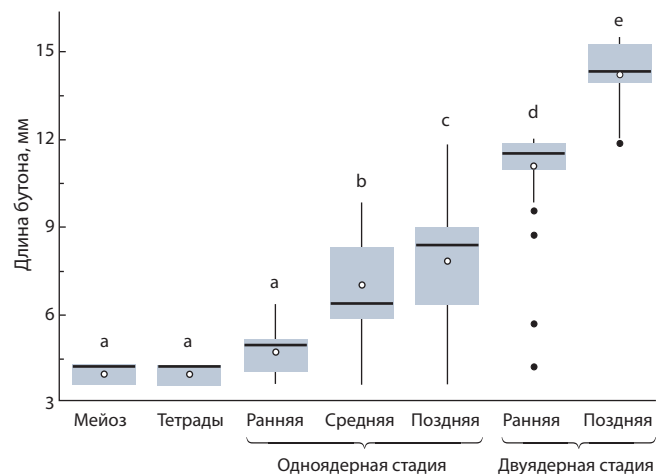


Рис. 5. Зависимость между длиной бутонов и стадиями развития мужского гаметофита дыни.

Буквы а–е соответствуют разным группам бутонов.

микроспор, коэффициенты линейной регрессии (R^2) варьировали от 0.767 до 0.783. Самая сильная корреляция выявлена для диаметра бутонов: $r = 0.885$, $R^2 = 0.783$ (рис. 4), затем идет длина бутонов ($r = 0.880$, $R^2 = 0.775$) (рис. 5) и, наконец, длина венчика, которая является менее надежным признаком ($r = 0.876$, $R^2 = 0.763$).

Заключение

Корреляция между морфологическими характеристиками бутонов и пыльников и стадиями развития микроспор дыни (*Cucumis melo* L.) позволяет отбирать подходящий материал для культивирования изолированных микроспор *in vitro*. Для этой цели лучше всего подходят три показателя: диаметр бутона, длина бутона, длина видимой части венчика. Диаметр и длина бутона обеспечивают более сильную корреляцию, и их легче использовать.

Результат исследования может быть полезен для дальнейшей разработки технологии получения удвоенных гаплоидов дыни в культуре изолированных микроспор.

Список литературы / References

- Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Кибкало И.А., Поминов А.В. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466.
- [Djatchouk T.I., Khomyakova O.V., Akinina V.N., Kibkalo I.A., Pominov A.V. Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466. (in Russian)]
- Козарь Е.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В. Факторы, влияющие на получение ДН-растений в культуре микроспор *in vitro* редиса европейского. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592.
- [Kozar E.V., Domblides E.A., Soldatenko A.V. Factors affecting DH plants *in vitro* production from microspores of European radish. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):31-39. DOI 10.18699/VJ20.592.]
- Нгуен М.Л., Та Ч.Х.Т., Хуен Т.Н.Б.Т., Воронина А.В. Каллусообразование в культуре пыльников момордики (*Momordica charantia* L.) в зависимости от стадии развития микроспор и состава питательной среды. *С.-х. биология*. 2019;54(1):140-148. DOI 10.15389/agrobiol.2019.1.140rus.
- [Nguyen M.L., Ta T.H.T., Huyen T.N.B.T., Voronina A.V. Anther-derived callus formation in bitter melon (*Momordica charantia* L.) as influenced by microspore development stage and medium composition. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(1):140-148. DOI 10.15389/agrobiol.2019.1.140eng.]
- Шмыкова Н.А., Химич Г.А., Коротцева И.Б., Домблидес Е.А. Перспективы получения удвоенных гаплоидов растений семейства Cucurbitaceae. *Овощи России*. 2015a;3-4:28-31. DOI 10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31.
- [Shmykova N.A., Khimich G.A., Korotseva I.B., Domblides E.A. Prospective of development of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2015a; 3-4:28-31. DOI 10.18619/2072-9146-2015-3-4-28-31. (in Russian)]
- Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015b;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014.
- [Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015b;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014. (in Russian)]
- Abdollahi M.R., Najafi S., Sarikhani H., Moosavi S.S. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turk. J. Biol.* 2016;40:571-579. DOI 10.3906/biy-1502-55.
- Adhikari P.B., Kang W.H. Association of floral bud and anther size with microspore developmental stage in Campari tomato. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 2017;35(5):608-617. DOI 10.12972/kjst.20170065.
- Babbar S.B., Agarwal P.K., Sahay S., Bhojwani S.S. Isolated microspore culture of *Brassica*: an experimental tool for developmental. *Indian J. Biotechnol.* 2004;3:185-202.
- Binarova P., Hause G., Cenklova V., Cordewener J.H.G., Van Lookeren Campagne M.M. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sex. Plant Reprod.* 1997;10:200-208. DOI 10.1007/s004970050088.
- Blackmore S., Wortley A.H., Skvarla J.J., Rowley J.R. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* 2007;174(3):483-498. DOI 10.1111/j.1469-8137.2007.02060.x.
- Chen J., Vanek E., Pieper M. Method for Producing Haploid, Dihaploid and Doubled Haploid Plants by Isolated Microspore Culture. Patent Int. Publ. No. WO 2017/017108 A1. Publ. date Feb. 2, 2017.
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Fiers M.A., Maasen B.T.H., van Lookeren Campagne M.M., Liu C.M. Androgenesis in *Brassica*: a model system to study the initiation of plant embryogenesis. In: Bhojwani S.S., Soh W.T. (Eds.) *Current Trends in The Embryology of Angiosperms*. Dordrecht: Springer, 2001;451-469. DOI 10.1007/978-94-017-1203-3_18.
- De Moraes A.P., Bered F., De Carvalho F.I.F., Kaltchuk-Santos E. Morphological markers for microspore developmental stage in maize. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008;51(5):911-916. DOI 10.1590/S1516-89132008000500006.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8:377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:301-309. DOI 10.1007/s11240-010-9800-y.
- Germanà M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:283-300. DOI 10.1007/s11240-010-9852-z.
- Gorecka K., Kowalska U., Krzyżanowska D., Kiszczak W. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. *J. Appl. Genet.* 2010;51(2):141-147. DOI 10.1007/BF03195722.
- Han N., Kim S.U., Park H.Y., Na H. Microspore-derived embryo formation and morphological changes during the isolated microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.). *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 2014;32(3):382-389. DOI 10.7235/hort.2014.13170.
- Hooghvorst I., Torrico O., Hooghvorst S., Nogués S. *In situ* parthenogenetic doubled haploid production in melon “Piel de Sapo” for breeding purposes. *Front. Plant Sci.* 2020;11:378. DOI 10.3389/fpls.2020.00378.
- Lotfi M., Alan A.R., Henning M.J., Jahn M.M., Earle E.D. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 2003;21(11):1121-1128. DOI 10.1007/s00299-003-0636-3.
- Maluszynski M., Kasha K., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A manual*. Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2003.
- Niazian M., Shariatpanahi M.E. *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica.* 2020;216:69. DOI 10.1007/s10681-020-02609-7.
- Parra-Vega V., Renau-Morata B., Sifres A., Seguí-Simarro J.M. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013; 112(3):353-360. DOI 10.1007/s11240-012-0242-6.
- Salas P., Rivas-Sendra A., Prohens J., Seguí-Simarro J.M. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica.* 2012;184:235-250. DOI 10.1007/s10681-011-0569-9.
- Sauton A. Doubled haploid production in melon. In: *Proceedings of the EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Avignon-Montfavet, France, 1988;06(01-02):119-128.
- Sebastian P., Schaefer H., Telford I.R.H., Renner S.S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(32):14269-14273. DOI 10.1073/pnas.1005338107.
- Seguí-Simarro J.M., Nuez F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. *Acta Physiol. Plant.* 2005;27:675-685. DOI 10.1007/s11738-005-0071-x.
- Sumarmi S., Daryono B.S., Rachmawati D., Indrianto A. Determination of soybean (*Glycine max* L. [Merrill]) microspores development stage based on the length of flower buds. *J. Biol. Res.* 2014;20:6-11. DOI 10.23869/bphjbr.20.1.20142.
- Takahata Y., Keller W.A. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.* 1991;74:235-242. DOI 10.1016/0168-9452(91)90051-9.

- Telmer C.A., Simmonds D., Newcomb W. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 1992;84:417-424. DOI 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04685.x.
- Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta.* 1996;200:144-152.
- Vergne P., Delvallee I., Dumas C. Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technol.* 1987;62:299-304. DOI 10.3109/10520298709108014.
- Weber S., Unker W., Friedt W. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment *in vitro* and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding.* 2005;124:511-513. DOI 10.1111/j.1439-0523.2005.01114.x.
- Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;107:305-315. DOI 10.1007/s112400110081z.
- Yi D., Sun J., Su Y., Tong Z., Zhang T., Wang Z. Doubled haploid production in alfalfa (*Medicago sativa* L.) through isolated microspore culture. *Sci. Rep.* 2019;9:9458. DOI 10.1038/s41598-019-45946-x.
- Zhan Y., Chen J.F., Malik A.A. Embryoid induction and plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through microspore culture. *Acta Hortic. Sin.* 2009;36(2):221-226.
- Zhang C., Tsukuni T., Ikeda M., Sato M., Okada H., Ohashi Y., Matsuno H., Yamamoto T., Wada M., Yoshikawa N., Matsumoto S., Li J., Mimida N., Watanabe M., Suzuki A., Komori S. Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in apple (*Malus domestica* Borkh.) anther culture. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 2013;82(2):114-124. DOI 10.2503/jjshs1.82.114.

ORCID ID

M.L. Nguyen orcid.org/0000-0002-0652-891X
T.N.B.T. Huyen orcid.org/0000-0003-0467-9391
D.M. Trinh orcid.org/0000-0002-3662-2392
A.V. Voronina orcid.org/0000-0003-0249-246X

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.07.2021. После доработки 06.09.2021. Принята к публикации 06.09.2021.

Developmental and hormonal regulation of *Arabidopsis thaliana* ornithine-delta-aminotransferase

A.A. Egorova^{1, 2}✉, S.V. Gerasimova^{1, 2}, A.V. Kochetov^{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

✉ egorova@bionet.nsc.ru

Abstract. Ornithine aminotransferase (OAT) catalyzes transfer of the delta-amino group from L-ornithine to oxo-glutarate. In plants, this reaction biochemically connects urea cycle, proline cycle, and polyamine biosynthesis pathway. OAT activity is shown to be associated with biotic and abiotic stress responses and nitrogen metabolism, but its physiological role is still unclear. In our study, we decided to investigate transcriptional regulation of the *OAT* gene in *Arabidopsis thaliana* under normal conditions and in response to various growth regulators. In the present work, the reporter gene construct containing the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene (*gus*) under control of the *A. thaliana* *OAT* gene promoter was introduced into the genome of *A. thaliana* ecotype Columbia plants using the floral dip method; GUS activity was assayed in different experimental conditions including hormone treatment, low and high nitrogen and salinity. The GUS activity was analyzed histochemically. Plants were incubated with staining solution containing X-Gluc. We show that under standard growth conditions, the promoter is active during germination and in developing floral organs. *OAT* promoter activity specifically activates in response to different forms of auxin (IAA, NAA, and 2,4D), cytokinin (6-BAP), ethylene precursor (ACC), high nitrogen and salinity. Analysis of the *OAT* expression by qRT-PCR confirmed the pattern observed using the GUS reporter system. The *OAT* gene showed a significantly elevated expression in four-day-old seedlings and in plant roots in response to auxins and cytokinins. The analysis of the *OAT* promoter structure reveals cis-acting regulatory DNA elements associated with auxin regulation and abiotic stresses. The results of the study indicate that the *OAT* gene is involved in developmental processes and is regulated by auxin and cytokinins. Key words: ornithine aminotransferase; *Arabidopsis thaliana*; auxin; nitrogen; development.

For citation: Egorova A.A., Gerasimova S.V., Kochetov A.V. Developmental and hormonal regulation of *Arabidopsis thaliana* ornithine-delta-aminotransferase. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):153-158. DOI 10.18699/VJGB-22-19

Регуляция дельта-орнитинаминотрансферазы *Arabidopsis thaliana* в развитии и в ответ на гормоны

A.A. Egorova^{1, 2}✉, С.В. Герасимова^{1, 2}, А.В. Кочетов^{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

✉ egorova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Фермент орнитинаминотрансфераза (OAT) катализирует перенос дельта-аминогруппы от L-орнитина на альфа-кетоглутарат. В растениях эта реакция связывает цикл мочевины, пролина и путь биосинтеза пролина. В литературе активность OAT связывают с ответом на биотические и абиотические стрессы, метаболизмом азота, но физиологическая роль этого фермента до сих пор остается неясной. В нашем исследовании мы изучали транскрипционную регуляцию гена OAT в *Arabidopsis thaliana* в нормальных условиях и в ответ на различные ростовые регуляторы. Репортерная конструкция, содержащая ген β -глюкуронидазы (*gus*) *Escherichia coli* под контролем промотора гена OAT из *A. thaliana* была интродуцирована в геном растений *A. thaliana*. Активность GUS оценивалась в различных экспериментальных условиях, включающих воздействие гормонов, низких и высоких концентраций азота, солевой стресс. Для выявления активности GUS мы использовали гистохимический метод, растения обрабатывали раствором, содержащим X-Gluc. В нормальных условиях промотор был активен при прорастании семени и в развивающихся пестиках и пыльниках. Промотор гена OAT специфично активируется в ответ на различные формы ауксина (IAA, NAA, 2,4D), цитокинина (6-BAP), предшественника этилена (ACC), высокие концентрации азота и NaCl. Результаты анализа экспрессии гена OAT соответствуют наблюдаемому паттерну активности промотора, полученному с использованием репортерной системы GUS. Экспрессия гена OAT значительно повышалась в четырехдневных проростках и в ответ на ауксины и цитокинины. При анализе структуры промотора гена OAT обнаружены цис-элементы, связанные с ответами на ауксин и абиотические стрессы. Наши результаты позволяют сделать вывод о связи гена OAT с процессами развития растений и о его регуляции ауксинами и цитокининами.

Ключевые слова: орнитинаминотрансфераза; *Arabidopsis thaliana*; ауксин; азот; развитие.

Introduction

The ornithine- δ -aminotransferase (OAT) is a mitochondrial pyridoxal-5-phosphate (PLP)-dependent enzyme that transfers an amino group from ornithine to oxo-glutarate with formation of glutamate-1-semialdehyde (GSA) and glutamate (Gerasimova et al., 2011b). Although the biochemical function of OAT is known, its biological role in plants is not fully understood. On the one hand, OAT is involved in metabolism of ornithine, which takes part in numerous biochemical processes in plants, such as arginine metabolism, synthesis of polyamines and alkaloids (Funck et al., 2008; Majumdar et al., 2015). On the other hand, one of the products of the reaction mediated by OAT, namely GSA, is involved in proline production. It readily interconverts into the cyclic 1-pyrroline-5-carboxylate (P5C), an intermediate in the proline biosynthesis, in a non-enzymatic fashion (Ginguay et al., 2017). Proline is involved in plant stress response (Kochetov et al., 2004; Hayat et al., 2012) and development (Kavi Kishor et al., 2015). It has already been shown in various experiments on several plant species that overexpression of the *OAT* gene is associated with increased proline content and resistance to abiotic stresses (Roosens et al., 1998, 2002; Wu et al., 2003). It is tempting to assume that OAT might link biological processes related to proline, ornithine and P5C metabolism, such as nitrogen recycling, stress response, secondary metabolism, growth and development.

We have previously shown that *OAT* overexpression in tobacco increases salt stress resistance. Interestingly, the level of proline accumulation in *OAT* overexpressing lines did not differ from that of WT plants under both normal and stress conditions, suggesting that OAT might contribute to stress resistance through processes not related to proline synthesis (Gerasimova et al., 2010). On a model of transgenic tobacco plants expressing GUS under the control of putative *Arabidopsis thaliana* *OAT* promoter we showed that the promoter activity is associated with meristems and zones of active growth (Gerasimova et al., 2011a). This observation suggests that the *OAT* gene might be involved in developmental processes. The present study aims to investigate transcriptional regulation of the *OAT* gene in *A. thaliana* under normal conditions and in response to various growth regulators.

Materials and methods

Development of transgenic *Arabidopsis* harboring AtOAT promoter construct. The 1844 bp region upstream of the *OAT* gene translation start (TAIR, AT5G46180) was cloned in the promoterless vector pBI101 with the formation of the P1844 construct (Gerasimova et al., 2011a). The resulting vector contains the expression cassette harboring the β -glucuronidase (*gus*) reporter gene under the control of putative *A. thaliana* *OAT* promoter. *A. thaliana* plants ecotype Columbia were grown at 22 °C in a long-day growth conditions (16 h of light and 8 h of dark). Construct P1844 was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL0, which was used to transform *A. thaliana* by floral dip method (Clough, Bent, 1998). T1 transformants were screened on 1/2 MS agar plates containing 50 mg/L kanamycin, transferred to pots and grown to maturity until the T2 generation seeds were harvested. T2 seeds were germinated on 1/2 MS agar plates containing 50 mg/L kanamycin and resistant plants were tested for the presence of GUS activity by histochemical assay. Six indepen-

dent transgenic T2 lines showing the presence of GUS activity in seedlings were selected for further experiments. Plants from the selected lines were grown to maturity and T3 generation seeds were harvested. Thus, six independent T3 transgenic lines have been obtained.

GUS staining. The histochemical staining method (Jefferson et al., 1987) was used to visualize GUS (*Escherichia coli* β -glucuronidase) activity in seedlings grown on agar plates and plant parts grown in soil (5-week-old plants). Whole seedlings and different plant parts were incubated in X-Gluc solution (2 mM X-Gluc, 50 mM NaPO₄, pH 7, 0.5 % (v/v) Triton-X) for 24 h at 37 °C. Chlorophyll was removed by repeated washing in 70 % (v/v) ethanol. GUS activity was observed using a ZEISS Stemi 2000-C microscope coupled with an AxioCam HRc camera.

Experimental treatments. Surface-sterilized seeds of six independent transgenic *A. thaliana* lines (T3) were germinated on MS plates supplemented with 1 % sucrose, 0.7 % agar. To detect promoter activity during germination, histochemical assay was performed for seedlings at 3rd, 5th, 6th and 14th day after sowing (DAS) on plates. For experimental treatments, one-week-old seedlings were transferred to the same medium supplemented with the following growth regulators (from Sigma-Aldrich): auxins (1 mg/L NAA, 2 mg/L IAA, 0.5 mg/L 2,4-D), cytokinins (1 mg/L 6-BAP, 100 μ M trans-zeatin, 10 μ M and 100 μ M kinetin), gibberellic acid (10 μ M GA3), 100 μ M abscisic acid, 1 mM methyl jasmonate, ethylene precursor (50 μ M ACC), high nitrogen (10 mM NH₄NO₃), high salinity (200 mM NaCl). For low nitrogen treatment, MS NH₄NO₃-free medium (Duchefa Biochemie) was used. GUS activity was assayed after 1, 4, 6 and 8 days of treatment. For cold and heat treatment, two-week-old transgenic plants were used. For cold treatment, plates with seedlings were incubated at +4 °C for 4 h, then for 2 h at 22 °C; for heat treatment, plates were incubated at +50 °C for 15 min, then 6 h at 22 °C.

Gene expression analysis (RNA isolation and qRT-PCR). Wild type Col-0 seed was surface sterilized with 12.5 % bleach (Aqualon) and 70 % ethanol and germinated on 1/2 MS medium (16-h daylight, 22 °C). To measure expression of the *OAT* gene during germination and early development, total RNA was isolated from whole seedlings at 4th, 7th and 14th DAS. For experimental treatments, one-week seedlings were transferred to 1/2 MS medium supplemented with different growth regulators (1 mg/L NAA, 2 mg/L IAA, 0.5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L 6-BAP, 50 μ M ACC), and control, to 1/2 MS medium. For each treatment, experiment was performed in three biological replicates. There were 30 seedlings per each biological replicate. Total RNA was isolated from roots of seedlings after 6 days of treatment with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). RNA was treated with DNase (QIAGEN RNase-Free DNase Set). The concentration of RNA was measured by NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). The quality of RNA was evaluated using Bioanalyzer 2100 (Agilent). First strand cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using BIORAD iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR. For qRT-PCR analysis, cDNA was diluted ten times. PCR was performed in a final volume of 15 μ L: 3 μ L of 5x Low Rox buffer (SibEnzyme), 0.15 μ L of each primer (10 μ M) and the taqman probe solution, 3 μ L of diluted

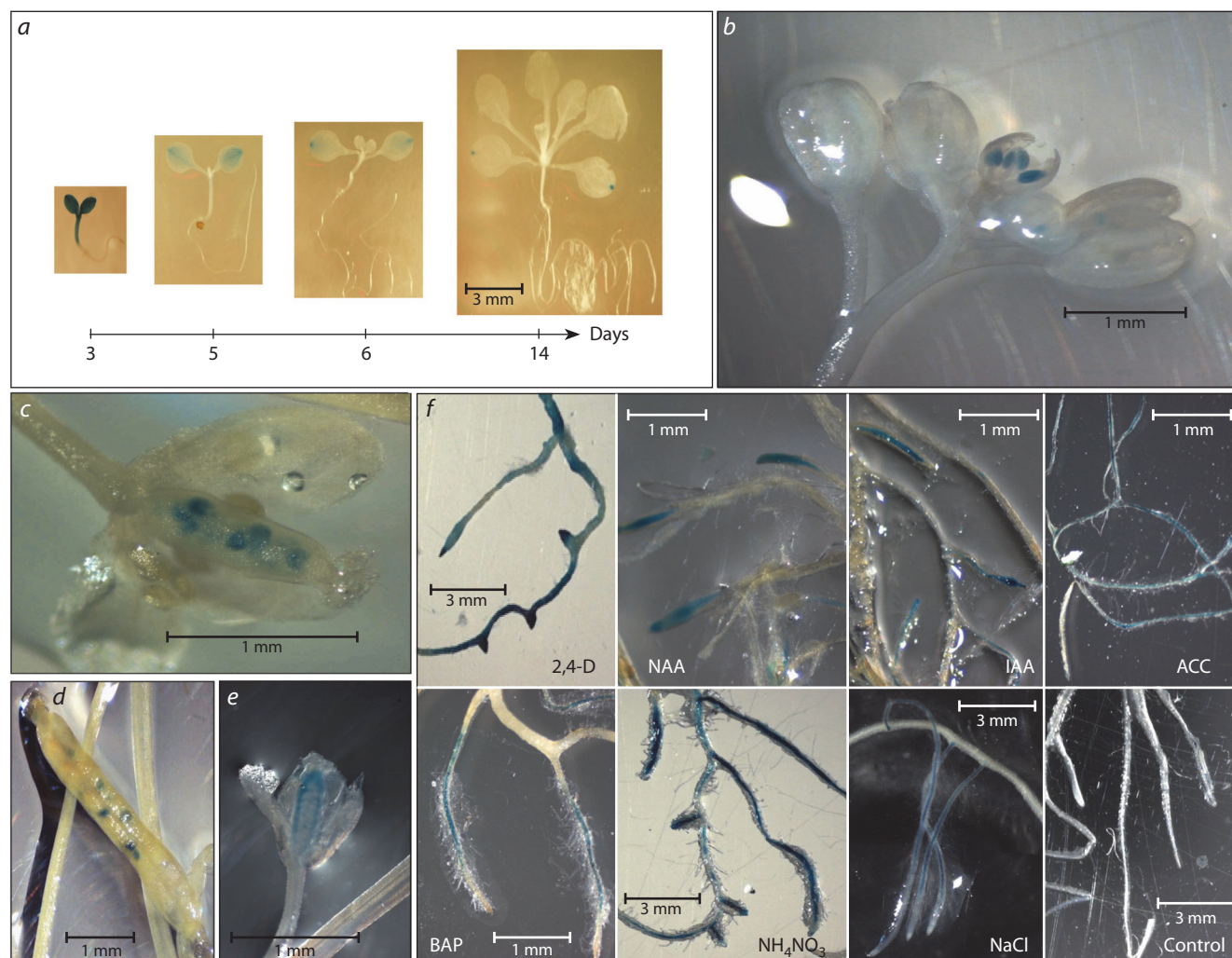


Fig. 1. Histochemical GUS analysis of transgenic *A. thaliana* lines:

a–e, tissue-specific GUS expression during plant development: *a*, different stages of seedling development; *b*, GUS expression in immature anthers; *c*, GUS expression in ovules; *d*, developing siliques with GUS expression in seeds; *e*, developing carpel; *f*, roots of plants treated with different inducers. Age of plants on pictures *b–e* – 1.5 months, on picture *f* – 13 days.

cDNA. The primers and probes were designed using IDT's PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/>). The comparative threshold cycle method was used to determine relative gene expression, with the expression of EF1- α and F-box (accession no. At1g13320 and At5g15710) serving as an internal control. The structures of primers and probes are given in Suppl. Table 1¹. The relative expression levels of *OAT* mRNA in all the treated samples were quantified using an Applied biosystems 7500 Real Time PCR System. Each reaction was performed in three technical replicates using the following program of the qRT-PCR; 95 °C for 10 min; 45 cycles of 95 °C for 15 s, 68 °C for 60 s. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. *p*-values < 0.05 were considered significant.

Web tools used for cis-acting regulatory DNA elements search and expression data analysis. Search of cis-acting regulatory elements was performed using the PLACE database (Higo et al., 1999). Gene expression data from different

microarray and RNA-seq experiments were extracted from Expression Atlas and Arabidopsis eFP Browser Web tools (Winter D. et al., 2007; Papatheodorou et al., 2018).

Results

Tissue-specific promoter activation at different developmental stages and under experimental treatments. Strong GUS staining was detected in hypocotyls and cotyledons of seedlings at 3–4th DAS. At later stages, the GUS activity was observed only in cotyledons. In 6- and 14- DAS seedlings, the GUS activity was found only in the distal parts of cotyledons (Fig. 1). During flower development, the GUS activity was observed in anthers, carpels and developing seeds of growing siliques (see Fig. 1, Suppl. Table 2).

To get a deeper insight into the transcriptional regulation of *OAT*, transgenic seedlings were subjected to experimental treatments including different concentrations of growth regulators and phytohormones auxins, cytokinins, gibberellin, ABA, methyl jasmonate, ethylene precursor (ACC), low and high nitrogen, high salinity, cold and heat stress (see Fig. 1, Suppl.

¹ Supplementary Tables 1–4 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx4.pdf>

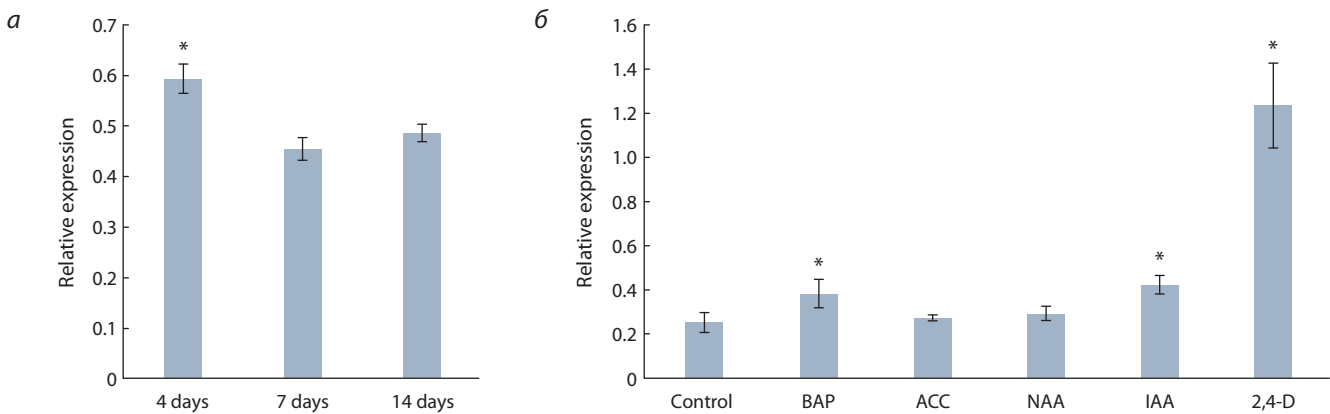


Fig. 2. The relative expression of *OAT*: *a*, in whole 4-, 7- and 14-days seedlings; *b*, in roots of seedlings, which were grown for 6 days on medium with inducers.

An asterisk indicates statistical significance in a one-way ANOVA ($p \leq 0.05$). Each bar represents the mean of three biological replicates \pm SE.

Table 2). We observed tissue-specific *OAT* promoter activity in response to different forms of auxin (IAA, NAA, and 2,4-D), cytokinin (6-BAP), and ACC. The strongest GUS activity was observed in response to 2,4-D in whole plant. Treatment with IAA and NAA caused GUS activation in root tips; treatment with 6-BAP – in the zone of root hairs. Treatment with ACC, salinity and nitrogen activated promoter along the whole root.

***OAT* gene expression analysis.** The qRT-PCR results showed that transcript levels of the *OAT* gene are significantly higher in four-day-old seedlings, than at later developmental stages (Fig. 2, *a*). In experimental treatments, the *OAT* gene showed significantly ($p \leq 0.05$) elevated expression in response to different forms of auxin (IAA and 2,4-D) and cytokinin (6-BAP) in comparison to control conditions. Treatment with synthetic auxin 2,4-D led to 3-fold increase in *OAT* expression level in roots (see Fig. 2, *b*).

Cis-acting regulatory DNA elements search and transcriptomic data analysis. Cis-acting regulatory DNA elements search revealed putative transcription factors binding sites, corresponding to different physiological processes, including hyperosmotic and hypoosmotic stress response, auxin response, axillary bud dormancy control, specific regulation in ontogenesis (Suppl. Table 3). Meta-analysis of microarray and RNA-seq data (Winter D. et al., 2007; Papatheodorou et al., 2018) shows that the *OAT* expression level changes in response to cold, drought, heat, wounding, osmotic and salt stress. Expression increases in response to pathogens *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora infestans* and some other infections. Altered *OAT* gene expression was observed in response to different hormones: it increased in response to 3 h of treatment with ABA, methyl jasmonate, and decreased in response to 3 h of treatment with brassinosteroids. The *OAT* gene demonstrates high expression in seeds, siliques, embryos, senescent leaves, floral organs in *A. thaliana* (Suppl. Table 4).

Discussion

For more than a decade *OAT* has been considered an enzyme involved in metabolic response to different stress conditions, such as osmotic stress, pathogen attack and ROS production, nitrogen starvation, etc. (Funck et al., 2008; Verslues, Sharma, 2010; Qamar et al., 2015). This enzyme belongs to the net-

work of nitrogen-metabolizing pathways in plants, affected by various environmental stimuli. It has been shown that plants accumulate proline during stress conditions (Verbruggen, Hermans, 2008). The results of Funck et al. (2008) and our previous study did not support the hypothesis of *OAT* contribution to proline accumulation. Instead, a specific role of the *OAT* gene in plant developmental and growth processes under both normal and stress conditions is hypothesized (Gerasimova et al., 2010, 2011a). This study provides a deeper insight into the role of the *OAT* gene in plant development.

The important metabolic role of the *OAT* was clearly shown in an experiment where *OAT*-deficient plants failed to develop with arginine or ornithine as the sole nitrogen source (Funck et al., 2008). This result demonstrated that *OAT* is required for utilization of arginine and ornithine. The present study demonstrates high *OAT* promoter activity and elevated *OAT* transcript level during seed germination. These results are in agreement with available transcriptomic data (Winter D. et al., 2007). In arginine catabolism, *OAT* acts downstream of arginase (Funck et al., 2008). Arginine is regarded as a major nitrogen storage compound in seeds. Urease and arginase activities increase sharply during germination in *A. thaliana* (Zonia et al., 1995) and other plant species (Winter G. et al., 2015). Taken together, these data provide evidence for *OAT* involvement in nitrogen reorganization during seed germination together with other enzymes of arginine catabolism.

Our work also shows that the *OAT* gene promoter is active during inflorescence development. This observation is in accordance with recent findings showing that the *OAT* enzyme plays a role in flower development and seed setting in rice (Liu et al., 2018). It has been reported that rice plants with a mutated *OAT* gene (*OsOAT* mutants) have different abnormalities in inflorescence and seed development. The mutant phenotype of the *OsOAT* mutant could be rescued by application of urea (Liu et al., 2018). Authors assumed that *OAT* mediates arginase activity and plays a role in regulation of nitrogen reutilization, which is critical for developing tissues (Liu et al., 2018).

Taking into account the association between the *OAT* gene expression and proline accumulation (Roosens et al., 1998, 2002; Wu et al., 2003), it can be assumed that *OAT* enzyme

activity may also play a role in control of proline level during inflorescence development. It has been reported that some proline metabolic enzymes can regulate a number of developmental processes including flowering time (Mattioli et al., 2008), pollen development (Mattioli et al., 2012; Biancucci et al., 2015a) and root growth (Biancucci et al., 2015b). Proline is known to be accumulated in reproductive organs of many plant species (Kavi Kishor et al., 2015). Ornithine to proline conversion is mediated by the plant oncogene RolD (Trovato et al., 2001), the overexpression of which stimulates flowering and affects inflorescence architecture in transgenic tobacco plants (Mauro et al., 1996). This study shows that the *OAT* promoter is active in inflorescences on different developmental stages (see Fig. 1), suggesting that the *OAT* enzyme can convert ornithine to proline directly or indirectly via arginine catabolism and glutamate production and might serve as a regulator of proline level during inflorescence development.

Tissue-specific activation of the *OAT* transcription in roots in response to auxin and cytokinin treatments, as well as the presence of the auxin-responsive element in the *OAT* promoter (see Suppl. Table 3) allow us to assume specific regulation of the *OAT* gene during root growth and development. Recent findings show the importance of nutrient and especially nitrogen signaling for root development and its interplay with hormone regulation. Thus, cytokinins negatively regulate uptake of nitrogen, but enhance nitrate distribution and translocation (Gu et al., 2018). Auxin level was shown to be elevated in roots of plants growing on a low-nitrogen medium, while in roots of plants growing on a medium with high nitrate concentration the auxin level was decreased. The reduction of auxin content correlated with the degree of inhibition of root growth and lateral root development (Kiba et al., 2011). The root growth regulation is associated with local reorganization of nitrogen metabolism (Kiba, Krapp, 2016). Thereby, *OAT* may play an important role in hormone-dependent fine-tuning of nitrogen metabolism during the process of root development.

Conclusion

The data regarding the *OAT* transcription activation in a wide spectrum of experimental conditions, which was shown in our experiment and other studies, support the hypothesis that ornithine aminotransferase provides a link between different biochemical pathways of nitrogen conversion and contributes to the complicated signaling network regulating plant development.

References

Ballas N., Wong L.M., Theologis A. Identification of the auxin-responsive element, *AuxRE*, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, *PS-IAA4/5*, of pea (*Pisum sativum*). *J. Mol. Biol.* 1993;233:580-596. DOI 10.1006/jmbi.1993.1537.

Biancucci M., Mattioli R., Forlani G., Funck D., Costantino P., Trovato M. Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. *Front. Plant Sci.* 2015a;6:680. DOI 10.3389/fpls.2015.00680.

Biancucci M., Mattioli R., Moubayidin L., Sabatini S., Costantino P., Trovato M. Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 2015b;15:263. DOI 10.1186/s12870-015-0637-8.

Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998;16:735-743. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x.

Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 2008;8:40. DOI 10.1186/1471-2229-8-40.

Gerasimova S.V., Gorelova V.V., Dorogina O.V., Zhmud E.V., Koval V.S., Romanova A.V., Kochetov A.V., Shumny V.K. Analysis of transcriptional activity of the *Arabidopsis thaliana* ornithine-delta-aminotransferase gene promoter. *Russ. J. Genet.* 2011a;47:625-628. DOI 10.1134/S1022795411050073.

Gerasimova S.V., Kochetov A.V., Ibragimova S.S., Shumnyi V.K. Functions of delta-ornithine aminotransferase in plants. *Uspekhi Sovremennoi Biologii = Advances in Current Biology.* 2011b;131:531-542. (in Russian)

Gerasimova S.V., Kolodyazhnaya Y.S., Titov S.E., Romanova A.V., Koval V.S., Kochetov A.V., Shumnyi V.K. Tobacco transformants expressing the *Medicago truncatula* ornithine aminotransferase cDNA. *Russ. J. Genet.* 2010;46(7):890-893. DOI 10.1134/S102279541007015X.

Gilles L., Bluteau D., Boukour S., Chang Y., Zhang Y., Robert T., Dessen P., Debili N., Bernard O.A., Vainchenker W., Raslova H. MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9 (MLC2) and MMP9. *Blood.* 2009;114(19):4221-4232. DOI 10.1182/blood-2009-03-209932.

Ginguy A., Cynober L., Curis E., Nicolis I. Ornithine aminotransferase, an important glutamate-metabolizing enzyme at the crossroads of multiple metabolic pathways. *Biology.* 2017;6(1):18. DOI 10.3390/biology6010018.

Gu J., Li Z., Mao Y., Struik P.C., Zhang H., Liu L., Wang Z., Yang J. Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications. *Plant Sci.* 2018;274:320-331. DOI 10.1016/j.plantsci.2018.06.010.

Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 2012;7:1456-1466. DOI 10.4161/psb.21949.

Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:297-300. DOI 10.1093/nar/27.1.297.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 1987;6:3901-3907. DOI 10.1073/pnas.1411926112.

Kavi Kishor P.B., Kumari P.H., Sunita M.S.L., Sreenivasulu N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front. Plant Sci.* 2015;6:544. DOI 10.3389/fpls.2015.00544.

Kiba T., Krapp A. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant Cell Physiol.* 2016;57:707-714. DOI 10.1093/pcp/pcw052.

Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J. Exp. Bot.* 2011;62:1399-1409. DOI 10.1093/jxb/erq410.

Kochetov A.V., Titov S.E., Kolodyazhnaya Y.S., Komarova M.L., Koval V.S., Makarova N.N., Ilyinskiy Y.Y., Trifonova E.A., Shumny V.K. Tobacco transformants bearing antisense suppressor of proline dehydrogenase gene are characterized by higher proline content and cytoplasm osmotic pressure. *Russ. J. Genet.* 2004;40:216-218. DOI 10.1023/B:RUGE.0000016999.53466.e1.

Liu C., Xue Z., Tang D., Shen Y., Shi W., Ren L., Li Y., Cheng Z. Ornithine δ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant J.* 2018;96:842-854. DOI 10.1111/tj.14072.

Majumdar R., Minocha R., Minocha S.C. Ornithine: at the crossroads of multiple paths to amino acids and polyamines. In: D'Mello J.P.F. (Ed.) *Amino Acids in Higher Plants*. Ch. 9. Oxfordshire, UK: CABI, 2015;156-176.

Mattioli R., Biancucci M., Lonoce C., Costantino P., Trovato M. Proline is required for male gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 2012;12:236. DOI 10.1186/1471-2229-12-236.

- Mattioli R., Marchese D., D'Angeli S., Altamura M.M., Costantino P., Trovato M. Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 2008;66:277-288. DOI 10.1007/s11103-007-9269-1.
- Mauro M.L., Trovato M., De Paolis A., Gallelli A., Costantino P., Altamura M.M. The plant oncogene rolD stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Dev. Biol.* 1996;180:693-700. DOI 10.1006/dbio.1996.0338.
- Papatheodorou I., Fonseca N.A., Keays M., Tang Y.A., Barrera E., Bazant W., Burke M., Füllgrabe A., Fuentes A.M.-P., George N., Huerta L., Koskinen S., Mohammed S., Geniza M., Preece J., Jaiswal P., Jarnuczak A.F., Huber W., Stegle O., Vizcaino J.A., Brazma A., Petryszak R. Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:D246-D251. DOI 10.1093/nar/gkx1158.
- Qamar A., Mysore K.S., Senthil-Kumar M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front. Plant Sci.* 2015;6:503. DOI 10.3389/fpls.2015.00503.
- Roosens N.H., Al Bitar F., Loenders K., Angenon G., Jacobs M. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 2002;9:73-80. DOI 10.1023/A:1026791932238.
- Roosens N.H., Thu T.T., Iskandar H.M., Jacobs M. Isolation of the ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1998;117:263-271. DOI 10.1104/pp.117.1.263.
- Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002;130:709-719. DOI 10.1104/pp.009993.
- Suzuki M., Ketterling M.G., McCarty D.R. Quantitative statistical analysis of cis-regulatory sequences in ABA/VP1- and CBF/DREB1-regulated genes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005;139:437-447. DOI 10.1104/pp.104.058412.
- Tatematsu K., Ward S., Leyser O., Kamiya Y., Nambara E. Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005;138(2):757-766. DOI 10.1104/pp.104.057984.
- Trovato M., Maras B., Linhares F., Costantino P. The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:13449-13453. DOI 10.1073/pnas.231320398.
- Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids.* 2008;35(4):753-759. DOI 10.1007/s00726-008-0061-6.
- Verslues P.E., Sharma S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book.* 2010;8:e0140. DOI 10.1199/tab.0140.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One.* 2007;2(8):e718. DOI 10.1371/journal.pone.0000718.
- Winter G., Todd C.D., Trovato M., Forlani G., Funck D. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 2015;6:534. DOI 10.3389/fpls.2015.00534.
- Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Zhang W., Qu L.J., Chen Z. Over-expression of an *Arabidopsis* δ -*OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Sci. Bull.* 2003;48:2594-2600. DOI 10.1360/03wc0218.
- Zonia L.E., Stebbins N.E., Polacco J.C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.* 1995;107:1097-1103. DOI 10.1104/pp.107.4.1097.

ORCID ID

A.A. Egorova orcid.org/0000-0002-6745-3077
S.V. Gerasimova orcid.org/0000-0001-8626-1831
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Author contributions. S.V. Gerasimova, A.A. Egorova designed and performed the experiment, analyzed the data, wrote the manuscript, A.V. Kochetov coordinated the project.

Acknowledgements. We thank Vera Gorelova for help in conducting the experiments and writing the manuscript. The work is supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation (FWNR-2022-0017).

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

Received October 28, 2021. Revised January 20, 2022. Accepted January 21, 2022.

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

Зависимые и независимые от уровня эстрадиола эффекты FGF21 у самок мышей с ожирением

Т.В. Яковлева¹✉, А.Ю. Казанцева¹, А.Д. Дубинина¹, Н.Ю. Балыбина¹, К.О. Баранов², Е.Н. Макарова¹, Н.М. Бажан^{1,3}

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

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

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ tatyajakovleva@yandex.ru

Аннотация. Синтезируемый в печени фактор роста фибробластов 21 (FGF21), действуя как гормон, повышает чувствительность к инсулину и расход энергии. Введение FGF21 оказывает мощное благотворное воздействие у людей, обезьян и грызунов с ожирением и диабетом второго типа. Терапевтические эффекты FGF21 исследованы главным образом на самцах, они не всегда проявляются у самок и сопровождаются половой специфической активацией экспрессии генов в тканях. Мы предположили, что одной из причин полового диморфизма в ответе на FGF21 является действие эстрадиола (E2). В настоящее время неизвестно, как эстрадиол влияет на проявление фармакологических эффектов FGF21. Задачей данного исследования было изучение влияния FGF21 на метаболические характеристики, потребление пищи и экспрессию генов углеводного и жирового обмена в печени, жировой ткани и гипоталамусе у самок мышей с алиментарным ожирением на фоне низкого (овариэктомия) и высокого (овариэктомия + E2) уровня эстрадиола в крови. У овариэктомизированных самок развитие ожирения индуцировали потреблением сладко-жирной диеты (стандартный корм, сало, печенье) в течение 8 недель. Мы оценили эффекты FGF21 на массу тела, показатели крови, выбор компонентов диеты, экспрессию генов в тканях при раздельном и совместном введении с E2 в течение 13 дней. У овариэктомизированных самок с ожирением FGF21, независимо от введения E2, не влиял на массу тела и жировой ткани, толерантность к глюкозе, повышал потребление стандартного корма, снижал уровень глюкозы в крови, подавлял в печени собственную экспрессию (*Fgf21*), а также экспрессию генов *Gbpc* и *Acaca*. Впервые показано влияние эстрадиола на эффекты FGF21: ингибирование FGF21-влияния на экспрессию *Irs2* и *Pklr* в печени и потенцирование FGF21-стимулированной экспрессии *Lepr* и *Klb* в гипоталамусе. Кроме того, на фоне введения эстрадиола не проявлялось ингибирующее влияние FGF21 на уровень инсулина в крови, а в подкожной белой жировой ткани проявлялось ингибирующее влияние FGF21 на экспрессию *Cpt1a* и не проявлялось активирующее влияние FGF21 на экспрессию генов *Insr* и *Acacβ*. Полученные данные позволяют заключить, что у овариэктомизированных самок с ожирением отсутствие эффектов FGF21 на массу тела и жировой ткани и его благотворное влияние на потребление пищи и уровень глюкозы в крови не связаны с действием эстрадиола. Однако эстрадиол влияет на транскрипционные эффекты FGF21 в печени, белом жире и гипоталамусе, что может лежать в основе половых различий в его действии на экспрессию метаболических генов и, возможно, половых различий его фармакологических эффектов. Ключевые слова: FGF21; эстрадиол; печень; жировая ткань; пищевое предпочтение; экспрессия генов; половые различия.

Для цитирования: Яковлева Т.В., Казанцева А.Ю., Дубинина А.Д., Балыбина Н.Ю., Баранов К.О., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Зависимые и независимые от уровня эстрадиола эффекты FGF21 у самок мышей с ожирением. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(2):159-168. DOI 10.18699/VJGB-22-20

Estradiol-dependent and independent effects of FGF21 in obese female mice

T.V. Jakovleva¹✉, A.Yu. Kazantseva¹, A.D. Dubinina¹, N.Yu. Balybina¹, K.O. Baranov², E.N. Makarova¹, N.M. Bazhan^{1,3}

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

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

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ tatyajakovleva@yandex.ru

Abstract. The fibroblast growth factor 21 (FGF21) synthesized in the liver, acting as a hormone, increases insulin sensitivity and energy expenditure. FGF21 administration has potent beneficial effects on obesity and diabetes in humans, cynomolgus monkey, and rodents. The therapeutic effects of FGF21 have been studied mainly in males. They are not always manifested in females, and they are accompanied by sex-specific activation of gene expression in tissues. We have suggested that one of the causes of sexual dimorphism in response to FGF21 is the effect of estradiol (E2). Currently, it is not known how estradiol modifies the pharmacological effects of FGF21. The objec-

tive of this study was to study the influence of FGF21 on metabolic characteristics, food intake, and the expression of carbohydrate and fat metabolism genes in the liver, adipose tissue, and hypothalamus in female mice with alimentary obesity and low (ovariectomy) or high (ovariectomy + E2) blood estradiol level. In ovariectomized (OVX) females, the development of obesity was induced by the consumption of a high sweet-fat diet (standard chow, lard, and cookies) for 8 weeks. We investigated the effects of FGF21 on body weight, blood levels, food preferences and gene expression in tissues when FGF21 was administered separately or in combination with E2 for 13 days. In OVX obese females, FGF21, regardless of E2-treatment, did not affect body weight, and adipose tissue weight, or glucose tolerance but increased the consumption of standard chow, reduced blood glucose levels, and suppressed its own expression in the liver (*Fgf21*), as well as the expression of the *G6pc* and *Acaca* genes. This study is the first to show the modification of FGF21 effects by estradiol: inhibition of FGF21-influence on the expression of *Irs2* and *Pklr* in the liver and potentiation of the FGF21-stimulated expression of *LepR* and *Klb* in the hypothalamus. In addition, when administered together with estradiol, FGF21 exerted an inhibitory effect on the expression of *Cpt1a* in subcutaneous white adipose tissue (scWAT), whereas no stimulating FGF21 effects on the expression of *Insr* and *Acacβ* in scWAT or inhibitory FGF21 effect on the plasma insulin level were observed. The results suggest that the absence of FGF21 effects on body and adipose tissue weights in OVX obese females and its beneficial effect on food intake and blood glucose levels are not associated with the action of estradiol. However, estradiol affects the transcriptional effects of FGF21 in the liver, white adipose tissue, and hypothalamus, which may underlie sex differences in the FGF21 effect on the expression of metabolic genes and, possibly, in pharmacological FGF21 effects.

Key words: FGF21; estradiol; liver; adipose tissue; food preference; gene expression; sex differences.

For citation: Jakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Dubinina A.D., Balybina N.Yu., Baranov K.O., Makarova E.N., Bazhan N.M. Estradiol-dependent and independent effects of FGF21 in obese female mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):159-168. DOI 10.18699/VJGB-22-20

Введение

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21), синтезируемый в печени, секретируется в кровь и действует как гормон (Kharitonov et al., 2005). Его уровень существенно возрастает в условиях метаболического стресса, а именно в условиях холода, при голодании и при ожирении (Fisher et al., 2011). Было показано, что FGF21 вовлечен в регуляцию углеводно-жирового метаболизма. В фармакологических дозах FGF21 улучшает метаболические показатели у животных и у людей с ожирением: повышает расход энергии и чувствительность к инсулину, снижает уровень глюкозы в крови (Kharitonov et al., 2005; Coskun et al., 2008). Кроме того, FGF21 влияет на вкусовые предпочтения: снижает потребление сладкого и алкоголя, повышает потребление белка (Talukdar et al., 2016; Allard et al., 2019; Larson et al., 2019).

В настоящее время FGF21 и его синтетические аналоги используются для создания препаратов для лечения метаболического синдрома при ожирении. Однако большая часть преclinical исследований фармакологических эффектов FGF21 выполнена на самцах. Исследуя эффекты FGF21 у мышей, мы обнаружили, что его фармакологические эффекты могут различаться у самок и самцов. У самок мышей C57Bl с ожирением, индуцированным диетой с высоким содержанием сахара и жиров, FGF21 снижал массу тела, но, в отличие от самцов, не влиял на толерантность к глюкозе и экспрессию метаболических генов в печени и в бурой жировой ткани (Bazhan et al., 2019). У мышей C57Bl с ожирением, потреблявших смешанную диету (стандартный корм и корм с высоким содержанием жиров), введение FGF21 улучшало ряд метаболических показателей у животных обоих полов, но повышало экспрессию генов в абдоминальной жировой ткани только у самок (Makarova et al., 2021). У самок мышей *A^y* с генетически-детерминированным ожирением, в отличие от самцов, FGF21 не влиял на массу тела, уровень инсулина в крови и экспрессию гена проопиомеланокортина в гипоталамусе, но повышал потребление пищи, массу печени

и модифицировал экспрессию метаболических генов в печени и в белом жире (Makarova et al., 2020).

Причины половых различий фармакологических эффектов FGF21 в настоящее время не известны. Мы предположили, что различия в реакции на FGF21 связаны с влиянием эстрогенов. Эстрадиол и FGF21 оказывают однонаправленное (схожее) действие на метаболические показатели. Эстрадиол, подобно FGF21, снижает потребление пищи и массу тела, уровни в крови глюкозы и инсулина, повышает толерантность к глюкозе у овариэктомизированных и интактных самок мышей с ожирением (Gao et al., 2006; Thammacharoen et al., 2009). Согласно имеющимся данным, эстрадиол и FGF21 имеют разные рецепторы и одинаковые сигнальные пути (Fisher et al., 2011; Vrtačnik et al., 2014). Кроме того, эстрадиол может влиять на уровень в крови FGF21. Было показано, что экспрессия *Fgf21* в печени, которая определяет уровень гормона в крови, зависит от стадии эстрального цикла и положительно коррелирует с уровнем эстрадиола в крови (Hua et al., 2018). Экзогенный эстрадиол также способен стимулировать экспрессию *Fgf21* в печени и повышать уровень FGF21 в крови (Allard et al., 2019).

Мы предположили, что FGF21 и эстрадиол могут взаимодействовать в регуляции углеводно-жирового обмена и фармакологические эффекты FGF21 могут зависеть от уровня эстрадиола в крови. Поэтому задачей данного исследования было изучение влияния FGF21 на метаболические характеристики, выбор пищи и экспрессию генов углеводного и жирового обмена в печени, жировой ткани и гипоталамусе у самок мышей с алиментарным ожирением и разным уровнем эстрогеновой активности.

Материалы и методы

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (1996 г.) и российскими национальными инструкциями по уходу и использованию лабораторных животных.

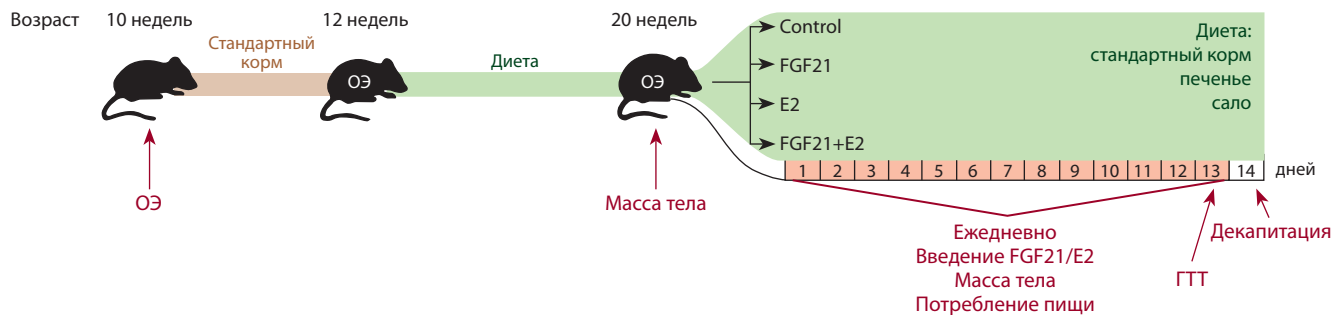


Рис. 1. Схема эксперимента.

ОЭ – овариэктомия; ГТТ – тест толерантности к глюкозе; диета – *ad libitum* стандартный корм, сало, печенье; введение – овариэктомированные самки с диет-индуцированным ожирением получали фактор роста фибробластов 21 (FGF21) в дозе 1 мг/1 кг массы тела подкожно и эстрадиол (E2) в дозе 20 мг/животное перорально раздельно или совместно в течение 13 дней ежедневно. Control-самки получали фосфатный буферный раствор (PBS) подкожно и масло перорально.

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6J (виварий конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН). Животных содержали в условиях 12 ч : 12 ч светового режима (световая фаза 07:30–19:30) при температуре 22–24 °С и свободном доступе к воде и пище. В возрасте 10 недель все самки были овариэктомированы. Для индукции развития ожирения через две недели после операции животных переводили на смешанную диету, состоящую из стандартного корма, печени и сала. Животные находились на этой диете в течение 8 недель до начала введения препаратов и на протяжении всего периода (2 недели) введения препаратов (рис. 1).

Мышиный рекомбинантный FGF21 (в дозе 1 мг/кг массы тела), растворенный в фосфатном буферном растворе (PBS), или PBS вводили подкожно (в объеме 200 мкл) в конце светового периода (17:00–19:00) в течение 13 дней. Экспрессию и очистку мышинового FGF21 выполнил доктор Баранов, как описано ранее (Makarova et al., 2021). Эстрадиол (E2 Sigma, США, 20 мкг/животное), растворенный в масле, или масло вводили перорально (100 мкл) одновременно с FGF21.

Овариэктомированные (ОЭ) самки мышей с диет-индуцированным ожирением были случайным образом разделены на четыре экспериментальные группы (по 6–8 животных в группе): 1) Control-самки, которые получали растворители (масло и PBS); 2) FGF21-самки, которые получали FGF21 и масло; 3) E2-самки, которые получали E2 и PBS; 4) FGF21+E2-самки, которые получали FGF21 и E2 одновременно.

Тест толерантности к глюкозе (ГТТ) проводили на 13-й день эксперимента, после чего самки получали последнюю инъекцию препаратов или растворителей соответственно экспериментальной группе. Через сутки после последней инъекции самки были декапитированы (14:00–16:00). Эстрадиол увеличил массу матки (43.5 ± 6.5 мг у самок, получавших масло ($n = 15$), и 114.0 ± 8.6 мг ($n = 12$) у самок, получавших E2, $p < 0.001$ по критерию Стьюдента), что указывает на эффективность выбранной дозы гормона. Перед декапитацией животных взвешивали. После декапитации печень, подкожный (scWAT), абдоминальный (abWAT) белый жир и бурый жир (BAT) были вырезаны и немедленно взвешены. Взятые образцы крови и тканей. Образцы тканей для оценки экспрессии

генов немедленно помещали в жидкий азот и хранили до выделения РНК.

Диета. Энергетическая ценность стандартного корма («БиоПро», Новосибирск, Россия) составляла 250 ккал/100 г, энергетическая ценность печенья («Шоколадная страна», Бердск, Россия) – 458 ккал/100 г, а энергетическая ценность сала (свиной подкожный жир) – 800 ккал/100 г. Количество калорий, потребляемых с каждым компонентом диеты, рассчитывали как массу компонента в граммах, умноженную на энергетическую ценность компонента. Долю калорий, потребленных с каждым компонентом диеты, рассчитывали как количество калорий, поступивших с данным компонентом, деленное на общее количество калорий, потребленных самкой, умноженное на 100, и представляли в процентах.

Овариэктомия. Анестезию проводили путем внутрибрюшинной инъекции 2.5 % авертина (смесь 2,2,2-трибромэтанола (Sigma-Aldrich Inc., США) и 2-метил-2-бутанола (Sigma-Aldrich Inc.) в объеме 400 мкл. Билатеральную овариэктомию выполняли через разрез кожи в области поясницы.

Тест толерантности к глюкозе (ГТТ). В 08:00 у животных убирали корм, тестирование начинали в 15:00. Глюкозу (АО «РЕАХИМ», Москва, Россия) вводили внутривенно в дозе 1 г/кг массы тела. Уровень глюкозы в крови определяли с помощью глюкометра Lifescan One Touch Basic Plus (LifeScan Inc., Швейцария) до и через 15, 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы. Площадь под кривой изменения уровня глюкозы в крови (AUC) представляли в виде ммоль/л·ч.

Гормоны и метаболиты крови. Концентрацию в плазме крови инсулина, лептина, адипонектина и кортикостерона определяли, используя коммерческие наборы Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Mouse Leptin ELISA Kit (EMD Millipore, США), Mouse Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США) и CORTICOSTERONE rat/mouse ELISA Kits (Xema Co. Ltd., Москва, Россия) соответственно. Концентрации глюкозы, триглицеридов, холестерина и свободных жирных кислот в плазме крови измеряли калориметрическим методом с помощью коммерческих наборов Fluitest GLU, Fluitest TG, Fluitest CHOL (Analyticon Biotechnologies GmbH, Германия) и NEFA FS DiaSys kits (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Германия)

соответственно. Для изучения влияния хронического введения FGF21 биохимические показатели определяли у животных в сытом состоянии, поскольку голодание вызывает резкое повышение эндогенной продукции FGF21.

Концентрация триглицеридов в печени. Образцы печени гомогенизировали в PBS (50 мг в 400 мкл) и центрифугировали при 1000 об/мин. Супернатант хранили при -20°C . Уровень триглицеридов определяли с помощью коммерческого набора Fluitest TG (Analyticon Biotechnologies GmbH, Германия), согласно инструкции.

Уровень экспрессии генов (Q-PCR) оценивали по уровню мРНК методом относительной оценки с проведением обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (relative quantitation real-time PCR). Общую РНК выделяли из образцов тканей с помощью набора ExtractRNA («Евроген», Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК первой цепи синтезировали с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мыши Молони (MMLV) («Евроген») и олиго (dT) в качестве праймера. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры и зонды TaqMan (Applied Biosystems, США): fibroblast growth factor 21 (*Fgf21*, Mm00840165_g1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (*Ppargc1a*, Mm01208835_m1), carnitine palmitoyltransferase 1A/1B (*Cpt1a/b*, Mm01231183_m1/Mm00487191_g1), acetyl-CoA carboxylase alpha/beta (*Acaca/b*, Mm01304257_m1/Mm01204671_m1), insulin receptor (*Insr*, Mm01211875_m1), insulin receptor substrate 1/2 (*Irs1/2*, Mm01278327_m1/Mm03038438_m1), protein-tyrosine phosphatase 1B (*Ptpn1*, Mm00448427_m1), pyruvate kinase (*Pklr*, Mm00443090_m1), glucokinase (*Gck*, Mm00439129_m1), glucose-6-phosphatase (*G6pc*, Mm00839363_m1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pck*, Mm01247058_m1), solute carrier family 2 member 2 (*Slc2a2*, Mm00446229_m1), solute carrier family 2 member 4 (*Slc2a4*, Mm00436615_m1), estrogen receptor 1 (*Esr1*, Mm00433149_m1), signal transducer and activator of transcription 3 (*Stat3*, Mm01219775_m1), peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma (*Ppara/g*, Mm00440939_m1/Mm00440940_m1), hormone-sensitive lipase (*Lipe*, Mm00495359_m1), adipose triglyceride lipase (*Atgl*, Mm00503040_m1), fatty acid synthase (*Fasn*, Mm00662319_m1), uncoupling protein 1 (*Ucp1*, Mm01244861_m1), deiodonase-2 (*Dio2*, Mm00515664_m1), corticotropin releasing hormone (*Crh*, Mm01293920_s1), agouti related neuropeptide (*Agrp*, Mm00475829_g1), neuropeptide Y (*Npy*, Mm01410146_m1), proopiomelanocortin (*Pomc*, Mm00435874_m1), leptin receptor (*Lepr*, Mm00440181_m1), klotho beta (*Klb*, Mm00473122_m1), cyclophilin A (*Ppia*, Mm02342430_g1), beta-actin (*Actb*, Mm00607939_s1). Циклофелин или β -актин использовали в качестве эндогенного контроля. Амплификацию последовательности и детекцию флуоресценции проводили на системе ПЦР в реальном времени Applied Biosystems VIIA 7. Относительную количественную оценку выполняли методом сравнительного порогового цикла (СТ-метод).

Статистический анализ. Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Для анализа влияния FGF21 и E2 на метаболические параметры применяли двухфакторный анализ ANOVA с фак-

торами “FGF21” (PBS или FGF21) и “E2” (масло или E2) с последующим сравнением с помощью post-hoc теста Tukey или U-теста Mann–Whitney в случае неравенства дисперсий. Для анализа влияния FGF21 и E2 на толерантность к глюкозе использовали repeated measures ANOVA с факторами “FGF21”, “E2” и “время” (время после введения глюкозы). Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Анализ выполнен в программном пакете STATISTICA 10.0 (StatSoft Russia, Москва, Россия).

Результаты

Потребление пищи, масса тела, печени и жировой ткани

В конце эксперимента у ОЭ самок с ожирением, получавших E2, масса тела, abWAT и scWAT были меньше, чем у самок, получавших масло ($p < 0.05$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно) (рис. 2, а). FGF21 не влиял на массу тела и белой жировой ткани при введении отдельно или совместно с эстрадиолом. Не выявлено достоверного влияния раздельного или совместного введения E2 и FGF21 на массу бурой жировой ткани, печени и уровень триглицеридов в печени (см. рис. 2, а, рис. 3, а).

Эстрадиол снижал потребление сала и общее количество потребленных калорий ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно), но не оказывал влияния на соотношение различных компонентов диеты (рис. 4, а). FGF21 независимо от введения E2 увеличивал количество и долю калорий, потребленных со стандартным кормом ($p < 0.001$ и $p < 0.05$ соответственно), но не влиял на общее количество поступивших калорий.

Таким образом, у ОЭ самок с ожирением эстрадиол снижал массу тела, по-видимому за счет уменьшения жировой массы. Оба препарата оказывали влияние на выбор компонентов пищи, и их действие не зависело друг от друга.

Чувствительность к инсулину и уровни в крови гормонов и метаболитов

У ОЭ самок с ожирением не выявлено влияния раздельного или совместного введения препаратов на уровни в плазме крови кортикостерона, свободных жирных кислот, триглицеридов и холестерина (рис. 5). FGF21 не влиял, а эстрадиол снижал уровни в плазме крови лептина и адипонектина ($p < 0.001$ в обоих случаях). Эстрадиол снижал уровень инсулина в плазме крови и уровень глюкозы в крови в состоянии натощак и повышал толерантность к глюкозе ($p < 0.001$ во всех случаях) (рис. 6, а, б). При введении раздельно FGF21 тоже снижал уровень инсулина в плазме крови ($p < 0.05$, post-hoc Tukey-тест). У самок, получавших препараты совместно, уровни инсулина не отличались от показателей у FGF21- и E2-самок и были достоверно ниже, чем у Control-самок ($p < 0.05$, post-hoc Tukey-тест). Независимо от введения эстрадиола, у самок, получавших FGF21, толерантность к глюкозе не отличалась, а уровень глюкозы в плазме крови в сытом состоянии был ниже по сравнению с Control-самками, хотя различия не достигали уровня значимости ($p = 0.07$).

Таким образом, у ОЭ самок с ожирением эстрадиол повышал чувствительность к инсулину. FGF21 независимо от введения эстрадиола не влиял на толерантность к

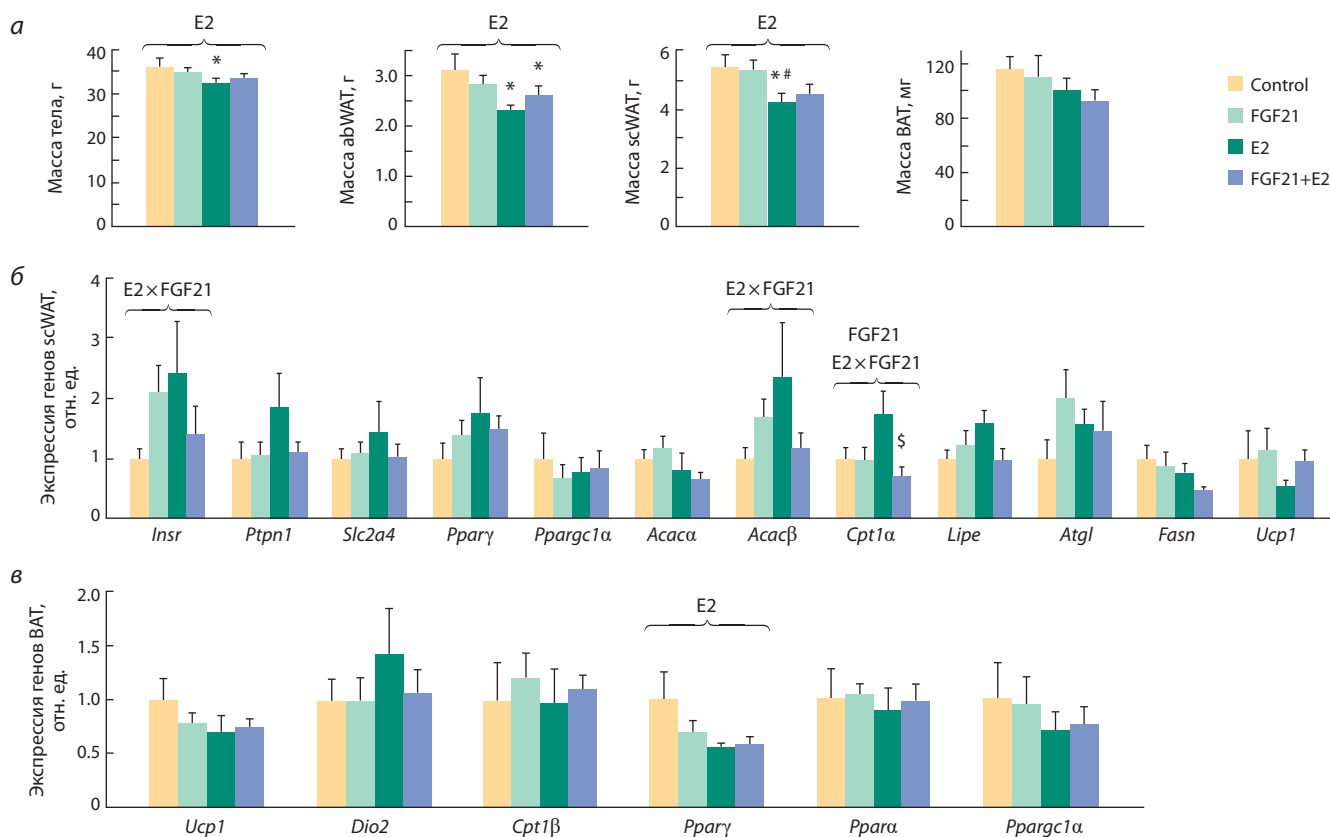


Рис. 2. Масса тела, масса абдоминальной и подкожной белой жировой ткани, масса бурой жировой ткани (а) и уровень мРНК генов регуляции метаболизма жиров и углеводов в подкожной белой жировой ткани (б) и в бурой жировой ткани (в).

Здесь и на рис. 3–6: факторы ANOVA, влияние которых на параметр является достоверным, показаны над скобками (E2, FGF21 или E2×FGF21).

* vs Control, # vs FGF21, post-hoc Tukey-тест; \$ vs E2, post-hoc Tukey-тест. abWAT – абдоминальная белая жировая ткань; scWAT – подкожная белая жировая ткань; BAT – бурая жировая ткань; *Insr* – insulin receptor; *Ptpn1* – protein-tyrosine phosphatase 1B; *Slc2a4* – solute carrier family 2 member 4; *Pparγ* – peroxisome proliferator-activated nuclear receptor gamma; *Ppargc1α* – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator; *Acaca* – acetyl-coenzyme A carboxylase alpha; *Acacβ* – acetyl-CoA carboxylase beta; *Cpt1α* – carnitine palmitoyltransferase 1A; *Lipe* – hormone-sensitive lipase; *Atgl* – adipose triglyceride lipase; *Fasn* – fatty acid synthase; *Ucp1* – uncoupling protein 1; *Dio2* – deiodonase-2; *Cpt1β* – carnitine palmitoyltransferase 1B; *Ppara* – peroxisome proliferator-activated receptor alpha coactivator.

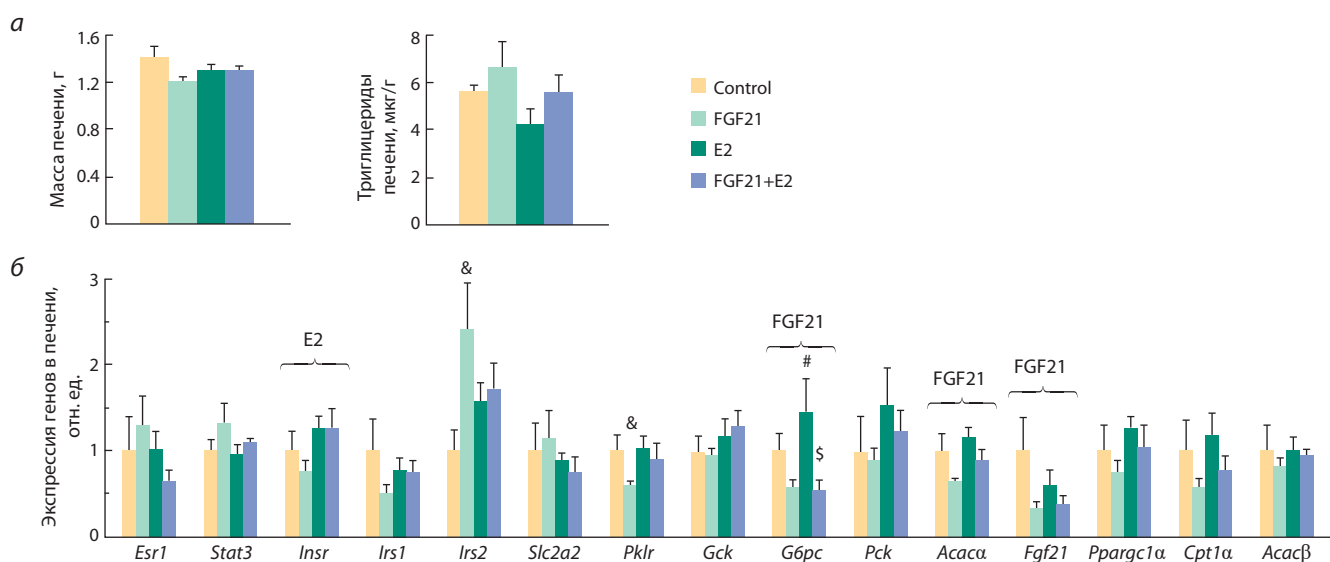


Рис. 3. Масса печени и уровни триглицеридов в печени (а); уровни мРНК генов, регулирующих метаболизм глюкозы и липидов (б).

vs FGF21; \$ vs E2, post-hoc Tukey-тест; & vs Control, Mann-Whitney U-тест.

Esr1 – estrogen receptor 1; *Stat3* – signal transducer and activator of transcription 3; *Insr* – insulin receptor; *Irs1/2* – insulin receptor substrate 1/2; *Slc2a2* – solute carrier family 2 member 2; *Pklr* – pyruvate kinase; *Gck* – glucokinase; *G6pc* – glucose-6-phosphatase; *Pck* – phosphoenolpyruvate carboxykinase; *Acaca* – acetyl-coenzyme A carboxylase alpha; *Fgf21* – fibroblast growth factor 21; *Ppargc1α* – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator; *Cpt1α* – carnitine palmitoyltransferase 1A; *Acacβ* – acetyl-CoA carboxylase beta.

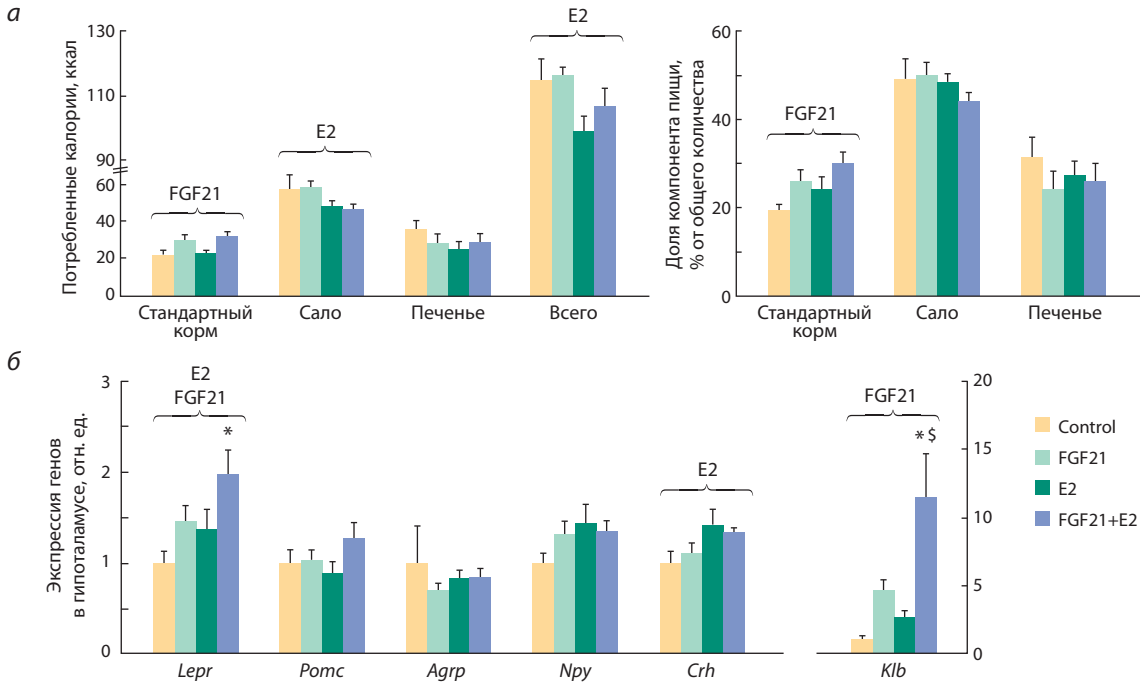


Рис. 4. Количество калорий, потребленных в ходе эксперимента (каждый компонент и общее количество), доля каждого компонента (%) (а) и уровень мРНК генов, связанных с контролем потребления пищи, в гипоталамусе (б).

* vs Control; § vs E2, post-hoc Tukey-тест.

Lepr – leptin receptor; *Pomc* – proopiomelanocortin; *AgRP* – agouti related peptide; *NPY* – neuropeptide Y; *Crh* – corticotropin releasing hormone; *Klb* – klotho beta.

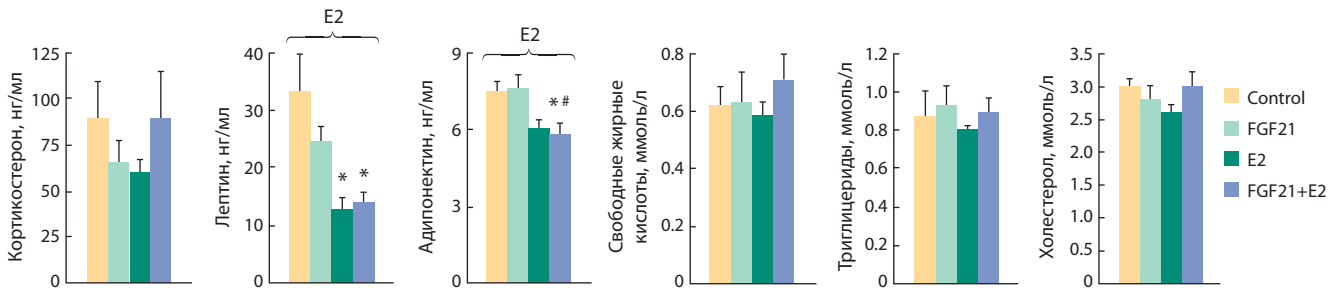


Рис. 5. Уровень гормонов и метаболитов в плазме крови.

* vs Control; # vs FGF21, post-hoc Tukey-тест.

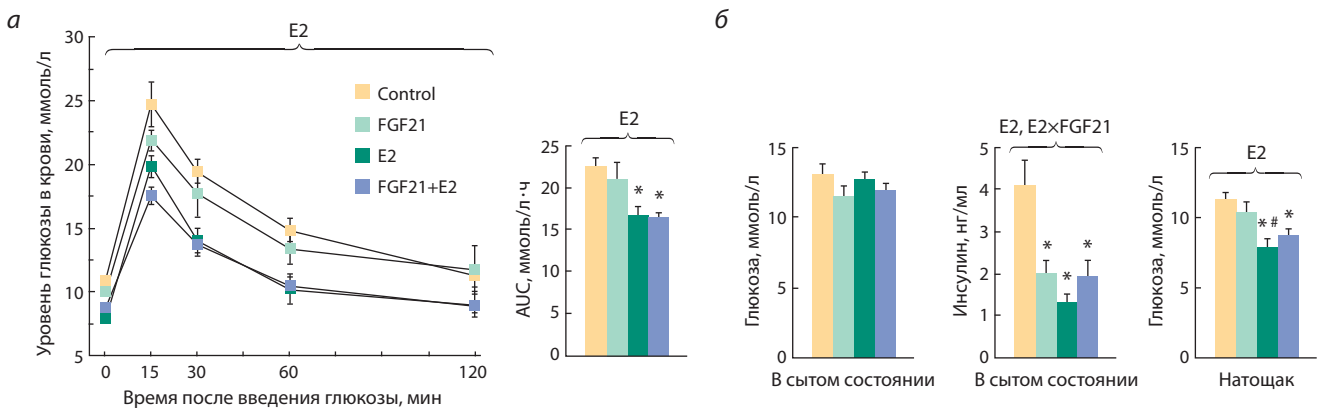


Рис. 6. Изменение уровня глюкозы в крови и площадь под кривой изменения уровня глюкозы в крови (AUC) в тесте толерантности к глюкозе (а); уровни глюкозы и инсулина в плазме крови в сытом состоянии и уровень глюкозы в крови в состоянии натощак (б).

* vs Control, # vs FGF21, post-hoc Tukey-тест.

глюкозе и уровень глюкозы натошак, но понижал уровень глюкозы в сытом состоянии. FGF21 оказывал также благотворное влияние на уровень инсулина в крови, однако данный эффект проявлялся только у самок без эстрадиола.

Экспрессия метаболических генов

В scWAT у ОЭ самок с ожирением FGF21 и эстрадиол при раздельном введении увеличивали экспрессию гена рецептора инсулина (*Insr*) и гена ацетил-КоА карбоксилазы бета (*Acacβ*, подавление окисления жирных кислот) (см. рис. 2, б). У самок, которые получали оба препарата, экспрессия этих генов в scWAT была ниже, чем у животных, получавших препараты раздельно, и не отличалась от таковой у Control-самок (влияние взаимодействия факторов – $p < 0.05$ в обоих случаях). Кроме того, в scWAT при раздельном введении FGF21 не влиял на экспрессию гена карнитинпальмитоилтрансферазы 1α (*Cpt1α*, активация окисления жирных кислот), но на фоне введения эстрадиола подавлял его экспрессию (влияние взаимодействия факторов – $p < 0.05$). У самок, получавших оба препарата, уровень мРНК этого гена был значительно ниже, чем у E2-самок ($p < 0.05$, post-hoc Tukey-тест), и не отличался от значений у Control-самок.

Не выявлено влияния раздельного или совместного введения препаратов на экспрессию генов в abWAT. В BAT эстрадиол снижал экспрессию транскрипционного фактора рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, типа гамма (*Pparγ*) ($p < 0.05$) (см. рис. 2, в). Независимо от эстрадиолового статуса, в бурой жировой ткани FGF21 не влиял на экспрессию генов, участвующих в термогенезе и бета-окислении жирных кислот.

Таким образом, у ОЭ самок с ожирением катаболический эффект эстрадиола был ассоциирован с его стимулирующим влиянием на экспрессию *Insr*, *Acacβ* в scWAT и *Pparγ* в BAT. Несмотря на отсутствие катаболического действия, FGF21 оказывал транскрипционные эффекты в scWAT: стимулировал экспрессию *Insr* и *Acacβ*, причем на фоне введения эстрадиола стимулирующее действие FGF21 на экспрессию генов не проявлялось.

В гипоталамусе изменения в потреблении пищи, вызванные действием эстрадиола, были ассоциированы с повышенной экспрессией генов рецептора лептина (*Lepr*) и кортикотропин-релизинг гормона (*Crh*) ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно) (см. рис. 4, б). Влияние FGF21 на потребление пищи было ассоциировано с увеличением экспрессии *Lepr* ($p < 0.05$), которое было более выраженным у самок, получавших E2. Помимо этого, FGF21 повышал экспрессию собственного корцептора бета-клото (*Klb*) ($p < 0.01$); эффект также был более выражен у самок, получавших E2.

Следовательно, влияние препаратов на выбор компонентов пищи было ассоциировано с изменением экспрессии в гипоталамусе факторов, участвующих в регуляции потребления пищи, причем эстрадиол усиливал транскрипционные эффекты FGF21.

В печени у ОЭ самок с ожирением эстрадиол повышал экспрессию гена рецептора инсулина (*Insr*) ($p < 0.05$) (см. рис. 3, б). FGF21 независимо от введения эстрадиола подавлял собственную экспрессию (*Fgf21*), экспрес-

сию генов, связанных с синтезом и окислением жирных кислот (ацетил-кофермент а карбоксилаза альфа, *Acaca*, и карнитинпальмитоилтрансфераза 1α, *Cpt1α* (тенденция)) и с глюконеогенезом (глюкозо-6-фосфатаза, *G6pc*) ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p = 0.08$ и $p < 0.01$ соответственно). Кроме того, FGF21 увеличивал экспрессию гена субстрата инсулинового рецептора второго типа (*Irs2*) и подавлял экспрессию пируваткиназы (*Pklr*, ключевого фермента гликолиза) только при раздельном с эстрадиолом введении ($p < 0.05$, FGF21-самки vs Control-самки, Mann–Whitney U-тест в обоих случаях). У самок, получавших одновременно FGF21 и эстрадиол, уровни мРНК *Irs2* и *Pklr* не отличались от таковых у E2- и Control-самок.

Таким образом, в печени показаны независимые друг от друга транскрипционные эффекты FGF21 и эстрадиола: эстрадиола – на экспрессию *Insr*, FGF21 – на экспрессию *G6pc*, *Acaca* и *Fgf21*. В то же время влияние FGF21 на экспрессию *Irs2* и *Pklr* проявлялось только при раздельном введении с эстрадиолом и отсутствовало при совместном, что предполагает E2-ингибирование эффектов FGF21.

Обсуждение

В этой работе мы исследовали, влияет ли уровень эстрадиола в крови на фармакологические эффекты FGF21 у самок с ожирением. Хроническое введение FGF21 самцам мышей с ожирением, как известно, вызывает улучшение многих метаболических параметров, включая нормализацию профиля липопротеинов, уровня в крови глюкозы и триглицеридов, повышение чувствительности к инсулину, увеличение расхода энергии, снижение массы тела и уменьшение глюконеогенеза и стеатоза в печени (Khari-tonenkov et al., 2005; Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009; Chau et al., 2010; Véniant et al., 2012; Fisher, Maratos-Flier, 2016; BonDurant, Potthoff, 2018). FGF21 влияет также на вкусовые предпочтения, увеличивая потребление белка и уменьшая потребление сахара у самцов мышей (Talukdar et al., 2016; Hill et al., 2019; Larson et al., 2019).

Согласно полученным нами данным, у ОЭ самок с ожирением эстрадиол снизил массу тела и жировой ткани, общее количество потребленных калорий, уровень инсулина в плазме крови в сытом состоянии и глюкозы в крови в состоянии натошак, а также повысил толерантность к глюкозе, что соответствует общепринятому мнению о влиянии эстрадиола на эти параметры у самок мышей с ожирением (Riant et al., 2009; Yan et al., 2019). Впервые показано, что анорексигенный эффект эстрадиола у ОЭ самок с ожирением обусловлен подавлением потребления компонента диеты с высоким содержанием жира (сало), и этот эффект ассоциирован с активацией экспрессии гена кортикотропин-релизинг гормона в гипоталамусе. Независимо от введения эстрадиола, мы не обнаружили у ОЭ самок с ожирением некоторых эффектов FGF21, наблюдаемых у самцов с ожирением. Например, FGF21 не влиял на массу тела и массу жировых тканей, уровни в крови липидов, лептина, адипонектина, а также на экспрессию генов, связанных с регуляцией термогенеза в BAT, генов, связанных с гипоталамической регуляцией приема пищи, и ряда генов, связанных с липидным обменом в scWAT и в печени. Эти результаты согласуются с

данными о влиянии FGF21 у неовариэктомированных самок с ожирением (Bazhan et al., 2019) и наводят на мысль, что помимо эстрадиола существуют другие факторы, связанные с полом, которые подавляют фармакологические эффекты FGF21 у самок с ожирением.

Мы показали, что влияние FGF21 на потребление пищи у ОЭ самок с ожирением, а именно повышение потребления ими стандартного корма, не зависело от эстрадиола и было, по-видимому, аналогично его влиянию на потребление пищи у самцов, поскольку у самцов FGF21 повышает потребление белка (казеина, обогащенного цистином) (Larson et al., 2019), а в нашей модели эксперимента стандартный корм содержал максимальное количество белка, по сравнению с салом и печеньем. Оба гормона, FGF21 и эстрадиол, влияли на выбор компонентов пищи, влияние каждого было направлено на снижение калорийности потребленной пищи. При этом эстрадиол снизил потребление высокожирного компонента диеты, а FGF21 увеличил потребление стандартного корма. Оба гормона повышали в гипоталамусе экспрессию лептиновых рецепторов. Гены гипоталамических нейропептидов проопиомеланокортина (*Pomc*), агутиподобного пептида (*Agrp*) и нейропептида Y (*Npy*) являются генами-мишенями лептина (Cowley et al., 2001) и связаны с регуляцией потребления пищи. Мы не обнаружили влияния FGF21 и эстрадиола на их экспрессию и можем предположить, что активация гипоталамической экспрессии *Lepr* и, соответственно, повышение чувствительности гипоталамуса к лептину в ответ на введение FGF21 и эстрадиола, по-видимому, не опосредовали их влияние на потребление пищи. В связи с этим механизм воздействия FGF21 на потребление пищи остается неясным и требует дальнейшего изучения, тогда как анорексигенное действие эстрадиола, вероятно, обусловлено повышением экспрессии *Crh* и активацией КРФ-системы. Следует отметить, что помимо экспрессии *Lepr*, FGF21 стимулировал экспрессию в гипоталамусе собственного корцептора *Klb*, причем экспрессия *Lepr* и *Klb* была максимальной при совместном введении препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что FGF21 при фармакологическом введении может повышать чувствительность гипоталамуса к регуляторным факторам, а эстрадиол – потенцировать центральные эффекты FGF21.

У ОЭ самок с ожирением FGF21 при введении отдельно с эстрадиолом увеличивал экспрессию *Insr* и *Acacβ* в scWAT и *Irs2* в печени и подавлял экспрессию в печени глюкозо-6-фосфатазы (*G6pc*), *Pklr*, *Acaca*, *Cpt1a* и свою собственную экспрессию. У самцов с ожирением хроническое введение FGF21, как известно, активирует экспрессию *Insr*, *Acacβ* и подавляет экспрессию *Cpt1a* в scWAT, а в печени стимулирует экспрессию *Insr* и подавляет собственную экспрессию и экспрессию *Acaca*, *Cpt1a* (Coskun et al., 2008; Fisher et al., 2011). Следовательно, у ОЭ самок с ожирением без эстрадиола транскрипционные эффекты FGF21 были аналогичны таковым у самцов с ожирением: благоприятны и направлены на повышение чувствительности к инсулину в печени и в жировой ткани, снижение уровня глюкозы и жирных кислот в крови. У ОЭ самок с ожирением, которые получали оба препа-

рата, благоприятные транскрипционные эффекты FGF21 сохранялись только в печени: FGF21 подавлял экспрессию в печени *G6pc*, *Acaca*, *Cpt1a* и собственную экспрессию.

При совместном введении с эстрадиолом FGF21 подавил экспрессию *Cpt1a* в scWAT, однако влияние FGF21 на экспрессию *Insr* и *Acacβ* в scWAT и *Irs2* и *Pklr* в печени не проявлялось. Влияние FGF21 на экспрессию в печени *G6pc*, таким образом, не зависело от эстрадиола и было ассоциировано со снижением уровня глюкозы в плазме крови в сытом состоянии. Мы предполагаем, что эти эффекты FGF21 (подавление экспрессии *G6pc* и снижение уровня глюкозы) были опосредованы активацией экспрессии *Lepr* в гипоталамусе, поскольку показана способность лептина, влияя на активность POMC нейронов, нормализовать уровни глюкозы в крови и повышать чувствительность к инсулину в печени (Berglund et al., 2012).

Таким образом, изучение транскрипционных эффектов FGF21 в печени, жировой ткани и гипоталамусе показало, что существуют разные типы взаимодействия FGF21 и эстрадиола в регуляции экспрессии метаболических генов у ОЭ самок с ожирением: 1) FGF21 может оказывать E2-независимые эффекты; 2) эстрадиол может подавлять или усиливать эффекты FGF21; 3) взаимодействие гормонов может приводить к взаимоподавлению их эффектов, наблюдаемых при раздельном введении. Способность FGF21 при фармакологическом применении подавлять эффекты эстрадиола наводит на мысль о возможном негативном влиянии FGF21 у самок, в том числе негативном влиянии на репродуктивную функцию.

Каковы возможные механизмы влияния эстрадиола на фармакологические эффекты FGF21? Показано, что FGF21 связывается с рецепторным комплексом, состоящим из рецептора фактора роста фибробластов первого типа (FGFR1) и корцептора бета-клото (Kurosu et al., 2007). В гипоталамусе, жировой ткани и поджелудочной железе экспрессируются рецептор и корцептор FGF21, а также все типы рецепторов эстрадиола (Kurosu et al., 2007; Nadal et al., 2009; Fisher et al., 2011; Bian et al., 2019; Pan et al., 2019). Эти ткани являются мишенью действия FGF21 и эстрадиола. В печени экспрессируются рецептор эстрадиола типа альфа и G-белок связанный рецептор эстрадиола (Palmisano et al., 2017), поэтому печень является мишенью действия эстрадиола. Уровень FGFR1 в печени очень низкий (Fisher et al., 2011), однако некоторые прямые эффекты FGF21 могут наблюдаться в печени при его фармакологическом введении как следствие большой дозы препарата (Owen et al., 2015). Взаимодействие FGF21 и эстрадиола в регуляции метаболических параметров может зависеть от молекулярного механизма регуляции экспрессии целевых генов, а также от типа и уровня рецепторов в ткани, т.е. может быть тканеспецифичным. Молекулярный механизм данного взаимодействия требует дополнительного изучения.

Заключение

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что овариэктомированные самки с ожирением проявляют резистентность к катаболическому действию FGF21, и эта резистентность не связана с действием эстрадиола. Способ-

ность FGF21 повышать потребление стандартного корма и снижать уровень глюкозы в крови также не зависит от эстрадиола. Однако FGF21 и эстрадиол, по-видимому, могут взаимодействовать в регуляции экспрессии генов и уровня инсулина в крови: эстрадиол может подавлять транскрипционные эффекты FGF21 в печени и потенцировать его влияние в гипоталамусе; в жировой ткани взаимодействие FGF21 и эстрадиола может подавлять активирующее влияние каждого из препаратов, наблюдаемое при раздельном введении, или способствовать проявлению ингибирующего влияния FGF21; на фоне эстрадиола не проявляется ингибирующее влияние FGF21 на уровень инсулина в крови.

Эстрадиолзависимые эффекты FGF21 могут по-разному проявляться в мужском и женском организме с различной активностью эстрогенов, определяя половой диморфизм фармакологических эффектов FGF21 у животных с ожирением.

Список литературы / References

- Allard C., Bonnet F., Xu B., Coons L., Albarado D., Hill C., Fagherazi G., Korach K.S., Levin E.R., Lefante J., Morrison C., Mauvais-Jarvis F. Activation of hepatic estrogen receptor- α increases energy expenditure by stimulating the production of fibroblast growth factor 21 in female mice. *Mol. Metab.* 2019;22:62-70. DOI 10.1016/j.molmet.2019.02.002.
- Bazhan N., Yakovleva T., Denisova E., Dubinina A., Makarova E. Antidiabetic FGF21 action depended on sex and exerted only in male mice with diet induced obesity. *Obes. Facts.* 2019;12(Suppl.1):189. DOI 10.1159/000489691.
- Berglund E.D., Vianna C.R., Donato J., Jr., Kim M.H., Chuang J.C., Lee C.E., Lauzon D.A., Lin P., Brule L.J., Scott M.M., Coppari R., Elmquist J.K. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 2012;122(3):1000-1009. DOI 10.1172/JCI59816.
- Bian C., Bai B., Gao Q., Li S., Zhao Y. 17 β -estradiol regulates glucose metabolism and insulin secretion in rat islet β cells through GPER and Akt/mTOR/GLUT2 pathway. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019;10:531. DOI 10.3389/fendo.2019.00531.
- BonDurant L.D., Potthoff M.J. Fibroblast growth factor 21: a versatile regulator of metabolic homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 2018;38:173-196. DOI 10.1146/annurev-nutr-071816-064800.
- Chau M.D., Gao J., Yang Q., Wu Z., Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(28):12553-12558. DOI 10.1073/pnas.1006962107.
- Coskun T., Bina H.A., Schneider M.A., Dunbar J.D., Hu C.C., Chen Y., Moller D.E., Kharitonov A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology.* 2008;149(12):6018-6027. DOI 10.1210/en.2008-0816.
- Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M., Cerdán M.G., Diano S., Horvath T.L., Cone R.D., Low M.J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001;411(6836):480-484. DOI 10.1038/35078085.
- Fisher F.M., Estall J.L., Adams A.C., Antonellis P.J., Bina H.A., Flier J.S., Kharitonov A., Spiegelman B.M., Maratos-Flier E. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) *in vivo*. *Endocrinology.* 2011;152(8):2996-3004. DOI 10.1210/en.2011-0281.
- Fisher F.M., Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 2016;78:223-241. DOI 10.1146/annurev-physiol-021115-105339.
- Gao H., Bryzgalova G., Hedman E., Khan A., Efendic S., Gustafsson J.A., Dahlman-Wright K. Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol. Endocrinol.* 2006;20(6):1287-1299. DOI 10.1210/me.2006-0012.
- Hill C.M., Laeger T., Dehner M., Albarado D.C., Clarke B., Wanders D., Burke S.J., Collier J.J., Qualls-Creekmore E., Solon-Biet S.M., Simpson S.J., Berthoud H.R., Münzberg H., Morrison C.D. FGF21 signals protein status to the brain and adaptively regulates food choice and metabolism. *Cell Rep.* 2019;27(10):2934-2947.e3. DOI 10.1016/j.celrep.2019.05.022.
- Hua L., Zhuo Y., Jiang D., Li J., Huang X., Zhu Y., Li Z., Yan L., Jin C., Jiang X., Che L., Fang Z., Lin Y., Xu S., Li J., Feng B., Wu D. Identification of hepatic fibroblast growth factor 21 as a mediator in 17 β -estradiol-induced white adipose tissue browning. *FASEB J.* 2018;32(10):5602-5611. DOI 10.1096/fj.201800240R.
- Kharitonov A., Shiyanova T.L., Koester A., Ford A.M., Micanicovic R., Galbreath E.J., Sandusky G.E., Hammond L.J., Moyers J.S., Owens R.A., Gromada J., Brozinick J.T., Hawkins E.D., Wroblewski V.J., Li D.S., Mehrbod F., Jaskunas S.R., Shanafelt A.B. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 2005;115(6):1627-1635. DOI 10.1172/JCI23606.
- Kurosu H., Choi M., Ogawa Y., Dickson A.S., Goetz R., Eliseenkova A.V., Mohammadi M., Rosenblatt K.P., Kliewer S.A., Kuro-O M. Tissue-specific expression of β Klotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* 2007;282(37):26687-26695. DOI 10.1074/jbc.M704165200.
- 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., Kazantseva A., Dubinina A., Yakovleva T., Balybina N., Baranov K., Bazhan N. The same metabolic response to FGF21 administration in male and female obese mice is accompanied by sex-specific changes in adipose tissue gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10561. DOI 10.3390/ijms221910561.
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Balybina N.Y., Baranov K.O., Denisova E.I., Dubinina A.D., Feofanova N.A., Bazhan N.M. Pharmacological effects of fibroblast growth factor 21 are sex-specific in mice with the *lethal yellow (A^y)* mutation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2020; 24(2):200-208. DOI 10.18699/VJ20.40-0.
- Nadal A., Alonso-Magdalena P., Soriano S., Ropero A.B., Quesada I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J. Physiol.* 2009;587(Pt.21):5031-5037. DOI 10.1113/jphysiol.2009.177188.
- Owen B.M., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends Endocrinol. Metab.* 2015;26(1):22-29. DOI 10.1016/j.tem.2014.10.002.
- Palmisano B.T., Zhu L., Stafford J.M. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017;1043:227-256. DOI 10.1007/978-3-319-70178-3_12.
- Pan Y., Wang B., Zheng J., Xiong R., Fan Z., Ye Y., Zhang S., Li Q., Gong F., Wu C., Lin Z., Li X., Pan X. Pancreatic fibroblast growth factor 21 protects against type 2 diabetes in mice by promoting insulin expression and secretion in a PI3K/Akt signaling-dependent manner. *J. Cell. Mol. Med.* 2019;23(2):1059-1071. DOI 10.1111/jcmm.14007.
- Riant E., Waget A., Cogo H., Arnal J.F., Burcelin R., Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology.* 2009;150(5):2109-2117. DOI 10.1210/en.2008-0971.
- Talukdar S., Zhou Y., Li D., Rossulek M., Dong J., Somayaji V., Weng Y., Clark R., Lanba A., Owen B.M., Brenner M.B., Trimmer J.K., Gropp K.E., Chabot J.R., Erion D.M., Rolph T.P., Goodwin B., Calle R.A. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab.* 2016;23(3):427-440. DOI 10.1016/j.cmet.2016.02.001.

- Thammacharoen S., Geary N., Lutz T.A., Ogawa S., Asarian L. Divergent effects of estradiol and the estrogen receptor- α agonist PPT on eating and activation of PVN CRH neurons in ovariectomized rats and mice. *Brain Res.* 2009;1268:88-96. DOI 10.1016/j.brainres.2009.02.067.
- Véniant M.M., Komorowski R., Chen P., Stanislaus S., Winters K., Hager T., Zhou L., Wada R., Hecht R., Xu J. Long-acting FGF21 has enhanced efficacy in diet-induced obese mice and in obese rhesus monkeys. *Endocrinology.* 2012;153(9):4192-4203. DOI 10.1210/en.2012-1211.
- Vrtačnik P., Ostanek B., Mencej-Bedrač S., Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem. Med. (Zagreb).* 2014;24(3):329-342. DOI 10.11613/BM.2014.035.
- Xu J., Stanislaus S., Chinookoswong N., Lau Y.Y., Hager T., Patel J., Ge H., Weiszmann J., Lu S.C., Graham M., Busby J., Hecht R., Li Y.S., Li Y., Lindberg R., Véniant M.M. Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models – association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009;297(5):E1105-E1114. DOI 10.1152/ajpendo.00348.2009.
- Yan H., Yang W., Zhou F., Li X., Pan Q., Shen Z., Han G., Newell-Fugate A., Tian Y., Majeti R., Liu W., Xu Y., Wu C., Allred K., Allred C., Sun Y., Guo S. Estrogen improves insulin sensitivity and suppresses gluconeogenesis via the transcription factor Foxo1. *Diabetes.* 2019;68(2):291-304. DOI 10.2337/db18-0638.

ORCID ID

T.V. Jakovleva orcid.org/0000-0001-7628-5856
A.Yu. Kazantseva orcid.org/0000-0003-4192-2020
A.D. Dubinina orcid.org/0000-0003-3907-3488
N.Yu. Balybina orcid.org/0000-0001-7168-1438
K.O. Baranov orcid.org/0000-0002-4029-6518
E.N. Makarova orcid.org/0000-0002-6417-9893
N.M. Bazhan orcid.org/0000-0002-7246-4758

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 17-15-01036-П, с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.10.2021. После доработки 23.11.2021. Принята к публикации 24.11.2021.

The impact of the *Hsp67Bc* gene product on *Drosophila melanogaster* longevity, fecundity, and acute heat stress tolerance

D. Malkeyeva , S.A. Fedorova, E. Kiseleva


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

 malkeyeva@bionet.nsc.ru


Abstract. *Drosophila melanogaster* Hsp67Bc is a heat- and cold-inducible small heat shock protein that participates in the prevention of aggregation of misfolded proteins and in macroautophagy regulation. Overexpression of the *Hsp67Bc* gene has been shown to enhance macroautophagy in *Drosophila* S2 cells, and the deletion of this gene leads to the formation of a slightly increased number of autophagic vacuoles in the fruit fly brain neurons. Recently, we found that *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* flies have poor tolerance to cold stress (0 °C) of various durations. In the present work, we investigated how the *Hsp67Bc* gene deletion affects the fitness of fruit flies under normal conditions and their tolerance to elevated temperatures at different developmental stages. Larvae and pupae were not adversely affected by the *Hsp67Bc* gene deletion, and adult *Hsp67Bc*-null flies showed an extended lifespan in comparison with the control at normal (24–25 °C) and elevated temperature (29 °C), and after acute heat stress (37 °C, 2 h). At the same time, the fecundity of the mutant females was lower by 6–13 % in all tested environments, except for permanent maintenance at 29 °C, where the mean numbers of eggs laid by the mutant and control flies were equal. We explain this phenomenon by a reduced number of ovarioles in *Hsp67Bc*-null females and enhanced macroautophagy in their germaria, which promotes the death of forming egg chambers. In addition, short heat stress (37 °C, 2 h), which increased the control line's longevity (an effect common for a wide range of organisms), had a negative impact on the lifespan of *Hsp67Bc*-null flies. Therefore, *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* have an extended lifespan under normal and elevated temperature conditions, and reduced fecundity and thermal stress tolerance. Key words: *Drosophila* longevity; thermal stress tolerance; elevated temperature; heat stress; small heat shock proteins; autophagy.

For citation: Malkeyeva D., Fedorova S.A., Kiseleva E. The impact of the *Hsp67Bc* gene product on *Drosophila melanogaster* longevity, fecundity, and acute heat stress tolerance. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):169-178. DOI 10.18699/VJGB-22-21

Влияние продукта гена *Hsp67Bc* на продолжительность жизни, плодовитость и устойчивость *Drosophila melanogaster* к кратковременному тепловому стрессу

Д.А. Малькеева , С.А. Фёдорова, Е.В. Киселева

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

 malkeyeva@bionet.nsc.ru

Аннотация. Hsp67Bc *Drosophila melanogaster* – индуцируемый в ответ на тепловой и холодовой стресс малый белок теплового шока, участвующий в предотвращении агрегации поврежденных белков и в регуляции макроаутофагии. Было показано, что повышенная экспрессия гена *Hsp67Bc* стимулирует макроаутофагию в клетках S2 дрозофилы, а его делеция приводит к небольшому увеличению количества аутофагических вакуолей в нейронах мозга мух. Недавно нами обнаружено, что нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* особи *D. melanogaster* имеют сниженную устойчивость к холодовому стрессу (0 °C) различной длительности. В настоящей работе мы исследовали, как наличие делеции в гене *Hsp67Bc* повлияет на жизнеспособность *D. melanogaster* в нормальных условиях и на их устойчивость к повышенной температуре на разных стадиях развития. Делеция *Hsp67Bc* не оказала на личинок и куколок дрозофил неблагоприятного воздействия; нуль-аллельные по гену *Hsp67Bc* имаго имели увеличенную по сравнению с контролем продолжительность жизни при нормальной (24–25 °C) и повышенной (29 °C) температуре, а также после кратковременного теплового стресса (37 °C, 2 ч). В то же время плодовитость мутантных самок была снижена на 6–13 % по сравнению с контролем при всех исследованных температурных режимах, за исключением постоянного содержания при 29 °C, при котором среднее число откладываемых яиц не различалось между контрольной и мутантной линиями. Мы связываем этот феномен со сниженным количеством овариол у нуль-аллельных по гену *Hsp67Bc* самок, а также с усиленной макроаутофагией в их гермариях, приводящей к росту числа гибнущих формирующихся яйцевых камер.

Кроме того, кратковременный тепловой стресс (37 °C, 2 ч), приводивший к увеличению продолжительности жизни *D. melanogaster* контрольной линии (что является распространенной реакцией у живых организмов), отрицательно влиял на продолжительность жизни мух с делецией *Hsp67Bc*. Таким образом, *D. melanogaster* с делецией в гене *Hsp67Bc* имеют увеличенную продолжительность жизни в нормальных условиях и при повышенной температуре и сниженные плодовитость и устойчивость к температурному стрессу.

Ключевые слова: продолжительность жизни *Drosophila*; устойчивость к температурному стрессу; повышенная температура; тепловой стресс; малые белки теплового шока; аутофагия.

Introduction

During ontogenesis, all living organisms experience stress. The effects of stress-inducing agents on cells include oxidative modification of proteins, which leads to their misfolding (Jolly, Morimoto, 2000). Misfolded proteins are detrimental to the cell because they may gain deleterious biological functions and are prone to forming insoluble aggregates (Jolly, Morimoto, 2000). To maintain homeostasis, cells synthesize heat shock proteins (HSPs): a group of conservative proteins that ensure correct folding of peptides, prevent aggregation of denatured proteins, and resolubilize protein aggregates (Jolly, Morimoto, 2000). This response is universal among all the known pro- and eukaryotes (Lindquist, 1986). Expression of the majority of *HSP* genes is up-regulated in stressful conditions such as heat and cold stress, hypoxia, bacterial and viral infections, and oxidative stress (Lindquist, 1986; Sørensen et al., 2003). Some HSPs are constitutively expressed and are necessary for growth and development of organisms under normal conditions (Kampinga et al., 2009; Sarkar et al., 2011). In a study by Raut et al. (2017) on *Drosophila*, knockdown of 42 out of 95 tested *HSP* genes led to F1 lethality indicating their crucial role in the fly development.

Drosophila melanogaster Hsp67Bc belongs to the small heat shock protein family of HSPs (Vos et al., 2016). It shares a function of preventing damaged protein aggregation with other members of the family (Vos et al., 2016). In addition, *Hsp67Bc* was shown to be involved in the regulation of macroautophagy – a conservative catabolic process allowing the recycling of cytoplasm components – alongside Starvin protein (Carra et al., 2010; Parzych, Klionsky, 2014). Overexpression of the *Hsp67Bc* gene separately or together with *stv* resulted in protein synthesis inhibition and macroautophagy stimulation (Carra et al., 2010).

Our studies on the *Hsp67Bc* gene deletion in *D. melanogaster* revealed that in brain neurons of *Hsp67Bc*-null flies infected by a pathogenic *Wolbachia* bacteria strain *wMelPop*, the number of autophagosomes and autolysosomes (organelles formed in the process of macroautophagy that sequester cytoplasm components and digest them) was increased, and the cross-sectional area of autolysosomes was more than 1.5-fold larger than in the control line with the wild-type *Hsp67Bc* gene (Malkeyeva et al., 2021). These observations may indicate that in the absence of the *Hsp67Bc* gene product, macroautophagy is slightly enhanced and autophagosome maturation process is affected. Furthermore, we showed that the *Hsp67Bc* gene product plays an important role in tolerance to cold stress in the fruit fly (Malkeyeva et al., 2020). *Hsp67Bc*-null adult flies needed more time to recover from chill coma than the control flies, and adult females with the *Hsp67Bc* gene deletion had a 1.6–3-fold lower survival after cold stress of various dura-

tions (2, 4, and 12 h at 0 °C) as compared to the control line (Malkeyeva et al., 2020).

In this study, we investigated fitness of *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* under normal conditions (24–25 °C) and their tolerance to elevated temperatures (29 °C or 2 h at 37 °C) at different stages of ontogenesis (larva, pupa, and imago). We found that the adult mutant flies had an increased lifespan at all the tested temperatures, in comparison with the control line with an intact *Hsp67Bc* gene. *Hsp67Bc*-null adult flies, however, had slightly reduced fecundity under normal conditions and after heat stress (37 °C, 2 h) and were negatively affected by acute heat stress (37 °C, 2 h) that prolonged longevity of the control line. Thus, despite having extended lifespan in comparison with the control line under all tested conditions, *Hsp67Bc*-null flies had lower fecundity and were less tolerant to acute heat stress.

Materials and methods

***Drosophila melanogaster* lines.** In this study, we used *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* line *Hsp67Bc-0* we created by an imprecise excision of a *P*-element located in proximity to the *Hsp67Bc* gene transcription start. Fly line *Hsp67Bc-2* containing a wild-type variant of *Hsp67Bc* obtained by a precise cutting out of the mentioned *P*-element was used as a control. The procedure for obtaining the fly lines is described in our recent article (Malkeyeva et al., 2020).

Heat stress applied to larvae and pupae. For these experiments, wandering late 3rd instar (L3) larvae were transferred from their rearing vials to the walls of vials with fresh cornmeal-agar medium, at 20 per vial. The larvae were then either directly transferred to a 37 °C environment (water bath in an incubator) for 2 h incubation or allowed to first reach the developmental stage that was to be treated. In particular, these were pupal stages P1–P2 (white prepupae, 1–2 h after pupation), P5 (18–20 h after pupation), or P7–P8 (46–48 h after pupation) (Bainbridge, Bownes, 1981). The cottons sealing the vials were slightly moisturized with water before the start of heat treatment to prevent drying of the larvae and pupae. After the heat stress treatment, the flies were kept at 24–25 °C until eclosion. Survivors to the pupa stage (in case of late L3 treatment) and to the adult stage (for all treatment groups) were then counted. In each experiment, 39–107 flies of each genotype were used.

Analysis of the lifespan and fecundity of adult *D. melanogaster* kept at either normal or elevated temperature. The flies were collected from rearing vials on the 1st day after eclosion and placed into vials with a fresh cornmeal-agar medium, at eight males and eight females per vial. The flies then underwent one of four treatments. The 1st group was kept at 24–25 °C (normal conditions); the 2nd group was subjected

to heat treatment at 37 °C for 2 h at 1 day of age and then was returned to the 24–25 °C environment; the 3rd group was heat treated (37 °C, 2 h) at 7 days of age, then returned to the 24–25 °C environment; the 4th group was transferred to a 29 °C environment at 1 day of age and kept at the elevated temperature. Each experimental group contained 45–62 males and 51–62 females of relevant genotypes.

All the flies were kept under the specified conditions until the death of all individuals, with survivors transferred to fresh food daily or every other day. In parallel, fecundity was measured in these *Drosophila* starting from day 2 in the 1st, 2nd, and 4th groups and starting from day 8 in the 3rd group (one day after the heat treatment). *D. melanogaster* females were allowed to lay eggs for 24 h in vials with fresh medium, then the parents were transferred to new food, and the eggs were counted. The number of eggs in a vial was then divided by the number of females that oviposited in that very vial. The egg per female ratio was evaluated on days 2–11, 15–17, and 22–24 in the 1st, 2nd, and 4th experimental groups; in the 3rd group, the ratio was measured on days 8–10, 13–15, and 20–22.

Protein starvation assay. For this assay, newly eclosed adult *D. melanogaster* individuals were collected every 2 h from their rearing vials and transferred to vials with protein-free medium containing 100 g/L sucrose, 5 g/L agar and 0.78 g/L methyl 4-hydroxybenzoate. The flies were transferred to a fresh medium every other day.

LysoTracker Red (LTR) staining. On the 5th and 15th days of the protein starvation experiment, ovaries of the starved adult *D. melanogaster* females and females kept on standard food were dissected in 0.01 M PBS (Medigen) (pH 7.4) and stained with 100 nM LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies) and DAPI. The LTR staining was performed as follows: the dissected ovaries were first placed into a droplet of a 100 nM LTR solution in 0.01 M PBS for 10 min incubation, washed thrice in PBS, and then fixed in 4 % paraformaldehyde for 20 min; next, the ovaries were washed three times with a 0.1 % Triton X-100 solution in PBS and mounted on a slide with a drop of DAPI-containing *SlowFade* Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific). To make sure the antifade mountant penetrates inner ovarioles, we let the ovaries stay without a cover slip for ~15 min before sealing them under it with nail polish. The samples were stored in the dark at 4 °C until analysis under the LSM 780 confocal microscope (Zeiss) with the Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objective.

Statistical analyses. Survival and recovery curves were compared by the log-rank test. The fecundity, lifespan, number of ovarioles, and number of dying egg chambers per ovariole datasets were tested for normality by the Shapiro–Wilk test; normally distributed data were compared by the heteroscedastic *t* test; data with non-normal distribution were compared by the Mann–Whitney *U* test. Differences in fecundity between the control and mutant fly lines throughout the experiment were evaluated at each point by the heteroscedastic *t* test, followed by the Benjamini–Krieger–Yekutieli method to control the false discovery rate. Analyses of the proportion (%) of LTR-positive germaria obtained in the LTR-staining experiments were performed by the chi-squared test. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

The Shapiro–Wilk test and the Mann–Whitney *U* test were conducted using Statistics Kingdom statistics calculators (<https://www.statskingdom.com>).

Results

Hsp67Bc-null *D. melanogaster* under normal conditions

To expand our knowledge on the functions of *Hsp67Bc* in the fruit fly we created a *D. melanogaster* line carrying a deletion of almost the entire *Hsp67Bc* gene (described in detail in our recent article (Malkeyeva et al., 2020)). The flies carrying the deletion in the *Hsp67Bc* gene in the homozygous state (*Hsp67Bc*-0) were viable and fertile, and had no visible morphological deviations from the control. The *Hsp67Bc*-0 line had extended longevity under normal conditions (24–25 °C) as compared to the control *Hsp67Bc*-2 line (Fig. 1, *a–c*). The mean lifespan of *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* significantly exceeded that of the control by 35 % in males and by 34 % in females at 24–25 °C (see Fig. 1, *c*). Thus, it was 70.9 ± 1.3 days in the mutant males as compared to 52.4 ± 1.9 days in the control males ($p < 0.001$) and 63.9 ± 2.2 days in *Hsp67Bc*-0 females, compared to 47.8 ± 2.4 days in the control line ($p < 0.001$). On the contrary, the mean fecundity measured during the first month of life was 5.9 % lower ($p = 0.809$) in *Hsp67Bc*-0 females than in the control (see Fig. 1, *d*).

Because under normal conditions the absence of the *Hsp67Bc* gene increased the mean lifespan of the flies while causing only a minor decrease in fecundity, and because no cases of the loss of this gene in wild fruit fly populations have been reported to date, a question arose about the role of the *Hsp67Bc* gene in *D. melanogaster*. It is known that heat shock proteins (which include *Hsp67Bc*) are essential for stress tolerance in all the living organisms (Lindquist, 1986; Sørensen et al., 2003). In our previous study, we discovered involvement of the *Hsp67Bc* gene product in cold stress tolerance in *D. melanogaster* (Malkeyeva et al., 2020). In addition, the *Hsp67Bc* gene expression was shown to increase in response to heat stress (Vos et al., 2016). Therefore, we decided to investigate the impact of the deletion in the *Hsp67Bc* gene on elevated temperature tolerance in the flies.

The effect of heat stress on survival of *Hsp67Bc*-null larvae and pupae

According to FlyBase (<https://flybase.org>), the *Hsp67Bc* gene expression levels are the highest in wandering 3rd instar (late L3) larvae and pupae of *D. melanogaster*, in particular, white prepupae, 12 h pupae, and 48 h pupae. We decided to check how heat stress would affect *Hsp67Bc*-0 flies at those stages of development, in addition to the adult stage.

The larvae and pupae were placed in a 37 °C environment for 2 h, after which they were returned to 24–25 °C to recover and continue development. The survival rates of the larvae and pupae were computed as a proportion (%) of eclosed individuals (Fig. 2, *a*). The mean survival rates to adult stage were similar between the control and *Hsp67Bc*-null pupae, varying between 95.0 ± 2.9 % (12 h *Hsp67Bc*-0 pupae) and 100 % (48 h *Hsp67Bc*-0 pupae). Statistically significant differences were observed between the survival rates of the control and mutant flies at wandering L3 larva stage: the mutant larvae

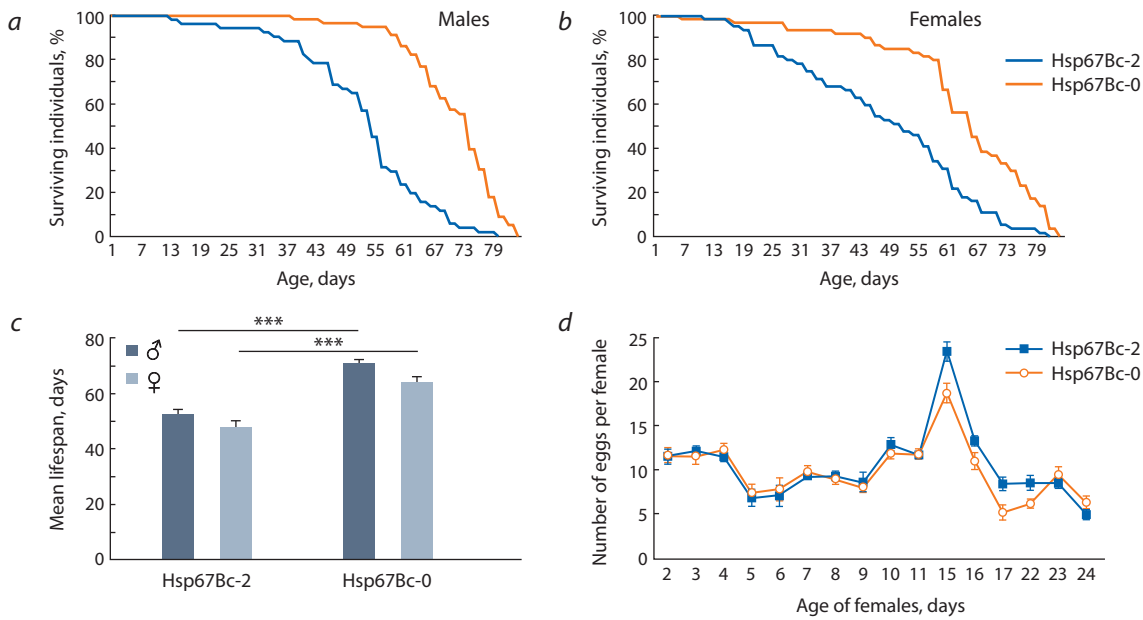


Fig. 1. The survival, lifespan, and fecundity of *Hsp67Bc*-null (*Hsp67Bc-0*) and control (*Hsp67Bc-2*) *D. melanogaster* under normal conditions (24–25 °C).

Survival curves of males (a) and females (b); the mean lifespan (c); fecundity (eggs per female) dynamics of mutant and control females throughout the first month of life (d). The error bars denote standard error of the mean (SEM). *** $p \leq 0.001$.

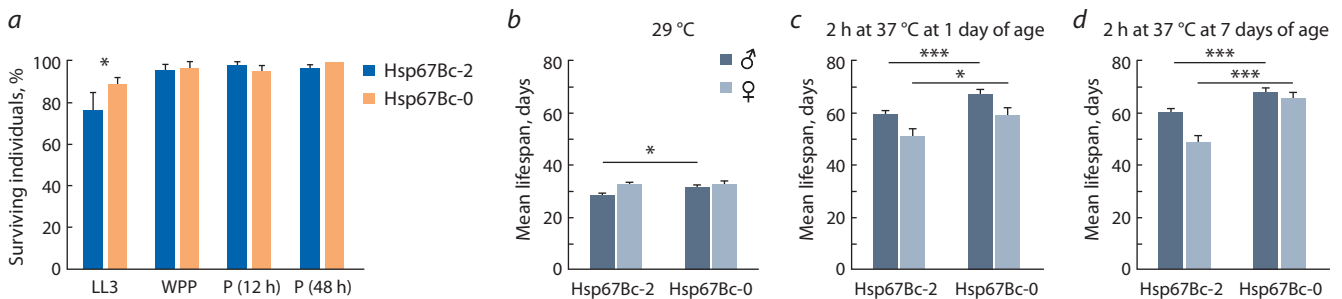


Fig. 2. Survival rates of larvae, white prepupae, and pupae of *Hsp67Bc*-null (*Hsp67Bc-0*) and control (*Hsp67Bc-2*) flies after acute heat stress (37 °C, 2 h), and the mean lifespan of adult mutant and control flies under different regimens involving heat treatment.

a, the proportion (%) of wandering L3 larvae (LL3), white prepupae (WPP), 11–13 h pupae (P (12 h)), and of 47–49 h pupae (P (48 h)) surviving to the adult stage after 2 h of heat treatment (37 °C); b, the mean lifespan of the adult males and females constantly kept at 29 °C; c, the mean lifespan of the adult flies kept at 24–25 °C after 2 h heat treatment (37 °C) at 1 day of age; d, the mean lifespan of the adult flies kept at 24–25 °C after 2 h heat treatment (37 °C) at 7 days of age. The error bars represent SEM. * $0.010 < p \leq 0.050$; *** $p \leq 0.001$.

showed higher survival rate as compared to the control line (88.9 ± 3.1 % in the *Hsp67Bc-0* line against 76.6 ± 8.3 % in the control, $p = 0.044$).

The impact of elevated temperature on *Hsp67Bc*-null adult flies

In continuation of the temperature stress experiments on larvae and pupae, *Hsp67Bc-0* and control adult flies were subjected to one of the two variants of elevated temperature treatment. The first variant was life-long maintenance at 29 °C starting from one day of age; the second variant included heat stress (2 h at 37 °C) at either one or seven days of age with subsequent maintenance at 24–25 °C until death of all individuals. The fly ages for heat stress treatment (2 h at 37 °C) were chosen based on FlyBase (<https://flybase.org>) data indicating that the *Hsp67Bc* protein levels are much higher in 1-day-old flies than in 7-day-old flies.

Constant maintenance at 29 °C significantly shortened the lifespan of both control and *Hsp67Bc*-null flies, as compared to maintenance under normal conditions (24–25 °C) without heat treatment (see Fig. 2, b, Fig. 1, c). The mean lifespan of males was 28.1 ± 0.9 days in the control line and 31.3 ± 0.8 days in the mutant line. Still, the mean lifespan of *Hsp67Bc*-null males was 11.5 % higher than that of the control line at 29 °C ($p = 0.010$), and the mutant males passed 50 % survival between days 33 and 34 of the experiment, whereas the control ones had passed it already between days 29 and 30 (Fig. 3). Females of the control line had a mean lifespan of 32.4 ± 0.7 days and *Hsp67Bc-0* females had a mean lifespan of 32.5 ± 1.1 days. Unlike males, females of the control and mutant lines had similar survival dynamics and lifespan at 29 °C (see Fig. 2, b, Fig. 3). Of note, although the mean lifespan of *Hsp67Bc*-null *Drosophila* was exceeding or equal to that of the control flies at the 29 °C environment, the re-

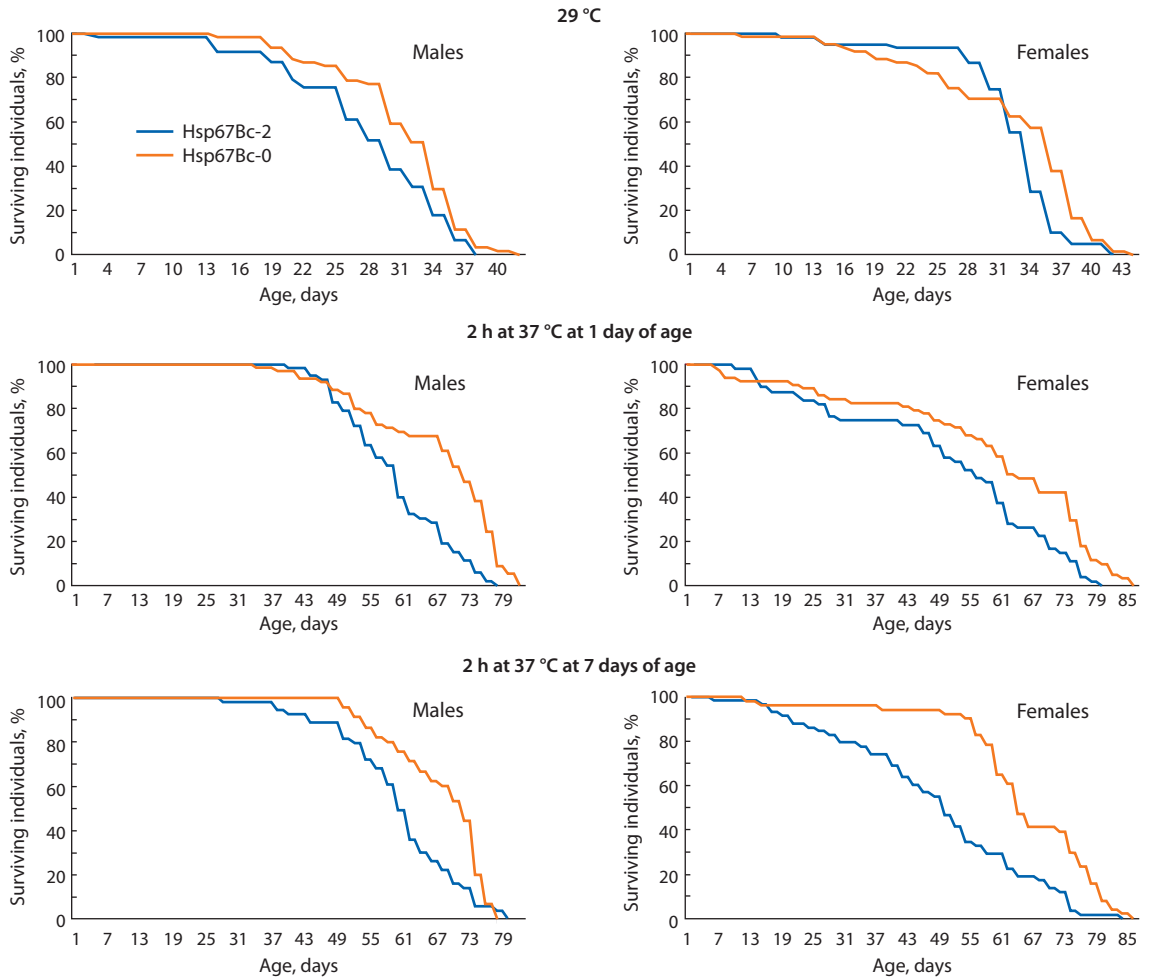


Fig. 3. Survival curves of adult *Hsp67Bc*-null (*Hsp67Bc*-0) and control (*Hsp67Bc*-2) flies kept at 29 °C or at 24–25 °C after 2 h heat treatment (37 °C) at either 1 or 7 days of age.

duction of longevity caused by maintenance at the elevated temperature (29 °C) was more prominent in the mutant flies than in the control ones. Thus, maintenance at 29 °C reduced the lifespan of *Hsp67Bc*-2 males and females 1.9-fold and 1.5-fold, respectively, as compared to normal conditions (24–25 °C) without heat stress, whereas the decline was 2.3-fold in *Hsp67Bc*-null males and 2.0-fold in *Hsp67Bc*-0 females (see Fig. 1, c, Fig. 2, b).

Heat shock (37 °C, 2 h) did not cause death in neither the control nor *Hsp67Bc*-null fly line. The mean lifespan of *Hsp67Bc*-0 flies was higher as compared to the control among both males and females at both variants of heat treatment (at one or seven days of age) (see Fig. 2, c, d). Survival dynamics also significantly differed between the lines with $p \leq 0.010$ (see Fig. 3). The mean lifespan of *Hsp67Bc*-0 males heat-treated at one or seven days of age was higher than that of the control males by ~13 % ($p < 0.001$) and was 67.0 ± 1.7 days in *Hsp67Bc*-0 males heat-shocked at one day of age and 67.9 ± 1.3 days in the mutant males heat-shocked at seven days of age (see Fig. 2, c, d). The mean lifespan of *Hsp67Bc*-null females that underwent heat stress at one day of age exceeded that of the control females by ~16 % (58.9 ± 2.8 days, $p = 0.014$); between the control and mutant females heat-treated at seven days of age, the difference in

the mean lifespan was ~35 % (65.4 ± 2.0 days, whereas that of *Hsp67Bc*-2 females was 48.5 ± 2.4 days, $p < 0.001$) (see Fig. 2, c, d). Of note, the applied heat stress (37 °C, 2 h) had a different impact on the control and *Hsp67Bc*-null flies. In comparison with the maintenance under normal conditions (24–25 °C, without treatment), it increased longevity of the control males and females by 1.5–14.5 % (see Fig. 1, c, Fig. 2, c, d). On the contrary, in the *Hsp67Bc*-0 line, heat stress at 37 °C reduced the mean lifespan of females treated at one day of age by 7.8 %, and the mean lifespan of males heat-shocked at one and seven days of age by 5.5 and 4.2 %, respectively (see Fig. 1, c, Fig. 2, c, d).

These findings may suggest that even though the *Hsp67Bc* gene deletion causes an increase in the lifespan of flies at both normal and elevated temperature, it has a detrimental effect on tolerance to acute heat stress, which normally improves the longevity of flies (Hercus et al., 2003; Le Bourg, 2011; Sarup et al., 2014).

The effect of elevated temperature on *D. melanogaster* fecundity

In parallel with lifespan and survival, we measured fecundity of the control and *Hsp67Bc*-null females as the number of eggs laid in each vial within 24 h divided by the number of

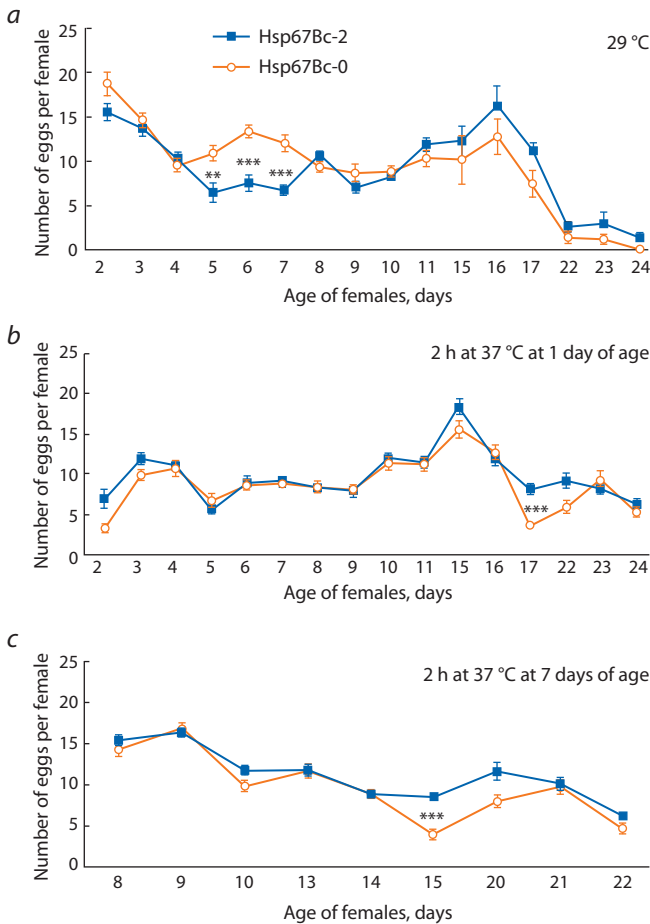


Fig. 4. Fecundity (eggs per female) measured throughout the first month of life of the *Hsp67Bc*-null (*Hsp67Bc*-0) and control (*Hsp67Bc*-2) females kept at 29 °C (a) or at 24–25 °C after 2 h heat treatment (37 °C) at either 1 day (b) or 7 days (c) of age.

The error bars denote SEM. ** 0.001 < p ≤ 0.010; *** p ≤ 0.001.

females kept in those very vials. The mean egg per female ratio calculated throughout the experiment did not statistically differ between the control and mutant lines in any of the heat treatment groups (29 °C, 2 h at 37 °C at one day of age, and 2 h at 37 °C at seven days of age). Nevertheless, *Hsp67Bc*-null females had slightly reduced fecundity as compared to the control flies after being subjected to heat shock (37 °C, 2 h). The differences between the lines were more prominent than at 24–25 °C without treatment. Thus, the mean number of eggs per female was 10.5 % lower in the mutant flies that underwent the heat treatment at one day of age as compared to the control (8.71 eggs/female in *Hsp67Bc*-0 line and 9.73 eggs/female in *Hsp67Bc*-2 line, $p = 0.564$); in the mutant flies subjected to heat stress at seven days of age, this value was 12.8 % (9.77 eggs/female in *Hsp67Bc*-0 line and 11.2 eggs/female in the control, $p = 0.427$).

The egg/female ratio measured each day significantly differed between the mutant and control lines only on some of the days of the experiment (Fig. 4). It is worth mentioning that heat shock (37 °C, 2 h) at one day of age was detrimental for the fecundity of females. The next day after the heat treatment, the number of laid eggs per female was much less than under normal conditions without treatment in both the control and

mutant lines (see Fig. 4, b, Fig. 1, d). The decrease was more prominent in *Hsp67Bc*-null flies (72 % decrease in *Hsp67Bc*-0 line as compared to 40 % reduction in the control line).

In search for the cause of the reduced mean fecundity in *Hsp67Bc*-null females kept at 24–25 °C, we analyzed the morphology of ovaries in the control and mutant lines. In the ovaries of both the control and mutant flies, egg chambers at all stages of oogenesis were present. However, the mutant females had lower number of ovarioles than the control ones. Five- and 15-day-old *Hsp67Bc*-2 females had 16.9–18.4 ovarioles per ovary, whereas *Hsp67Bc*-0 females had 14.6–16.2 ovarioles per ovary ($p = 0.680$ in case of the 5-day-old flies and $p < 0.001$ in case of the 15-day-old flies). This finding may partially explain the difference in the fecundity of the two lines.

The number of ovarioles may be influenced by nutrient deprivation in *D. melanogaster* (Sarıkaya et al., 2012). Dietary restriction stimulates macroautophagy, a process of intracellular component degradation, in regulation of which *Hsp67Bc* was shown to participate (Amano et al., 2006; Carra et al., 2010; Kroemer et al., 2010). Our recent studies on macroautophagy revealed a slight increase in autophagic vacuole number in the brain of adult *Hsp67Bc*-null flies (Malkeyeva et al., 2021). Therefore, we next decided to study the morphology of the control and *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* ovaries under the stress of protein starvation.

The impact of *Hsp67Bc* gene deletion on starvation-induced macroautophagy in *D. melanogaster* ovaries

It is known that starvation, including protein deprivation, induces macroautophagy in *Drosophila* ovaries at two nutrient status checkpoints: germarium and mid-oogenesis (Hou et al., 2008), which then leads to oogenesis slowdown and to an increase in the number of egg chambers eliminated from oogenesis (Barth et al., 2011). The discarded egg chambers degrade through apoptosis with the participation of autophagy (Bolobolova et al., 2020). To evaluate macroautophagy intensity, we used the LysoTracker Red DND-99 (LTR) dye, which had been shown to label acidic organelles, such as lysosomes and autolysosomes, in *D. melanogaster* (Scott et al., 2004; Klionsky et al., 2007). Massive acidification of the cytoplasm signifies death of forming egg chamber cells. We estimated the percentages of LTR-positive germaria in the control and *Hsp67Bc*-null flies kept on standard food and after five (Fig. 5) and 15 days of protein starvation.

As compared to the control line, in the ovaries of *Hsp67Bc*-null females kept on either the standard or protein-free medium, a higher number of LTR-positive germaria was observed (Fig. 6, see Fig. 5). During early oogenesis, the *Hsp67Bc* gene deletion resulted in a 1.2- to 1.5-fold increase in the LTR-positive-germaria proportion (see Fig. 6). Thus, in 5-day-old *Hsp67Bc*-0 females kept on the standard medium, 32.1 % of germaria were LTR-positive, relative to 21.1 % in the control *Hsp67Bc*-2 line ($p = 0.066$); in 5-day-old starved *Hsp67Bc*-null female ovaries, the percentage of LTR-positive germaria was as high as 77.9 % but was only 59.3 % in *Hsp67Bc*-2 females ($p = 0.045$). In 15-day-old *Hsp67Bc*-null females kept on the standard food, LTR-positive germaria constituted 31.1 %, whereas in the control line, this proportion was 24.3 % ($p = 0.348$); in 15-day-old starved flies, the percentages of LTR-positive germaria in ovaries were 73.3 % in the

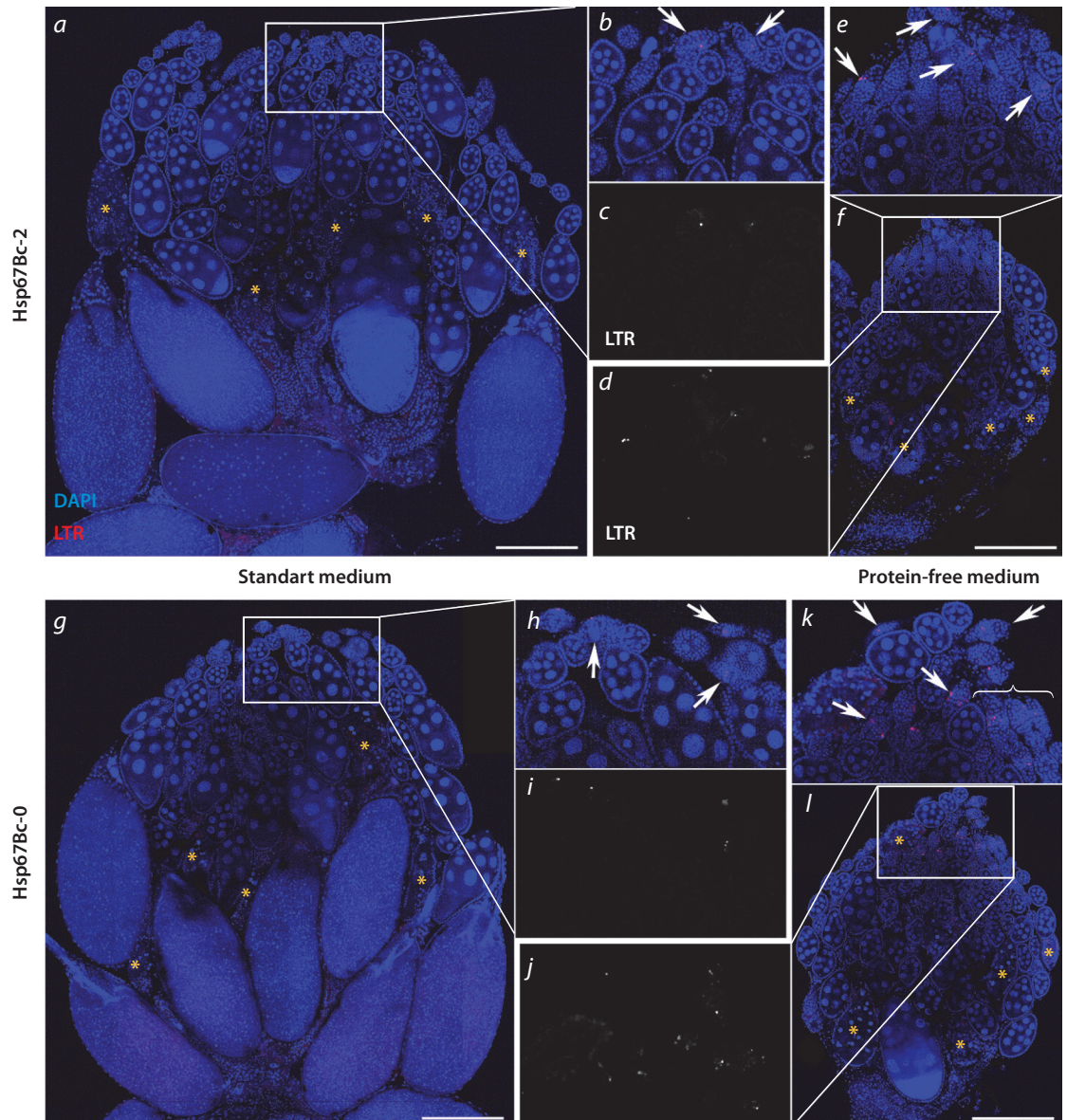


Fig. 5. LTR-labelled ovaries of *Hsp67Bc*-null (*Hsp67Bc-0*) and control (*Hsp67Bc-2*) adult *D. melanogaster* females kept on either the standard or protein-free medium for 5 days.

a, an ovary of a control female kept on the standard medium; *b*, *c*, the magnified white rectangle from panel *a* showing DAPI (blue) and LTR (red) channels (*b*) and a separate LTR channel (*c*); *d*–*f*, an ovary (*f*) of an *Hsp67Bc-2* female kept on the protein-free medium, and its magnified fragment (white rectangle from panel *f*) showing DAPI and LTR channels (*e*) and a separate LTR channel (*d*); *g*–*i*, same as *a*–*f*, for the *Hsp67Bc-0* line. Yellow asterisks denote egg chambers with highly condensed and/or fragmented nuclei; white arrows indicate LTR-positive germaria; because too many LTR-positive germaria are present in panel *k*, not all of them are indicated by arrows, and three of them are indicated by a brace. Scale bars are 200 µm.

Hsp67Bc-0 line and 60.4 % in the *Hsp67Bc-2* line ($p = 0.226$). These data reflect an increase in macroautophagy intensity in the germaria of *Hsp67Bc*-null females.

During mid-oogenesis, we noted a decrease in the number of egg chambers with highly condensed chromatin (see Fig. 5), which is a marker of apoptotic cell death, in *Hsp67Bc*-null flies in comparison with the control, except for the 5-day-old females kept on the standard medium. In 5- and 15-day-old starved and in 15-day-old normally fed *Hsp67Bc*-null flies, the mean number of apoptotic egg chambers per ovariole was slightly lower than that in the control flies, the difference being significant only in 5-day-old starved flies (Fig. 6). Thus, the

observed egg chamber apoptosis was 37 % lower in 5-day-old starved mutant females than in the control females ($p = 0.008$). In 15-day-old starved flies, the mean number of apoptotic egg chambers per ovariole was 11 % lower in the *Hsp67Bc-0* flies than that in the control individuals ($p = 0.528$); in 15-day-old females kept on the standard food, this number was 35 % lower in the mutant flies than in the *Hsp67Bc-2* line ($p = 0.131$). Although we observed a lower mean number of apoptotically dying mid-oogenesis egg chambers in *Hsp67Bc*-null flies, we can hypothesize that this phenomenon is related to the observed increased apoptosis of forming egg chambers in germaria during early oogenesis in the mutant flies.

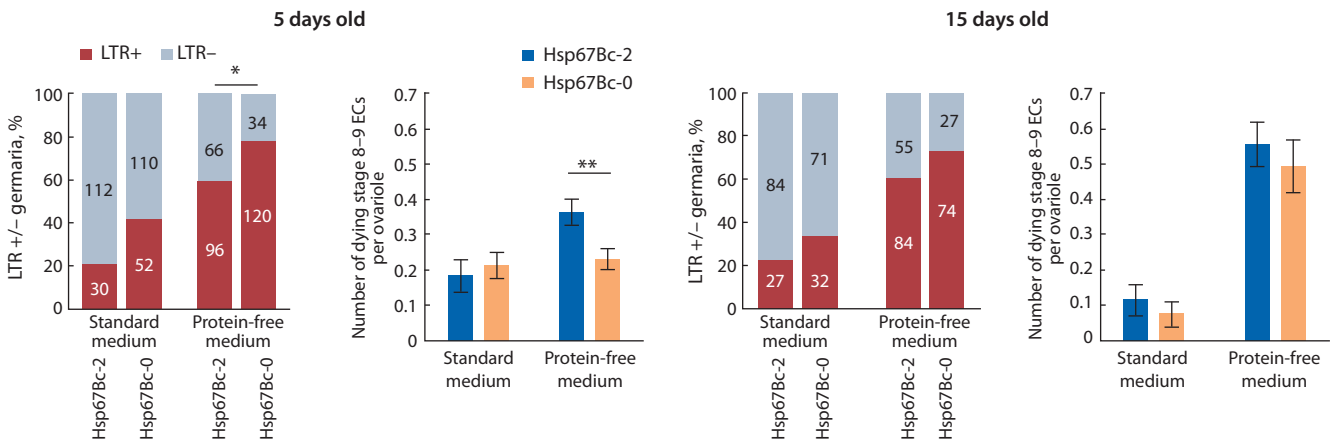


Fig. 6. Diagrams depicting ratios of LTR-positive (LTR+) and LTR-negative (LTR-) germaria and mean numbers of mid-oogenesis egg chambers (ECs) with highly condensed and/or fragmented nuclei per ovariole in the ovaries of 5- and 15-day-old mutant (*Hsp67Bc-0*) and control (*Hsp67Bc-2*) females kept on either the standard or protein-free medium.

The numerals written inside columns in the LTR+/- diagrams represent actual numbers of analyzed germaria. The error bars denote SEM. * 0.010 < *p* ≤ 0.050; ** 0.001 < *p* ≤ 0.010.

Discussion

In this study, we investigated the impact of the *Hsp67Bc* gene deletion on *D. melanogaster* fitness under normal conditions and on their heat-stress tolerance. *Hsp67Bc*-null flies showed extended lifespan as compared to the control line under normal conditions (24–25 °C), elevated temperature conditions (29 °C), and after acute heat stress (37 °C, 2 h) (see Fig. 1, Fig. 2). At the same time, the mean fecundity of the mutant females was slightly reduced at 24–25 °C without heat treatment and after the short heat stress (Fig. 1, *d*, Fig. 4, *b*, *c*).

The observed statistically insignificant decrease in *Hsp67Bc*-null female fecundity can be explained by a combination of the following factors. First, the mutants had reduced number of ovarioles, a trait that was reported by other researchers to result in lower egg yield (Yamamoto et al., 2021). Second, the quantity of LTR-positive germaria was higher in *Hsp67Bc*-null females as compared to the control line (Fig. 6), which indicates increased macroautophagy and enhanced death of forming egg chambers resulting in less eggs (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001; Nezis et al., 2009). Contrary, in the mutant females, a lower number of mid-oogenesis egg chambers dying via apoptosis was present as compared to the control flies (Fig. 6). This last feature of the mutant ovaries may partially compensate the first two in terms of eventual egg yield making the difference between the lines statistically insignificant. In *D. melanogaster*, ovariole number is determined at the stage of 3rd instar larva and can be influenced by either genetic or environmental factors, such as rearing temperature and diet (Sarikaya et al., 2012).

Nutrition plays an important role in defining the quantity of ovarioles: larvae kept on medium with reduced nutrient level develop into adult flies with less ovarioles (Sarikaya et al., 2012). The decreased ovariole number in *Hsp67Bc*-null flies reared on the standard food may be caused by impaired larva nutrition due to reduced food intake or uptake, which was not registered in our studies. Alternatively, the number of ovarioles in mutant flies could be affected by slightly increased macroautophagy, which we detected in *Hsp67Bc*-null fly germaria and, previously, in brain neurons of adult flies

with the *Hsp67Bc* gene deletion (Malkeyeva et al., 2021). It is known that macroautophagy is strongly stimulated in response to starvation (Kroemer et al., 2010); therefore, enhanced macroautophagy on larval stage caused by the absence of the *Hsp67Bc* gene product may mimic nutrient deprivation conditions leading to formation of less ovarioles. The decrease in apoptotic stage 8 egg chambers in *Hsp67Bc*-null females may be a result of increased death of forming egg chambers and, hence, enhanced quality control in the germarium resulting in less defective mid-oogenesis egg chambers in *Hsp67Bc*-null fly ovaries in comparison with the control line.

Extended longevity caused by gene mutations has been reported in *D. melanogaster*. Lifespan is increased in fruit flies carrying hypomorphic mutations in the *InR* (*insulin-like receptor*), *chico*, and *methuselah* genes (Lin et al., 1998; Clansy et al., 2001; Tatar et al., 2001). Notably, products of all these genes are involved in macroautophagy modulation via target of rapamycin (TOR) pathway (Clansy et al., 2001; Wang et al., 2015; Graze et al., 2018; Yamamoto et al., 2021), and their down-regulation leads to macroautophagy stimulation. Similarly, macroautophagy stimulation by dietary restriction or TOR kinase inhibition expands lifespan of animals belonging to various taxa (Masoro, 2000; Kapahi et al., 2004). Moreover, it was shown that longevity extension of *chico*-null *D. melanogaster* is only possible with intact macroautophagy (Bjedov et al., 2020). In this work, we discovered that the number of LTR-positive germaria was slightly higher in *Hsp67Bc*-null *D. melanogaster* ovaries (Fig. 6), which signifies increased macroautophagy. Similarly, our recent study on ultrastructure of neurons in *Wolbachia*-infected *Drosophila* brains revealed an increment in the number of autophagic vacuoles in *Hsp67Bc-0* fly neurons, which, again, points towards enhanced macroautophagy (Malkeyeva et al., 2021). Bjedov et al. (2020) demonstrated that moderate enhancement of macroautophagy in a complex of tissues increases lifespan in *D. melanogaster*, while strong and ubiquitous stimulation of macroautophagy shortens it. Hence, the extension of lifespan we observed in *Hsp67Bc*-null flies may be caused by slight increase in macroautophagy in their tissues.

Although the *Hsp67Bc*-0 flies had an increased lifespan as compared to the control line under all the tested conditions (normal temperature, elevated temperature, and short heat stress), a decline in longevity was present in the mutant flies that were heat treated in relation to untreated *Hsp67Bc*-null flies. Heat shock had the opposite effect on the control line, with acute heat stress improving the longevity of the flies. Generally, mild heat (or other stress) treatment of young adults extends *Drosophila* longevity (Hercus et al., 2003; Le Bourg, 2011; Sarup et al., 2014), as we observed in the control flies. Our experiments with 2–12 h cold treatment of *Hsp67Bc*-null fly line revealed a decreased cold stress tolerance in the mutants (Malkeyeva et al., 2020). Taken together, our results point towards an adverse impact of the *Hsp67Bc* gene deletion on short temperature stress tolerance in adult *D. melanogaster*. While in the laboratory environment flies are rarely exposed to thermal and other stresses, conditions are different in the *D. melanogaster* natural habitat, where fruit flies may experience a wide variety of extreme stresses including heat shock and chill coma. Therefore, an extended lifespan under normal conditions does not guarantee survival in the wild, as was revealed in a study by Wit et al. (2013). It is important for the survival of poikilothermic animals like *Drosophila* to be able to cope with thermal stresses. Hence, the loss of the *Hsp67Bc* gene, the product of which promotes tolerance to acute thermal stresses, though extending lifespan under normal conditions, may be deleterious in a changing environment. Taking into account that *D. melanogaster* overwinter at the adult stage in temperate regions (Izquierdo, 1991), we assume that the *Hsp67Bc* gene was not eliminated from the fruit fly genome because of its prominent role in promoting acute heat and cold tolerance in adult flies.

Conclusion

Here, we studied the effect of the *Hsp67Bc* gene deletion on *D. melanogaster* lifespan and fecundity under normal conditions, and their tolerance to elevated temperature and acute heat stress. We did not detect any difference in survival of heat-shocked (37 °C, 2 h) pupae between the mutant and control lines, and the *Hsp67Bc*-null larvae showed improved survival. Adult *Hsp67Bc*-null flies had a greater lifespan than the control line at all the tested temperature regimes but lower fecundity and decreased acute heat tolerance. We hypothesize that the lifespan extension is caused by slightly increased macroautophagy in the mutant flies, which we observed in ovaries of *Hsp67Bc*-deficient *Drosophila* and – in our earlier work – in the brains of *Hsp67Bc*-null females. At the same time, the enhanced macroautophagy in germlaria, combined with a reduced number of ovarioles, may be the cause of the fecundity reduction in the mutant flies. In conclusion, although the *Hsp67Bc* gene deletion causes the increase in *D. melanogaster* lifespan in a stress-free environment, it has a negative effect on fruit fly acute heat stress tolerance, which may negate the longevity benefits in nature habitat, where stresses like extremely high and low temperature are common.

References

Amano A., Nakagawa I., Yoshimori T. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J. Biochem.* 2006;140(2):161-166. DOI 10.1093/jb/mvj162.

- Bainbridge S.P., Bownes M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1981;66:57-80.
- Barth J.M.I., Szabad J., Hafen E., Köhler K. Autophagy in *Drosophila* ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis. *Cell Death Differ.* 2011;18:915-924. DOI 10.1038/cdd.2010.157.
- Bjedov I., Cochemé H.M., Foley A., Wieser D., Woodling N.S., Castillo-Quan J.I., Norvaisas P., Lujan C., Regan J.C., Toivonen J.M., Murphy M.P., Thornton J., Kinghorn K.J., Neufeld T.P., Cabreiro F., Partridge L. Fine-tuning autophagy maximises lifespan and is associated with changes in mitochondrial gene expression in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2020;16:e1009083. DOI 10.1371/journal.pgen.1009083.
- Bolobolova E.U., Dorogova N.V., Fedorova S.A. Major scenarios of genetically regulated cell death during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Russ. J. Genet.* 2020;56:655-665. DOI 10.1134/S1022795420060034.
- Carra S., Boncoraglio A., Kanon B., Brunsting J.F., Minoia M., Rana A., Vos M.J., Seidel K., Sibon O.C., Kampinga H.H. Identification of the *Drosophila* ortholog of HSPB8. *J. Biol. Chem.* 2010;285:37811-37822. DOI 10.1074/jbc.M110.127498.
- Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leivers S.J., Partridge L. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science.* 2001;292(5514):104-106. DOI 10.1126/science.1057991.
- Drummond-Barbosa D., Spradling A.C. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 2001;231(1):265-278. DOI 10.1006/dbio.2000.0135.
- Graze R.M., Tzeng R.-Y., Howard T.S., Arbeitman M.N. Perturbation of IIS/TOR signaling alters the landscape of sex-differential gene expression in *Drosophila*. *BMC Genom.* 2018;19:893. DOI 10.1186/s12864-018-5308-3.
- Hercus M.J., Loeschcke V., Rattan S.I.S. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology.* 2003;4:149-156. DOI 10.1023/A:1024197806855.
- Hou Y.-C.C., Chittaranjan S., Barbosa S.G., McCall K., Gorski S.M. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol.* 2008;182:1127-1139. DOI 10.1083/jcb.200712091.
- Izquierdo J.I. How does *Drosophila melanogaster* overwinter? *Entomol. Exp. Appl.* 1991;59:51-58. DOI 10.1111/j.1570-7458.1991.tb01485.x.
- Jolly C., Morimoto R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2000;92(19):1564-1572. DOI 10.1093/jnci/92.19.1564.
- Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A., Cheetham M.E., Chen B., Hightower L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14:105-111. DOI 10.1007/s12192-008-0068-7.
- Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* 2004;14(10):885-890. DOI 10.1016/j.cub.2004.03.059.
- Klionsky D.J., Cuervo A.M., Seglen P.O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy.* 2007;3(3):181-206. DOI 10.4161/auto.3678.
- Kroemer G., Mariño G., Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell.* 2010;40(2):280-293. DOI 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
- Le Bourg É. Using *Drosophila melanogaster* to study the positive effects of mild stress on aging. *Exp. Gerontol.* 2011;46:345-348. DOI 10.1016/j.exger.2010.08.003.
- Lin Y.-J., Seroude L., Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science.* 1998;282(5390):943-946. DOI 10.1126/science.282.5390.943.
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:1151-1191. DOI 10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.
- Malkeyeva D., Kiseleva E., Fedorova S. Small heat shock protein *Hsp67Bc* plays a significant role in *Drosophila melanogaster* cold-

- stress tolerance. *J. Exp. Biol.* 2020;223(Pt.21):jeb219592. DOI 10.1242/jeb.219592.
- Malkeyeva D.A., Kiseleva E.V., Fedorova S.A. Loss of *Hsp67Bc* leads to autolysosome enlargement in the *Drosophila* brain. *Cell Biol. Int.* 2021. DOI 10.1002/cbin.11721.
- Masoro E.J. Caloric restriction and aging: an update. *Exp. Gerontol.* 2000;35:299-305. DOI 10.1016/S0531-5565(00)00084-X.
- Nezis I.P., Lamark T., Velentzas A.D., Rusten T.E., Bjørkøy G., Johansen T., Papassideri I.S., Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Stenmark H., Brech A. Cell death during *Drosophila melanogaster* early oogenesis is mediated through autophagy. *Autophagy.* 2009;5: 298-302. DOI 10.4161/auto.5.3.7454.
- Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;20(3): 460-473. DOI 10.1089/ars.2013.5371.
- Raut S., Mallik B., Parichha A., Amrutha V., Sahi C., Kumar V. RNAi-mediated reverse genetic screen identified *Drosophila* chaperones regulating eye and neuromuscular junction morphology. *G3: Genes Genomes Genetics. (Bethesda).* 2017;7(7):2023-2038. DOI 10.1534/g3.117.041632.
- Sarikaya D.P., Belay A.A., Ahuja A., Dorta A., Green D.A., Extavour C.G. The roles of cell size and cell number in determining ovariole number in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 2012;363:279-289. DOI 10.1016/j.ydbio.2011.12.017.
- Sarkar S., Singh M.D., Yadav R., Arunkumar K.P., Pittman G.W. Heat shock proteins: molecules with assorted functions. *Front. Biol. (Beijing).* 2011;6(4):312. DOI 10.1007/s11515-011-1080-3.
- Sarup P., Sørensen P., Loeschcke V. The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan. *Exp. Gerontol.* 2014;50:34-39. DOI 10.1016/j.exger.2013.11.017.
- Scott R.C., Schuldiner O., Neufeld T.P. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell.* 2004;7(2):167-178. DOI 10.1016/j.devcel.2004.07.009.
- Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 2003;6:1025-1037. DOI 10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x.
- Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.-P., Yin C.-M., Garofalo R.S. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science.* 2001;292(5514): 107-110. DOI 10.1126/science.1057987.
- Vos M.J., Carra S., Kanon B., Bosveld F., Klauke K., Sibon O.C.M., Kampinga H.H. Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan. *Aging Cell.* 2016;15:217-226. DOI 10.1111/acel.12422.
- Wang J., Wang Z., Zhang Z., Hua Q., Wang M., Shi C., Xue L., Zhang R., Xie X. *Methuselah* regulates longevity via dTOR: a pathway revealed by small-molecule ligands. *J. Mol. Cell Biol.* 2015; 7:280-282. DOI 10.1093/jmcb/mjv018.
- Wit J., Kristensen T.N., Sarup P., Frydenberg J., Loeschcke V. Laboratory selection for increased longevity in *Drosophila melanogaster* reduces field performance. *Exp. Gerontol.* 2013;48:1189-1195. DOI 10.1016/j.exger.2013.07.012.
- Yamamoto R., Palmer M., Koski H., Curtis-Joseph N., Tatar M. Aging modulated by the *Drosophila* insulin receptor through distinct structure-defined mechanisms. *Genetics.* 2021;217(2):iyaa037. DOI 10.1093/genetics/iyaa037.

ORCID ID

D. Malkeyeva orcid.org/0000-0002-7308-8846
S.A. Fedorova orcid.org/0000-0001-8257-4654
E. Kiseleva orcid.org/0000-0001-6949-182X

Acknowledgements. LTR analyses were performed at the Multiple-access Center for Microscopy of Biological Objects (Institute of Cytology and Genetics SB RAS). This work was supported by budget project No. 0259-2021-0011.

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

Received November 19, 2021. Revised December 30, 2021. Accepted January 10, 2022.

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

Роль генов воспалительного ответа организма в формировании индивидуальных различий в уровне невербального интеллекта

Р.Ф. Еникеева^{1, 2}, А.В. Казанцева^{1, 2}, Ю.Д. Давыдова^{1, 2}, Р.Н. Мустафин^{2, 3}, З.Р. Тахирова², С.Б. Малых^{4, 5}, Ю.В. Ковас^{2, 6}, Э.К. Хуснутдинова^{1, 2, 5}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, кафедра генетики и фундаментальной медицины, лаборатория нейрокогнитивной геномики, Уфа, Россия

³ Башкирский государственный медицинский университет, кафедра медицинской генетики и фундаментальной медицины, Уфа, Россия

⁴ Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет психологии, Москва, Россия

⁶ Голдсмит, Лондонский университет, международная лаборатория междисциплинарных исследований индивидуальных различий в обучении, департамент психологии, Лондон, Великобритания

✉ Kazantsa@mail.ru; Enikeevarf@gmail.com

Аннотация. Невербальный интеллект – один из компонентов когнитивных функций мозга, использующий визуальные образы и невербальные методы для решения поставленных задач. Особую роль в развитии индивидуальных различий в уровне когнитивных функций мозга отводят взаимодействию нервной и иммунной систем. Гены, кодирующие про- и противовоспалительные цитокины, могут являться кандидатами при изучении невербального интеллекта. Проведен анализ ассоциаций шести локусов генов, белковые продукты которых принимают участие в регуляции воспалительного ответа в центральной нервной системе: *CRP* (rs3093077), *IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs116944), *TNF/LTA* (rs1041981, rs1800629), *P2RX7* (rs2230912), с уровнем невербального интеллекта у здоровых индивидов без когнитивных нарушений в возрасте 18–25 лет с включением половой, этнической принадлежности и наличия «рискового» аллеля ε4 гена *APOE* в качестве ковариат. С учетом важной роли средовых факторов, влияющих на формирование когнитивных функций мозга в целом и невербального интеллекта в частности, осуществлен анализ ген-средовых (G×E) взаимодействий. В результате статистического анализа показано, что полиморфные варианты rs1041981 и rs1800629 гена фактора некроза опухоли альфа (*TNF*) ассоциированы с фенотипическими вариациями в показателе невербального интеллекта на уровне гаплотипов (для гаплотипа AA: $\beta_{ST} = 1.19$; $p = 0.033$; $p_{perm} = 0.047$) в группе носителей «рискового» варианта ε4 гена *APOE*. Построены модели ген-средовых взаимодействий, детерминирующие межличностные различия в уровне невербального интеллекта: число детей в семье и табакокурение модулируют ассоциацию вариантов генов *TNF/LTA* (rs1041981) ($\beta = 2.08$; $\beta_{ST} = 0.16$; $p = 0.001$) и *P2RX7* (rs2230912) ($\beta = -1.70$; $\beta_{ST} = -0.10$; $p = 0.022$) с уровнем невербального интеллекта. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффект гена *TNF/LTA* на формирование особенностей когнитивной сферы наблюдается только в случае наличия «неблагоприятного» варианта гена *APOE* и при сочетании определенных социальных факторов. Ключевые слова: невербальный интеллект; когнитивные функции; однонуклеотидный полиморфный локус; анализ ассоциаций; микроглия; воспалительный ответ.

Для цитирования: Еникеева Р.Ф., Казанцева А.В., Давыдова Ю.Д., Мустафин Р.Н., Тахирова З.Р., Малых С.Б., Ковас Ю.В., Хуснутдинова Э.К. Роль генов воспалительного ответа организма в формировании индивидуальных различий в уровне невербального интеллекта. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):179-187. DOI 10.18699/VJGB-22-22

The role of inflammatory system genes in individual differences in nonverbal intelligence

R.F. Enikeeva^{1, 2}, A.V. Kazantseva^{1, 2}, Yu.D. Davydova^{1, 2}, R.N. Mustafin^{2, 3}, Z.R. Takhirova², S.B. Malych^{4, 5}, Y.V. Kovas^{2, 6}, E.K. Khusnutdinova^{1, 2, 5}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Bashkir State University, Department of genetics and fundamental medicine, Laboratory of neurocognitive genomics, Ufa, Russia

³ Bashkir State Medical University, Department of medical genetics and fundamental medicine, Ufa, Russia

⁴ Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Department of psychology, Moscow, Russia

⁶ Goldsmiths, University of London, Department of psychology, London, United Kingdom

✉ Kazantsa@mail.ru; Enikeevarf@gmail.com

Abstract. Nonverbal intelligence represents one of the components of brain cognitive functions, which uses visual images and nonverbal approaches for solving required tasks. Interaction between the nervous and immune systems plays a specific role in individual differences in brain cognitive functions. Therefore, the genes encoding pro- and anti-

inflammatory cytokines are prospective candidate genes in the study of nonverbal intelligence. Within the framework of the present study, we conducted the association analysis of six SNPs in the genes that encode proteins involved in inflammatory response regulation in the central nervous system (*CRP* rs3093077, *IL1A* rs1800587, *IL1B* rs16944, *TNF/LTA* rs1041981, rs1800629, and *P2RX7* rs2230912), with nonverbal intelligence in mentally healthy young adults aged 18–25 years without cognitive decline with inclusion of sex, ethnicity and the presence of the “risky” *APOE* $\epsilon 4$ allele as covariates. Considering an important role of environmental factors in the development of brain cognitive functions in general and nonverbal intelligence in particular, we conducted an analysis of gene-by-environment ($G \times E$) interactions. As a result of a statistical analysis, rs1041981 and rs1800629 in the tumor necrosis factor gene (*TNF*) were shown to be associated with a phenotypic variance in nonverbal intelligence at the haplotype level (for AA-haplotype: $\beta_{ST} = 1.19$; $p = 0.033$; $p_{perm} = 0.047$) in carriers of the “risky” *APOE* $\epsilon 4$ allele. Gene-by-environment interaction models, which determined interindividual differences in nonverbal intelligence, have been constructed: sibship size (number of children in a family) and smoking demonstrated a modulating effect on association of the *TNF/LTA* (rs1041981) ($\beta = 2.08$; $\beta_{ST} = 0.16$; $p = 0.001$) and *P2RX7* (rs2230912) ($\beta = -1.70$; $\beta_{ST} = -0.10$; $p = 0.022$) gene polymorphisms with nonverbal intelligence. The data obtained indicate that the effect of *TNF/LTA* on the development of cognitive functions is evident only in the presence of the “unfavorable” *APOE* $\epsilon 4$ variant and/or certain environmental conditions. Key words: nonverbal intelligence; cognitive functions; single nucleotide polymorphism (SNP); association analysis; microglia; inflammatory response.

For citation: Enikeeva R.F., Kazantseva A.V., Davydova Yu.D., Mustafin R.N., Takhirova Z.R., Malykh S.B., Kovas Y.V., Khusnutdinova E.K. The role of inflammatory system genes in individual differences in nonverbal intelligence. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):179-187. DOI 10.18699/VJGB-22-22

Введение

Понимание природы когнитивного развития человека – актуальная проблема современной психогенетики. Повышение эффективности процесса обучения на любом возрастном этапе напрямую зависит от знания закономерностей развития когнитивных функций мозга и факторов, детерминирующих этот процесс. Одним из компонентов когнитивных функций мозга является невербальный интеллект – показатель когнитивного развития, который подразумевает под собой способность человека использовать стратегии решения проблем и манипулировать визуальной информацией без применения вербальных навыков (Kuschner, 2013). В свою очередь, к вербальному интеллекту относятся языковые навыки, формирование рецептивной и экспрессивной речи, объем словарного запаса, способность к вербальным абстрактным рассуждениям (Dawson, 2013). Необходимо отметить существование различий в функциональной архитектуре головного мозга, связанных с применением вербальных и невербальных навыков (Feklicheva et al., 2021).

В настоящее время наиболее оправданным считается подход к изучению невербального интеллекта с биологической точки зрения (Vyshedskiy et al., 2017), в связи с чем предполагается, что индивидуальные различия в показателях интеллектуального развития объясняются действием ряда физиологических факторов (анатомо-физиологических особенностей мозга, особенностей сигнальных систем и т. д.) (Li et al., 2009), на которые существенное влияние оказывает геном индивида (Mustafin et al., 2020). Разные социодемографические особенности играют не менее важную роль в формировании различий в показателе невербального интеллекта на индивидуальном уровне (Francic et al., 2014).

Медиаторы воспаления относятся к одной из перспективных и малоизученных в отношении невербального интеллекта биологических систем. Единственными клетками иммунной системы в паренхиме центральной нервной системы (ЦНС) являются клетки микроглии, выполняющие функции резидентных макрофагов (Kierdorf, Prinz,

2017). Микроглиальные клетки в зрелом мозге, помимо барьерной функции, могут продуцировать различные нейротрофические факторы, такие как BDNF (нейротрофический фактор головного мозга) и GDNF (нейротрофический фактор глиальных клеток) (Parkhurst et al., 2013). Кроме того, современные исследования сообщают о том, что микроглиальные клетки имеют рецепторы нейромедиаторов, нейропептидов и нейромодуляторов (Алексеева и др., 2019), что свидетельствует о связи между микроглией и нейрональной активностью, указывая на перспективность изучения системы медиаторов воспаления в контексте когнитивных функций мозга в целом и невербального интеллекта в частности. Таким образом, гены, отвечающие за регуляцию активации и деактивации микроглиальных клеток, могут опосредовать формирование уровня невербального интеллекта.

Важная функция микроглии – поддержание баланса про- и противовоспалительных процессов в интактном мозге. Такой баланс достигается путем продуцирования микроглией противовоспалительных цитокинов: С-реактивного белка (CRP), интерлейкина 1 α (IL1 α), интерлейкина 1 β (IL1 β), фактора некроза опухолей альфа (TNF α). Нарушение баланса в работе микроглиальных клеток может приводить к накоплению цитокинов в ЦНС (Ferro et al., 2021), что является одной из причин повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Нарушение интеграции ГЭБ способствует инфильтрации ЦНС лейкоцитами и нейровоспалению, которое может переходить в хроническую форму и приводить к нарушению синаптической пластичности нейронов, уменьшению количества синаптических соединений и нейродегенеративным процессам (Haruwaka et al., 2019). Еще один, не менее важный участник регуляции воспалительного ответа – пуринергические рецепторы. Так, активация микроглии в ЦНС осуществляется посредством пуринергической передачи сигналов (Franke et al., 2007). Согласно литературным данным, активация пуринергического рецептора P2X7 инициирует врожденный иммунитет, способствуя повышению концентрации провоспалительных цитокинов

(преимущественно IL-1 β и IL-18) в ЦНС, что приводит к усилению воспаления и/или гибели нервных клеток у различных видов животных и человека (Lister et al., 2007).

К дополнительным генетическим факторам риска развития нарушений когнитивного функционирования можно также отнести наличие аллеля $\epsilon 4$ в гене аполипопротеина Е (*APOE*), который, в соответствии с литературными данными, ассоциирован с риском развития нейродегенеративных заболеваний (Emrani et al., 2020), старением и долголетием (Erdman et al., 2016). Белок *APOE* имеет три изоформы, E2, E3 и E4, кодируемые аллелями $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$ соответственно. Все больше данных свидетельствует о том, что *APOE* снижает воспаление в ЦНС изоформ-специфическим образом: изоформы $\epsilon 2$ и $\epsilon 3$ обладают противовоспалительными и протективными свойствами, а изоформа $\epsilon 4$ проявляет низкую противовоспалительную активность (Lanfranco et al., 2021). Кроме того, мыши, у которых отсутствует ген *APOE*, демонстрируют повышенное количество провоспалительных цитокинов в ЦНС (Vitek et al., 2009), что подтверждает то, что присутствие *APOE* регулирует иммунную функцию. Таким образом, существует прямая связь между влиянием *APOE* на функционирование микроглиальных клеток и выработкой цитокинов.

Опубликованные данные указывают на функциональную значимость полиморфных локусов rs1800629 (с.-488G>A) и rs1041981 (с.179C>A или Thr60Asn) в гене *TNF/LTA* (Hameed et al., 2018), rs2230912 (с.1379A>G или Gln460Arg) в гене *P2RX7* (Winham et al., 2019), rs1800587 (-889C>T) в промоторном регионе гена *IL1A* (Dominici et al., 2002), rs16944 (-511T>C) в гене *IL1B* (Tayel et al., 2018), свидетельствуя об ассоциации их аллельных вариантов с изменением экспрессии соответствующих генов. Кроме того, полногеномный анализ ассоциаций уровня С-реактивного белка позволил выявить локус rs3093077 в гене *CRP* в большой когорте здоровых индивидов (Naitza et al., 2012).

С учетом функциональной роли отмеченных полиморфных вариантов генов, ответственных за регуляцию воспалительного ответа в ЦНС, впервые проведен анализ ассоциаций локусов генов *CRP* (rs3093077), *IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *TNF/LTA* (rs1041981, rs1800629), *P2RX7* (rs2230912) с межличностными различиями в уровне невербального интеллекта. Проанализирован также возможный модулирующий эффект аллеля $\epsilon 4$ гена *APOE* (который определяется вариантами локусов rs7412, rs429358) и ряда социодемографических параметров на ассоциацию генов системы медиаторов воспаления организма с уровнем невербального интеллекта.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 1011 индивидов (80 % женского пола; средний возраст составил 19.79 ± 1.69 года) различной этнической принадлежности: 535 русских, 231 татарин, 160 удмуртов и 85 лиц смешанной этнической принадлежности. Все испытуемые на момент участия в исследовании являлись студентами вузов Российской Федерации, не состояли на учете у психиатра и/или нарколога. От всех участников получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Дизайн

настоящего исследования был одобрен биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики УФИЦ РАН.

Уровень невербального интеллекта испытуемых был измерен при помощи черно-белого варианта теста «Прогрессивные матрицы Равена» (Raven, 2000), являющегося незаменимым и широко используемым инструментом диагностики данного когнитивного конструкта, обладающего высокой валидностью и воспроизводимостью результатов (Feklicheva et al., 2021). Суть этой методики заключается в том, что испытуемому предъявляются рисунки с фигурами, связанными между собой определенной зависимостью. Одной фигуры недостает, и испытуемому требуется выбрать какую-либо из представленных шести-восьми фигур. Задача испытуемого – установить закономерность, связывающую между собой фигуры на рисунке, и выбрать искомую фигуру из предлагаемых вариантов. Тест состоит из 60 таблиц (пять серий). Сложность заданий нарастает с увеличением номера серии и номера задания в каждой серии таблиц.

Для оценки модулирующего эффекта ряда социально-демографических параметров, ранее продемонстрировавших влияние на развитие когнитивных способностей, у испытуемых была собрана информация, включающая национальную принадлежность до трех поколений, порядок рождения и количество детей в семье, статус курения, особенности воспитания, наличие у близких родственников отягощенности по психическим заболеваниям, знание своего родного языка (башкирского, татарского, удмуртского и др.). Информация о стиле воспитания включала в себя такие вопросы о детско-родительских отношениях в семье, как эпизоды плохого обращения в детстве, воспитание в полной/неполной семье, материальное положение семьи, возраст матери при рождении ребенка.

В качестве материала для исследования служили образцы ДНК, выделенные из венозной крови по методу фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов *IL1b* (rs16944), *IL1A* (rs1800587), *CRP* (rs3093077), *TNF α* (rs1041981, rs1800629), *P2RX7* (rs2230912), *APOE* (rs7412, rs429358) осуществляли с помощью ПЦР с флуоресцентной детекцией по методу KASP. Детекцию выполняли на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке. Генотипы в гене *APOE* были сгруппированы на основании наличия аллелей $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$.

Оценку частот аллелей и генотипов проводили при помощи теста Харди–Вайнберга. Проверку на подчинение данных теста «прогрессивные матрицы Равена» распределению Гаусса выполняли с использованием *W*-теста Шапиро–Уилка. Для оценки основного эффекта полиморфных локусов генов-кандидатов и ген-средовых взаимодействий ($G \times E$) в вариации уровня невербального интеллекта был проведен линейный регрессионный анализ. В качестве независимых переменных в $G \times E$ анализе выступали генотипы и ряд социальных параметров, а зависимой переменной – уровень невербального интеллекта. Статистический анализ включал проверку нескольких моделей линейной регрессии (аддитивной, доминантной, рецессивной), ковариатами выступали половая и этническая принадлежность и наличие «рискового» аллеля $\epsilon 4$ *APOE*. Коррекция

на множественность сравнений выполнена с помощью процедуры FDR (false discovery rate) или пермутации (10000) в случае анализа гаплотипов. Статистический анализ осуществлен с использованием программ PLINK v.1.09, R, SPSS Statistics 23.0. Визуализация проведена в среде R.

Результаты

В исследовании проанализирована вовлеченность восьми полиморфных локусов в шести генах: *CRP* (rs3093077), *IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *TNF/LTA* (rs1041981, rs1800629), *P2RX7* (rs2230912), *APOE* (rs7412, rs429358), участвующих в регуляции системы воспалительного ответа организма, в формировании различий в уровне невербального интеллекта у психически здоровых индивидов. Согласно *W*-тесту Шапиро–Уилка, показатели уровня невербального интеллекта подчинялись нормальному распределению ($p > 0.05$). Распределение аллелей и генотипов всех изученных полиморфных локусов соответствовало распределению Харди–Вайнберга ($p > 0.05$). Анализ распределения частот аллелей и генотипов между различными этническими группами не показал статистически значимых различий ($p > 0.05$), в связи с чем последующую статистическую обработку осуществляли в общей выборке с принятым включением половой и этнической принадлежности в качестве ковариат, а также среди мужчин и женщин по отдельности.

Статистический анализ ассоциаций восьми полиморфных локусов в шести генах, ответственных за регуляцию системы воспалительного ответа организма с невербальным интеллектом, проведенный при помощи метода линейной регрессии, показал ассоциацию полиморфных локусов rs1800629 (для аддитивной модели: $\beta_{ST} = 0.15$; $p = 0.022$; $p_{FDR} = 0.137$; для доминантной модели: $\beta_{ST} = 0.16$; $p = 0.019$; $p_{FDR} = 0.059$) и rs1041981 (для доминантной мо-

дели: $\beta_{ST} = 0.16$; $p = 0.019$; $p_{FDR} = 0.059$) в гене *TNF* с различиями в уровне невербального интеллекта среди индивидов–носителей «рискового» варианта $\epsilon 4$ в гене *APOE* (см. таблицу, рис. 1, в, е). Однако после введения поправки на множественность сравнений эта ассоциация осталась лишь на уровне тенденции. В частности, у носителей минорного аллеля А полиморфных локусов rs1800629 и rs1041981 наблюдалось повышение уровня невербального интеллекта по сравнению с носителями генотипов G/G и C/C (соответственно) на уровне тенденции, которая отмечается лишь в условиях генетически-детерминированной низкой противовоспалительной активности (аллеля $\epsilon 4$ в гене *APOE*). В группе мужчин обнаруженная ассоциация локусов в гене *TNF* с невербальным интеллектом осталась статистически незначимой после FDR-коррекции (см. таблицу, рис. 1, б, д).

Проведенный нами анализ неравновесия по сцеплению между локусами rs1800629 и rs1041981 в гене *TNF* выявил наличие сцепления между ними ($D' = 0.741$, $r^2 = 0.235$), в связи с чем был выполнен гаплотипический анализ. Частоты гаплотипов в гене *TNF* (на основе rs1041981, rs1800629) были следующие: AA – 0.094, CA – 0.023, AG – 0.143, CG – 0.740. В результате гаплотипического анализа обнаружена ассоциация гаплотипа *TNF**AA (rs1041981, rs1800629) ($\beta_{ST} = 1.19$; $p = 0.033$; $p_{perm} = 0.047$) с повышенными показателями невербального интеллекта у индивидов без когнитивных нарушений, которая осталась значимой после поправки на множественность сравнений.

В настоящей работе также проведено исследование ген-средовых взаимодействий, включающее анализ эффектов 14 социомографических параметров. Выявлено, что количество детей в семье оказывает эффект на формируемые ассоциации полиморфного варианта rs1041981 в гене *TNF* ($\beta = 2.08$; $\beta_{ST} = 0.16$; $p = 0.001$). Так, показано, что носите-

Изученные полиморфные локусы, тест Харди–Вайнберга и результаты линейного регрессионного анализа ассоциации генов с невербальным интеллектом в общей группе и подгруппах

Ген	SNP	Аллели ^а	MAF	p_{HWE}	Общая выборка		Женщины		Мужчины		<i>APOE</i> $\epsilon 4+$		<i>APOE</i> $\epsilon 4-$	
					β_{ST}	p	β_{ST}	p	β_{ST}	p	β_{ST}	p	β_{ST}	p
<i>IL1b</i>	rs16944	A/G	0.374	0.945	0.02	0.545	0.04	0.275	-0.07	0.366	0.07	0.306	< 0.01	0.913
					0.03	0.427	0.04	0.280	-0.02	0.762	0.02	0.718	0.02	0.652
<i>IL1A</i>	rs1800587	A/G	0.285	0.395	-0.01	0.827	-0.01	0.810	< -0.01	0.991	0.10	0.134	-0.04	0.323
					< 0.01	0.977	< -0.01	0.889	0.03	0.641	0.09	0.154	-0.03	0.437
<i>CRP</i>	rs3093077	G/T	0.105	0.052	-0.01	0.801	-0.01	0.834	-0.01	0.867	< -0.01	0.955	-0.01	0.746
					-0.02	0.566	-0.03	0.389	0.03	0.708	-0.02	0.712	-0.01	0.738
<i>TNF</i>	rs1041981	A/C	0.234	0.157	0.01	0.555	< -0.01	0.941	0.11	0.150	0.10	0.130	-0.01	0.771
					0.03	0.405	< 0.01	0.996	0.014	0.051	0.16	0.019^d	< -0.01	0.953
					0.02	0.486	-0.02	0.625	0.20	0.008^b	0.15	0.022^e	-0.021	0.588
	rs1800629	A/G	0.118	0.448	0.03	0.356	< -0.01	0.869	0.19	0.009^c	0.16	0.019^d	< -0.01	0.797
<i>P2RX7</i>	rs2230912	G/A	0.191	0.299	-0.03	0.403	-0.03	0.429	-0.03	0.702	0.02	0.736	-0.05	0.239
					< -0.01	0.946	-0.01	0.755	0.04	0.611	0.04	0.548	-0.01	0.685

Примечание. p_{HWE} – p -value для теста Харди–Вайнберга; MAF – частота минорного аллеля; β_{ST} – стандартизованный коэффициент регрессии; p – p -value. В верхней строчке для каждого полиморфного варианта указаны результаты параметров для аддитивной модели, в нижней – для доминантной модели. Статистически значимые различия выделены жирным шрифтом. ^а Минорный/мажорный аллели; ^б $p_{FDR} = 0.051$; ^с $p_{FDR} = 0.058$; ^д $p_{FDR} = 0.059$; ^е $p_{FDR} = 0.137$.

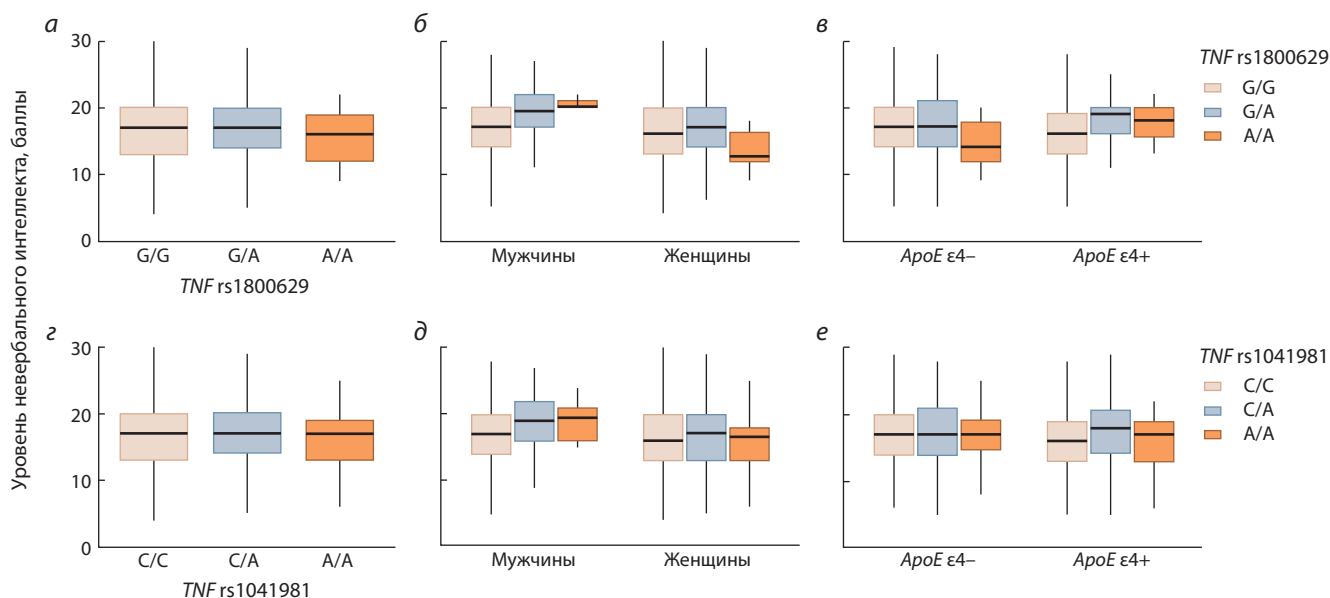


Рис. 1. Средние значения уровня невербального интеллекта в зависимости от генотипа по локусам rs1800629 и rs1041981 в гене *TNF* в общей группе (а, з), в зависимости от половой принадлежности (б, д) и наличия/отсутствия аллеля *APOE* ε4 (в, е).

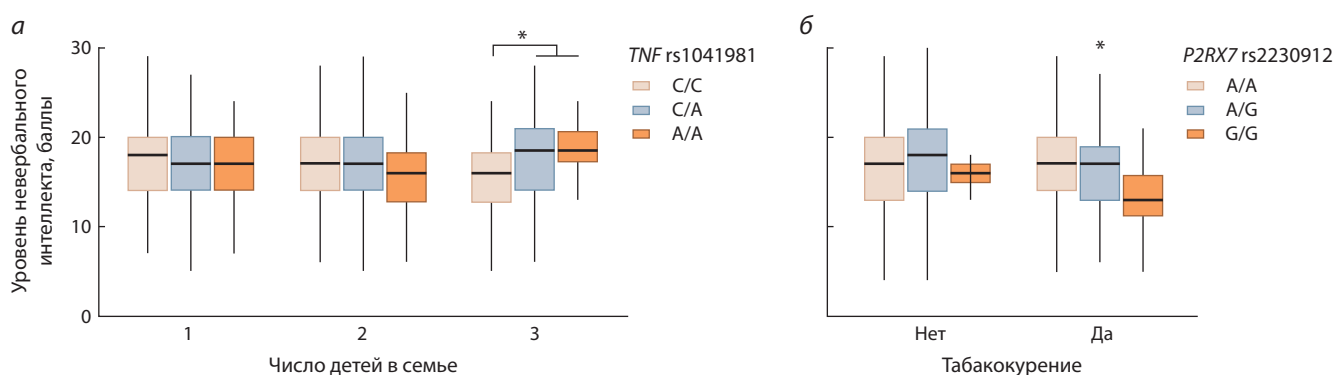


Рис. 2. Результаты анализа ген-средовых взаимодействий, демонстрирующие модулирующий эффект (а) числа детей в семье на ассоциацию полиморфного варианта rs1041981 в гене *TNF*, (б) табакокурения на ассоциацию варианта rs2230912 в гене *P2RX7* с уровнем невербального интеллекта.

Статистически значимые различия в уровне невербального интеллекта между группами отмечены скобками. * $p_{FDR} < 0.05$.

ли аллеля rs1041981*A, воспитанные в многодетной семье (3 и более детей), демонстрируют более высокие показатели невербального интеллекта по сравнению с носителями генотипа rs1041981*C/C (рис. 2, а). Кроме того, обнаружено, что табакокурение оказывает модулирующий эффект на ассоциацию локуса rs2230912 в гене *P2RX7* ($\beta = -1.70$; $\beta_{ST} = -0.10$; $p = 0.022$) с различиями в уровне невербального интеллекта. В частности, среди курящих индивидов наблюдался дозозависимый эффект минорного аллеля rs2230912*G в гене *P2RX7* на снижение уровня невербального интеллекта (см. рис. 2, б). Полиморфные локусы в генах *IL1B* (rs16944), *IL1A* (rs1800587), *CRP* (rs3093077) не продемонстрировали ассоциаций с индивидуальными различиями в уровне невербального интеллекта.

Обсуждение

Система воспалительного ответа организма играет важную роль в формировании и нормальном функционировании когнитивных функций мозга (Sartori et al., 2012;

Fard, Stough, 2019). В нашем исследовании предпринята попытка выявить доказательства вовлеченности генов, кодирующих белки системы медиаторов воспаления организма, в формирование индивидуальных различий в уровне невербального интеллекта. Результаты этой работы идентифицировали участие генов фактора некроза опухоли альфа (*TNF*) и пуринергического рецептора *P2X7* (*P2RX7*) и таких социальных параметров, как статус табакокурения и количество sibлингов у испытуемого в детстве в развитии когнитивных способностей. Ранее нами также был выявлен модулирующий эффект количества sibлингов на развитие когнитивных способностей (Казанцева и др., 2016). Полученные результаты могут представить ценную информацию для определения генетических механизмов, лежащих в основе формирования когнитивных функций мозга в целом и невербального интеллекта в частности.

На сегодняшний день существует относительно немного научных исследований, посвященных изучению

системы воспалительного ответа организма в контексте когнитивных функций мозга в норме. Этому может быть несколько объяснений. Когнитивные функции мозга представляют собой сложный личностный конструктор, в основе формирования которого лежит большое количество как биологически обусловленных факторов, так и параметров внешней среды (Xu et al., 2015; Wang et al., 2019). В связи с этим генетические данные относительно этого когнитивного фенотипа накапливаются медленно, большая часть работ направлена на изучение более очевидных биологических систем, которые могут оказывать непосредственное влияние на передачу информации между нейронами, нейрогенез, дифференцировку нейронов и др. (Kazantseva et al., 2020; Казанцева и др., 2021). Второй причиной может быть то, что долгое время мозг считался органом, полностью изолированным от иммунных процессов. Однако к настоящему времени появляется все больше данных о клеточных компонентах врожденного и приобретенного иммунитета, представленных в головном мозге (Filiano et al., 2015; Morimoto, Nakajima, 2019).

Воспалительная реакция организма относится к неспецифическому врожденному иммунитету и возникает в ответ на проникновение патогена. Научные публикации свидетельствуют о том, что воспалительный процесс в мозге, в первую очередь, связан с работой микроглиальных клеток (Li, Vargas, 2018), которые представляют собой большую популяцию иммунных клеток в центральной нервной системе (Ginhoux et al., 2010). Одна из главных функций микроглии – поддержание баланса воспалительных и противовоспалительных процессов в интактном мозге (Li, Vargas, 2018). Нарушение этого баланса может трансформироваться в патологический процесс, инициирующий эндогенное нейровоспаление (Wake et al., 2011), приводящее к повреждению целостности нейронов. Последнее, в свою очередь, может быть результатом действия факторов, ответственных за активацию микроглии, и влиять на прохождение когнитивных процессов в головном мозге. Это отчасти может объяснить обнаруженные в этой работе ассоциации полиморфных маркеров гена, кодирующего фактор некроза опухоли альфа (*TNF*), с вариациями в уровне невербального интеллекта. Показана ассоциация минорных аллелей полиморфных локусов rs1800629 и rs1041981 гена *TNF* (на уровне гаплотипа) с более высоким уровнем невербального интеллекта у психически здоровых индивидов. Белок *TNF α* – один из провоспалительных цитокинов, играет важную роль в инициации и регулировании цитокинового каскада в процессе воспалительной реакции (Makhatadze, 1998). Согласно литературным данным, дефицит *TNF α* приводит к неконтролируемому воспалительному ответу, что, в свою очередь, может выражаться в хроническом течении воспалительного процесса и негативно влиять на целостность нейронов (Raffaele et al., 2020).

Изученные нами полиморфные локусы rs1800629 (с.-488G>A) в гене *TNF* и rs1041981 (с.179C>A или Thr60Asn) в гене *LTA* являются функционально значимыми, и минорные аллели ассоциированы с повышенной экспрессией генов *TNF/LTA* (Hameed et al., 2018), что свидетельствует о том, что наши результаты согласуются с данными предыдущих исследований. Исходя из получен-

ных результатов, можно предположить, что повышенная экспрессия гена *TNF* может выполнять протекторную функцию и способствовать более контролируемому воспалительному процессу в головном мозге, что позитивным образом сказывается на когнитивных функциях человека.

Необходимо отметить, что положительный эффект минорных аллелей в гене *TNF* на улучшение когнитивных показателей наблюдался только в условиях наличия «неблагоприятного» аллеля $\epsilon 4$ в гене *APOE*. Известно, что белок АРОЕ, наряду с вовлеченностью в метаболизм холестерина, обладает также иммуномодулирующими свойствами, и все чаще в литературе появляются свидетельства, указывающие на роль АРОЕ в развитии нейродегенеративных заболеваний. На сегодняшний день известно, что АРОЕ может изменять ответ ЦНС на острое и хроническое повреждение, таким образом, быть активным участником регуляции процесса активации и деактивации микроглии (Fitz et al., 2021).

Обнаруженная в нашем исследовании ассоциация полиморфных вариантов гена *TNF* с невербальным интеллектом у носителей «рискового» аллеля $\epsilon 4$ гена *APOE* может объясняться тесной связью этих белков в организме человека. В работе D.T. Laskowitz с коллегами (1997) показано, что АРОЕ способен блокировать секрецию *TNF α* глиальными клетками, а дефицит *TNF α* в ЦНС приводит к нарушению баланса в воспалительных и противовоспалительных процессах в интактном мозге. Таким образом, благоприятный эффект наличия минорных аллелей в гене *TNF* (на уровне гаплотипа) на формирование когнитивных способностей может быть как раз обусловлен АРОЕ-связанным изменением секреции *TNF α* и, как следствие, определенным уровнем нейровоспаления.

Интересными представляются результаты ген-средовых исследований. Так, обнаружено, что число детей в семье может оказывать модулирующий эффект на ассоциацию полиморфного локуса rs1800629 гена *TNF* с вариациями в уровне невербального интеллекта. В литературе существует множество противоречивых данных, касающихся вопроса влияния «интеллектуального климата» в семье на уровень интеллекта. Результаты большей части исследований свидетельствуют о том, что младшие дети менее успешны в обучении и имеют более низкие показатели по когнитивным тестам, если сравнивать их с первенцами (Kanazawa, 2012). Такие наблюдения объясняются тем, что один ребенок в семье получает больше родительского внимания и времени, в то время как с появлением каждого последующего ребенка времени и ресурсов родителей становится недостаточно. Тем не менее такие закономерности справедливы больше для вербального интеллекта и могут не распространяться на невербальный (Blake, 2020).

В нашем исследовании не было найдено различий в уровне когнитивных способностей в зависимости от размера семьи. Но ассоциация более высоких показателей в уровне невербального интеллекта с наличием минорного аллеля rs1041981*А в гене *TNF* наблюдалась только среди индивидов, выросших в многодетной семье, в то время как в группах лиц с другим числом сиблингов *TNF*-зависимой ассоциации с когнитивными показателями не отмечено. С другой точки зрения, невербальный интеллект положительно коррелирует с размером семьи, поскольку

дети в больших семьях лучше считывают невербальные сигналы в связи со снижением вербальных контактов (Mogand, 1999). Таким образом, как раз в случае воспитания в многодетной семье, способствующего развитию невербальных процессов (Mogand, 1999), существенную роль в формировании невербального интеллекта играют генетически детерминированные особенности пророспалительного ответа организма, связанные с экспрессией гена *TNF*. Полученные нами данные указывают на благоприятный эффект минорного аллеля rs1041981*А в гене *TNF*, ассоциированного с более контролируемым воспалительным процессом в головном мозге, на формирование невербального интеллекта, который проявляется лишь в условиях ограниченности вербальных родительских ресурсов (т. е. многодетной семьи).

Второй статистически значимый результат ген-средового анализа, проведенного в этой работе, продемонстрировал модулирующий эффект «статуса курения» на ассоциацию полиморфного варианта rs2230912 в гене *P2RX7* с показателями невербального интеллекта. Так, носители аллеля rs2230912*G гена *P2RX7* продемонстрировали снижение уровня невербального интеллекта в группе курящих людей по сравнению с носителями других генотипов. Рецептор *P2RX7* относится к пуринергической сигнальной системе, которая регулирует взаимодействие нейронов и поведение глиальных клеток, в первую очередь микроглии (Lister et al., 2007).

Согласно литературным данным, транзиция аллеля А на G полиморфного маркера rs2230912 гена *P2RX7* приводит к замене глутамата на аргинин в 460-м положении, что выражается в изменении передачи сигналов транслируемым белком *P2RX7* (Winham et al., 2019). Этот рецептор участвует в секреции и процессах деградации внеклеточного АТФ, относящегося к молекулам, индуцирующим воспаление. Нарушение метаболизма АТФ приводит к повышению концентрации этой молекулы в межклеточном пространстве, что может способствовать хроническому воспалительному процессу в ЦНС и негативно влиять на целостность нейронов (Шевела и др., 2020). Причиной нарушения метаболизма АТФ в организме также является сигаретный дым. Одним из механизмов воздействия сигаретного дыма на метаболизм АТФ может быть его способность вызывать изменения в экспрессии гена *TSPO*, кодирующего одноименный транслокаторный белок, высокая концентрация которого обнаруживается во внешней митохондриальной мембране, отвечающей за синтез АТФ (Zeineh et al., 2019). Кроме того, в современной литературе существуют работы, связывающие возникновение когнитивных нарушений с никотиновой зависимостью и количеством выкуренных сигарет в день. Согласно масштабным лонгитюдным исследованиям индивидов с никотиновой зависимостью, было показано снижение объема рабочей памяти и способности решать проблемы (Vermeulen et al., 2018).

Изученный нами полиморфный локус (аллель G) и увеличение экспрессии белка *P2RX7* ранее были ассоциированы с риском развития аффективных и депрессивных расстройств (Winham et al., 2019), что частично согласуется с нашими результатами о более низком уровне когнитивного функционирования у носителей аллеля

rs2230912*G, которое проявляется только в условиях увеличенной нейровоспалительной реакции (табакокурения). Таким образом, предположительно, снижение уровня невербального интеллекта может быть связано с изменениями метаболизма АТФ и ассоциированного с этим нейровоспалительного процесса.

Заключение

Проведенное нами исследование имеет свои ограничения, поскольку результаты были получены с использованием средней по размеру выборки. Другим ограничением является небольшое количество проанализированных полиморфных локусов, что делает наши выводы о вовлеченности системы медиаторов воспаления неполными. Необходимо также отметить, что в этой работе не проведена оценка корреляции между уровнем невербального и вербального интеллектов, а также других когнитивных характеристик, что не позволяет сделать окончательные выводы о специфичности продемонстрированных генетических ассоциаций именно для невербального интеллекта. Тем не менее полученные результаты закладывают важный фундамент и задают направление для изучения генетически обусловленных факторов, лежащих в основе рассмотренного когнитивного параметра.

Настоящая работа имеет и сильные стороны: впервые осуществлен анализ ассоциаций генов, белковые продукты которых участвуют в регуляции воспалительного ответа организма, с невербальным интеллектом. Кроме того, наше исследование включает в себя анализ ген-средовых взаимодействий, который помогает понять биологическую природу невербального интеллекта и роль иммунной системы в манифестации межиндивидуальных различий в уровне этого когнитивного конструкта у психически здоровых индивидов.

Список литературы / References

- Алексеева О.С., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции. *Журн. эвол. биохимии и физиологии*. 2019;55(4):231-241. DOI 10.1134/S0044452919040028.
- [Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevskii D.E. Microglia of the brain: origin, structure and functions. *Zhurnal Evolutsionnoy Biokhimii i Phiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2019;55(4):231-241. DOI 10.1134/S0044452919040028. (in Russian)]
- Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Давыдова Ю.Д., Мустафин Р.Н., Тахирова З.Р., Малых С.Б., Лобаскова М.М., Тихомирова Т.Н., Хуснутдинова Э.К. Вовлеченность генов *KIBRA* и *APOE* в формирование особенностей пространственного мышления человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):839-846. DOI 10.18699/VJ21.097.
- [Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Davydova Yu.D., Mustafin R.N., Takhirova Z.R., Malykh S.B., Lobaskova M.M., Tikhomirova T.N., Khusnutdinova E.K. The role of the *KIBRA* and *APOE* genes in developing spatial abilities in humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8): 839-846. DOI 10.18699/VJ21.097. (in Russian)]
- Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Романова А.Р., Башкатов С.А., Галютдинова С.И., Тихомирова Т.Н., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. Гены семейства нейрексинов (*CNTNAP2* и *NRXN1*): их роль в развитии математической тревожности. *Мед. генетика*. 2016;15(11):17-23.

- [Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Romanova A.R., Bashkatov S.A., Galyautdinova S.I., Tikhomirova T.N., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Neurexin family genes (*CNTNAP2* and *NRXN1*): their involvement in mathematics anxiety. *Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics*. 2016;15(11):17-23. (in Russian)]
- Шевела Е.Я., Маркова Е.В., Князева М.А., Проскурина А.С., Ефремов Я.Р., Молодцов В.В., Селедцов И.А., Останин А.А., Богачев С.С., Колчанов Н.А., Черных Е.Р. Изменение транскриптома генов гиппокампа мышей в модели депрессии при интраназальном введении биоактивных факторов М2 макрофагов. *Матем. биология и биоинформатика*. 2020;15(2):357-393. DOI 10.17537/2020.15.357.
- [Shevela E.Y., Markova E.V., Knyazheva M.A., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Molodtsov V.V., Seledtsov I.A., Ostanin A.A., Bogachev S.S., Kolchanov N.A., Chernykh E.R. Changes in the hippocampal genes transcriptome in depression model mice upon intranasal exposure to m2 macrophage secretome factors. *Matematicheskaya Biologiya i Bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2020;15(2):357-393. DOI 10.17537/2020.15.357. (in Russian)]
- Blake J. Family Size and Achievement. Berkeley: University of California Press, 2020. DOI 10.1525/9780520330597.
- Dawson M. Verbal intelligence. In: Volkmar F.R. (Ed.). *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*. New York: Springer, 2013;3243-3250. DOI 10.1007/978-1-4419-1698-3_375.
- Dominici R., Cattaneo M., Malferrari G., Archi D., Mariani C., Grimaldi L.M., Biunno I. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics*. 2002;54(2):82-86. DOI 10.1007/s00251-002-0445-9.
- Emrani S., Arain H.A., DeMarshall C., Nuriel T. *APOE4* is associated with cognitive and pathological heterogeneity in patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Alz. Res. Therapy*. 2020; 12(1):141. DOI 10.1186/s13195-020-00712-4.
- Erdman V.V., Nasibullin T.R., Tuktarova I.A., Somova R.S., Mustafina O.E. Analysis of *FOXO1A* and *FOXO3A* gene allele association with human longevity. *Russ. J. Genet*. 2016;52(4):416-422. DOI 10.1134/S1022795416020034.
- Fard M.T., Stough C. A review and hypothesized model of the mechanisms that underpin the relationship between inflammation and cognition in the elderly. *Front. Aging Neurosci*. 2019;11:56. DOI 10.3389/fnagi.2019.00056.
- Feklicheva I., Zakharov I., Chipeeva N., Maslennikova E., Korobova S., Adamovich T., Ismatullina V., Malykh S. Assessing the relationship between verbal and nonverbal cognitive abilities using resting-state EEG functional connectivity. *Brain Sci*. 2021;11(1):94. DOI 10.3390/brainsci11010094.
- Ferro A., Auguste Y.S.S., Cheadle L. Microglia, cytokines, and neural activity: unexpected interactions in brain development and function. *Front. Immunol*. 2021;12:703527. DOI 10.3389/fimmu.2021.703527.
- Filiano A.J., Gadani S.P., Kipnis J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res*. 2015; 1617:18-27. DOI 10.1016/j.brainres.2014.07.050.
- Fitz N.F., Nam K.N., Wolfe C.M., Letronne F., Playso B.E., Iordanova B.E., Kozai T.D.Y., Biedrzycki R.J., Kagan V.E., Tyurina Y.Y., Han X., Lefterov I., Koldamova R. Phospholipids of APOE lipoproteins activate microglia in an isoform-specific manner in pre-clinical models of Alzheimer's disease. *Nat. Commun*. 2021;12(1): 3416. DOI 10.1038/s41467-021-23762-0.
- Franić S., Dolan C.V., van Beijsterveldt C.E., Pol H.H.E., Bartels M., Boomsma D.I. Genetic and environmental stability of intelligence in childhood and adolescence. *Twin Res. Hum. Genet*. 2014;17(3): 151-163. DOI 10.1017/thg.2014.26.
- Franke H., Schepper C., Illes P., Krügel U. Involvement of P2X and P2Y receptors in microglial activation *in vivo*. *Purinergic Signal*. 2007;3(4):435-445. DOI 10.1007/s11302-007-9082-y.
- Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M.F., Conway S.J., Ng L.G., Stanley E.R., Samokhvalov I.M., Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-845. DOI 10.1126/science.1194637.
- Hameed I., Masoodi S.R., Malik P.A., Mir S.A., Ghazanfar K., Ganai B.A. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. *Gene*. 2018;661:51-59. DOI 10.1016/j.gene.2018.03.095.
- Haruwaka K., Ikegami A., Tachibana Y., Ohno N., Konishi H., Hashimoto A., Matsumoto M., Kato D., Ono R., Kiyama H., Moorhouse A.J., Nabekura J., Wake H. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat. Commun*. 2019;10(1):5816. DOI 10.1038/s41467-019-13812-z.
- Kanazawa S. Intelligence, birth order, and family size. *Pers. Soc. Psychol. Bull*. 2012;38(9):1157-1164. DOI 10.1177/0146167212445911.
- Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Romanova A.R., Galyautdinova S.I., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Stress-associated cognitive functioning is controlled by variations in synaptic plasticity genes. *Russ. J. Genet*. 2020;56(1):88-95. DOI 10.1134/S1022795420010068.
- Kierdorf K., Prinz M. Microglia in steady state. *J. Clin. Invest*. 2017; 127(9):3201-3209. DOI 10.1172/JCI90602.
- Kuschner E.S. Nonverbal intelligence. In: Volkmar F.R. (Eds.). *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*. New York: Springer, 2013; 82-139. DOI 10.1007/978-1-4419-1698-3_354.
- Lanfranco M.F., Sepulveda J., Kopetsky G., Rebeck G.W. Expression and secretion of apoE isoforms in astrocytes and microglia during inflammation. *Glia*. 2021;69(6):1478-1493. DOI 10.1002/glia.23974.
- Laskowitz D.T., Goel S., Bennett E.R., Matthew W.D. Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF α . *J. Neuroimmunol*. 1997;76(1-2):70-74. DOI 10.1016/s0165-5728(97)00021-0.
- Li Q., Barres B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol*. 2018;18(4):225-242. DOI 10.1038/nri.2017.125.
- Li Y., Liu Y., Li J., Qin W., Li K., Yu C., Jiang T. Brain anatomical network and intelligence. *PLoS Comput. Biol*. 2009;5(5):e1000395. DOI 10.1371/journal.pcbi.1000395.
- Lister M.F., Sharkey J., Sawatzky D.A., Hodgkiss J.P., Davidson D.J., Rossi A.G., Finlayson K. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J. Inflamm. (Lond)*. 2007;4:5. DOI 10.1186/1476-9255-4-5.
- Makhatadze N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum. Immunol*. 1998;59(9):571-579. DOI 10.1016/s0198-8859(98)00056-1.
- Morand D.A. Family size and intelligence revisited: the role of emotional intelligence. *Psychol. Rep*. 1999;84(2):643-649. DOI 10.2466/pr0.1999.84.2.643.
- Morimoto K., Nakajima K. Role of the immune system in the development of the central nervous system. *Front. Neurosci*. 2019;13:916. DOI 10.3389/fnins.2019.00916.
- Mustafin R.N., Kazantseva A.V., Khusnutdinova E.K., Malykh S.B. Genetic mechanisms of cognitive development. *Russ. J. Genet*. 2020;56(8):891-902. DOI 10.1134/S102279542007011X.
- Naitza S., Porcu E., Steri M., Taub D.D., Mulas A., Xiao X., Strait J., Dei M., Lai S., Busonero F., Maschio A., Usala G., Zoledziewska M., Sidore C., Zara I., Pitzalis M., Loi A., Virdis F., Piras R., Deidda F., Whalen M.B., Crisponi L., Concas A., Podda C., Uzzau S., Scheet P., Longo D.L., Lakatta E., Abecasis G.R., Cao A., Schlesinger D., Uda M., Sanna S., Cucca F. A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in Sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. *PLoS Genet*. 2012;8(1):e1002480. DOI 10.1371/journal.pgen.1002480.
- Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., Savas J.N., Yates J.R. 3rd, Lafaille J.J., Hempstead B.L., Littman D.R., Gan W.B. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived

- neurotrophic factor. *Cell*. 2013;155(7):1596-1609. DOI 10.1016/j.cell.2013.11.030.
- Raffaie S., Lombardi M., Verderio C., Fumagalli M. TNF production and release from microglia via extracellular vesicles: impact on brain functions. *Cells*. 2020;9(10):2145. DOI 10.3390/cells9102145.
- Raven J. The Raven's progressive matrices: change and stability over culture and time. *Cogn. Psychol.* 2000;41(1):1-48. DOI 10.1006/cogp.1999.0735.
- Sartori A.C., Vance D.E., Slater L.Z., Crowe M. The impact of inflammation on cognitive function in older adults. *J. Neurosci. Nurs.* 2012;44(4):206-217. DOI 10.1097/JNN.0b013e3182527690.
- Tayel S.I., Fouda E.A.M., Elshayeb E.I., Eldakamawy A.R.A., El-Kousy S.M. Biochemical and molecular study on interleukin-1 β gene expression and relation of single nucleotide polymorphism in promoter region with Type 2 diabetes mellitus. *J. Cell Biochem.* 2018;119(7):5343-5349. DOI 10.1002/jcb.26667.
- Vermeulen J.M., Schirmbeck F., Blankers M., van Tricht M., Brugge-man R., van den Brink W., de Haan L. Genetic Risk and Outcome of Psychosis (GROUP) investigators. Association between smoking behavior and cognitive functioning in patients with psychosis, siblings, and healthy control subjects: results from a prospective 6-year follow-up study. *Am. J. Psychiatry*. 2018;175(11):1121-1128. DOI 10.1176/appi.ajp.2018.18010069.
- Vitek M.P., Brown C.M., Colton C.A. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol. Aging*. 2009; 30(9):1350-1360. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.014.
- Vyshedskiy A., Dunn R., Piryatinsky I. Neurobiological mechanisms for nonverbal IQ tests: implications for instruction of nonverbal children with autism. *Res. Ideas Outcomes*. 2017;3:e13239. DOI 10.3897/RIO.3.E13239.
- Wake H., Moorhouse A.J., Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(1):47-53. DOI 10.1017/S1740925X12000063.
- Wang Y., Du Y., Li J., Qiu C. Lifespan intellectual factors, genetic susceptibility, and cognitive phenotypes in aging: implications for interventions. *Front. Aging Neurosci.* 2019;11:129. DOI 10.3389/fragi.2019.00129.
- Winham S.J., Bobo W.V., Liu J., Coombes B., Backlund L., Frye M.A., Biernacka J.M., Schalling M., Lavebratt C. Sex-specific effects of gain-of-function P2RX7 variation on bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 2019;245:597-601. DOI 10.1016/j.jad.2018.11.007.
- Xu C., Sun J., Duan H., Ji F., Tian X., Zhai Y., Wang S., Pang Z., Zhang D., Zhao Z., Li S., Gue M.M., Hjelmberg J.V., Christensen K., Tan Q. Gene, environment and cognitive function: a Chinese twin ageing study. *Age Ageing*. 2015;44(3):452-457. DOI 10.1093/ageing/afv015.
- Zeineh N., Nagler R., Gabay M., Weizman A., Gavish M. Effects of cigarette smoke on TSPO-related mitochondrial processes. *Cells*. 2019;8(7):694. DOI 10.3390/cells8070694.

ORCID ID

R.F. Enikeeva orcid.org/0000-0002-4301-5283
A.V. Kazantseva orcid.org/0000-0002-3744-8058
Yu.D. Davydova orcid.org/0000-0003-3508-4710
R.N. Mustafin orcid.org/0000-0002-4091-382X
S.B. Malykh orcid.org/0000-0002-3786-7447
Y.V. Kovas orcid.org/0000-0001-9633-6374
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-78-30028) в части сбора психологических данных и биологических образцов, мегагранта Правительства РФ (проект № 075-15-2021-595) в части статистической обработки и биоинформатического анализа данных, мегагранта Правительства Республики Башкортостан в части генотипирования изученных вариантов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.10.2021. После доработки 12.01.2022. Принята к публикации 27.01.2022.

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

Полиморфизм гена *TCF7L2* в популяциях пяти этносов Сибири

Л.Э. Табиханова^{1,3}✉, Л.П. Осипова^{1,3}, Т.В. Чуркина^{1,3}, Е.Н. Воронина^{2,3}, М.Л. Филипенко^{2,3}

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

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ tabikhan@bionet.nsc.ru

Аннотация. Исследование частот функционально значимых вариантов генов в медико-биологическом и географическом контексте является актуальным направлением в изучении генетической структуры популяций человека. С переходом человечества от традиционного к урбанизированному образу жизни все большее распространение получают болезни цивилизации, связанные с нарушением метаболизма, в том числе сахарный диабет 2-го типа. Цель настоящей работы – проанализировать частоты функционально значимых аллелей генов метаболического профиля у коренных народов Сибири, чтобы определить «запас прочности» генофонда, оценить степень подверженности разных этнических групп заболеваниям метаболического спектра в меняющихся условиях внешней среды и спрогнозировать эпидемиологическую ситуацию в ближайшем будущем. Материалом исследования послужили этнические выборки восточных и западных бурят, телеутов, долган и двух территориальных групп якутов. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определены частоты полиморфных вариантов, обусловленных однонуклеотидными заменами *G103894T*, *rs12255372*, и *C53341T*, *rs7903146* гена *TCF7L2*. Полученные показатели сравнены с частотами в выборке русских Восточной Сибири и с литературными данными. В соответствии с общим географическим градиентом распределения полиморфных вариантов, частоты их в выборках коренных сибирских народов находятся в промежуточном положении между европеоидами и популяциями Восточной Азии. Показана статистически значимо меньшая встречаемость аллелей риска сахарного диабета 2-го типа *TCF7L2* (*G103894T*) и *TCF7L2* (*C53341T*) в выборках коренных сибирских народов по сравнению с русскими, что согласуется с их меньшей подверженностью метаболическим нарушениям, чем у пришлого европеоидного населения. В условиях урбанизации можно также прогнозировать сниженный рост заболеваемости сахарным диабетом 2-го типа у коренных народов Сибири – бурят, якутов, долган и телеутов, по сравнению с пришлым европеоидным населением. Для более полного понимания молекулярно-генетических основ адаптивного потенциала коренных народностей Сибири необходимо дальнейшее изучение структуры популяций по другим генам метаболического профиля.

Ключевые слова: буряты; телеуты; якуты; долганы; русские Восточной Сибири; сахарный диабет 2 типа; генетический полиморфизм; ПЦР в режиме реального времени; *TCF7L2* (*G103894T*, *rs12255372*); *TCF7L2* (*C53341T*, *rs7903146*).

Для цитирования: Табиханова Л.Э., Осипова Л.П., Чуркина Т.В., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. Полиморфизм гена *TCF7L2* в популяциях пяти этносов Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):188-195. DOI 10.18699/VJGB-22-23

TCF7L2 gene polymorphism in populations of five Siberian ethnic groups

L.E. Tabikhanova^{1,3}✉, L.P. Osipova^{1,3}, T.V. Churkina^{1,3}, E.N. Voronina^{2,3}, M.L. Filipenko^{2,3}

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

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ tabikhan@bionet.nsc.ru

Abstract. Investigation of the frequencies of functionally significant gene variants in the context of medical biology and gene geography is a relevant issue for studying the genetic structure of human populations. The transition from a traditional to an urbanized lifestyle leads to a higher incidence of civilizational diseases associated with metabolic disorders, including type 2 diabetes mellitus. The goal of the present paper is to analyze the frequencies of functionally significant gene alleles in the metabolic profiles of indigenous Siberian peoples to identify the gene pool resilience, evaluate the susceptibility of various ethnic groups to metabolic disorders under changing environmental conditions, and predict the epidemiological situation that may occur in the near future. The study was performed in the monoethnic samples of eastern and western Buryats, Teleuts, Dolgans, and two territorial groups of Yakuts. A real-time PCR was used to determine the frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) *G103894T*, *rs12255372*, and *C53341T*, *rs7903146* in the *TCF7L2* gene. The results obtained were compared to the frequencies identified for Russians from Eastern Siberia and the values available in the literature. The frequencies of the polymorphic variants studied in the samples from the

indigenous Siberian peoples place them in between Caucasian and East Asian populations, following the geographic gradient of polymorphism distribution. A significantly lower occurrence of type 2 diabetes risk alleles *TCF7L2* (*103894T*) and *TCF7L2* (*53341T*) in the samples of indigenous Siberian peoples compared to Russians was observed, which agrees with their lower susceptibility to metabolic disorders compared to the newcomer Caucasian population. Taking into account urbanization, a reduced growth in type 2 diabetes incidence may be predicted in indigenous Siberian peoples, i. e. Buryats, Yakuts, Dolgans, and Teleuts, compared to the newcomer Caucasian population. A further study of population structure with respect to different metabolic profile genes is required to better understand the molecular genetic foundations of the adaptive potential of indigenous Siberian peoples.

Key words: Buryats; Teleuts; Yakuts; Dolgans; Russians from East Siberia; type 2 diabetes mellitus; genetic polymorphism; real-time PCR; *TCF7L2* (*G103894T*, rs12255372); *TCF7L2* (*C53341T*, rs7903146).

For citation: Tabikhanova L.E., Osipova L.P., Churkina T.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. *TCF7L2* gene polymorphism in populations of five Siberian ethnic groups. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):188-195. DOI 10.18699/VJGB-22-23

Введение

Изучение особенностей популяционно-генетической структуры этнических групп в медико-биологическом и геногеографическом контексте является актуальным направлением генетики человека. Для понимания молекулярно-генетических основ адаптивного потенциала каждого этноса, сложившегося в процессе его становления в конкретных климато-географических условиях проживания и адаптации к особенностям пищевого рациона, важен анализ частот аллелей генов-кандидатов, функциональная значимость которых установлена по результатам исследований в отдельных популяциях мирового населения.

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) занимает одну из ведущих позиций по причинам смертности и инвалидизации среди трудоспособного населения (Асфандиярова, 2015). СД2 является компонентом метаболического синдрома и связан с повышенным риском множественных ассоциированных патологических состояний, в первую очередь сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркт, инсульт, сердечно-сосудистая недостаточность) и хронической почечной недостаточности.

С полиморфизмом гена *TCF7L2* связано одно из важнейших звеньев патогенеза СД2 – дефект секреции гормонов инкретинового ряда; продукт этого гена регулирует образование β-клеток поджелудочной железы из полипотентных стволовых клеток и необходим для глюкозостимулированной секреции инсулина (Bennett et al., 2002). Мишенью для действия гена является также головной мозг, где *TCF7L2* определяет выраженность аноректогенного эффекта и влияет на центральный механизм регуляции глюкозы (Аметов и др., 2016). В печени ген вовлечен в регуляцию обмена липопротеинов низкой и очень низкой плотности и триглицеридов, в процесс глюконеогенеза и опосредует развитие состояния инсулинорезистентности (Nobrega, 2013).

Установлено, что ассоциацией с СД2 обладают полиморфные варианты, обусловленные однонуклеотидными заменами *G103894T*, rs12255372, и *C53341T*, rs7903146, в интронах 3 и 4 гена *TCF7L2* (Sladek et al., 2007; Timpson et al., 2009; Xi et al., 2014; Katsoulis et al., 2018). Связь аллелей *TCF7L2* (*103894T*) и *TCF7L2* (*53341T*) с повышенным риском СД2 продемонстрирована в ряде мировых популяций, в том числе в российских (Saxena et al., 2006; Cauchi et al., 2007; Rotarov et al., 2010; Бондарь и др., 2013; Авзалетдинова и др., 2016; Кауа et al., 2017; Мельникова и др., 2020). Показано, что вариант *TCF7L2* (*53341T*) связан

с большим риском развития СД2, чем *TCF7L2* (*103894T*), а гомозиготы по этим аллелям подвержены заболеванию в большей степени, чем гетерозиготы (Anjum et al., 2018).

Полиморфные варианты *TCF7L2* имеют связь также с индексом массы тела, общим объемом жировых отложений и количественным содержанием висцерального и подкожного жира (Haupt et al., 2010; Сметанина, 2015). Аллель *TCF7L2* (*53341T*) ассоциирован с риском развития синдрома, имеющих общие звенья патогенеза, заболеваний – ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда (Melzer et al., 2006; Han et al., 2010; Орлов и др., 2011). Ген *TCF7L2* связан с почечным эмбриогенезом, носительство его полиморфных вариантов сопряжено с разной степенью прогрессирования хронической болезни почек, этим сосудистым осложнением СД2 (Franceschini et al., 2012; Аметов и др., 2016; Vikulova et al., 2017). Представлены доказательства того, что полиморфизм гена *TCF7L2* в локусах rs7903146 и rs12255372 ассоциирован с риском возникновения рака желудка, молочной железы и колоректального рака (Rosales-Reynoso et al., 2016; Zhang et al., 2018). Выявлено действие естественного отбора на локус rs7903146 гена *TCF7L2*, показана статистически значимая связь частоты аллеля *53341T* с рядом климато-географических факторов (Trifonova et al., 2020).

Работы по изучению частот аллелей генов, ассоциированных с риском диабета 2-го типа и других нарушений метаболизма в коренных популяциях Сибири, сохраняют свою актуальность в последнее десятилетие (Баирова и др., 2013; Батулин и др., 2017; Куртанов и др., 2018; Hallmark et al., 2018; Иевлева и др., 2019; Tabikhanova et al., 2019; Мельникова и др., 2020). Однако распределение вариантов такого функционально значимого гена, как *TCF7L2*, в сибирских популяциях еще недостаточно изучено. В исследовании (Trifonova et al., 2020) приведены частоты вариантов в одном полиморфном локусе rs7903146 у некоторых сибирских народов, в том числе у бурят и якутов, но не указан район сбора материала, что представляется необходимым для таких многочисленных, заселяющих обширные территории гетерогенных этносов.

Настоящая работа посвящена изучению частот полиморфных вариантов *G103894T*, rs12255372, и *C53341T*, rs7903146 гена *TCF7L2*, ассоциированного с рядом заболеваний, в популяциях коренных сибирских этносов – бурят, телеутов, якутов и долган, в сравнении с русскими жителями Сибири.

Материалы и методы

Генетический материал для исследования был собран во время экспедиций 2000–2006 гг. Забор крови производился у добровольцев, практически здоровых на момент исследования, с использованием «Информированного согласия», с одобрения местных органов здравоохранения и этического комитета ИЦиГ СО РАН. Перед сдачей крови каждый испытуемый заполнял специально разработанную демографическую анкету, в которой уточнял национальную принадлежность предков до третьего-четвертого поколения.

На основании собранной информации были сформированы семь выборок населения Южной и Восточной Сибири. Лица бурятской национальности, не имеющие иноэтнических предков, проживающие в селах Алханай и Орловский Агинского Бурятского округа (АБО) Забайкальского края, вошли в группу восточных бурят ($N = 132$). Этнические буряты, проживающие в селах Эхирит-Булагатского района Усть-Ордынского Бурятского округа (УОБО) Иркутской области ($N = 278$), составили западную выборку. Также в исследование были включены телеуты Беловского района Кемеровской области ($N = 116$). Были сформированы две этнически чистые выборки якутов: Нюрбинская – из проживающих в селах Нюрбачан и Сюльцы Нюрбинского улуса ($N = 109$), и Усть-Алданская – из жителей села Дюпся Усть-Алданского улуса ($N = 100$). Жители г. Дудинка, поселков Волочанка и Усть-Авам Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края, относящие себя к долганскому этносу, составили выборку долган ($N = 180$). Русские жители Забайкальского края и Иркутской области были объединены в седьмую выборку ($N = 133$).

Образцы ДНК были выделены из лейкоцитарных фракций венозной крови с помощью наборов «БиоСилика» (Россия). Генотипирование однонуклеотидных замен *TCF7L2* (*G103894T*, rs12255372) и *TCF7L2* (*C53341T*, rs7903146) проводили в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Структуру праймеров и зондов подбирали с помощью последовательностей, доступных в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), с использованием программ UGENE (version 1.14, <http://ugene.unipro.ru/>) и Oligo Analyzer (version 1.0.3, <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) (табл. 1).

Аmplификацию выполняли в объеме 25 мкл, ПЦР-смесь включала в себя 300 нМ праймеров, 100 нМ TaqMan-зондов, 65 мМ TrisHCl (pH 8.9), 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 мМ MgCl_2 , 0.05 % Tween-20, 0.2 мМ dNTP, 0.5–10 нг ДНК и 0.5 U Taq-ДНК полимеразы (hot-start, Biosan, ИНВФМ). Условия ПЦР: начальная денатурация 3 мин при 96 °C;

затем 46 циклов, включающих денатурацию при 96 °C – 5 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 61 °C – 30 с (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала на длине волны эмиссии флуорофоров FAM и HEX).

Популяционные частоты аллельных вариантов определяли на основе наблюдаемых частот генотипов. Соответствие эмпирически наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому распределению, равновесному по закону Харди–Вайнберга, проверяли с использованием критерия χ^2 (Пирсона) (при $p > 0.05$ равновесие выполняется). Достоверность различий в частотах аллелей между исследованными выборками оценивали по критерию χ^2 с применением поправки Йейтса на непрерывность; при $p < 0.025$ (с поправкой на множественность сравнения, $0.025 = 0.05/2$) результаты считались статистически значимыми.

Результаты

Результаты генотипирования *TCF7L2* (*G103894T*, rs12255372) и (*C53341T*, rs7903146) в выборках бурят, телеутов, якутов, долган и русских Восточной Сибири приведены в табл. 2.

Распределение генотипов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга для всех полиморфных локусов и выборок. Частоты аллелей *TCF7L2* (*103894T*) и *TCF7L2* (*53341T*) в изученных выборках, а также в некоторых этнических группах, описанных в литературе (The 1000 Genomes..., 2012), и сравнение популяций (p -value) представлены в табл. 3 и 4.

Показано, что частота аллеля *TCF7L2* (*103894T*) в выборке русских (23.1 %) соответствует встречаемости его в других европеоидных группах (22–37 %) (The 1000 Genomes..., 2012). В изученных выборках коренных народов Сибири она варьирует от 5.4 % у западных бурят до 9.5 % у телеутов, при этом статистически значимые различия между ними не выявлены. Однако во всех выборках коренного населения частота этого аллеля статистически значимо меньше, чем у русских Восточной Сибири, а также у других европеоидных групп, описанных в литературе (The 1000 Genomes..., 2012). В то же время она значимо выше, чем в ряде популяций Восточной Азии – китайцев и вьетнамцев. Также по этому показателю телеуты статистически значимо отличаются от японцев, что не выявлено для других исследованных групп. Промежуточное положение коренных популяций Сибири на примере бурят и телеутов уже было продемонстрировано ранее по частотам полиморфных вариантов ряда других генов метаболического профиля (Tabikhanova et al., 2019).

Таблица 1. Структуры праймеров и зондов, использованных для генотипирования однонуклеотидных замен в гене *TCF7L2*

Локус	Праймеры	Зонды
<i>G103894T</i> , rs12255372	5'-aaggatgtgcaaatccagcag-3'	5'- FAM -tccaggcaagaattacat-BHQ-3'
	5'-tgaatctggcactcagaagag-3'	5'-HEX-ccaggcaagaatgacat-BHQ-3'
<i>C53341T</i> , rs7903146	5'-ggcttctctgctcaaacct-3'	5'- FAM-agcacttttagatataata-BHQ-3'
	5'-cttgcttctcctgtaactgt-3'	5'- HEX-agcacttttagatataata-BHQ-3'

Таблица 2. Распределение генотипов *TCF7L2* в выборках бурят, телеутов, якутов, долган и русских Восточной Сибири

Популяция			Буряты		Телеуты	Якуты		Долганы	Русские Восточной Сибири
			восточные	западные		Нюрбинский улус	Усть-Алданский улус		
<i>G103894T</i> , <i>rs12255372</i>	Распределение генотипов, <i>n</i> (%)	<i>G/G</i>	116 (88.5)	251 (90.3)	96 (82.8)	96 (88.1)	87 (87)	159 (88.3)	78 (59.1)
		<i>G/T</i>	15 (11.5)	24 (8.6)	18 (15.5)	13 (11.9)	13 (13)	20 (11.1)	47 (35.6)
		<i>T/T</i>	0	3 (1.1)	2 (1.7)	0	0	1 (0.6)	7 (5.3)
	<i>N</i> , человек		131	278	116	109	100	180	132
	<i>p</i> (H-W)		0.905	0.668	0.817	0.907	0.899	0.940	0.993
<i>C53341T</i> , <i>rs7903146</i>	Распределение генотипов, <i>n</i> (%)	<i>C/C</i>	119 (90.1)	225 (81.6)	91 (79.1)	90 (90.1)	84 (87.5)	143 (85.1)	73 (54.9)
		<i>C/T</i>	13 (9.9)	49 (17.7)	22 (19.1)	9 (9.9)	12 (12.5)	24 (14.3)	51 (38.3)
		<i>T/T</i>	0	2 (0.7)	2 (1.8)	0	0	1 (0.6)	9 (6.8)
	<i>N</i> , человек		132	276	115	99	96	168	133
	<i>p</i> (H-W)		0.925	0.932	0.904	0.942	0.907	0.999	0.982

Примечание. *N* – объем выборки; *n* – численность; *p* (H-W) – значение вероятности отклонения от равновесного распределения Харди-Вайнберга.

Таблица 3. Частота аллеля *TCF7L2* (*103894T*) в некоторых популяциях (этнических группах) и сравнение популяций (*p*-value)

Популяция/ этническая группа	<i>N</i> , человек	Частота <i>TCF7L2</i> (<i>103894T</i>), %	Сравнение популяций (<i>p</i> -value)						Долганы	Русские Восточной Сибири
			Буряты		Телеуты	Якуты				
			восточные	западные		Нюрбинский улус	Усть-Алданский улус			
Буряты восточные*	131	5.7		0.991	0.153	0.955	0.873	0.971	<i>p</i> < 0.001	
Буряты западные*	278	5.4	0.991		0.051	0.878	0.691	0.763	<i>p</i> < 0.001	
Телеуты*	116	9.5	0.153	0.051		0.227	0.336	0.168	<i>p</i> < 0.001	
Якуты, Нюрбинский улус*	109	6.0	0.955	0.878	0.227		0.993	0.896	<i>p</i> < 0.001	
Якуты, Усть-Алданский улус*	100	6.5	0.873	0.691	0.336	0.993		0.996	<i>p</i> < 0.001	
Долганы*	180	6.1	0.971	0.763	0.168	0.896	0.996		<i>p</i> < 0.001	
Русские Восточной Сибири*	132	23.1	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001		
Китайцы дай, Сишуанбаньна, Китай**	93	1.1	0.024	0.022	<i>p</i> < 0.001	0.020	0.013	0.013	<i>p</i> < 0.001	
Китайцы хань, Пекин, Китай**	103	0	0.001	0.001	<i>p</i> < 0.001	0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	
Южные китайцы хань, Китай**	105	1.0	0.013	0.012	<i>p</i> < 0.001	0.011	0.007	0.007	<i>p</i> < 0.001	
Японцы, Токио, Япония**	104	2.4	0.125	0.116	0.004	0.109	0.076	0.073	<i>p</i> < 0.001	
Кинь (вьеты), Хошимин, Вьетнам**	99	0.5	0.006	0.005	<i>p</i> < 0.001	0.005	0.003	0.003	<i>p</i> < 0.001	
Население штата Юта, потомки выходцев из Северной и Западной Европы**	99	27.8	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.296	
Финны, Финляндия**	99	21.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.807	
Англичане и шотландцы**	91	26.4	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.493	
Иберы, Испания**	107	37.4	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	
Тосканцы, Италия**	107	31.8	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.043	

Примечание. Здесь и в табл. 4: * собственные данные; ** литературные данные (The 1000 Genomes..., 2012). Жирным шрифтом выделены значения *p* < 0.025, при которых различия считались статистически значимыми.

Таблица 4. Частота аллеля *TCF7L2* (53341T) в некоторых популяциях (этнических группах) и сравнение популяций (*p*-value)

Популяция/ этническая группа	N, человек	Частота <i>TCF7L2</i> (53341T), %	Сравнение популяций (<i>p</i> -value)							
			Буряты		Телеуты		Якуты	Долганы		Русские Восточной Сибири
			восточные	западные			Нюрбинский улус	Усть-Алданский улус		
Буряты восточные*	132	4.9		0.030	0.014	0.983	0.660	0.224	<i>p</i> < 0.001	
Буряты западные*	276	9.6	0.030		0.556	0.037	0.213	0.399	<i>p</i> < 0.001	
Телеуты*	115	11.3	0.014	0.556		0.017	0.106	0.190	<i>p</i> < 0.001	
Якуты, Нюрбинский улус*	99	4.5	0.983	0.037	0.017		0.573	0.205	<i>p</i> < 0.001	
Якуты, Усть-Алданский улус*	96	6.3	0.660	0.213	0.106	0.573		0.672	<i>p</i> < 0.001	
Долганы*	168	7.7	0.224	0.399	0.190	0.205	0.672		<i>p</i> < 0.001	
Русские Восточной Сибири*	133	25.9	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001		
Китайцы дай, Сишунбаньна, Китай**	93	2.2	0.220	0.002	<i>p</i> < 0.001	0.335	0.086	0.017	<i>p</i> < 0.001	
Китайцы хань, Пекин, Китай**	103	2.4	0.245	0.001	<i>p</i> < 0.001	0.375	0.094	0.017	<i>p</i> < 0.001	
Южные китайцы хань, Китай***	105	2.9	0.386	0.003	0.001	0.552	0.162	0.033	<i>p</i> < 0.001	
Японцы, Токио, Япония**	104	2.9	0.388	0.003	0.001	0.554	0.164	0.033	<i>p</i> < 0.001	
Кинь (вьеты), Хошимин, Вьетнам**	99	1.0	0.037	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.068	0.011	0.001	<i>p</i> < 0.001	
Население штата Юта, потомки выходцев из Северной и Западной Европы**	99	31.3	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.240	
Финны, Финляндия**	99	22.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.002	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.494	
Англичане и шотландцы**	91	25.8	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.931	
Иберы, Испания**	107	39.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.002	
Тосканцы, Италия**	107	37.4	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.009	

Частота аллеля *TCF7L2* (53341T) в выборке русских (25.9 %) также соответствует значениям этого показателя в других европеоидных группах (23–40 %) (The 1000 Genomes..., 2012). В изученных нами выборках коренных народов он статистически значимо меньше, чем в группе русских, и варьирует от 4.5 % у якутов Нюрбинского улуса до 11.3 % у телеутов. Выявлены статистически значимые различия между группой телеутов и выборками, где эта частота минимальна, – восточными бурятами (4.9 %) и якутами Нюрбинского улуса. Приведенные в работе (Trifonova et al., 2020) данные по частоте изученного аллеля *TCF7L2* (53341T) в выборках бурят (6.3 %) и якутов (4.3 %) оказались близки к полученным нами результатам. К сожалению, в этой статье не указаны объемы выборок и место проживания испытуемых, что не позволило нам оценить достоверность различий. Мы не обнаружили статистически значимых различий между выборками восточных бурят и якутов Нюрбинского улуса и представленными в литературе выборками коренного населения Восточной Азии – китайцами, японцами и вьетнамцами. Для якутов Усть-Алданского улуса показано, что частота аллеля *TCF7L2* (53341T) статистически

значимо выше, чем у вьетнамцев; у долган выявлены различия еще и с некоторыми китайскими популяциями. Группы западных бурят и телеутов демонстрируют статистически значимо большую частоту изученного аллеля по сравнению со всеми описываемыми восточно-азиатскими выборками. Показано также, что частота этого варианта в популяциях коренных жителей Сибири статистически значимо меньше, чем в европеоидных группах, описанных в литературе (The 1000 Genomes..., 2012). Таким образом, тенденция к промежуточному положению выборок коренных сибирских народов между восточно-азиатскими популяциями и европеоидами наблюдается и по частоте аллеля *TCF7L2* (53341T).

Обсуждение

Исследование частот функционально значимых вариантов генов в медико-биологическом и геногеографическом контексте является актуальным направлением в изучении популяционно-генетической структуры коренных народов Сибири. В настоящей работе определены частоты аллелей 103894T и 53341T гена *TCF7L2*, ассоциированных с СД2 и другими метаболическими заболеваниями,

в популяциях бурят, якутов, долган, телеутов и в выборке русских Восточной Сибири. Показано, что в группе русских они находятся в интервале, характерном для других европеоидных популяций. В то же время в популяциях коренных сибирских этносов выявлены статистически значимо меньшие частоты вариантов *TCF7L2* (*G103894T*) и *TCF7L2* (*G53341T*). По этому показателю коренное население Сибири занимает промежуточное положение между европеоидами и популяциями Восточной Азии.

Существует ряд работ, в которых показано, что метаболический синдром и один из его компонентов – СД2 – реже встречаются среди коренных этносов Сибири, Дальнего Востока, а также европейской части России, имеющих в составе генофонда монголоидный компонент, чем среди европеоидов (Цыреторова и др., 2015; Кичигин и др., 2017; Цыганкова и др., 2018). Это обусловлено, прежде всего, традиционным образом жизни, предполагающим достаточные физические нагрузки и рацион, состоящий из преимущественно животной пищи, богатой белками и жирами, с ограниченной углеводной составляющей (Баирова и др., 2013).

Этнические особенности в распространении и проявлении СД2 определяет и отличный от европейцев генофонд, характеризующийся уникальным сочетанием частот функционально значимых генов, который сформировался в результате адаптации к условиям среды (Батурин и др., 2017; Hallmark et al., 2018). Различия в условиях жизни коренного и пришлого населения нивелируются в процессе урбанизации: изменяются многовековые традиции, характер питания и, как следствие, среди коренных народов все больше распространение получают болезни цивилизации, связанные с нарушением метаболизма, в том числе сахарный диабет 2-го типа (Овсянникова и др., 2007; Цыреторова и др., 2015; Цыганкова и др., 2018). Изучая распределение вариантов функционально значимых генов, ассоциированных с риском заболеваний в популяциях коренного населения Сибири, можно определить «запас прочности» генофонда, оценить степень подверженности разных этнических групп заболеваниям метаболического спектра в меняющихся условиях внешней среды и спрогнозировать эпидемиологическую ситуацию в ближайшем будущем.

Меньшая распространенность сахарного диабета 2-го типа среди коренного населения Сибири согласуется с выявленными в настоящем исследовании пониженными популяционными частотами изученных аллелей *TCF7L2* (*G103894T*) и *TCF7L2* (*G53341T*), ассоциированных с СД2 и рядом синтропных заболеваний. Можно предположить, что сниженная частота этих вариантов вносит вклад в этнические особенности заболеваемости в изученных популяциях. В условиях урбанизации у коренных этносов Сибири можно прогнозировать сниженный, по сравнению с пришлыми европеоидами, рост заболеваемости СД2 и другими ассоциированными с этими вариантами патологическими состояниями.

Высокую по сравнению с бурятами и якутами частоту варианта *TCF7L2* (*G53341T*) у телеутов Кемеровской области можно объяснить тем, что во время становления этот этнос вообрал в свой генофонд некоторую долю европеоидного компонента (Остапцева и др., 2006). Проживая

в более комфортных условиях, обусловленных близостью городов Прокопьевск, Кемерово, Новокузнецк, и имея расширенный, приближенный к европейскому рацион питания, телеуты могут быть подвержены повышенному риску развития СД2 и ассоциированных с ним заболеваний. Повышение частоты сердечно-сосудистых заболеваний в последние десятилетия у них уже отмечается (Овсянникова и др., 2007). Однако для более корректных выводов необходимо изучение частот вариантов и других функционально значимых генов.

Заключение

В настоящей работе изучены этнические особенности в распределении частот полиморфных вариантов гена *TCF7L2* (*G103894T*, rs12255372) и (*G53341T*, rs7903146) в популяциях бурят, якутов, долган и телеутов и в выборке русских Восточной Сибири. Исследование локуса rs12255372 у разных территориальных групп бурят и якутов было выполнено впервые, так же как и впервые исследованы популяции телеутов и долган по обоим локусам rs12255372 и rs7903146. Показано, что в соответствии с общим географическим градиентом распределения полиморфных вариантов, частоты их в выборках коренных сибирских народов занимают промежуточное положение между европеоидами и популяциями Восточной Азии.

Продемонстрировано, что встречаемость аллелей *TCF7L2* (*G103894T*) и *TCF7L2* (*G53341T*), ассоциированных с сахарным диабетом 2-го типа и другими заболеваниями метаболического спектра, статистически значимо ниже в выборках сибирских народов, чем среди русских, что согласуется с меньшей подверженностью коренного населения метаболическим нарушениям, в том числе СД2. В условиях перехода к урбанизованному образу жизни можно прогнозировать сниженный, по сравнению с пришлыми европеоидами, рост заболеваемости СД2 и других ассоциированных с этими вариантами патологических состояний у коренных этносов Сибири – бурят, якутов, долган и телеутов.

Для более полного понимания природы этнических различий необходимо дальнейшее изучение структуры популяций по другим генам метаболического профиля.

Список литературы / References

- Авзалетдинова Д.Ш., Шарипова Л.Ф., Кочетова О.В., Моругова Т.В., Эрдман В.В., Сомова Р.Ш., Мустафина О.Е. Анализ ассоциаций полиморфного маркера rs7903146 гена *TCF7L2* с сахарным диабетом 2 типа в татарской этнической группе, проживающей в Башкортостане. *Сахарный диабет*. 2016;19(2): 119-124. DOI 10.14341/DM2004138-45.
- [Avzaletdinova D.S., Sharipova L.F., Kochetova O.V., Morugova T.V., Erdman V.V., Somova R.S., Mustafina O.E. The association of *TCF7L2* rs7903146 polymorphism with type 2 diabetes mellitus among Tatars of Bashkortostan. *Sakharnyi Diabet = Diabetes Mellitus*. 2016;19(2):119-124. DOI 10.14341/DM2004138-45. (in Russian)]
- Аметов А.С., Камынина Л.Л., Ахмедова З.Г. Клинические аспекты эффективности инкретиновой терапии (Wnt-патогенетический путь и полиморфизм гена *TCF7L2*). *Рос. мед. журн.* 2016;22(1): 47-51. DOI 10.18821/0869-2106-2016-22-1-47-51.
- [Ametov A.S., Kamynina L.L., Akhmedova Z.G. The clinical aspects of effectiveness of incretin therapy (Wnt-pathogenic path and polymorphism of gene *TCF7L2*). *Rossiyskiy Meditsinskiy Zhurnal =*

- Medical Journal of the Russian Federation*. 2016;22(1):47-51. DOI 10.18821/0869-2106-2016-22-1-47-51. (in Russian)]
- Асфандиярова Н.С. Смертность при сахарном диабете 2 типа. *Сахарный диабет*. 2015;18(4):12-21. DOI 10.14341/DM6846. [Asfandiayarova N.S. A review of mortality in type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyi Diabet = Diabetes Mellitus*. 2015;18(4):12-21. DOI 10.14341/DM6846. (in Russian)]
- Байрова Т.А., Долгих В.В., Колесникова Л.И., Первушина О.А. Нутрициогенетика и факторы риска сердечно-сосудистой патологии: ассоциативные исследования в популяциях Восточной Сибири. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*. 2013;4(92):87-92. [Bairova T.A., Dolgikh V.V., Kolesnikova L.I., Pervushina O.A. Nutriciogenetics and risk factors of cardiovascular disease: associated research in Eastern Siberia populations. *Byulleten' VSNTs SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2013;4(92):87-92. (in Russian)]
- Батурин А.К., Сорокина Е.Ю., Погожева А.В., Кешабянц Э.Э., Кобелькова И.В., Камбаров А.О., Елизарова Е.В., Тутельян В.А. Изучение ассоциации полиморфизмов rs993609 гена *FTO* и rs659366 гена *UCP2* с ожирением у населения Арктической зоны Российской Федерации. *Вопр. питания*. 2017;86(3):32-39. [Baturin A.K., Sorokina E.Yu., Pogozheva A.V., Keshabyants E.E., Kobelkova I.V., Kambarov A.O., Elizarova E.V., Tutelyan V.A. The association of rs993609 polymorphisms of gene *FTO* and rs659366 polymorphisms of gene *UCP2* with obesity among Arctic Russian population. *Voprosy Pitaniya = Problems of Nutrition*. 2017;86(3):32-39. (in Russian)]
- Бондарь И.А., Филипенко М.Л., Шабельникова О.Ю., Соколова Е.А. Ассоциация полиморфных маркеров rs7903146 гена *TCF7L2* и rs1801282 гена *PPARG* (*Pro12Ala*) с сахарным диабетом 2 типа в Новосибирской области. *Сахарный диабет*. 2013;4:17-22. DOI 10.14341/DM2013417-22. [Bondar' I.A., Filipenko M.L., Shabel'nikova O.Yu., Sokolova E.A. Rs7903146 variant of *TCF7L2* gene and rs1801282 variant of *PPARG2* gene (*Pro12Ala*) are associated with type 2 diabetes mellitus in Novosibirsk population. *Sakharnyi Diabet = Diabetes Mellitus*. 2013;4:17-22. DOI 10.14341/DM2013417-22. (in Russian)]
- Иевлева К.Д., Байрова Т.А., Шенеман Е.А., Аюрова Ж.Г., Бальжиева В.В., Новикова Е.А., Бугун О.В., Рычкова Л.В., Колесникова Л.И. Протективный эффект G-аллеля полиморфизма *PPARG2* rs1801282 в отношении избыточной массы тела и ожирения у подростков-монголоидов. *Журн. мед.-биол. исследований*. 2019;7(4):452-463. DOI 10.17238/issn2542-1298.2019.7.4.452. [Ievleva K.D., Bairova T.A., Sheneman E.A., Ayurova Zh.G., Bal'zheva V.V., Novikova E.A., Bugun O.V., Rychkova L.V., Kolesnikova L.I. The protective effect of the G-allele of *PPARG2* rs1801282 polymorphism against overweight and obesity in Mongoloid adolescents. *Zhurnal Mediko-Biologicheskikh Issledovaniy = Journal of Medical and Biological Research*. 2019;7(4):452-463. DOI 10.17238/issn2542-1298.2019.7.4.452. (in Russian)]
- Кичигин В.А., Кочемирова Т.Н., Акимова В.П. Этнические особенности распространенности факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в городской популяции. *Acta Medica Eurasica*. 2017;4:16-23. [Kichigin V.A., Kochemirova T.N., Akimova V.P. Ethnic peculiarities in prevalence of cardiovascular risk factors in urban population. *Acta Medica Eurasica*. 2017;4:16-23. (in Russian)]
- Куртанов Х.А., Сыдыкова Л.А., Павлова Н.И., Филиппова Н.П., Додохов В.В., Апсолихова Г.А., Соловьева Н.А., Дьяконова А.Т., Неустроева Л.М., Варламова М.А., Борисова Н.В. Полиморфизм гена адипонутрина (*PNPLA3*) у коренных жителей Республики Саха (Якутия), страдающих сахарным диабетом 2-го типа. *Альманах клин. медицины*. 2018;46(3):258-263. DOI 10.18786/2072-0505-2018-46-3-258-263. [Kurtanov Kh.A., Sydykova L.A., Pavlova N.I., Filippova N.P., Dodykhov V.V., Apsolikhova G.A., Solov'eva N.A., D'yakonova A.T., Neustroeva L.M., Varlamova M.A., Borisova N.V. Polymorphism of the adiponutrin gene (*PNPLA3*) in the indigenous inhabitants of the Republic of Sakha (Yakutia) with type 2 diabetes mellitus. *Al'manakh Klinicheskoy Meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(3):258-263. DOI 10.18786/2072-0505-2018-46-3-258-263. (in Russian)]
- Мельникова Е.С., Рымар О.Д., Иванова А.А., Мустафина С.В., Шапкина М.Ю., Бобак М., Малютина С.К., Воевода М.И., Максимов В.Н. Ассоциация полиморфизмов генов *TCF7L2*, *FABP2*, *KCNQ1*, *ADIPOQ* с прогнозом развития сахарного диабета 2-го типа. *Терапевт. архив*. 2020;92(10):40-47. DOI 10.26442/00403660.2020.10.000393. [Mel'nikova E.S., Rymar O.D., Ivanova A.A., Mustafina S.V., Shapkina M.Ju., Bobak M., Maljutina S.K., Voevoda M.I., Maximov V.N. Association of polymorphisms of genes *TCF7L2*, *FABP2*, *KCNQ1*, *ADIPOQ* with the prognosis of the development of type 2 diabetes mellitus. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*. 2020;92(10):40-47. DOI 10.26442/00403660.2020.10.000393. (in Russian)]
- Овсянникова О.В., Подхомутников В.М., Колбаско А.В., Лузина Ф.А., Гуськова Е.В. Сердечно-сосудистая патология у коренных сельских жителей Кузбасса – телеутов. *Рос. кардиол. журн*. 2007;6:59-62. [Ovsyannikova O.V., Podkhomutnikov V.M., Kolbasko A.V., Luzina F.A., Gus'kova E.V. Cardiovascular disease in rural Kuzbass aborigines – Teleut. *Rossiyskiy Kardiologicheskij Zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2007;6:59-62. (in Russian)]
- Орлов П.С., Куликов И.В., Устинов С.Н., Гафаров В.В., Малютин С.К., Ромашенко А.Г., Воевода М.И., Максимов В.Н. Ассоциативный анализ некоторых однонуклеотидных полиморфных маркеров сахарного диабета второго типа с инфарктом миокарда. *Бюл. СО РАМН*. 2011;31(5):19-24. [Orlov P.S., Kulikov I.V., Ustinov S.N., Gafarov V.V., Malyutina S.K., Romashchenko A.G., Voevoda M.I., Maksimov V.N. Association analysis of some single nucleotide polymorphism markers of the second type of diabetes with myocardial infarction. *Byulleten' SO RAMN = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2011;31(5):19-24. (in Russian)]
- Остапцева А.В., Шабалдин А.В., Ахматянова В.Р., Минина В.И., Глушков А.Н., Дружинин В.Г., Зоркольева И.В., Шабалдин Е.В., Глушкова О.А., Макаренченко О.С., Агеева Т.Н. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма гена интерлейкина-4 у телеутов, шорцев и европеоидов Кемеровской области. *Мед. иммунология*. 2006;8(5-6):737-740. [Ostap'tseva A.V., Shabaldin A.V., Akhmatianova V.R., Minina V.I., Glushkov A.N., Druzhinin V.G., Zorkoltseva I.V., Shabaldin E.V., Glushkova O.A., Makarchenko O.S., Ageyeva T.N. Molecular genetic analysis of interleukin 4 gene polymorphism among Teleutians, Shorians, and Caucasians of Kemerovo region. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology*. 2006;8(5-6):737-740. (in Russian)]
- Сметанина С.А. Молекулярно-генетические и гормонально-метаболические ассоциации у женщин российской популяции репродуктивного возраста с ожирением и ранним менархе. *Мед. наука и образование Урала*. 2015;2(1):126-129. [Smetanina S.A. Molecular-genetic and hormonal-metabolic associations among women of the Russian population of reproductive age with obesity and early menarche. *Meditsinskaya Nauka i Obrazovaniye Urala = Medical Science and Education in Ural*. 2015;2(1):126-129. (in Russian)]
- Цыганкова Д.П., Мулерова Т.А., Огарков М.Ю., Саарела Е.Ю., Барбараш О.Л. Смена традиционного уклада жизни как причина роста риска метаболических нарушений среди жителей Горной Шории. *Consilium Medicum*. 2018;20(5):66-70. DOI 10.26442/2075-1753_2018.5.66-71. [Cygankova D.P., Mulerova T.A., Ogarkov M.Yu., Saarela Ye.Yu., Barbarash O.L. Traditional lifestyle change as a reason for metabolic disorders risk increase in residents of Gornaya Shoriya. *Consilium Medicum*. 2018;20(5):66-70. DOI 10.26442/2075-1753_2018.5.66-71. (in Russian)]

- Цыреторова С.С., Бардымова Т.П., Протасов К.В., Дониорова О.С., Мистяков М.В. Этнические особенности сахарного диабета и ишемической болезни сердца. *Сиб. мед. журн. (Иркутск)*. 2015; 136(5):15-21. [Tsyretorova S.S., Bardymova T.P., Protasov K.V., Donirova O.S., Mistyakov M.V. Ethnic features of diabetes mellitus and coronary heart disease. *Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2015;136(5):15-21. (in Russian)]
- Anjum N., Jehangir A., Liu Y. Two *TCF7L2* variants associated with type 2 diabetes in the Han nationality residents of China. *J. Coll. Physicians Surg. Pak*. 2018;28(10):794-797.
- Bennett C.N., Ross S.E., Longo K.A., Bajnok L., Hemati N., Johnson K.W., Harrison S.D., MacDougald O.A. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem*. 2002;277(34):30998-31004. DOI 10.1074/jbc.M204527200.
- Cauchi S., El Achhab Y., Choquet H., Dina C., Krempler F., Weitgasser R., Nejjari C., Patsch W., Chikri M., Meyre D., Froguel P. *TCF7L2* is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J. Mol. Med*. 2007;85(7):777-782. DOI 10.1007/s00109-007 0203-4.
- Franceschini N., Shara N.M., Wang H., Voruganti V.S., Laston S., Haack K., Lee E.T., Best L.G., MacCluer J.W., Cohran B., Dyer T.D., Howard B.V., Cole S.A., North K.E., Umans J.G. The association of genetic variants of type 2 diabetes with kidney function. *Kidney Int*. 2012;82(2):220-225. DOI 10.1038/ki.2012.107.
- Hallmark B., Karafet T.M., Hsieh P.H., Osipova L.P., Watkins J.C., Hammer M.F. Genomic evidence of local adaptation to climate and diet in indigenous Siberians. *Mol. Biol. Evol*. 2018;36(2):315-327. DOI 10.1093/molbev/msy211.
- Han X., Luo Y., Ren Q., Zhang X., Wang F., Sun X., Zhou X., Ji L. Implication of genetic variants near *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *FTO*, *TCF2*, *KCNQ1*, and *WFS1* in type 2 diabetes in a Chinese population. *BMC Med. Genet*. 2010;11:81. DOI 10.1186/1471-2350-11-81.
- Haupt A., Thamer C., Heni M., Ketterer C., Machann J., Schick F., Machicao F., Stefan N., Claussen C.D., Häring H.U., Fritsche A., Staiger H. Gene variants of *TCF7L2* influence weight loss and body composition during lifestyle intervention in a population at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*. 2010;59(3):747-750. DOI 10.2337/db09-1050.
- Katsoulis K., Paschou S.A., Hatzis E., Tigas S., Georgiou I., Tsatsoulis A. *TCF7L2* gene variants predispose to the development of type 2 diabetes mellitus among individuals with metabolic syndrome. *Hormones (Athens)*. 2018;17(3):359-365. DOI 10.1007/s42000-018-0047-z.
- Kaya E.D., Arikoğlu H., Kayış S.A., Öztürk O., Gönen M.S. Transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene polymorphisms are strong predictors of type 2 diabetes among nonobese diabetics in the Turkish population. *Turk. J. Med. Sci*. 2017;47(1):22-28. DOI 10.3906/sag-1507-160.
- Melzer D., Murray A., Hurst A.J., Weedon M.N., Bandinelli S., Corsi A.M., Ferrucci L., Paolisso G., Guralnik J.M., Frayling T.M. Effects of the diabetes linked *TCF7L2* polymorphism in a representative older population. *BMC Med*. 2006;4:34. DOI 10.1186/1741-7015-4-34.
- Nobrega M.A. *TCF7L2* and glucose metabolism: time to look beyond the pancreas. *Diabetes*. 2013;62(3):706-708. DOI 10.2337/db12-1418.
- Potapov V.A., Nosikov V.V., Shamkhalova M.N., Shestakova M.V., Smetanina S.A., Bel'chikova L.N., Suplotova L.A. *TCF7L2 rs12255372* and *SLC30A8 rs13266634* confer susceptibility to type 2 diabetes in a Russian population. *Russ. J. Genet*. 2010;46(8):1001-1008. DOI 10.1134/S1022795410080132.
- Rosales-Reynoso M.A., Arredondo-Valdez A.R., Juárez-Vázquez C.I., Wence-Chavez L.I., Barros-Núñez P., Gallegos-Arreola M.P., Flores-Martínez S.E., Morán-Moguel M.C., Sánchez-Corona J. *TCF7L2* and *CCND1* polymorphisms and its association with colorectal cancer in Mexican patients. *Cell Mol. Biol*. 2016;62(11):13-20. DOI 10.14715/cmb/ 2016.62.11.3.
- Saxena R., Gianniny L., Burt N.P., Lyssenko V., Giuducci C., Sjögren M., Florez J.C., Almgren P., Isomaa B., Orho-Melander M., Lindblad U., Daly M.J., Tuomi T., Hirschhorn J.N., Ardlie K.G., Groop L.C., Altshuler D. Common single nucleotide polymorphisms in *TCF7L2* are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes*. 2006;55(10):2890-2895. DOI 10.2337/db06-0381.
- Sladek R., Rocheleau G., Rung J., Dina C., Shen L., Serre D., Boutin P., Vincent D., Belisle A., Hadjadj S., Balkau B., Heude B., Charpentier G., Hudson T.J., Montpetit A., Pshzhetsky A.V., Prentki M., Posner B.I., Balding D.J., Meyre D., Polychronakos C., Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-885. DOI 10.1038/nature05616.
- Tabikhanova L.E., Osipova L.P., Voronina E.N., Bragin A.O., Filipenko M.L. Polymorphism of lipid exchange genes in some populations of South and East Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8):1011-1019. DOI 10.18699/VJ19.578.
- The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. DOI 10.1038/nature11632.
- Timpson N.J., Lindgren C.M., Weedon M.N., Randall J., Ouwehand W.H., Strachan D.P., Rayner N.W., Walker M., Hitman G.A., Doney A.S., Palmer C.N., Morris A.D., Hattersley A.T., Zeggini E., Frayling T.M., McCarthy M.I. Adiposity-related heterogeneity in patterns of type 2 diabetes susceptibility observed in genome-wide association data. *Diabetes*. 2009;58(2):505-510. DOI 10.2337/db08-0906.
- Trifonova E.A., Popovich A.A., Bocharova A.V., Vagaitseva K.V., Stepanov V.A. The role of natural selection in the formation of the genetic structure of populations by SNP markers in association with body mass index and obesity. *Mol. Biol*. 2020;54(3):349-360. DOI 10.1134/S0026893320030176.
- Vikulova O.K., Zheleznyakova A.V., Lebedeva N.O., Nikitin A.G., Nosikov V.V., Shestakova M.V. Genetic factors in the development of kidney chronic disease in patients with diabetes mellitus. *Russ. J. Genet*. 2017;53(4):420-432. DOI 10.1134/S1022795417030140.
- Xi B., Takeuchi F., Meirhaeghe A., Kato N., Chambers J.C., Morris A.P., Cho Y.S., Zhang W., Mohlke K.L., Kooner J.S., Shu X.O., Pan H., Tai E.S., Pan H., Wu J.Y., Zhou D., Chandak G.R., DIAGRAM Consortium, AGEN-T2D Consortium, SAT2D Consortium. Associations of genetic variants in/near body mass index-associated genes with type 2 diabetes: a systematic meta-analysis. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2014;81(5):702-710. DOI 10.1111/cen.12428.
- Zhang M., Tang M., Fang Y., Cui H., Chen S., Li J., Xiong H., Lu J., Gu D., Zhang B. Cumulative evidence for relationships between multiple variants in the *VTG1A* and *TCF7L2* genes and cancer incidence. *Int. J. Cancer*. 2018;142(3):498-513. DOI 10.1002/ijc.31074.

ORCID ID

L.E. Tabikhanova orcid.org/0000-0002-5547-8189
L.P. Osipova orcid.org/0000-0001-7602-1156

T.V. Churkina orcid.org/0000-0003-1398-6537
E.N. Voronina orcid.org/0000-0002-3405-6980
M.L. Filipenko orcid.org/0000-0002-8950-5368

Благодарности. Исследование популяций бурят, телеутов, якутов и долган было поддержано грантом Российского научного фонда, проект № 19-15-00219. Изучение русской выборки выполнено в рамках государственного задания ИЦиГ СО РАН (№ 0259-2021-0014).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.08.2021. После доработки 29.10.2021. Принята к публикации 10.11.2021.

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

Показатель снижения температуры растительного полога в селекции пшеницы на засухоустойчивость и жаростойкость

С.Б. Лепехов 

Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Россия
 sergei.lepehov@yandex.ru

Аннотация. Прошло более 40 лет с начала использования инфракрасного термометра для оценки засухо- и жаростойкости в селекции растений. За это время метод широко распространился во всем мире. Однако в России описываемый способ оценки стрессоустойчивости сортов до сих пор не применяется. Нами сделан обзор результатов использования инфракрасного термометра в селекции растений. На примере пшеницы описаны основные достоинства и недостатки показателя CTD (canopy temperature depression), оцениваемого посредством инфракрасного термометра. Генотипы с более высоким значением CTD, а значит, более прохладным пологом в условиях засухи, используют большее количество доступной почвенной влаги для охлаждения за счет транспирации. CTD – интегрирующий признак, который диагностирует текущий водный статус растений. Коэффициент вариации показателя CTD находится в пределах 10–43 %. В значительном количестве работ показана его тесная взаимосвязь с урожайностью и высокая наследуемость, однако в целом больший коэффициент наследуемости имела урожайность. Применение показателя CTD в практической селекции пшеницы оспаривается рядом исследователей из-за значительного количества влияющих на него факторов. CTD тесно связан с другими признаками, отражающими водный статус растений или результат адаптации к засухе или жаре. Локусы количественных признаков, ассоциированные с CTD, обнаружены на всех хромосомах, за исключением хромосомы 3D. Выявленные локусы часто описывают небольшую часть фенотипической изменчивости (10–20 %, чаще менее 10 %), что затруднит пирамидирование генов, связанных с температурой полога, посредством маркерной селекции. Оценка показателя CTD надежна, технически проста и производительна и при надлежащем ее использовании позволяет объективно определить одну из сторон жаро- и засухоустойчивости сортов, сохранив растения в живом виде, что выгодно отличает ее от других методов. Наилучший результат описываемый метод демонстрирует в условиях терминальной засухи. Ключевые слова: показатель CTD; пшеница; засухоустойчивость; жаростойкость; критерий отбора.

Для цитирования: Лепехов С.Б. Показатель снижения температуры растительного полога в селекции пшеницы на засухоустойчивость и жаростойкость. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):196-201. DOI 10.18699/VJGB-22-24

Canopy temperature depression for drought- and heat stress tolerance in wheat breeding

S.B. Lepekhov 

Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Barnaul, Russia
 sergei.lepehov@yandex.ru

Abstract. An infrared thermometer was first used to assess drought and heat tolerance in plant breeding more than 40 years ago. Soon afterward, this method became widely used throughout the world. However, Russia has not yet applied the described method for evaluating stress tolerance. This paper presents an overview of using infrared thermometry in plant breeding. Taking wheat as an example, it shows major advantages and disadvantages of canopy temperature depression (CTD) values measured by the infrared thermometer. The paper also demonstrates that genotypes with higher CTD values, and therefore with a lower canopy temperature, use more available soil moisture under drought stress to cool the canopy by transpiration. It refers to CTD as an integrative trait that reflects an overall plant water status. Its coefficient of variation lies in the interval of 10 to 43 %. A large number of publications illustrate a close relation between CTD values and yield and indicate a high heritability of the former. Meanwhile, the same works show that yield has a higher heritability. Moreover, some researchers doubt that CTD should be used in applied wheat breeding as there are many factors that influence it. CTD has a high correlation with other traits that reflect plant water status or their adaptation to drought or heat stress. Quantitative trait loci (QTLs) associated with CTD are localized in all chromosomes, except for 3D. These QTLs often explain a small part of phenotypic variance (10–20 %, more likely less than 10 %), which complicates the pyramiding of canopy

temperature genes through marker-assisted selection. The paper concludes that the evaluation of CTD appears to be a reliable, relatively simple, labor-saving, objective, and non-invasive method that sets it apart from other methods as well as shows the best results under terminal drought and heat stress conditions.

Key words: CTD; wheat; drought tolerance; heat tolerance; selection criteria.

For citation: Lepekhev S.B. Canopy temperature depression for drought- and heat stress tolerance in wheat breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):196-201. DOI 10.18699/VJGB-22-24

Введение

Ущерб от засухи и жары ежегодно отмечается на посевах мягкой пшеницы, которые занимают общую площадь 200 млн га (Ortiz et al., 2008). Пшеница очень чувствительна к тепловому стрессу. Оптимальная температура для фотосинтеза у нее составляет примерно 25 °C (Nagai, Makino, 2009). Подсчитано, что с повышением температуры воздуха над оптимальной на 1 °C в период налива зерна урожайность пшеницы снижается на 3–4 % (Wardlaw et al., 1989).

Одним из способов снижения ущерба от засухи является селекция засухоустойчивых сортов. Работа в этом направлении трудоемка, поскольку включает оценку большого количества растений и осложнена низкой и непостоянной взаимосвязью между фенотипом и урожайностью в условиях засухи по причине множества вовлеченных механизмов адаптации. Отбор, основанный исключительно на урожайности, осложняет селекцию на засухоустойчивость, так как урожайность характеризуется низкой наследуемостью в условиях засухи (Sofi et al., 2019). Следовательно, крайне важно обнаружить другие признаки, связанные с засухоустойчивостью, для быстрой оценки большого количества сортообразцов (Sohail et al., 2020).

Для выявления толерантных генотипов было предложено несколько физиологических признаков. Физиологический признак – это признак, который влияет на механизмы, играющие роль в адаптации растений к стрессу (Reynolds et al., 2009), например длина колеоптиле, сохранность зеленой окраски листьями, концентрация растворимых углеводов в стебле, водный потенциал листа, температура полога (*англ.* canopy temperature) и др.

В настоящей статье представлен обзор результатов использования инфракрасного термометра в селекции растений.

Назначение показателя CTD и метод его определения

Температура полога – интегрирующий признак, который отражает водный статус растений, т. е. равновесие между потреблением воды корнями и транспирацией побегов (Berger et al., 2010). Под действием интенсивной солнечной радиации и засухи устьичная проводимость растений снижается, дефицит почвенной влаги приводит к падению нормального уровня транспирации, что в свою очередь способствует увеличению температуры полога (Rebetzke et al., 2013), поэтому измерение его температуры может использоваться в экспериментах по жаро- и засухоустойчивости растений. Нередко вместо температуры полога исследователи рассчитывают показатель CTD (canopy temperature depression), который определяется по разности между температурой воздуха и температурой полога

(Jackson et al., 1981). Если под действием транспирации температура полога опускается ниже температуры воздуха, то CTD положительный, и наоборот: когда полог нагревается сильнее воздуха, CTD отрицательный. Генотипы с более высоким значением CTD и, следовательно, более прохладным пологом в условиях засухи используют большее количество доступной почвенной влаги для охлаждения за счет транспирации. Поскольку устоявшегося определения для термина ‘canopy temperature depression’ в русском языке нет, мы предлагаем оставить без изменения английский вариант – показатель CTD.

Температуру полога измеряют с помощью портативного инфракрасного термометра или инфракрасной камеры (Yousfi et al., 2019). Работа проводится в безветренную и безоблачную погоду после полудня. Наиболее существенные генотипические различия по CTD наблюдаются с 14 до 15 ч (Thara et al., 2018), при высокой температуре и низкой влажности воздуха (Zhang X. et al., 2018). Исследователь должен располагаться по отношению к делянке таким образом, чтобы не отбрасывать тень на область измерения (Pinto et al., 2010). Если делянка посеяна рядами, то рекомендуется стоять сбоку от них, располагая термометр под углом к рядам. Когда покрытие почвы листьями низкое, необходимо держать термометр под небольшим углом к горизонтали, чтобы свести к минимуму влияние температуры почвы (Reynolds et al., 2001). Прибор размещают в 50 см над пологом, отступая от края делянки 1 м (Mason et al., 2011; Sohail et al., 2020). Лучшая фаза для измерения – период налива зерна (Thara et al., 2018).

Инфракрасный термометр был впервые внедрен в сельское хозяйство для планирования орошения в 1970-х гг. (Jackson et al., 1977), а использовать его для изучения засухоустойчивости начали в 1980-х гг. (Blum et al., 1982). С конца 1980-х гг. в CIMMYT применяют оценку CTD в различных экспериментах как критерий устойчивости к засухе и высокой температуре воздуха. Популяции с высоким значением CTD отбираются в поколении F₃ (Blum, 2005). Измерение температуры полога может значительно ускорить выявление засухоустойчивых генотипов благодаря высокой скорости работы (~10 с на делянку), простоте и сравнительной экономичности. Показатель CTD интегрирует весь посев за счет одновременной оценки многих растений, что снижает ошибку, связанную с вариацией отдельных генотипов (Cossani, Reynolds, 2012).

Факторы, влияющие на точность определения CTD

Помимо вышеперечисленных достоинств, метод имеет некоторые ограничения. Точность измерения подвержена влиянию микроклимата, складывающегося в агрофито-

ценозе. Высокая изменчивость наблюдается при резкой смене условий, например в облачные дни (Chaves, 2013). На СТД влияет ряд биологических и средовых факторов, таких как температура и относительная влажность воздуха, влажность почвы, скорость ветра, солнечная радиация, эвапотранспирация, адаптация листа к дефициту воды (Bahar et al., 2008), густота стояния растений (White et al., 2012), размер колоса, окраска листьев и их размер (Balota et al., 2008), угол наклона листьев (Zhang Y. et al., 2011), длина междоузлия и наличие остей (Bonari et al., 2020). Поскольку органы растения различаются по своей охлаждающей способности, температура полога с колосьями на 2 °C выше, чем без колосьев (Olivares-Villegas et al., 2007).

Наличие описанных ограничений позволяет сделать вывод о том, что особенности показателя СТД в достаточной степени изучены. Воздействие среды неизбежно, но корректировка данных относительно стандартов, использование повторностей и неоднократный сбор данных компенсируют это влияние (Reynolds et al., 2001).

Взаимосвязь показателя СТД с другими признаками пшеницы

В большом количестве экспериментов показатель СТД демонстрирует существенную корреляцию с урожайностью в условиях засухи и жары (Gao et al., 2016; Liang et al., 2018; Sohail et al., 2020). При снижении СТД на 1 °C урожайность пшеницы уменьшается на 1.5–1.7 ц/га (Kaur et al., 2018). В связи с этим описываемый параметр остается важным критерием отбора в селекционных программах не только Мексики, но и других стран (Al-Ghzawi et al., 2018; Thara et al., 2018). В результате новые сорта пшеницы характеризуются более прохладным пологом (Thara et al., 2018), хотя для сортов разных сортосмен, возделываемых в благоприятных условиях или при орошении, такая закономерность не прослеживается (Balota et al., 2017).

В исследованиях установлена и подтверждается тесная взаимосвязь между СТД и другими признаками, влияющими на водный статус растения или на результат адаптации к засухе и жаре: устьичной проводимостью (Bonari et al., 2020), задержкой старения листьев (Fang et al., 2017), восковым налетом на листьях и стебле (Mondal et al., 2015), глубиной и распределением корневой системы в почве (Pinto, Reynolds, 2015), стерильностью колоса (Sohail et al., 2020) и массой 1000 зерен (Gulnaz et al., 2019).

Варьирование и наследуемость показателя СТД

Коэффициент вариации показателя СТД, обнаруживаемый в различных исследованиях, меняется от среднего – 10–14 % (Sharma P. et al., 2017; Jokar et al., 2018) до значительного – 26–43 % (Kumar et al., 2017; Sharma D. et al., 2018). При жаркой и засушливой погоде СТД предсказуемо снижается вплоть до отрицательных значений (Thara et al., 2018), а различия между генотипами возрастают (Pinto et al., 2010). С этой точки зрения показатель СТД лучше подходит для характеристики засухоустойчивости сортов, чем урожайность при засухе. Высказывается мнение, что по сравнению с прямым отбором по урожайности и другим признакам СТД имеет большую ценность как косвенный критерий для отбора генотипов, что достигается за счет высокой наследуемости и корреляции с урожайностью

Коэффициент наследуемости СТД и урожайности мягкой пшеницы в различных научных публикациях

Коэффициенты наследуемости	Урожайности	Литературный источник
СТД	урожайности	
0.25, 0.32, 0.67	0.74, 0.82, 0.85	Olivares-Villegas et al., 2007
0.82, 0.11 и 0.34, 0.81	0.56 и 0.60	Reynolds et al., 2007
0.49	0.65–0.90	Pinto et al., 2010
0.51	0.61	Rathey et al., 2011
0.81	0.66	Paliwal et al., 2012
0.66	0.95	Bellundagi et al., 2013
0.24, 0.29	0.59	Lopes et al., 2013
0.22	0.62	Sukumaran et al., 2015
0.83	0.91	Rahman et al., 2016
0.52–0.61	0.66	Sharma D. et al., 2018

(Rebetzke et al., 2013). Хотя в ряде работ наследуемость показателя СТД достигала значений 0.65–0.80 (Kumar et al., 2017; Khan et al., 2020), многие авторы, рассчитывавшие наследуемость как для СТД, так и для урожайности, часто получали для последнего признака лучшую наследуемость (см. таблицу).

Влияние среды – наиболее вероятная причина низкой наследуемости СТД (Gao et al., 2016). Таким образом, анализ литературных данных не позволяет считать показатель СТД более подходящим критерием отбора по сравнению с урожайностью при засухе. Наиболее уместно использовать этот показатель в качестве дополнительного параметра оценки засухоустойчивости сортов.

Генетические факторы, влияющие на снижение температуры полога

Генетический контроль показателя СТД интенсивно изучался два последних десятилетия. Асуña-Galindo с коллегами (Асуña-Galindo et al., 2015) проанализировали результаты 30 научных работ с 2002 по 2011 г. и выделили четыре металокуса (MQTL), содержащих два или более QTL для признаков, связанных с засухоустойчивостью и жаростойкостью (включая показатель СТД), идентифицированных в различных исследованиях, популяциях или средах. Данные металокусы расположены на хромосомах 1В (34±2 сМ), 2В (68±2 сМ), 3В (139±4 сМ) и 7А (100±6 сМ). Одиночные QTL для СТД в этой же работе описаны для металокусов на хромосомах 3В, 4А, 7А и три MQTL – для хромосомы 5А. QTL, ассоциированные с СТД, были локализованы совместно с QTL, контролирующими другие адаптивные признаки (урожайность, биомасса, длительность периода «всходы–колошение», озерненность колоса, масса 1000 зерен и содержание растворимых углеводов в стебле). Pinto с коллегами (Pinto et al., 2010), обобщая результаты собственных и предыдущих исследований, приводят данные о том, что QTL для температуры полога локализованы на хромосомах 1А, 1В,

1D, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 6B, 6D, 7A и 7B. В публикациях после 2011 г. QTL для STD были обнаружены практически на всех хромосомах, за исключением 1D, 3A, 3D и 6D (Paliwal et al., 2012; Lopes et al., 2013; Mason et al., 2013; Rebetzke et al., 2013; Mondal et al., 2015; Sukumaran et al., 2015; Awlachev et al., 2016; Gao et al., 2016; Mohammed et al., 2021).

Установлена совместная или близкая локализация QTL для STD с генами *Rht-B1* (Gao et al., 2016), *Rht-D1* – низкорослая пшеница имеет более теплый полог, и *Ppd-D1* (Rebetzke et al., 2013), *Vrn-A1* (Mondal et al., 2015), транскрипционным фактором *Dreb1* (Khalid et al., 2019).

Обнаруженные локусы для температуры полога объясняют 10–20 % фенотипической вариации данного показателя (Paliwal et al., 2012; Mondal et al., 2015; Awlachev et al., 2016) или даже менее 10 % (Rebetzke et al., 2013; Sukumaran et al., 2015). Это ожидаемо, так как STD – интегрирующий признак, связанный с многими механизмами засухоустойчивости (Lopes et al., 2013). Более того, охлаждение растений на разных стадиях развития контролируется локусами с различной локализацией (Lopes et al., 2013; Gao et al., 2016), поэтому результат оценки STD варьирует в зависимости от стадии развития растений (Gulnaz et al., 2019). Вероятно, невысокие генетические эффекты множественных QTL совместно с используемыми в селекции популяциями небольшого размера ограничат пирамидирование аллелей STD в случае маркерной селекции (Rebetzke et al., 2013).

Проблемы, связанные с использованием показателя STD в практической селекции

STD – хороший индикатор любого типа стресса, будь то высокая температура воздуха, дефицит влаги или микроэлементов (Kaur et al., 2018). Внесение азотных удобрений повышает STD (Yang et al., 2018), поэтому описываемый показатель выявляет не только водный, но и азотный статус растений (Guo et al., 2016). Сообщается о взаимосвязи между NDVI и STD (Yousfi et al., 2019). Температура полога может повышаться из-за заражения растений септориозом (Wang et al., 2019). В то же время обнаружено, что теплый полог создает неблагоприятные условия для развития желтой ржавчины (Cheng et al., 2015). Поскольку факторы среды действуют на растение в совокупности, использование STD только для суждения о засухоустойчивости генотипов в отсутствие засухи может вести к неверным выводам.

Помимо широко известной отрицательной корреляции урожайности и STD при засухе или жаре, описанной выше, ученые указывают на противоречивый характер их взаимосвязи в разных средах (Balota et al., 2017). Например, в высокопродуктивных средах сорта со сравнительно высоким STD имеют большую урожайность, чем сорта с низким STD, а в низкоурожайных средах взаимосвязь этих признаков исчезает (Lu et al., 2020). Это объясняется тем, что различия в уровне устойчивости растений отчетливо проявляются лишь при определенной напряженности лимитирующего фактора (Удовенко, 1973). Некоторые авторы выявляют несущественную или положительную взаимосвязь между STD и урожайностью (Rahman et al., 2016; Bala, Sikder, 2017). При засухе обнаружены

высокоурожайные сорта как с положительным, так и с отрицательным STD (Sofi et al., 2019).

Изменчивость урожайности при засухе может быть объяснена небольшим количеством признаков, включая STD. В большинстве случаев они поддаются количественному учету у родителей и проверке их экспрессии в расщепляющемся потомстве (Reynolds et al., 2007). Однако в ряде работ STD не мог быть точно измерен из-за плохого смыкания растительного покрова над почвой (Liang et al., 2018) или в случаях, когда урожайность сильно зависела от ограниченного количества доступной почвенной влаги (Royo et al., 2002). Balota с коллегами (Balota et al., 2017) пришли к заключению о том, что STD затруднительно использовать в практической селекции, поскольку из-за различий в высоте существует эффект влияния соседней деланки.

Следует проявлять осторожность при отборе генотипов с высоким STD в условиях дефицита влаги, так как хорошо развитые позднеспелые генотипы могут формировать большую биомассу к моменту измерения температуры полога. Биомасса и транспирация физиологически связаны, и линии с высокой биомассой будут быстрее истощать почвенную влагу, вызывая закрытие устьиц и нагрев растений. Поэтому отбор генотипов с прохладным пологом в условиях дефицита почвенной влаги может способствовать накоплению линий с низким потенциалом урожайности и биомассой (Rebetzke et al., 2013) или идентификации узкоспециализированных генотипов (Jokar et al., 2018).

Заключение

Таким образом, показатель STD надежен, технически прост, быстро измеряем и при надлежащем его использовании позволяет объективно оценить одну из сторон жаро- и засухоустойчивости сортов, сохранив растения в живом виде, что выгодно отличает его от любого лабораторного метода. Для лучшей оценки устойчивости сортов к засухе и жаре необходимо учитывать комплекс показателей, поэтому показатель STD может обогатить знания о засухоустойчивости сортов. Следует также помнить, что данный метод показывает наилучший результат в условиях терминальной засухи.

Список литературы / References

- Удовенко Г.В. Характер защитно-приспособительных реакций и причины разной устойчивости растений к экстремальным воздействиям. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1973;49(3):258-268.
- [Udovenko G.V. Character of adaptation reaction and causes of different resistance of plants to extremal conditions. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1973;49(3):258-268. (in Russian)]
- Acuña-Galindo M.A., Mason R.E., Subramanian N.K., Hays D.B. Meta-analysis of wheat QTL regions associated with adaptation to drought and heat stress. *Crop Sci*. 2015;55(2):477-492. DOI 10.2135/cropsci2013.11.0793.
- Al-Ghazawi A.L.A., Khalaf Y.B., Al-Ajlouni Z.I., Al-Quraan N.A., Musallam I., Hani N.B. The effect of supplemental irrigation on canopy temperature depression, chlorophyll content, and water use efficiency in three wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) varieties grown in dry regions of Jordan. *Agriculture*. 2018;8(5):67. DOI 10.3390/agriculture8050067.

- Awlachev Z.T., Singh R., Kaur S., Bains N.S., Chhuneja P. Transfer and mapping of the heat tolerance component traits of *Aegilops speltoides* in tetraploid wheat *Triticum durum*. *Mol. Breed.* 2016;36:78. DOI 10.1007/s11032-016-0499-2.
- Bahar B., Yildirim M., Barutcular C., Genc I. Effect of CTD on grain yield and yield component in bread and durum wheat. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 2008;36(1):34-37. DOI 10.15835/nbha36187.
- Bala P., Sikder S. Heat stress indices, correlation and regression analysis of wheat genotypes for yield potential. *Int. J. Curr. Agric. Sci.* 2017;7(4):190-194.
- Balota M., Green A.J., Griffey C.A., Pitman R., Thomason W. Genetic gains for physiological traits associated with yield in soft red winter wheat in the Eastern United States from 1919 to 2009. *Eur. J. Agron.* 2017;84:76-83. DOI 10.1016/j.eja.2016.11.008.
- Balota M., Peters T.R., Payne W.A., Evett S.R. Morphological and physiological traits related with canopy temperature depression in three-closely related wheat lines. *Crop Sci.* 2008;48(5):1897-1910. DOI 10.2135/cropsci2007.06.0317.
- Bellundagi A., Singh G.P., Prabhu K.V., Arora A., Neelu J., Ramya P., Singh A.M., Singh P.K., Ahlawat A. Early ground cover and other physiological traits as efficient selection criteria for grain yield under moisture deficit stress conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian J. Plant Physiol.* 2013;18:277-281. DOI 10.1007/s40502-013-0047-6.
- Berger B., Parent B., Tester M. High-throughput shoot imaging to study drought responses. *J. Exp. Bot.* 2010;61(13):3519-3528. DOI 10.1093/jxb/erq201.
- Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust. J. Agric. Res.* 2005;56(11):1159-1168. DOI 10.1071/AR05069.
- Blum A., Mayer J., Gozlan G. Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat. *Field Crops Res.* 1982;5:137-146. DOI 10.1016/0378-4290(82)90014-4.
- Bonari A., Edalat M., Ghadiri H., Kazemeini S.A., Modarresi M. The study of temperature depression and its association with grain yield in six wheat cultivars under heat stress conditions and salicylic acid application. *Iran Agric. Res.* 2020;39(1):99-108. DOI 10.22099/iar.2020.31975.1318.
- Chaves M.M. Thermography to explore plant-environment interactions. *J. Exp. Bot.* 2013;64(13):3937-3949. DOI 10.1093/jxb/ert029.
- Cheng J.-J., Li H., Ren B., Zhou C.-J., Kang Z.-S., Huang L.-L. Effect of canopy temperature on the stripe rust resistance of wheat. *N.Z.J. Crop Hortic. Sci.* 2015;43(4):306-315. DOI 10.1080/01140671.2015.1098708.
- Cossani C.M., Reynolds M.P. Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 2012;160(4):1710-1718. DOI 10.1104/pp.112.207753.
- Fang Q., Zhang X., Chen S., Shao L., Sun H. Selecting traits to increase winter wheat yield under climate change in the North China Plain. *Field Crops Res.* 2017;207:30-41. DOI 10.1016/j.fcr.2017.03.005.
- Gao F., Liu J., Yang L., Wu X., Xiao Y., Xia X., He Z. Genome-wide linkage mapping of QTL for physiological traits in a Chinese wheat population using the 90K SNP array. *Euphytica.* 2016;209(3):789-804. DOI 10.1007/s10681-016-1682-6.
- Gulnaz S., Zulkiffal M., Sajjad M., Ahmed J., Musa M., Abdullah M., Ahsan A., Refman A. Identifying Pakistani wheat landraces as genetic resources for yield potential, heat tolerance and rust resistance. *Int. J. Agric. Biol.* 2019;21(3):520-526. DOI 10.17957/IJAB/15.0924.
- Guo J., Tian G., Zhou Y., Wang M., Ling N., Shen Q., Guo S. Evaluation of the grain yield and nitrogen nutrient status of wheat (*Triticum aestivum* L.) using thermal imaging. *Field Crops Res.* 2016;196:463-472. DOI 10.1016/j.fcr.2016.08.008.
- Jackson R.D., Idso S.B., Reginato R.J., Pinter P.J. Canopy temperature as a crop water-stress indicator. *Water Resour. Res.* 1981;17(4):1133-1138. DOI 10.1029/WR017i004p01133.
- Jackson R.D., Reginato R.J., Idso S.B. Wheat canopy temperature – practical tool for evaluating water requirements. *Water Resour. Res.* 1977;13(3):651-656. DOI 10.1029/WR013i003p00651.
- Jokar F., Karimizadeh R., Masoumiasl A., Fahliani R.A. Canopy temperature and chlorophyll content are effective measures of drought stress tolerance in durum wheat. *Not. Sci. Biol.* 2018;10(4):575-583. DOI 10.25835/nsb10410288.
- Kaur S., Singh S.P., Kingra P.K. Canopy temperature as indicator of thermal and nutrient stresses in wheat crop. *Mausam.* 2018;69(2):309-314.
- Khalid M., Afzal F., Gul A., Amir R., Subhani A., Ahmed Z., Mahmood Z., Xia X., Rasheed A., He Z. Molecular characterization of 87 functional genes in wheat diversity panel and their association with phenotypes under well-watered and water-limited conditions. *Front. Plant Sci.* 2019;10:717. DOI 10.3389/fpls.2019.00717.
- Khan A., Ahmad M., Shah M.K.N., Ahmed M. Genetic manifestation of physio-morphic and yield related traits conferring thermotolerance in wheat. *Pak. J. Bot.* 2020;52(5):1545-1552. DOI 10.30848/PJB2020-5(27).
- Kumar J., Kumar M., Singh S.K., Singh L. Estimation of genetic variability and heritability in bread wheat under abiotic stress. *Int. J. Pure Appl. Biosci.* 2017;5(1):156-163. DOI 10.18782/2320-7051.2475.
- Liang X., Liu Y., Chen J., Adams C. Late-season photosynthetic rate and senescence were associated with grain yield in winter wheat of diverse origins. *J. Agron. Crop Sci.* 2018;204(1):1-12. DOI 10.1111/jac.12231.
- Lopes M.S., Reynolds M.P., McIntyre C.L., Mathews K.L., Kamali M.R.J., Mossad M., Feltaous Y., Tahir I.S.A., Chatrath R., Ogbonaya F., Baum M. QTL for yield and associated traits in the Seri/Babax population grown across several environments in Mexico, in the West Asia, North Africa, and South Asia regions. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(4):971-984. DOI 10.1007/s00122-012-2030-4.
- Lu Y., Yan Z., Li L., Gao C., Shao L. Selecting traits to improve the yield and water use efficiency of winter wheat under limited water supply. *Agric. Water Manag.* 2020;242:106410. DOI 10.1016/j.agwat.2020.106410.
- Mason R.E., Hays D.B., Mondal S., Ibrahim A.M.H., Basnet B.R. QTL for yield, yield components and canopy temperature depression in wheat under late sown field conditions. *Euphytica.* 2013;194:243-259. DOI 10.1007/s10681-013-0951-x.
- Mason R.E., Mondal S., Beecher F., Hays D. Genetic loci linking improved heat tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) to lower leaf and spike temperatures under controlled conditions. *Euphytica.* 2011;180:181-194. DOI 10.1007/s10681-011-0349-6.
- Mohammed S., Huggins T., Mason E., Beecher F., Chick C., Sengodan P., Paudel A., Ibrahim A., Tilley M., Hays D. Mapping the genetic loci regulating leaf epicuticular wax, canopy temperature and drought susceptibility index in *Triticum aestivum* L. *Crop Sci.* 2021;61:2294-2305. DOI 10.1002/csc2.20458.
- Mondal S., Mason R.E., Huggins T., Hays D.B. QTL on wheat (*Triticum aestivum* L.) chromosomes 1B, 3D and 5A are associated with constitutive production of leaf cuticular wax and may contribute to lower leaf temperatures under heat stress. *Euphytica.* 2015;201:123-130. DOI 10.1007/s10681-014-1193-2.
- Nagai T., Makino A. Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant Cell Physiol.* 2009;50(4):744-755. DOI 10.1093/pcp/pcp029.
- Olivares-Villegas J.J., Reynolds M.P., McDonald G.K. Drought-adaptive attributes in the Seri/Babax hexaploid wheat population. *Funct. Plant Biol.* 2007;34(3):189-203. DOI 10.1071/FP06148.
- Ortiz R., Sayre K.D., Govaerts B., Gupta R., Subbarao G.V., Ban T., Hodson D., Dixon J.M., Ortiz-Monasterio J.I., Reynolds M. Climate change: can wheat beat the heat? *Agric. Ecosyst. Environ.* 2008;126(1-2):46-58. DOI 10.1016/j.agee.2008.01.019.
- Paliwal R., Roder M.S., Kumar U., Srivastava J.P., Joshi A.K. QTL mapping of terminal heat tolerance in hexaploid wheat (*T. aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(3):561-575. DOI 10.1007/s00122-012-1853-3.

- Pinto R.S., Reynolds M.P., Mathews K.L., McIntyre C.L., Olivares-Villegas J.J., Chapman S.C. Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(6):1001-1021. DOI 10.1007/s00122-010-1351-4.
- Pinto R.S., Reynolds M.P. Common genetic basis for canopy temperature depression under heat and drought stress associated with optimized root distribution in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128:575-585. DOI 10.1007/s00122-015-2453-9.
- Rahman M., Barma N., Biswas B., Khan A., Rahman J. Study on morpho-physiological traits in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed condition. *Bangladesh J. Agric. Res.* 2016;41(2):235-250. DOI 10.3329/bjar.v41i2.28227.
- Ratley A., Shorter R., Chapman S. Evaluation of CIMMYT conventional and synthetic spring wheat germplasm in rainfed sub-tropical environments. II. Correlated response for grain yield components and physiological traits due to selection for grain yield. *Field Crops Res.* 2011;124(2):195-204. DOI 10.1016/j.fcr.2011.02.006.
- Rebetzke G.J., Ratley A.R., Farquhar G.D., Richards R.A., Condon A.G. Genomic regions for canopy temperature and their genetic association with stomatal conductance and grain yield in wheat. *Funct. Plant Biol.* 2013;40(1):14-33. DOI 10.1071/FP12184.
- Reynolds M., Manes Y., Izanloo A., Langridge P. Phenotyping approaches for physiological breeding and gene discovery in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 2009;155(3):309-320. DOI 10.1111/j.1744-7348.2009.00351.x.
- Reynolds M.P., Ortiz-Monasterio J.I., McNab A. Application of physiology in wheat breeding. Mexico: CIMMYT, 2001.
- Reynolds M.P., Pierre C.S., Saad A.S.I., Vargas M., Condon A.G. Evaluating potential genetic gains in wheat associated with stress-adaptive trait expression in elite genetic resources under drought and heat stress. *Crop Sci.* 2007;47(S3):S-172-S-189. DOI 10.2135/cropsci2007.10.0022IPBS.
- Royo C., Villegas D., Del Moral L.F.G., Elhani S., Aparicio N., Rharabti Y., Araus J.L. Comparative performance of carbon isotope discrimination and canopy temperature depression as predictors of genotypes differences in durum wheat yield in Spain. *Aust. J. Agric. Res.* 2002;53(3):561-569. DOI 10.1071/AR01016.
- Sharma D., Jaiswal J.P., Singh N.K., Chauhan A., Gahtyari N.C. Developing a selection criterion for terminal heat tolerance in bread wheat based on various morpho-physiological traits. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018;7(7):2716-2726. DOI 10.20546/ijcmas.2018.707.318.
- Sharma P., Sareen S., Saini M.S. Assessing genetic variation for heat stress tolerance in Indian bread wheat genotypes using morpho-physiological traits and molecular markers. *Plant Genet. Resour.* 2017;15(6):539-547. DOI 10.1017/S1479262116000241.
- Sofi P.A., Ara A., Gull M., Rehman K. Canopy temperature depression as an effective physiological trait for drought screening. In: Ondrasek G. (Ed.) *Drought-Detection and Solutions*. London: IntechOpen, 2019;77-92. DOI 10.5772/intechopen.85966.
- Sohail M., Hussain I., Qamar M., Tanveer S.K., Abbas S.H., Ali Z., Imtiaz M. Evaluation of spring wheat genotypes for climatic adaptability using canopy temperature as physiological indicator. *Pak. J. Agric. Sci.* 2020;33(1):89-96. DOI 10.17582/journal.pjar/2020/33.1.89.96.
- Sukumaran S., Dreisigacker S., Lopes M., Chavez P., Reynolds M.P. Genome-wide association study for grain yield and related traits in an elite spring wheat population grown in temperate irrigated environments. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(2):353-363. DOI 10.1007/s00122-014-2435-3.
- Thapa S., Jessup K.E., Pradhan G.P., Rudd J.C., Liu S., Mahan J.R., Devkota R.N., Baker J.A., Xue Q. Canopy temperature depression at grain filling correlates to winter wheat yield in the U.S. Southern High Plains. *Field Crops Res.* 2018;217:11-19. DOI 10.1016/j.fcr.2017.12.005.
- Wang Y., Zia-Khan S., Owusu-Adu S., Miedaner T., Müller J. Early detection of *Zymoseptoria tritici* in winter wheat by infrared thermography. *Agriculture.* 2019;9(7):139. DOI 10.3390/agriculture9070139.
- Wardlaw I.F., Dawson I.A., Munibi P., Fewster R. The tolerance of wheat to high temperatures during reproductive growth. I. Survey procedures and general response patterns. *Aust. J. Agric. Res.* 1989;40(1):1-13. DOI 10.1071/AR9890001.
- White J.W., Andrade-Sanchez P., Gore M.A., Bronson K.F., Cof-felt T.A., Conley M.M. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crop Res.* 2012;133:101-112. DOI 10.1016/j.fcr.2012.04.003.
- Yang D.Q., Dong W.H., Luo Y.L., Song W.T., Cai T., Li Y., Yin Y.P., Wang Z.L. Effects of nitrogen application and supplemental irrigation on canopy temperature and photosynthetic characteristics in winter wheat. *J. Agric. Sci. Technol.* 2018;156(1):13-23. DOI 10.1017/S0021859617000946.
- Yousfi S., Gracia-Romero A., Kellas N., Kaddour M., Chadouli A., Karrou M., Araus J.L., Serret M.D. Combined use of low-cost remote sensing techniques and $\delta^{13}\text{C}$ to assess bread wheat grain yield under different water and nitrogen conditions. *Agronomy.* 2019;9(6):285. DOI 10.3390/agronomy9060285.
- Zhang X., Zhang X., Chen S., Sun H., Shao L., Liu X. Optimized timing of using canopy temperature to select high-yielding cultivars of winter wheat under different water regimes. *Exp. Agric.* 2018;54(2):257-272. DOI 10.1017/S0014479716000235.
- Zhang Y., Zhang Y., Wang Z., Wang Z. Characteristics of canopy structure and contributions of non-leaf organs to yield in winter wheat under different irrigated conditions. *Field Crops Res.* 2011;123(3):187-195. DOI 10.1016/j.fcr.2011.04.014.

ORCID ID

S.B. Lepikhov orcid.org/0000-0003-1561-6345

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий № 0534-2021-0003 «Использование молекулярно-генетических и биотехнологических методов исследований в селекции растений».

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.10.2021. После доработки 09.11.2021. Принята к публикации 10.11.2021.

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

Обзор современных методов обнаружения и идентификации болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений

А.Ф. Чешкова 

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия
 cheshanna@yandex.ru


Аннотация. Болезни растений приводят к значительным экономическим потерям в секторе сельскохозяйственного производства во всем мире. Раннее выявление, количественная оценка и идентификация болезней имеют решающее значение для целенаправленного применения мер защиты в растениеводстве. В настоящее время ведутся интенсивные научные исследования по разработке инновационных методов диагностики болезней растений, основанных на гиперспектральных технологиях. Анализ спектра отражения растительной ткани позволяет проводить классификацию здоровых и больных растений, оценивать тяжесть заболевания, дифференцировать виды патогенов и выявлять симптомы биотических стрессов на ранних стадиях, в том числе в инкубационный период, когда симптомы не видны человеческому глазу. В обзоре описаны основные принципы измерения спектра отражения растительной ткани. Обсуждаются и оцениваются возможности применения различных типов гиперспектральных сенсоров и платформ для диагностики болезней растений. Гиперспектральный анализ является новой областью, соединяющей в себе методы оптической спектроскопии и методы анализа изображений, которые позволяют одновременно оценивать как физиологические, так и морфологические параметры. Описаны главные этапы анализа гиперспектральных данных: получение и предварительная обработка изображения; извлечение и обработка данных; моделирование и анализ данных. Приведен перечень алгоритмов и методов, применяемых на каждом из этапов. Рассмотрены основные области применения гиперспектральных сенсоров в диагностике болезней растений, такие как обнаружение болезни, дифференциация и идентификация типа заболевания, оценка степени поражения, оценка устойчивости генотипов. Приведен всесторонний обзор научных публикаций, подчеркивающий преимущества гиперспектральных технологий при исследовании взаимодействий между растениями и патогенами в различных масштабах измерений. Несмотря на обнадеживающий прогресс, достигнутый за последние несколько десятилетий в мониторинге болезней растений на основе гиперспектральных технологий, остаются нерешенными некоторые технические проблемы, препятствующие применению этих методов на практике. В заключение обсуждаются проблемы и перспективы практического использования новых технологий в сельскохозяйственном производстве.

Ключевые слова: гиперспектральные технологии; болезни растений; анализ изображений; спектральный анализ.

Для цитирования: Чешкова А.Ф. Обзор современных методов обнаружения и идентификации болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):202-213. DOI 10.18699/VJGB-22-25

A review of hyperspectral image analysis techniques for plant disease detection and identification

A.F. Cheshkova 

Siberian Federal Scientific Center of AgroBioTechnology of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia
 cheshanna@yandex.ru

Abstract. Plant diseases cause significant economic losses in agriculture around the world. Early detection, quantification and identification of plant diseases are crucial for targeted application of plant protection measures in crop production. Recently, intensive research has been conducted to develop innovative methods for diagnosing plant diseases based on hyperspectral technologies. The analysis of the reflection spectrum of plant tissue makes it possible to classify healthy and diseased plants, assess the severity of the disease, differentiate the types of pathogens, and identify the symptoms of biotic stresses at early stages, including during the incubation period, when the symptoms are not visible to the human eye. This review describes the basic principles of hyperspectral measurements and different types of available hyperspectral sensors. Possible applications of hyperspectral sensors and platforms on different scales for diseases diagnosis are discussed and evaluated. Hyperspectral analysis is a new subject that combines optical spectroscopy and image analysis methods, which make it possible to simultaneously evaluate both physiological and morphological parameters. The review describes the main steps of the hyperspectral data analysis process: image acquisition and prepro-

cessing; data extraction and processing; modeling and analysis of data. The algorithms and methods applied at each step are mainly summarized. Further, the main areas of application of hyperspectral sensors in the diagnosis of plant diseases are considered, such as detection, differentiation and identification of diseases, estimation of disease severity, phenotyping of disease resistance of genotypes. A comprehensive review of scientific publications on the diagnosis of plant diseases highlights the benefits of hyperspectral technologies in investigating interactions between plants and pathogens at various measurement scales. Despite the encouraging progress made over the past few decades in monitoring plant diseases based on hyperspectral technologies, some technical problems that make these methods difficult to apply in practice remain unresolved. The review is concluded with an overview of problems and prospects of using new technologies in agricultural production.

Key words: hyperspectral technologies; plant diseases; image analysis; spectral analysis.

For citation: Cheshkova A.F. A review of hyperspectral image analysis techniques for plant disease detection and identification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):202-213. DOI 10.18699/VJGB-22-25

Введение

Болезни растений повсеместно ведут к потерям урожая, снижению качества сельскохозяйственной продукции и даже могут угрожать здоровью людей. В связи с этим сельхозтоваропроизводителям необходимы современные и эффективные инструменты для раннего обнаружения и идентификации болезней растений (Mahlein et al., 2019b). Традиционные методы диагностики, такие как визуальная экспертиза и микробиологический лабораторный анализ, являются высокозатратными по времени и человеческим ресурсам, что ограничивает возможность их применения в крупных сельскохозяйственных предприятиях.

В последние годы быстрыми темпами развиваются новые неинвазивные методы диагностики болезней растений с использованием сенсорных технологий, робототехники, компьютерного зрения и машинного обучения (Singh A. et al., 2016; Демидчик и др., 2020; Zheng et al., 2021). Они обладают высокой производительностью, позволяют получать данные в режиме реального времени и анализировать информацию о целом спектре физиологических параметров (Walter et al., 2015). Большое количество информации, получаемой от современных датчиков и сенсоров, трансформируется в новые знания с помощью компьютерной обработки данных и моделирования, сокращая расстояние от фундаментальной науки до практического применения результатов (Афонников и др., 2016; Tardieu et al., 2017). Такие подходы позволяют за счет автоматизации существенно ускорить процесс диагностики, увеличить его точность, устранив субъективизм, присущий человеку (Fahlgren et al., 2015; Lobos et al., 2017).

Новые цифровые технологии включают в себя анализ изображений в различных областях спектра. Регистрация изображений осуществляется при помощи таких оптических сенсоров, как гиперспектральные, термальные и RGB-камеры, сенсоры флуоресценции, томографы (Bock et al., 2010; Li L. et al., 2014).

Значительное развитие получили методы диагностики болезней растений на основе анализа гиперспектральных снимков (Mahlein, 2016; Mahlein et al., 2018; Дубровская и др., 2018). В базе данных Scopus за последние 15 лет зарегистрировано 412 научных публикаций по ключевым словам 'plant disease' и 'hyperspectral' (рис. 1). Гиперспектральный анализ соединяет в себе методы оптической спектроскопии и методы анализа изображений, позволяя одновременно оценивать как физиологические, так и морфологические параметры.

Цель данной публикации – предоставить читателю обзор современных технологий диагностики болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений. В первой части статьи рассматриваются главные принципы и инструментарий гиперспектральных технологий. Далее описываются алгоритмы и методы анализа гиперспектральных изображений. Затем приводится краткий обзор научных публикаций, посвященных данной тематике. И в заключение обсуждаются проблемы и перспективы использования новых технологий.

Основные принципы и инструментарий гиперспектральных технологий

Взаимодействие света (электромагнитного излучения) и растений

Свет может взаимодействовать с тканью растения следующими способами: отражение, рассеяние, поглощение и пропускание. Отражательная характеристика зависит от биохимического состава растительной ткани и от ее физических свойств (Mishra et al., 2017). Взаимодействие света и растений зависит также от длины волны. В видимом диапазоне длин волн (400–700 нм) поверхность растения имеет низкую отражательную способность в связи с поглощением света светочувствительными пигментами (хлорофиллами, антоцианами и каротиноидами). В ближнем инфракрасном диапазоне (700–1100 нм) коэффициент отражения повышается по причине рассеивания света в межклеточном пространстве. В диапазоне коротковолнового инфракрасного излучения (1100–2500 нм) здоровые растения имеют низкий коэффициент отражения из-за абсорбции света водой, белками и другими углеродными составляющими (Lowe et al., 2017). Зеленая окраска листа согласуется с характерным пиком отражения при длине волны 550 нм.

Спектральные профили здоровых и больных растений могут различаться. В результате воздействия биотических и абиотических стрессоров меняется биохимический состав растительных тканей, отражающийся в изменении цвета и формы листьев, скорости транспирации, морфологии растительного покрова и, следовательно, в спектральных характеристиках растений (Zhang J. et al., 2019). Более того, каждое индивидуальное взаимодействие растения и патогена имеет определенную пространственную и временную динамику, и данные процессы влияют на различные диапазоны электромагнитного спектра. Так,

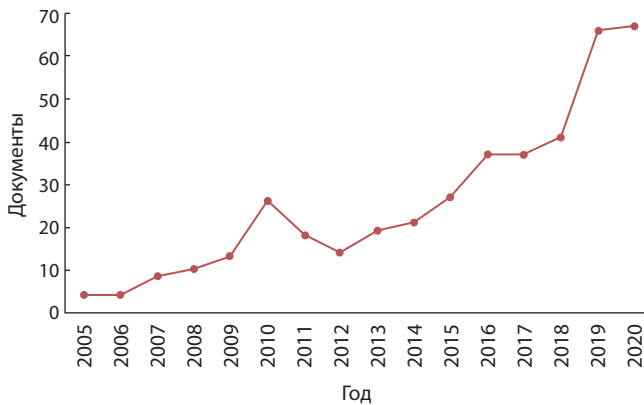


Рис. 1. Число опубликованных статей по диагностике болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений (Scopus).

например, изменение фотосинтетической активности, вызванное воздействием патогенов, сказывается на отражательной способности в видимом диапазоне спектра. Изменения на клеточном уровне оказывают большое влияние на ближний инфракрасный спектр. Некроз ткани приводит к увеличению отражения в диапазоне коротковолнового инфракрасного излучения (Zhang N. et al., 2020).

Таким образом, анализ спектральных характеристик, связанных с воздействием биотических и абиотических стрессоров, лежит в основе новых технологий диагностики болезней растений.

Гиперспектральные сенсоры и платформы

Базовый принцип гиперспектральных сенсоров сопоставим с принципом, лежащим в основе камер RGB и мультиспектральных камер (Thomas et al., 2018b). Все эти системы измеряют количество света, попадающего на датчик, и сохраняют информацию. В отличие от камер RGB (3 полосы спектра) и мультиспектральных камер (<20 полос), гиперспектральный сенсор измеряет до нескольких сотен полос электромагнитного спектра в диапазоне длин волн датчика. Каждая из этих спектральных полос составляет всего несколько нанометров электромагнитного спектра, что обеспечивает высокое спектральное разрешение.

Различают два основных типа сенсоров: датчики изображений и датчики, не формирующие изображения. Датчики, не формирующие изображения, измеряют средний спектр отражения в определенной области поверхности без сохранения пространственной информации. Размер

области усреднения зависит от величины фокусного расстояния, угла обзора и расстояния до объекта съемки. Большинство датчиков, не создающих изображения, являются портативными и не требуют сложных измерительных платформ. Они имеют широкий спектральный диапазон (300–2500 нм), высокое спектральное разрешение (1–3 нм) и небольшую массу (1–5 кг). Наиболее популярны среди них спектрометры ASD FieldSpec (Analytical Spectral Devices Inc., США), SVC (Spectral Vista Corporation, США), ImSpector (Spectral Imaging Ltd., Финляндия). Эти приборы обычно используют в лабораторных, тепличных и полевых условиях (Naidu et al., 2009; Zhang J. et al., 2017; Couture et al., 2018; Bohnenkamp et al., 2019; Mahlein et al., 2019a). Существуют также микроспектрометры, например STS-VIS spectrometer (Ocean Optics Inc., США), подходящие для применения с беспилотными летательными аппаратами (БПЛА) (Burkart et al., 2015). Поскольку ранние симптомы болезни растений часто появляются при размерах менее 1 мм, то их обнаружение с помощью спектрометров ограничено. Это связано с усреднением спектра здоровой и больной ткани в области измерения (Mahlein et al., 2012).

Гиперспектральные датчики изображения формируют спектральный профиль для каждого отдельного пикселя, тем самым комбинируя спектральное и пространственное разрешение. Результирующее изображение представляет собой трехмерный массив данных (гиперкуб), содержащий два измерения пространственной информации и дополнительно одно измерение спектральной информации. В зависимости от типа используемых сенсоров существуют четыре способа получения гиперкуба данных (рис. 2): точечное сканирование (whisk-broom), линейное сканирование (push-broom), сканирование спектра (spectral scanning) и снимок без сканирования (snapshot) (Wu, Sun, 2013).

Как правило, гиперспектральные датчики изображения охватывают ограниченный спектральный диапазон: VNIR (300–1000 нм) или SWIR (1000–2500 нм) со спектральным разрешением 1–7 нм. Пространственное разрешение варьируется от микрометров до сантиметров в зависимости от расстояния до объекта и характеристик сенсора.

В случае сенсоров точечного или линейного сканирования (whisk-broom, push-broom) для создания гиперспектрального изображения необходимо перемещать объект съемки или камеру для регистрации спектра каждой отдельной точки или линии. В научных исследованиях чаще других применяют сканирующие камеры марки Specim

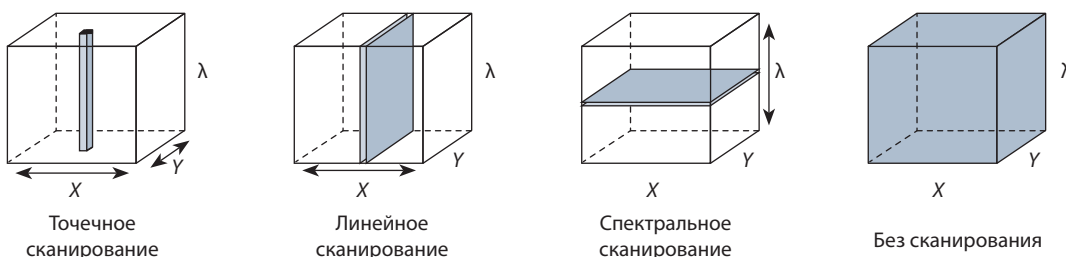


Рис. 2. Способы регистрации гиперспектральных изображений.

Направления сканирования показаны стрелками; серые области – данные, полученные за один проход.

(Spectral Imaging Ltd., Финляндия), Headwall (Headwall Hyperspec Ltd., Канада), Photonfocus (Photonfocus AG, Швейцария), Pika L (Resonon Inc., США). Большинство гиперспектральных сканирующих камер в лабораторных условиях устанавливают на специализированные подвижные платформы, обеспечивающие линейное перемещение и стабилизацию камеры (Leucker et al., 2016; Yeh et al., 2016). В тепличных условиях используют стационарные рельсовые системы (Thomas et al., 2018a), в полевых условиях – колесные транспортные средства (Vigneau et al., 2011; Williams et al., 2017) или БПЛА (Huang W. et al., 2007; Abdulridha et al., 2019). Недостатком сканирующих сенсоров является относительно длительное время получения изображения, зависящее от размера измеряемой области, что усложняет съемку подвижных объектов. Данный недостаток устранен в портативных камерах Specim IQ со встроенным сканером (Behmann et al., 2018; Альт и др., 2020; Barreto et al., 2020).

В сенсорах, основанных на принципе сканирования спектра (spectral scanning), используются LCTF-фильтры, которые пропускают только свет определенной длины волны, быстро меняющейся во время съемки (Choudhary et al., 2009; Wang et al., 2012). Эти сенсоры создают двумерные пространственные изображения для каждой длины волны в спектральном диапазоне. Работа с ними не требует перемещения объекта съемки или камеры для получения гиперкуба. Время получения изображения в основном зависит от времени экспонирования, вследствие чего регистрация изображения происходит быстрее, чем при точечном или линейном сканировании. Если объект движется, то такой принцип измерения может привести к несогласованным спектрам, поскольку отдельные полосы наблюдаются в разные моменты времени.

Недавно были разработаны сенсоры, не требующие сканирования объекта для получения гиперспектрального изображения (snapshot). В них задействован принцип мозаики обычных RGB камер. Данные сенсоры обеспечивают значительно более высокую скорость записи изображений, но более низкое пространственное разрешение по сравнению с традиционными. Известные камеры такого типа: Rikola, Senop (Senop Ltd., Финляндия), Ultris, FireFleye (Cubert Ltd., Канада). Компактный размер, короткое время съемки и возможность создания последовательностей гиперспектральных изображений движущегося объекта делают их оптимальными для использования на БПЛА (Aasen et al., 2015; Sankaran et al., 2015; Franceschini et al., 2019).

Алгоритмы и методы анализа гиперспектральных изображений

Извлечение информации из гиперспектральных изображений, характеризующихся огромным объемом данных с высокой степенью коллинеарности, является очень сложной и новой задачей, требующей нетривиальных решений. В настоящее время для этих целей успешно адаптированы методы дискриминантного и кластерного анализа, машинного обучения, нейронных сетей (ElMasry, Nakauchi, 2016; Lowe et al., 2017).

Для обработки данных применяют специализированное программное обеспечение: ENVI (Research Systems Inc.);

MATLAB (The Math-Works Inc.); Python (Python Software Foundation); R (R Software Foundation).

Процесс анализа гиперспектральных изображений, как правило, состоит из следующих этапов (рис. 3): получение и предварительная обработка изображения; извлечение и обработка данных; моделирование и анализ данных.

Получение и предварительная обработка изображения

Первый и важный шаг в анализе болезней растений – это получение высококачественных гиперспектральных изображений, отвечающих задачам исследований. Правильный выбор сенсоров и платформ, пространственного и спектрального разрешения, схемы освещения, скорости сканирования, частоты кадров и времени экспозиции является предпосылкой для получения точных результатов (Wu, Sun, 2013).

Следующий шаг – предварительная обработка изображения, включающая в себя калибровку и коррекцию спектра. Калибровка проводится для стандартизации спектральных и пространственных осей, повышения точности, обеспечения воспроизводимости данных в различных условиях эксперимента, устранения эффекта кривизны поверхности съемки, устранения приборных ошибок (Rinnan et al., 2009; Vidal, Amigo, 2012). Стандартным приемом является калибровка отражения, для которой используют два эталонных спектра: «черный» и «белый». «Черный» спектр получают, закрыв объектив камеры непрозрачной крышкой. «Белый» спектр регистрируется с помощью стандартной белой поверхности (например, из тефлона) с коэффициентом отражения около 99.9 % для получения максимально возможной интенсивности каждого пикселя на каждой длине волны. Затем исходное гиперспектральное изображение калибруется по формуле

$$R = \frac{I_S - I_D}{I_W - I_D},$$

где I_S – исходное изображение; I_D и I_W – темное и белое эталонное изображение соответственно; R – результирующее изображение.

Для устранения эффекта кривизны поверхности при калибровке применяют спектральную нормализацию изображения (Polder et al., 2004), адаптивное сферическое преобразование (Tao, Wen, 1999) или преобразование Ламберта (Gomez-Sanchis et al., 2008).

Целью корректировки спектра является улучшение качества изображения (Savitzky, Golay, 1964; Barnes et al., 1989; Burger, 2006; Esquerre et al., 2012). Так, например, алгоритмы сглаживания (скользящее среднее, фильтр Савицкого–Голея, медианный фильтр, фильтр Гаусса), а также преобразования Фурье и вейвлет-преобразования используют для уменьшения шума в спектральных данных. Первую и вторую производные – для коррекции сдвига базовой линии спектра. Для коррекции рассеивания применяют нормализацию стандартным преобразованием или мультипликативную коррекцию рассеивания.

Извлечение и обработка данных

На этом этапе выполняют сегментацию изображения и производят выбор информативных признаков для дальнейшего анализа.

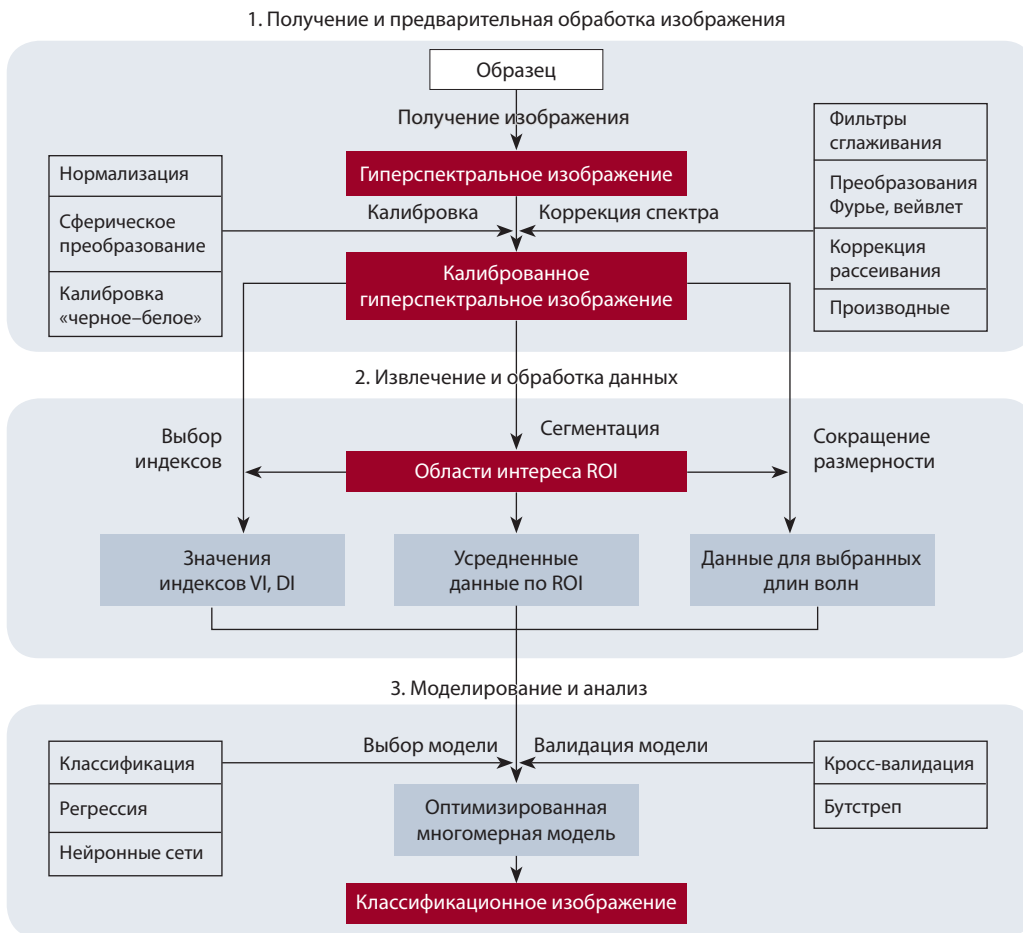


Рис. 3. Схема типичного процесса анализа гиперспектральных изображений.

Сегментация изображения используется в качестве этапа предварительной обработки данных и обычно выполняется перед спектральным анализом для выделения целевых объектов из фона и формирования областей интересов (ROI). Известны следующие методы сегментации:

- по пороговому значению (threshold-based) (Pandey et al., 2017);
- методы кластеризации (K-means) (Behmann et al., 2014);
- алгоритм водораздела (watershed algorithm) (Li J. et al., 2019);
- методы обнаружения края (edge detection) (Sun et al., 2017; Williams et al., 2017).

Выбор информативных признаков является одним из наиболее важных шагов в процессе анализа гиперспектральных изображений. Его цель – извлечение и формирование новых векторов признаков путем комбинирования и оптимизации спектральных, пространственных и текстурных характеристик, а затем их передачи в набор классификаторов или алгоритмов машинного обучения.

В качестве информативных признаков могут выступать вегетационные индексы (VI) или индексы заболеваемости (DI) (Huete et al., 2002; Gitelson et al., 2006; Mahlein et al., 2013; Candiago et al., 2015). В этом случае требуется только небольшое количество длин волн для анализа. При анализе всего спектра используют методы для сокращения

размерности и устранения автокорреляций (Steddom et al., 2003; Delalieux et al., 2007; Naidu et al., 2009; Moshou et al., 2011; Yuan et al., 2014b; Zhou et al., 2019):

- метод главных компонент (principal component analysis);
- алгоритм минимизации шума (minimum noise fraction algorithm);
- линейный дискриминантный анализ (linear discriminant analysis);
- пошаговый дискриминантный анализ (stepwise discriminant analysis);
- дискриминантный анализ частных наименьших квадратов (partial least square discriminant analysis).

Моделирование и анализ данных

На последнем этапе анализа изображений производят выбор модели и применение ее к данным. В зависимости от целей исследования это могут быть классификационные модели (для диагностики и дифференциации болезней) либо регрессионные модели (для прогнозирования и оценки взаимосвязи между целевыми переменными и спектральным откликом).

Наиболее распространенные модели:

- классификационные модели, использующие алгоритмы машинного обучения и нейронные сети (Moshou et al., 2004; Liu et al., 2010; Rumpf et al., 2010; Yeh et al.,

2013; Li Y. et al., 2017). Методы: спектрального угла (spectral angle mapper), опорных векторов (support vector machine), k -ближайших соседей (k -nearest neighbor), максимального правдоподобия (maximum likelihood classifier);

- регрессионные (Huang W. et al., 2007; Singh D. et al., 2007; Yang et al., 2007; Huang J. et al., 2012): множественная линейная регрессия (multiple linear regression), бинарная логистическая регрессия (binary logistic regression), частичная регрессия наименьших квадратов (partial least squares regression), регрессия агрегирования Дирихле (Dirichlet aggregation regression).

Области применения гиперспектральных технологий в диагностике болезней растений

Основными задачами при диагностике болезней растений являются: обнаружение болезни, дифференциация и идентификация типа заболевания, оценка степени поражения, оценка устойчивости генотипов. Данные задачи решаются на различных уровнях организации живых систем в соответствующих им масштабах измерений.

Измерения на клеточном уровне или в масштабе растительной ткани выполняют в лабораторных условиях с использованием гиперспектральных микроскопов, позволяющих наблюдать за грибковыми спорами и выявлять метаболические изменения в тканях, вызванные взаимодействием растений и патогенов. Такие эксперименты обычно проводят в контексте фундаментальных исследований и в определенной степени для идентификации патогенов и оценки устойчивости генотипов.

Измерения на уровне отдельных органов (лист, колос, стебель, корень, плод) или целого растения проводят в лабораторных, тепличных или полевых условиях с целью раннего обнаружения и дифференциации заболевания.

Измерения в масштабе растительного покрова решают задачи выявления заболевания и количественной оценки степени поражения растений.

Далее приводится краткий обзор научных публикаций, посвященных решению основных задач в диагностике болезней растений с использованием гиперспектральных технологий (см. таблицу).

Обнаружение болезней

При обнаружении болезней необходимо дифференцировать здоровые и зараженные растения. Предметом исследования при этом является только одно конкретное заболевание, его различные состояния, симптомы и динамика.

Сравнение возможностей применения различных сенсоров для раннего обнаружения фузариоза (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum*) колоса пшеницы рассмотрено в работе (Mahlein et al., 2019a). Опыты проводились в контролируемых лабораторных условиях с использованием инфракрасной термографии, сенсоров флуоресценции хлорофилла и гиперспектральных изображений. Инфракрасная термография позволила визуализировать разницу температур внутри инфицированных колосков, начиная с 5-го дня после инокуляции растений. Также на 5-й день было подтверждено нарушение фотосинтетической активности, выраженное изменением флуоресценции хлоро-

филла колосков. Пигмент-специфическое простое соотношение, полученное на основе гиперспектральных изображений в диапазоне длин волн 400–2500 нм, позволило различать колоски, инфицированные *Fusarium*, и неинфицированные уже на 3-й день. Для классификации использовался метод опорных векторов (SVM). Точность классификации составляла 78 % для термографии, 56 % для флуоресценции хлорофилла и 78 % для гиперспектральных изображений.

В работе (Abdulridha et al., 2019) сравниваются два способа обнаружения язвенной болезни цитрусовых (*Xanthomonas citri*) на основе гиперспектральных изображений: съемка в лабораторных условиях и дистанционное зондирование с использованием БПЛА. В лаборатории гиперспектральный (400–1000 нм) сенсор применялся для выявления язвы цитрусовых на нескольких стадиях развития заболевания (бессимптомная, ранние и поздние симптомы) на листьях и незрелых плодах с использованием двух методов классификации: радиальной базисной функции (RBF) и k -ближайших соседей (KNN). Тот же сенсор, установленный на БПЛА, применялся для обнаружения язвы цитрусовых на кронах деревьев в полевых условиях. Общая точность классификации RBF была выше (94, 96 и 100 %), чем у метода KNN (94, 95 и 96 %), при выявлении язвы на листьях в лаборатории. Дистанционное зондирование с использованием БПЛА позволило достичь 100 % точности классификации для обнаружения здоровых и зараженных язвой деревьев. Среди 31 изученного вегетационного индекса более точно выявляют язвы в лабораторных и полевых условиях соответственно водный индекс (WI) и модифицированный индекс абсорбции хлорофилла (TCARI). Предложенная методика также успешно распознала плоды, инфицированные язвой, на поздней стадии (точность классификации 92 %).

Идентификация болезней

При идентификации болезней важно определить тип патогена, воздействующего на растение. Предметом исследования являются несколько видов заболеваний, их отличительные черты.

Для дифференциации болезней сельскохозяйственных культур А.-К. Mahlein с коллегами (Mahlein et al., 2013) предложили использовать специфические «спектральные индексы болезней». Модельной системой служили растения сахарной свеклы и три болезни листьев: пятнистость листьев *Cercospora*, ржавчина сахарной свеклы и мучнистая роса. Спектральный профиль здоровых и больных листьев сахарной свеклы регистрировали с помощью спектрорадиометра без визуализации на разных стадиях развития и степени поражения. Наиболее значимые длины волн и двухполосные нормализованные разности, описывающие влияние болезни на спектр отражения листьев, были извлечены из набора данных с использованием алгоритма RELIEF-F. Спектральный индекс болезни определялся подбором наилучшей взвешенной комбинации одной длины волны и нормализованной разности длин волн. Оптимизированные индексы болезней были протестированы. С высокой точностью и чувствительностью были классифицированы здоровые листья и листья сахарной свеклы, пораженные пятнистостью листьев *Cercospora*,

Использование гиперспектральных изображений для диагностики болезней растений в научной литературе

Цель	Культура	Болезнь	Масштаб/сенсор/платформа	Методы и алгоритмы	Литературный источник
Обнаружение	Пшеница	Фузариоз	Колос/ ImSpector V10E, N25E/ подвижная платформа	Опорных векторов (SVM)	Mahlein et al., 2019a
	Цитрусовые	Язвенная болезнь цитрусовых	Крона/ Pika L/ БПЛА	Вегетационные индексы, <i>k</i> -ближайших соседей (KNN), нейронные сети	Abdulridha et al., 2019
	Лук	Кислая бактериальная гниль чешуек лука (<i>Burkholderia sepacia</i>)	Луковица/ SU320KTS-1.7RT SWIR камера, LCTF-фильтр/ штатив	Главных компонент (PCA), пошаговый дискриминантный анализ (SDA)	Wang et al., 2012
	Сахарная свекла	Корнеед свеклы (<i>Rhizoctonia solani</i>)	Растение/ Specim IQ/ штатив	<i>k</i> -ближайших соседей (KNN), частичных наименьших квадратов (PLSR), случайный лес (RF), опорных векторов (SVM)	Barreto et al., 2020
Идентификация	Сахарная свекла	Пятнистость листьев <i>Cercospora</i> , ржавчина сахарной свеклы, мучнистая роса	Лист/ ASD FieldSpec Pro/ штатив	Спектральные индексы болезней, алгоритм RELIEF-F	Mahlein et al., 2013
Дифференциация	Пшеница	Бурая ржавчина, желтая ржавчина	Лист/ ImSpector V10E/ подвижная платформа	Наименьших квадратов (LSR)	Bohnenkamp et al., 2019
		Желтая ржавчина, мучнистая роса, пшеничная тля	Лист/ ASD FieldSpec/ штатив	Частичных наименьших квадратов (PLSR), линейный дискриминантный анализ Фишера (FLDA)	Yuan et al., 2014a
		Фузариоз (<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>)	Колос/ ImSpector V10E, ImSpector N25E/ подвижная платформа	Вегетационные индексы, опорных векторов (SVM)	Alisaac et al., 2018
Оценка степени поражения	Ячмень	Мучнистая роса	Растительный покров (делянка)/ Specim V10E/ рельсовая система	Опорных векторов (SVM), матричная факторизация (SiVM)	Thomas et al., 2018a
	Картофель	Фитофтороз картофеля	Растительный покров (делянка)/ Rikola/ БПЛА	Максимизация симплексного объема (SiVM)	Franceschini et al., 2019
	Огурец	Угловатая пятнистость	Лист/ ImSpector V10/ подвижная платформа	Частичных наименьших квадратов (PLSR)	Zhao et al., 2016
	Пшеница	Мучнистая роса	Лист/ ASD FieldSpec/ штатив	Частичных наименьших квадратов (PLSR), многомерная линейная регрессия (MLR)	Zhang J. et al., 2012
	Томат	Бактериоз (<i>Pseudomonas cichorii</i>)	Лист/ Hyperspec Headwall/ подвижная платформа	Главных компонент (PCA)	Rajendran et al., 2016
Оценка устойчивости генотипов	Сахарная свекла	Пятнистость листьев <i>Cercospora</i>	Лист/ ImSpector V10E/ подвижная платформа	Вегетационные индексы	Leucker et al., 2016
	Виноград	Ложная мучнистая роса винограда	Лист/ ASD AgriSpec spectrometer, ImSpector V10E/ подвижная платформа	Вегетационные индексы	Oerke et al., 2016
	Ячмень	Мучнистая роса	Клетки, ткань/ Specim V10E камера, Z6 APO микроскоп/ подвижная платформа	Максимизация симплексного объема (SiVM)	Kuska et al., 2015

ржавчиной и мучнистой росой (точность классификации 89, 92, 87 и 85 % соответственно).

В работе (Bohnenkamp et al., 2019) предложен новый метод обнаружения и дифференциации бурой ржавчины (*Puccinia triticina*) и желтой ржавчины (*P. striiformis*) пшеницы с использованием гиперспектральных изображений. Эксперимент проводился в масштабе листа в контролируемых лабораторных условиях. Для создания обучающей выборки были взяты эталонные спектры спор возбудителей бурой и желтой ржавчины. Факторизация методом наименьших квадратов применялась для выявления присутствия спектрального сигнала спор ржавчины в смешанных спектрах листьев пшеницы. Это исследование демонстрирует интерпретируемое разложение смеси спектральных коэффициентов отражения во время патогенеза.

Оценка степени поражения

Количественная диагностика степени поражения растений болезнью – одно из важных направлений гиперспектральных исследований. Основными критериями оценки серьезности заболевания являются интенсивность поражения и распространенность. Кроме того, в зависимости от патогенов и симптомов, которые они вызвали, часто рассматриваются как косвенные критерии оценки содержание пигментов, содержание воды и структурные параметры.

Y.-R. Zhao с коллегами (Zhao et al., 2016) использовали метод гиперспектральной визуализации для определения пространственного распределения содержания хлорофилла и каротиноидов в листьях огурца, зараженных угловатой пятнистостью. Содержание пигментов было установлено с помощью биохимических анализов. Для пяти степеней поражения были построены модели регрессии по методу частичных наименьших квадратов (PLSR) и проведен количественный анализ взаимосвязи между степенью поражения, спектром и содержанием пигментов. Затем были выбраны оптимальные длины волн для моделей. И наконец, распределения хлорофилла и каротиноидов в листьях огурца были картированы по пикселям путем применения оптимальных моделей к гиперспектральным изображениям.

В исследовании (Zhang J. et al., 2012) степень поражения листьев пшеницы мучнистой росой оценивалась на основе спектрального анализа. Гиперспектральные коэффициенты отражения нормальных листьев и листьев, пораженных мучнистой росой, измеряли с помощью спектрометра в лаборатории. Степень поражения определяли по девятибалльной шкале индекса заболевания. В общей сложности 32 спектральных индекса были рассчитаны и исследованы с помощью корреляционного анализа и независимого t-критерия. Две модели регрессии – многомерная линейная регрессия (MLR) и регрессия по методу частичных наименьших квадратов (PLSR) – применялись для оценки степени поражения мучнистой росой. По результатам кросс-валидации были отобраны семь спектральных индексов, минимизирующих относительную среднеквадратичную ошибку. Модель PLSR превзошла модель MLR с относительной среднеквадратичной ошибкой 0.23 и коэффициентом детерминации 0.80 при использовании семи выбранных индексов.

Оценка устойчивости генотипов

Анализ взаимодействия «патоген–хозяин» позволяет определить устойчивость генотипов к конкретному заболеванию и считается важной частью селекционной работы. В селекционной практике фенотипирование генотипов растений осуществляется путем трудоемкой и дорогостоящей визуальной оценки. В этом контексте гиперспектральный анализ является многообещающим неинвазивным методом для ускорения и автоматизации классических методов фенотипирования.

В работе (Leucker et al., 2016) оценивалась устойчивость пяти генотипов сахарной свеклы к пятнистости листьев *Cercospora*. Эксперимент проводился в контролируемых лабораторных условиях. Степень поражения листьев оценивали классическими количественными и качественными методами в сочетании с гиперспектральным анализом. Установлено, что спектральные характеристики пораженных участков листьев зависят от плотности спор патогена на поверхности и от их пространственного распределения, вследствие чего возможна дифференциация по степени поражения для устойчивых и неустойчивых к заболеванию генотипов. Оценка степени поражения на основе гиперспектрального анализа споруляции может быть подходящим методом для выявления тонких различий генотипов в устойчивости к болезням.

М.Т. Kuska с коллегами (Kuska et al., 2015) использовали гиперспектральный микроскоп для определения устойчивости сортов ячменя к мучнистой росе (*Blumeria graminis*). Спектр отражения инокулированных и неинокулированных листьев регистрировали ежедневно в видимом (400–700 нм) и ближнем инфракрасном (700–1000 нм) диапазоне с 3-го по 14-й день после инокуляции. Восприимчивые к патогену генотипы показали увеличение отражательной способности в видимом диапазоне в соответствии с развитием симптомов заболевания, в то время как спектральная характеристика устойчивого генотипа не претерпела значительных изменений за экспериментальный период.

Проблемы и перспективы применения гиперспектральных технологий для диагностики болезней растений

Несмотря на обнадеживающий прогресс, достигнутый за последние несколько десятилетий в мониторинге болезней растений на основе гиперспектральных технологий, все еще остаются некоторые проблемы, препятствующие применению данных методов на практике. И будущие тенденции будут определяться поиском их решения.

Одной из таких проблем является раннее обнаружение болезней растений в полевых условиях. В настоящее время в сельскохозяйственном производстве широко применяются низковысотные, бортовые и спутниковые мультиспектральные системы для мониторинга состояния растительного покрова на основе вегетационных индексов (Hatfield, Pinter, 1993; Huang Y.B. et al., 2013). Однако надежный мониторинг обычно достигается только при полном проявлении симптомов, что может быть слишком поздно для принятия мер по профилактике. В научных исследованиях по использованию гиперспектральных сенсоров для раннего обнаружения болезней растений по-

лучены значительные результаты, тем не менее их практическое применение в полевых и тепличных условиях в системах точного земледелия является еще не решенной задачей.

Связано это с тем, что большинство научных исследований по данной теме проводится в контролируемых условиях, часто с искусственным освещением и точным регулированием направлений входящего и отраженного света, регистрируемого путем размещения камеры или датчика под определенным углом к ткани листа. Условия освещения в поле сильно отличаются от лабораторных, что создает огромные трудности для надежной диагностики болезней. Области растительного покрова, расположенные на солнце, кажутся намного ярче, чем расположенные в тени. Спектральные характеристики зависят также от угла наклона объекта съемки по отношению к входящему и отраженному солнечному свету. Неоднородности в яркости изображения меняются каждую минуту. Следовательно, при установке порога для различения здоровой и пораженной ткани необходимо учитывать общую яркость конкретного изображения в данном месте и угол падения света, что является предметом интенсивных исследований (Guo et al., 2013; Yu et al., 2017).

Другая проблема заключается в том, чтобы точно определить конкретное заболевание в реальных условиях, когда на культуру одновременно воздействуют несколько стрессоров. Сейчас большинство мониторинговых исследований проводится на экспериментальных полях, где предварительно известен тип патогена. Когда же такая информация отсутствует, сложно добиться надежного и точного результата. Многие патогены, а также абиотические стрессоры имеют похожую симптоматику и, соответственно, близкую спектральную сигнатуру. Некоторые современные алгоритмы, такие как алгоритмы глубокого обучения, могут сыграть важную роль в дифференциации биотических и абиотических стрессоров в полевых и тепличных условиях (Liu et al., 2010; Mahlein et al., 2019b). Кроме того, необходимо создавать базу знаний о болезнях растений (например, о географическом распространении, благоприятных средах обитания, типах почв, климатических условиях), поскольку предварительная информация поможет снизить неопределенность при мониторинге болезней.

Заключение

Болезни растений приводят к значительным экономическим потерям в секторе сельскохозяйственного производства во всем мире, особенно под воздействием климатических изменений, происходящих в последние годы. Многообещающей технологией для неинвазивного быстрого, эффективного и надежного способа обнаружения и идентификации болезней растений является использование гиперспектральных сенсоров и платформ.

Новые технологии расширяют возможности человеческого восприятия, предоставляя информацию за пределами видимого диапазона спектра. Анализ спектра отражения растительной ткани позволяет проводить классификацию здоровых и больных растений, оценивать тяжесть заболевания, дифференцировать виды патогенов и обнаруживать симптомы биотических стрессов на ран-

них стадиях, в том числе в инкубационный период, когда симптомы не видны человеческому глазу.

В связи с большим объемом информации наиболее перспективными методами для обработки гиперспектральных данных являются машинное обучение и нейронные сети. В настоящее время гиперспектральные методы диагностики болезней растений находятся на начальной стадии разработки. Помимо того, что это дорогостоящая технология, существует множество технических трудностей, ограничивающих ее применение в производственном процессе. Однако с развитием сенсорных технологий и методов анализа данных можно ожидать, что гиперспектральная визуализация станет одним из важных инструментов для изучения болезней растений.

Список литературы / References

- Альт В.В., Гурова Т.А., Елкин О.В., Клименко Д.Н., Максимов Л.В., Пестунов И.А., Дубровская О.А., Генаев М.А., Эрст Т.В., Генаев К.А., Комышев Е.Г., Хлесткин В.К., Афонников Д.А. Использование гиперспектральной камеры Specim IQ для анализа растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(3):259-266. DOI 10.18699/VJ19.587.
- [Alt V.V., Gurova T.A., Elkin O.V., Klimenko D.N., Maximov L.V., Pestunov I.A., Dubrovskaya O.A., Genaev M.A., Erst T.V., Genaev K.A., Komyshev E.G., Khlestkin V.K., Afonnikov D.A. The use of Specim IQ, a hyperspectral camera, for plant analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(3):259-266. DOI 10.18699/VJ19.587. (in Russian)]
- Афонников Д.А., Генаев М.А., Дорошков А.В., Комышев Е.Г., Пшеничникова Т.А. Методы высокопроизводительного фенотипирования растений для массовых селекционно-генетических экспериментов. *Генетика*. 2016;52(7):788-803. DOI 10.7868/S001667581607002X.
- [Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. *Russ. J. Genet*. 2016;52(7):688-701. DOI 10.1134/S1022795416070024.]
- Демидчик В.В., Шашко А.Ю., Бондаренко В.Ю., Смоликова Г.Н., Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Пожванов Г.А., Барковский А.В., Смолич И.И., Соколик А.И., Медведев С.С. Феномика растений: фундаментальные основы, программно-аппаратные платформы и методы машинного обучения. *Физиология растений*. 2020;67(3):227-245. DOI 10.31857/S0015330320030069.
- [Demidchik V.V., Shashko A.Yu., Bondarenko V.Yu., Smolikova G.N., Przhevalskaya D.A., Chernysh M.A., Pozhvanov G.A., Barkovskij A.V., Smolich I.I., Sokolik A.I., Medvedev S.S. Plant phenomics: fundamental bases, software and hardware platforms, and machine learning. *Russ. J. Plant Physiol*. 2020;67(3):397-412. DOI 10.1134/S1021443720030061.]
- Дубровская О.А., Гурова Т.А., Пестунов И.А., Котов К.Ю. Методы обнаружения болезней на посевах пшеницы по данным дистанционного зондирования (обзор). *Сиб. вестн. с.-х. науки*. 2018; 48(6):76-89. DOI 10.26898/0370-8799-2018-6-11.
- [Dubrovskaya O.A., Gurova T.A., Pestunov I.A., Kotov K.Yu. Methods of detection of diseases on wheat crops according to remote sensing (overview). *Sibirskii Vestnik Sel'skokhozyaistvennoi Nauki = Siberian Herald of Agricultural Science*. 2018;48(6):76-89. DOI 10.26898/0370-8799-2018-6-11. (in Russian)]
- Aasen H., Burkhart A., Bolten A., Bareth G. Generating 3D hyperspectral information with lightweight UAV snapshot cameras for vegetation monitoring: from camera calibration to quality assurance. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens*. 2015;108:245-259. DOI 10.1016/j.isprsjprs.2015.08.002.
- Abdulridha J., Batuman O., Ampatzidis Y. UAV-based remote sensing technique to detect citrus canker disease utilizing hyperspectral

- imaging and machine learning. *Remote Sens.* 2019;11:1373. DOI 10.3390/rs11111373.
- Alisaac E., Behmann J., Kuska M.T., Dehne H.-W., Mahlein A.-K. Hyperspectral quantification of wheat resistance to *Fusarium* head blight: comparison of two *Fusarium* species. *Eur. J. Plant Pathol.* 2018;152:869-884. DOI 10.1007/s10658-018-1505-9.
- Barnes R., Dhanoa M., Lister S.J. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 1989;43:772-777. DOI 10.1366/0003702894202201.
- Barreto A., Paulus S., Varrelmann M., Mahlein A.-K. Hyperspectral imaging of symptoms induced by *Rhizoctonia solani* in sugar beet: comparison of input data and different machine learning algorithms. *J. Plant Dis. Prot.* 2020;127:441-451. DOI 10.1007/s41348-020-00344-8.
- Behmann J., Acebron K., Emin D., Bennertz S., Matsubara S., Thomas S., Bohnenkamp D., Kuska M.T., Jussila J., Salo H., Mahlein A.-K., Rascher U. Specim IQ: evaluation of a new, miniaturized handheld hyperspectral camera and its application for plant phenotyping and disease detection. *Sensors.* 2018;18:441. DOI 10.3390/s18020441.
- Behmann J., Steinucken J., Plumer L. Detection of early plant stress responses in hyperspectral images. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* 2014;93:98-111. DOI 10.1016/j.isprsjprs.2014.03.016.
- Bock C.H., Poole G.H., Parker P.E., Gottwald T.R. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2010;29:59-107. DOI 10.1080/07352681003617285.
- Bohnenkamp D., Kuska M.T., Mahlein A.-K., Behmann J. Hyperspectral signal decomposition and symptom detection of wheat rust disease at the leaf scale using pure fungal spore spectra as reference. *Plant Pathol.* 2019;68:1188-1195. DOI 10.1111/ppa.13020.
- Burger J. Hyperspectral NIR image analysis. Data Exploration, Correction, and Regression. Doctoral Dissertation. Arkitektkopia, Umea, Sweden, 2006.
- Burkart A., Aasen H., Alonso L., Menz G., Bareth G., Rascher U. Angular dependency of hyperspectral measurements over wheat characterized by a novel UAV based goniometer. *Remote Sens.* 2015;7(1):725-746. DOI 10.3390/rs70100725.
- Candiago S., Remondino F., De Giglio M., Dubbini M., Gattelli M. Evaluating multispectral images and vegetation indices for precision farming applications from UAV images. *Remote Sens.* 2015;7(4):4026-4047. DOI 10.3390/rs70404026.
- Choudhary R., Mahesh S., Paliwal J., Jayas D.S. Identification of wheat classes using wavelet features from near infrared hyperspectral images of bulk samples. *Biosyst. Eng.* 2009;102(2):115-127. DOI 10.1016/j.biosystemseng.2008.09.028.
- Couture J.J., Singh A., Charkowski A.O., Groves R.L., Gray S.M., Bethke P.C., Townsend P.A. Integrating spectroscopy with potato disease management. *Plant Dis.* 2018;102:2233-2240. DOI 10.1094/PDIS-01-18-0054-RE.
- Delalieux S., van Aardt J., Keulemans W., Schrevels E., Coppin P. Detection of biotic stress (*Venturia inaequalis*) in apple trees using hyperspectral data: non-parametric statistical approaches and physiological implications. *Eur. J. Agron.* 2007;27:130-143. DOI 10.1016/j.eja.2007.02.005.
- ElMasry G.M., Nakauchi S. Image analysis operations applied to hyperspectral images for non-invasive sensing of food quality – a comprehensive review. *Biosyst. Eng.* 2016;142:53-82. DOI 10.1016/j.biosystemseng.2015.11.009.
- Esquerre C., Gowen A.A., Burger J., Downey G., O'Donnell C.P. Suppressing sample morphology effects in near infrared spectral imaging using chemometric data pre-treatments. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2012;117:129-137. DOI 10.1016/j.chemolab.2012.02.006.
- Fahlgren N., Gehan M.A., Baxte I. Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015;24:93-99. DOI 10.1016/j.pbi.2015.02.006.
- Franceschini M.H.D., Bartholomeus H., van Apeldoorn D.F., Suomalainen J., Kooistra L. Feasibility of unmanned aerial vehicle optical imagery for early detection and severity assessment of late blight in potato. *Remote Sens.* 2019;11:224. DOI 10.3390/rs11030224.
- Gitelson A.A., Keydan G.P., Merzlyak M.N. Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophys. Res. Lett.* 2006;33(11):L11402. DOI 10.1029/2006GL026457.
- Gomez-Sanchis J., Molto E., Camps-Valls G., Gomez-Chova L., Aleixos N., Blasco J. Automatic correction of the effects of the light source on spherical objects. An application to the analysis of hyperspectral images of citrus fruits. *J. Food Eng.* 2008;85(2):191-200. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2007.06.036.
- Guo W., Rage U.K., Ninomiya S. Illumination invariant segmentation of vegetation for time series wheat images based on decision tree model. *Comput. Electron. Agric.* 2013;96:58-66. DOI 10.1016/j.compag.2013.04.010.
- Hatfield J.L., Pinter P.J. Remote-sensing for crop protection. *Crop. Prot.* 1993;12:403-413. DOI 10.1016/0261-2194(93)90001-Y.
- Huang J., Liao H., Zhu Y., Sun J., Sun Q., Liu X. Hyperspectral detection of rice damaged by rice leaf folder (*Cnaphalocrocis medinalis*). *Comput. Electron. Agric.* 2012;82:100-107. DOI 10.1016/j.compag.2012.01.002.
- Huang W., Lamb D.W., Niu Z., Zhang Y., Liu L., Wang J. Identification of yellow rust in wheat using in-situ spectral reflectance measurements and airborne hyperspectral imaging. *Precis. Agric.* 2007;8:187-197. DOI 10.1007/s11119-007-9038-9.
- Huang Y.B., Thomson S.J., Hoffmann W.C., Lan Y.B., Fritz B.K. Development and prospect of unmanned aerial vehicle technologies for agricultural production management. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 2013;6(3):1-10. DOI 10.3965/j.ijabe.20130603.001.
- Huete A., Didan K., Miura T., Rodriguez E.P., Gao X., Ferreira L.G. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. *Remote Sens. Environ.* 2002;83(1):195-213. DOI 10.1016/S0034-4257(02)00096-2.
- Kuska M.T., Wahabzada M., Leucker M., Dehne H.-W., Kersting K., Oerke E.-C., Steiner U., Mahlein A.-K. Hyperspectral phenotyping on the microscopic scale: towards automated characterization of plant-pathogen interactions. *Plant Methods.* 2015;11:28-41. DOI 10.1186/s13007-015-0073-7.
- Leucker M., Mahlein A.-K., Steiner U., Oerke E.-C. Improvement of lesion phenotyping in *Cercospora beticola* – sugar beet interaction by hyperspectral imaging. *Phytopatology.* 2016;106:177-184. DOI 10.1094/PHYTO-04-15-0100-R.
- Li J., Zhang R., Li J., Wang Z., Zhang H., Zhan B., Jiang Y. Detection of early decayed oranges based on multispectral principal component image combining both bi-dimensional empirical mode decomposition and watershed segmentation method. *Postharvest Biol. Technol.* 2019;158:110986-110996. DOI 10.1016/j.postharvbio.2019.110986.
- Li L., Zhang Q., Huang D. A review of imaging techniques for plant phenotyping. *Sensors.* 2014;14:20078-20111. DOI 10.3390/s141120078.
- Li Y., Zhang H., Shen Q. Spectral-spatial classification of hyperspectral imagery with 3D convolutional neural network. *Remote Sens.* 2017;9:67. DOI 10.3390/rs9010067.
- Liu Z.-Y., Wu H.-F., Huang J.-F. Application of neural networks to discriminate fungal infection levels in rice panicles using hyperspectral reflectance and principal components analysis. *Comput. Electron. Agric.* 2010;72:99-106. DOI 10.1016/j.compag.2010.03.003.
- Lobos G.A., Camargo A.V., del Pozo A., Araus J.L., Ortiz R., Doonan J.H. Editorial: plant phenotyping and phenomics for plant breeding. *Front. Plant Sci.* 2017;8:2181. DOI 10.3389/fpls.2017.02181.
- Lowe A., Harrison N., French A.P. Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress. *Plant Methods.* 2017;13:80-91. DOI 10.1186/s13007-017-0233-z.
- Mahlein A.-K. Plant disease detection by imaging sensors-parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Dis.* 2016;100:241-251. DOI 10.1094/PDIS-03-15-0340-FE.

- Mahlein A.-K., Alisaac E., Masri A.A., Behmann J., Dehne H.-W., Oerke E.-C. Comparison and combination of thermal, fluorescence, and hyperspectral imaging for monitoring *Fusarium* head blight of wheat on spikelet scale. *Sensors*. 2019a;19:2281. DOI 10.3390/s19102281.
- Mahlein A.-K., Kuska M.T., Thomas S., Wahabzada M., Behmann J., Rascher U., Kersting K. Quantitative and qualitative phenotyping of disease resistance of crops by hyperspectral sensors: seamless interlocking of phytopathology, sensors, and machine learning is needed! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019b;50:156-162. DOI 10.1016/j.pbi.2019.06.007.
- Mahlein A.-K., Kuska M.T., Behmann J., Polder G., Walter A. Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: state of the art. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2018;56:535-558. DOI 10.1146/annurev-phyto-080417-050100.
- Mahlein A.-K., Rumpf T., Welke P., Dehne H.-W., Plümer L., Steiner U., Oerke E.-C. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sens. Environ.* 2013;128: 21-30. DOI 10.1016/j.rse.2012.09.019.
- Mahlein A.-K., Steiner U., Hillnhütter C., Dehne H.-W., Oerke E.-C. Hyperspectral imaging for small-scale analysis of symptoms caused by different sugar beet diseases. *Plant Methods*. 2012;8:3. DOI 10.1186/1746-4811-8-3.
- Mishra P., Asaari M., Herrero-Langreo A., Lohumi S., Diezma B., Scheunders P. Close range hyperspectral imaging of plants: a review. *Biosyst. Eng.* 2017;164:49-67. DOI 10.1016/j.biosystemseng. 2017.09.009.
- Moshou D., Bravo C., Oberti R., West J.S., Ramon H., Vougioukas S., Bochtis D. Intelligent multi-sensor system for the detection and treatment of fungal diseases in arable crops. *Biosyst. Eng.* 2011;108: 311-321. DOI 10.1016/j.biosystemseng.2011.01.003.
- Moshou D., Bravo C., West J., Wahlen S., McCartney A., Ramon H. Automatic detection of 'yellow rust' in wheat using reflectance measurements and neural networks. *Comput. Electron. Agric.* 2004;44: 173-188. DOI 10.1016/j.compag.2004.04.003.
- Naidu R.A., Perry E.M., Pierce F.J., Mekuria T. The potential of spectral reflectance technique for the detection of *Grapevine leafroll-associated virus-3* in two red-berried wine grape cultivars. *Comput. Electron. Agr.* 2009;66:38-45. DOI 10.1016/j.compag.2008.11.007.
- Oerke E.-C., Herzog K., Toepfer R. Hyperspectral phenotyping of the reaction of grapevine genotypes to *Plasmopara viticola*. *J. Exp. Bot.* 2016;67(18):5529-5543. DOI 10.1093/jxb/erw318.
- Pandey P., Ge Y., Stoerger V., Schnable J.C. High throughput *in vivo* analysis of plant leaf chemical properties using hyperspectral imaging. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1348-1359. DOI 10.3389/fpls.2017. 01348.
- Polder G., van der Heijden G.W.A.M., van der Voet H., Young I.T. Measuring surface distribution of carotenes and chlorophyll in ripening tomatoes using imaging spectrometry. *Postharvest Biol. Techn.* 2004;34(2):117-129.
- Rajendran D.K., Park E., Nagendran R., Hung N.B., Cho B.-K., Kim K.-H. Visual analysis for detection and quantification of *Pseudomonas cichorii* disease severity in tomato plants. *Plant Pathol. J.* 2016;32:300-310. DOI 10.5423/PPJ.OA.01.2016.0032.
- Rinnan A., Berg F., Engelsen S. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends Anal. Chem.* 2009;28(10):1201-1222. DOI 10.1016/j.trac.2009.07.007.
- Rumpf T., Mahlein A.-K., Steiner U., Oerke E.-C., Dehne H.-W., Plümer L. Early detection and classification of plant diseases with Support Vector Machines based on hyperspectral reflectance. *Comput. Electron. Agric.* 2010;74:91-99. DOI 10.1016/j.compag.2010. 06.009.
- Sankaran S., Khot L.R., Espinoza C.Z., Jarolmasjed S., Sathuvali V.R., Vandemark G.J., Miklas P.N., Carter A.H., Pumphrey M.O., Knowles N.R., Pavek K.J. Low-altitude, high-resolution aerial imaging systems for row and field crop phenotyping: a review. *Eur. J. Agron.* 2015;70:112-123. DOI 10.1016/j.eja.2015.07.004.
- Savitzky A., Golay M.J. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 1964;36:1627-1639. DOI 10.1021/ac60214a047.
- Singh A., Ganapathysubramanian B., Singh A.K., Sarkar S. Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. *Trends Plant Sci.* 2016;21(2):110-124. DOI 10.1016/j.tplants.2015.10.015.
- Singh D., Sao R., Singh K.P. A remote sensing assessment of pest infestation on sorghum. *Adv. Space Res.* 2007;39:155-163. DOI 10.1016/j.asr.2006.02.025.
- Steddom K., Heidel G., Jones D., Rush C.M. Remote detection of rhizomania in sugar beets. *Phytopathology*. 2003;93:720-726. DOI 10.1094/PHYTO.2003.93.6.720.
- Sun G., Zhang A., Ren J., Ma J., Wang P., Zhang Y., Jia X. Gravitation-based edge detection in hyperspectral images. *Remote Sens.* 2017;9:592. DOI 10.3390/rs9060592.
- Tao Y., Wen Z. An adaptive spherical image transform for high-speed fruit defect detection. *Trans. ASABE*. 1999;42(1):241-246.
- Tardieu F., Cabrera-Bosquet L., Pridmore T., Bennett M. Plant phenomics, from sensors to knowledge. *Curr. Biol.* 2017;27:R770-R783. DOI 10.1016/j.cub.2017.05.055.
- Thomas S., Behmann J., Steier A., Kraska T., Muller O., Rascher U., Mahlein A.-K. Quantitative assessment of disease severity and rating of barley cultivars based on hyperspectral imaging in a non-invasive, automated phenotyping platform. *Plant Methods*. 2018a; 14:45. DOI 10.1186/s13007-018-0313-8.
- Thomas S., Kuska M.T., Bohnenkamp D. Benefits of hyperspectral imaging for plant disease detection and plant protection: a technical perspective. *J. Plant Dis. Prot.* 2018b;125:5-20. DOI 10.1007/s41348-017-0124-6.
- Vidal M., Amigo J.M. Pre-processing of hyperspectral images. Essential steps before image analysis. *Chemom. Intell. Lab.* 2012;117: 138-148. DOI 10.1016/j.chemolab.2012.05.009.
- Vigneau N., Ecartot M., Rabatel G., Roumet P. Potential of field hyperspectral imaging as a non destructive method to assess leaf nitrogen content in wheat. *Field Crops Res.* 2011;122:25-31. DOI 10.1016/j.fcr.2011.02.003.
- Walter A., Liebisch F., Hund A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis (review). *Plant Methods*. 2015;11:14. DOI 10.1186/s13007-015-0056-8.
- Wang W., Li C., Tollner E.W., Gitaitis R.D., Rains G.C. Shortwave infrared hyperspectral imaging for detecting sour skin (*Burkholderia cepacia*)-infected onions. *J. Food Eng.* 2012;109(1):38-48. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.001.
- Williams D., Britten A., McCallum S., Jones H., Aitkenhead M., Karley A., Loades K., Prashar A., Graham J. A method for automatic segmentation and splitting of hyperspectral images of raspberry plants collected in field conditions. *Plant Methods*. 2017;13:74-85. DOI 10.1186/s13007-017-0226-y.
- Wu D., Sun D.-W. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review – Part I: Fundamentals. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2013;19:1-14. DOI 10.1016/j.ifset.2013.04.014.
- Yang C., Cheng C., Chen R. Changes in spectral characteristics of rice canopy infested with brown planthopper and leafhopper. *Crop Sci.* 2007;47:329-335. DOI 10.2135/cropsci2006.05.0335.
- Yeh Y.F., Chung W., Liao J., Chung C., Kuo Y., Lin T. A comparison of machine learning methods on hyperspectral plant disease assessments. *IFAC Proc.* 2013;46:361-365. DOI 10.3182/20130327-3-JP-3017.00081.
- Yeh Y., Chung W., Liao J., Chung C., Kuo Y., Lin T. Strawberry foliar anthracnose assessment by hyperspectral imaging. *Comput. Electron. Agric.* 2016;122:1-9. DOI 10.1016/j.compag.2016.01.012.
- Yu K., Kirchgessner N., Grieder C., Walter A., Hund A. An image analysis pipeline for automated classification of imaging light conditions and for quantification of wheat canopy cover time series in field phenotyping. *Plant Methods*. 2017;13:15. DOI 10.1186/s13007-017-0168-4.

- Yuan L., Huang Y., Loraamm R.W., Nie C., Wang J., Zhang J. Spectral analysis of winter wheat leaves for detection and differentiation of diseases and insects. *Field Crops Res.* 2014a;156:199-207. DOI 10.1016/j.fcr.2013.11.012.
- Yuan L., Zhang J., Shi Y., Nie C., Wei L., Wang J. Damage mapping of powdery mildew in winter wheat with high-resolution satellite image. *Remote Sens.* 2014b;6:3611-3623. DOI 10.3390/rs6053611.
- Zhang J., Huang Y., Pu R., Gonzalez-Moreno P., Yuan L., Wu K., Huang W. Monitoring plant diseases and pests through remote sensing technology: a review. *Comput. Electron. Agric.* 2019;165:104943-104956. DOI 10.1016/j.compag.2019.104943.
- Zhang J., Pu R., Wang J., Huang W., Yuan L., Luo J. Detecting powdery mildew of winter wheat using leaf level hyperspectral measurements. *Comput. Electron. Agric.* 2012;85:13-23. DOI 10.1016/j.compag.2012.03.006.
- Zhang J., Wang N., Yuan L., Chen F., Wu K. Discrimination of winter wheat disease and insect stresses using continuous wavelet features extracted from foliar spectral measurements. *Biosyst. Eng.* 2017; 162:20-29. DOI 10.1016/j.biosystemseng.2017.07.003.
- Zhang N., Yang G., Pan Y., Yang X., Chen L., Zhao C. A review of advanced technologies and development for hyperspectral-based plant disease detection in the past three decades. *Remote Sens.* 2020;12: 3188. DOI 10.3390/rs12193188.
- Zhao Y.-R., Li X., Yu K.-Q., Cheng F., He Y. Hyperspectral imaging for determining pigment contents in cucumber leaves in response to angular leaf spot disease. *Sci. Rep.* 2016;6:27790. DOI 10.1038/srep27790.
- Zheng C., Abd-Elrahman A., Whitaker V. Remote sensing and machine learning in crop phenotyping and management, with an emphasis on applications in strawberry farming. *Remote Sens.* 2021;13:531. DOI 10.3390/rs13030531.
- Zhou R.-Q., Jin J.-J., Li Q.-M., Su Z.-Z., Yu X.-J., Tang Y., Luo S.-M., He Y., Li X.-L. Early detection of *Magnaporthe oryzae*-infected barley leaves and lesion visualization based on hyperspectral imaging. *Front. Plant Sci.* 2019;9:1962. DOI 10.3389/fpls.2018.01962.

ORCID ID

A.F. Cheshkova orcid.org/0000-0003-2265-7129

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 0533-2021-0007.**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.09.2021. После доработки 24.12.2021. Принята к публикации 27.12.2021.

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

Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*

Н.Б. Рудометова , Д.Н. Щербаков, А.П. Рудометов, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
 nadenkaand100@mail.ru


Аннотация. ВИЧ-инфекция по-прежнему остается одной из глобальных проблем здравоохранения во всем мире. Борьба с инфекцией ведется по нескольким направлениям. Во-первых, это профилактические мероприятия, которые включают просвещение населения по проблеме ВИЧ/СПИДа, пропаганду здорового образа жизни, защищенные половые контакты, доконтактную профилактику уязвимых групп населения. Во-вторых, прохождение своевременного тестирования на ВИЧ и применение антиретровирусной терапии в случае его обнаружения. В-третьих, это научные исследования, связанные как с поиском новых лекарственных агентов, так и с разработкой вакцины против ВИЧ-1. Ключевой момент при определении эффективности вакцин и химиотерапевтических препаратов – выбор инструмента, позволяющего быстро и точно оценить их эффективность *in vitro*. Классическим методом вирусологии, позволяющим оценить нейтрализующую активность сывороток животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами, и эффективность химиотерапевтических агентов, является метод нейтрализации с использованием вирусных изолятов, а также инфекционных молекулярных клонов, которые представляют собой инфекционные вирусные частицы, полученные путем трансфекции клеток плазмидным вектором, содержащим полноразмерный геном ВИЧ-1, кодирующий структурные, регуляторные и вспомогательные белки вируса, необходимые для образования репликационно-компетентных вирусных частиц в культуре клеток. При этом метод нейтрализации с использованием вирусных изолятов и инфекционных молекулярных клонов отличается трудоемкостью, продолжительностью и требует повышенных мер биобезопасности. Альтернативным решением, устраняющим указанные недостатки и позволяющим проводить быстрый скрининг, является использование для анализа нейтрализующей активности псевдовирюсов, которые представляют собой рекомбинантные вирусные частицы. В отличие от инфекционных вирусов, работа с псевдовирюсами безопасна, поскольку геном псевдовирюсов нарушен для того, чтобы их инфекция ограничивалась лишь одним циклом. Данный обзор посвящен описанию модельных вирусных систем, используемых для оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*: первичных изолятов ВИЧ-1 и лабораторно-адаптированных штаммов, инфекционных молекулярных клонов и *env*-псевдовирюсов. Кратко представлена их сравнительная характеристика. Более подробно описана технология *env*-псевдовирюсов ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ-1; первичные изоляты; инфекционные молекулярные клоны; *env*-псевдовирюсы; анализ нейтрализации вируса.

Для цитирования: Рудометова Н.Б., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Модельные системы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), используемые для оценки эффективности кандидатных вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(2): 214-221. DOI 10.18699/VJGB-22-26

Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1

N.B. Rudometova , D.N. Shcherbakov, A.P. Rudometov, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia
 nadenkaand100@mail.ru

Abstract. HIV infection still remains a major challenge for healthcare systems of the world. There are several aspects on counteracting the HIV/AIDS epidemic. The first aspect covers preventive measures including educational campaigns on HIV/AIDS and promotion of a healthy lifestyle, protected sex, and pre-exposure prophylaxis of vulnerable groups. The second aspect is timely HIV testing and the use of antiretroviral therapy when test results come back positive. The third aspect is the scientific research associated with discovering new pharmaceutical agents and developing HIV-1 vaccines. Selecting an adequate tool for quick and accurate *in vitro* efficacy assessment is the key aspect for efficacy assessment of vaccines and chemotherapy drugs. The classical method of virology, which makes it possible to evaluate the neutralizing activity of the sera of animals immunized with experimental vaccines and the efficacy of

chemotherapy agents is the method of neutralization using viral isolates and infectious molecular clones, i.e. infectious viral particles obtained via cell transfection with a plasmid vector including the full-length HIV-1 genome coding structural, regulatory, and accessory proteins of the virus required for the cultivation of replication-competent viral particles in cell culture. However, neutralization assessment using viral isolates and infectious molecular clones is demanding in terms of time, effort, and biosafety measures. An alternative eliminating these disadvantages and allowing for rapid screening is the use of pseudoviruses, which are recombinant viral particles, for the analysis of neutralizing activity. Pseudotyped viruses have defective genomes restricting their replication to a single cycle, which renders them harmless compared to infectious viruses. The present review focuses on describing viral model systems for *in vitro* efficacy assessment of vaccines and drugs against HIV-1, which include primary HIV-1 isolates, laboratory-adapted strains, infectious molecular clones, and *env*-pseudoviruses. A brief comparison of the listed models is presented. The HIV-1 *env*-pseudoviruses approach is described in more detail.

Key words: HIV-1; primary isolates; infectious molecular clones; *env*-pseudoviruses; virus neutralization assay.

For citation: Rudometova N.B., Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Model systems of human immunodeficiency virus (HIV-1) for *in vitro* efficacy assessment of candidate vaccines and drugs against HIV-1. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):214-221. DOI 10.18699/VJGB-22-26

Введение

Пандемия ВИЧ/СПИДа остается одной из глобальных проблем мирового здравоохранения, вовлекая в ряды инфицированных около двух миллионов человек ежегодно¹. В настоящее время основным способом лечения ВИЧ-инфекции является применение антиретровирусной терапии, позволяющей снижать уровень вирусной нагрузки, улучшать качество и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов. Однако известные антиретровирусные препараты имеют и существенные недостатки, такие как высокая стоимость лечения, выраженные побочные эффекты, развитие резистентности к применяемым препаратам, необходимость в периодическом изменении схем лечения и регулярный прием препаратов в течение всей жизни (Arts, Nazuda, 2012). Более того, до сих пор не разработан препарат, способный полностью излечить человека от ВИЧ-инфекции (Phanuphak, Gulick, 2020). Поэтому приоритетным направлением в борьбе с ВИЧ/СПИД по-прежнему остается создание эффективной профилактической вакцины (Stephenson et al., 2020).

На сегодняшний день наиболее успешными были клинические испытания RV144, которые проводились в Таиланде с 2003 по 2009 г. Эффективность исследуемой вакцины составила 60 % через 12 месяцев после вакцинации и 31.2 % после трех с половиной лет наблюдения (Kim et al., 2015). Спустя несколько лет компоненты вакцины из клинических испытаний RV144 были адаптированы для экспрессии антигенов штаммов ВИЧ, циркулирующих в Южной Африке. В январе 2020 г. были подведены предварительные итоги клинических испытаний, которые показали, что модифицированная вакцина не предотвращала инфицирование ВИЧ-1 среди добровольцев (Gray et al., 2021). В области вакцинологии ВИЧ-1 остается еще много нерешенных вопросов и проблем, но при этом ясно, что для разработки эффективной вакцины необходимо использовать новые подходы по ее дизайну (Hsu, O'Connell, 2017). Поэтому сейчас активно разрабатываются различные направления и подходы, способные обеспечить индукцию защитного как Т-, так и В-клеточного иммунного ответа против ВИЧ-1, включая широконейтрализующие анти-

тела (bnAbs) (Shcherbakov et al., 2015; Rudometov et al., 2019b; Jones et al., 2020; Liu et al., 2020; Ng'uni et al., 2020).

Неотъемлемой частью научных исследований, связанных с созданием вакцины и химиотерапевтических препаратов против вирусных патогенов, включая ВИЧ-1, является выбор инструмента, позволяющего оценить их эффективность *in vitro*. Классический метод вирусологии, позволяющий оценить нейтрализующую активность сывороток животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами, и эффективность химиотерапевтических агентов, – это метод нейтрализации с помощью вирусных изолятов (Jackson et al., 1988). Однако данный метод отличается трудоемкостью, продолжительностью и требует повышенных мер биобезопасности. Альтернативой вирусным изолятам является использование инфекционных молекулярных клонов, которые представляют собой инфекционные вирусные частицы, полученные путем трансфекции клеток плазмидным вектором, содержащим полноразмерный геном ВИЧ-1, кодирующий структурные, регуляторные и вспомогательные белки вируса, необходимые для образования репликационно-компетентных вирусных частиц в культуре клеток (Peden et al., 1991).

В последние годы многие исследователи отдают приоритет технологии псевдовирюсов – безопасному методу, позволяющему работать в условиях BSL-2 (Li Q. et al., 2018; Montefiori et al., 2018). В отличие от изолятов вируса и инфекционных молекулярных клонов, работа с псевдовирюсами безопасна, поскольку в кодирующие области генома внесены мутации, ограничивающие развитие вируса только одним циклом, поэтому псевдовирюсы нередко называют «вирусами одного цикла инфекции» (Чересиз и др., 2010; Li Q. et al., 2018).

В данном обзоре будут рассмотрены модельные системы ВИЧ-1, используемые для оценки эффективности химиотерапевтических препаратов, широконейтрализующих антител и кандидатных вакцин против ВИЧ-1 *in vitro*.

Изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1

Исторически самой первой системой, которая использовалась для оценки эффективности вакцин и анализа нейтрализующей активности антител, были первичные изоляты ВИЧ-1 (Jackson et al., 1988). Изоляты вируса полу-

¹ Информационный бюллетень по ВИЧ/СПИД. Всемирная организация здравоохранения, 2020. Режим доступа: URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (дата обращения 02.06.2021).

чают путем совместного культивирования мононуклеаров периферической крови (МПК) ВИЧ-положительного пациента с ФГА-стимулированными МПК здорового донора. При этом выделенные из крови вирусы представляют собой генетически неоднородную популяцию вследствие квазивидовой природы ВИЧ-1. Для того чтобы исключить возможное селективное давление на вирусные изоляты и обеспечить наиболее оптимальное сохранение фенотипа вируса, его наработку ведут на первичных культурах клеток, а не на перевиваемых клеточных линиях (Voronin et al., 2007; Van't Wout et al., 2008). Как правило, для определения наличия нейтрализующих антител в сыворотках, полученных от вакцинированных, или эффективности исследуемого антивирусного агента, анализ нейтрализации также проводят на клеточной культуре МПК с добавлением инфекционной дозы вируса и серийных разведений иммунной сыворотки или тестируемого соединения. Оценку подавления репликации ВИЧ-1 выполняют с помощью ИФА путем измерения концентрации белка p24 (структурный компонент капсида ВИЧ-1) в культуральной среде (Зырянова и др., 2020).

Применение первичных изолятов ВИЧ-1 для анализа вируснейтрализации имеет ряд недостатков, среди которых можно выделить репликацию возбудителя на первичных клетках МПК, повышенные требования к биобезопасности, низкую воспроизводимость результатов и, как следствие, сложность стандартизации (Mascola et al., 1996, 2005). Поэтому в первые годы разработки вакцины для простоты и воспроизводимости экспериментов некоторые штаммы ВИЧ-1 (ПШВ/LAV, MN, SF2) были адаптированы для репликации в иммортализованных клеточных линиях (H9, SEM) и названы лабораторно-адаптированными штаммами или, точнее, вирусами, адаптированными к Т-клеточной линии. Позже было показано, что вакцинация добровольцев рекомбинантными тримерами, полученными на основе лабораторно-адаптированных штаммов ВИЧ-1, приводила к индукции антител, которые нейтрализовали именно эти лабораторные штаммы. Однако дополнительные эксперименты с использованием первичных изолятов ВИЧ-1 показали, что, несмотря на мощную индукцию нейтрализующих антител против лабораторно-адаптированных штаммов, нейтрализующая активность в отношении первичных изолятов отсутствовала (Mascola et al., 1996; Montefiori et al., 2018). Вследствие этого при использовании лабораторно-адаптированных штаммов вируса для анализа нейтрализации могли быть получены ошибочные данные, что снова привело исследователей к первичным изолятам как более адекватному инструменту для анализа вируснейтрализующей активности антител, образующихся в результате вакцинации. Поскольку данный метод является трудоемким и не позволяет проводить массовый анализ, его стали применять на заключительных этапах исследований.

Инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1

Как было отмечено выше, первичные изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1 характеризуются трудоемкостью культивирования и значительной разнородностью вследствие своей природы, а также вариабель-

ности донорских МПК (Polonis et al., 2008), поэтому для стабильного воспроизведения вирусных частиц стали использовать инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1 (ИМК). Их получают путем трансфекции клеток плазмидным вектором, который содержит полноразмерный геном ВИЧ-1, обеспечивающий образование вирусных частиц, обладающих способностью к дальнейшей репликации в культуре эукариотических клеток (рис. 1). В результате формируются генетически однородные вирусные частицы, в отличие от первичных изолятов ВИЧ-1, так как геном вируса находится в виде ДНК в составе плазмидного вектора (Edmonds et al., 2010; Зуянова et al., 2020). Для возможности стандартизации анализа нейтрализации с ИМК, с помощью методов генетической инженерии были созданы модифицированные перевиваемые клеточные линии, несущие на своей поверхности рецептор CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4 (Princen et al., 2004; González et al., 2010). Поскольку ИМК представляют собой инфекционные вирусные частицы, то экспериментальная работа с ними, так же как и с первичными изолятами и лабораторно-адаптированными штаммами, требует соблюдения соответствующих мер биобезопасности и отличается продолжительностью анализа.

В то же время использование ИМК позволяет характеризовать и исследовать биологические свойства генетически различных изолятов ВИЧ-1 (Ochsenbauer et al., 2012; Baalwa et al., 2013; Wang et al., 2013; Chenine et al., 2018; Зуянова et al., 2020), изучать механизмы возникновения лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ-1 и влияние мутаций на биологические свойства вируса (Johnston et al., 2005; Pugach et al., 2007; Varghese et al., 2013), а также проводить поиск новых антиретровирусных агентов (Su et al., 2019; Wagstaff et al., 2019; Mavian et al., 2020).

Env-псевдовirusы ВИЧ-1

При использовании классических вирусологических методов для работы с ВИЧ-1 исследователи сталкиваются с рядом сложностей, отмеченных выше. Для быстрой и адекватной оценки гуморального иммунного ответа, возникающего в ответ на вакцинные конструкции, и скрининга потенциальных химиотерапевтических агентов, а именно ингибиторов проникновения, наилучшим образом себя зарекомендовала технология *env*-псевдовирусов (Montefiori et al., 2018).

Env-псевдовirusы ВИЧ-1 представляют собой рекомбинантные вирусные частицы, полученные путем трансфекции эукариотических клеток двумя плазмидами – коровой и оболочечной. Коровая плаزمиды содержит гены структурных (Gag и Pol), регуляторных (Tat и Rev) и вспомогательных (Vpr, Vpr, Vif и Nef) белков ВИЧ-1, которые необходимы для сборки вирусных частиц, а также последовательности, необходимые для упаковки вирусной РНК (Ψ). Оболочечная плазмиды несет ген поверхностного гликопротеина (Env) определенного подтипа ВИЧ-1. В результате трансфекции происходит формирование вирусных частиц с дефектным геномом, не способным обеспечить сборку инфекционных дочерних вирионов при заражении (Li M. et al., 2005; Li Q. et al., 2018). С помощью электронной микроскопии показано, что при трансфекции

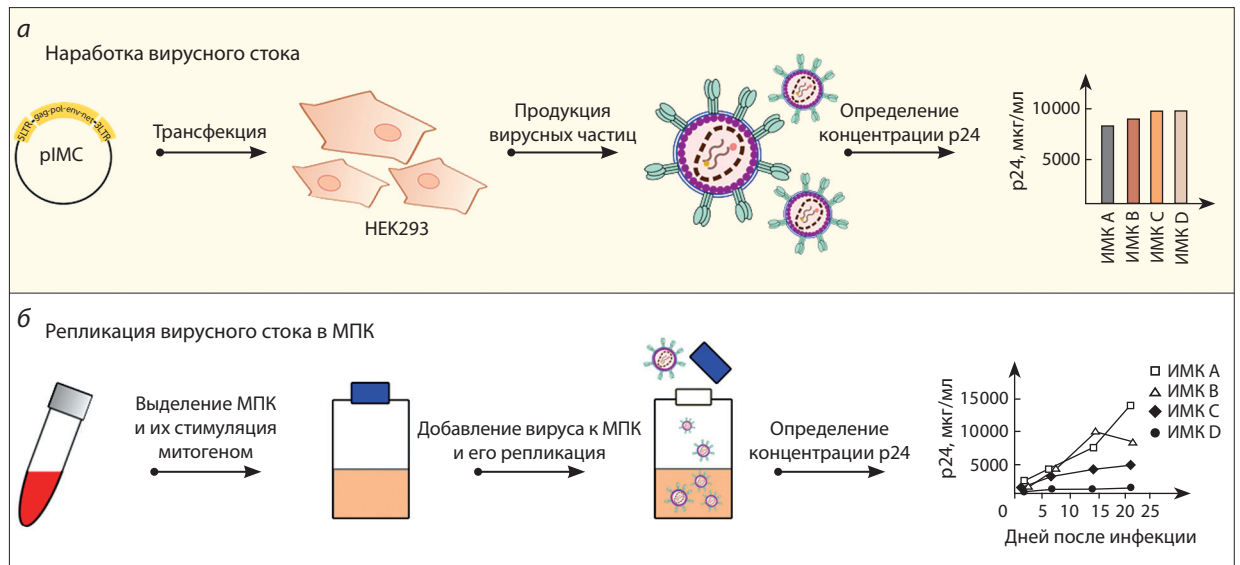


Рис. 1. Схема работы с ИМК ВИЧ-1.

Условно получение ИМК ВИЧ-1 можно разделить на два этапа. Первый этап (а) включает трансфекцию клеточной линии HEK293 для продукции вирусных частиц, так называемого вирусного стока. На втором этапе (б) проводят последующую репликацию вирусного стока с использованием ФГА-стимулированных МПК здорового донора в течение нескольких недель. На каждом из этих этапов титр вирусных частиц оценивают с помощью ИФА путем определения концентрации р24 антигена в культуральной среде. Увеличение концентрации капсидного белка р24 не менее чем в тысячу раз по сравнению с его начальной концентрацией в культуральной среде свидетельствует о продукции репликационно-компетентных вирусов.

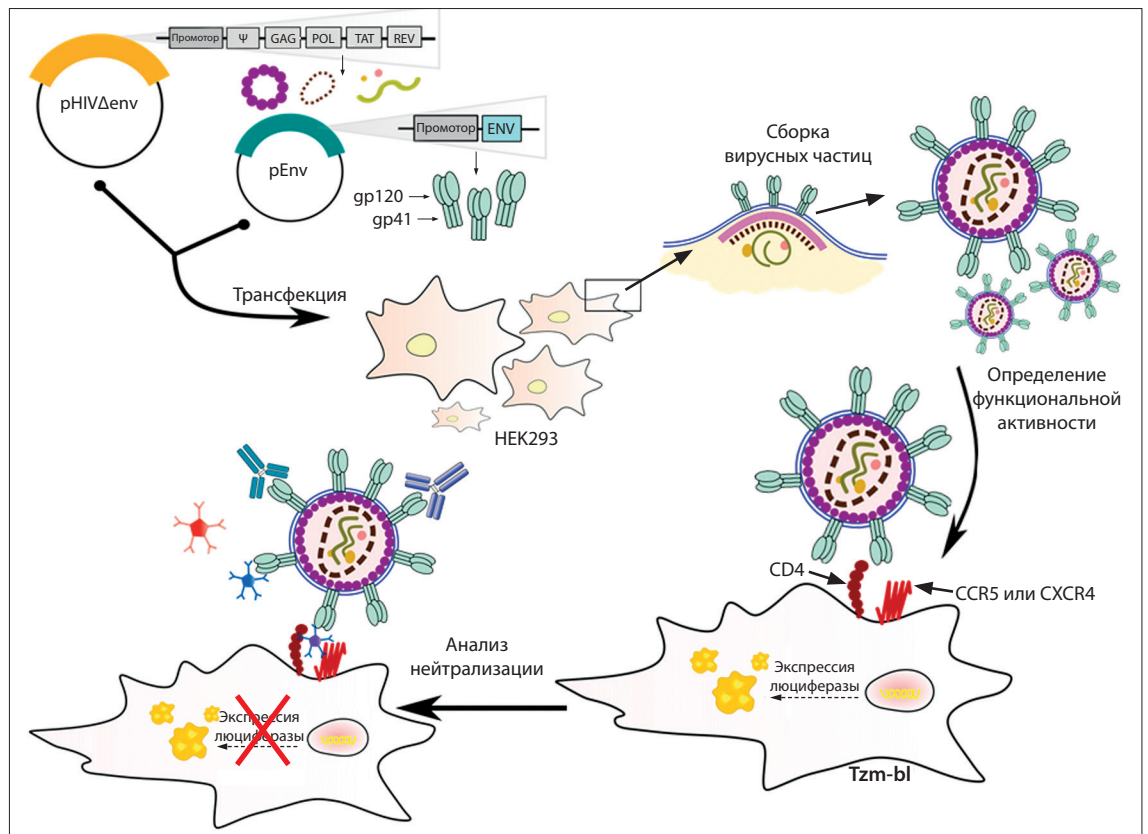


Рис. 2. Схема работы с env-псевдовиральной системой ВИЧ-1.

Экспериментальная работа с env-псевдовиралами включает несколько этапов: первый – сборка вирусных частиц с помощью трансфекции клеточной линии HEK293 с использованием двух плазмид – коровой и оболочечной; второй – определение функциональной активности псевдовиральных частиц, т. е. способности заражать клетки-мишени и активировать репортерный ген люциферазы светлячка; третий этап – непосредственно анализ нейтрализации с использованием иммунных сывороток или химиотерапевтических агентов с целью определения их способности блокировать проникновение псевдовиралов в клетку-мишень.

Сравнительная характеристика модельных систем ВИЧ-1,
используемых для оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*

Параметр	<i>Env</i> -псевдовirusы	Инфекционные молекулярные клоны	Первичные изоляты и лабораторно- адаптированные штаммы
Требования к биобезопасности (опасность)	Низкие	Высокие	Высокие
Скорость и производительность анализа	Высокая	Низкая	Низкая
Стандартизация	Высокая	Высокая	Низкая
Изучение различных свойств вируса и вирусного цикла	Только этап проникновения вируса в клетку-мишень	Все этапы жизненного цикла ВИЧ-1	Все этапы жизненного цикла ВИЧ-1
Условия культивирования	Перевиваемые клеточные линии	Перевиваемые клеточные линии; МПК	МПК

клеточной линии HEK293 двумя плазмидами формируются вирусные частицы, морфологически идентичные вирионам ВИЧ-1 (Zaitsev et al., 2019; Ladinsky et al., 2020).

Определение функциональной активности *env*-псевдовirusов и анализ нейтрализации проводят на клеточной линии TZM-bl, которая является перевиваемой, генетически модифицированной клеточной линией HeLa и на поверхности которой локализованы рецепторы CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4. Кроме того, в геноме клеточной линии TZM-bl интегрированы репортерные гены люциферазы светлячка и β -галактозидазы *E. coli* под транскрипционным контролем длинного концевой повтора ВИЧ-1. При проникновении псевдовirusа в клетку-мишень TZM-bl в ответ на синтез вирусного белка Tat запускается экспрессия репортерного гена люциферазы, которая детектируется с помощью люменометра. При этом высокая интенсивность люминесценции соответствует проникновению псевдовirusных частиц в клетки-мишени, а подавление люминесценции, наоборот, указывает на нейтрализацию *env*-псевдовirusов ВИЧ-1 (Platt et al., 1998; Wei et al., 2002). Общий принцип работы *env*-псевдовirusной системы представлен на рис. 2.

Env-псевдовirusная система имеет ряд неоспоримых достоинств. Во-первых, благодаря тому, что TZM-bl представляет собой стабильную перевиваемую клеточную линию, она может заменить первичные Т-клетки человека, уменьшая потребность в индивидуальных донорских клетках. Во-вторых, *env*-псевдовirusы безопасны, в отличие от изолятов вируса и ИМК, работа с которыми требует соблюдения специальных условий биобезопасности, что усложняет эксперименты и повышает их стоимость. В-третьих, белок Env на поверхности псевдовirusных частиц формирует тримерные структуры, идентичные тримерам природного вируса. Однако главное достоинство технологии псевдовirusов заключается в том, что она позволяет получать аналоги вирусных частиц различных подтипов и штаммов ВИЧ-1, тем самым обеспечивая широкий охват генетического разнообразия ВИЧ-1 (Seaman et al., 2010; Montefiori et al., 2018). Кроме того, метод нейтрализации с использованием *env*-псевдовirusов можно оптимизировать и стандартизировать (Wei et al., 2002; Seaman et al., 2010; Sarzotti-Kelsoe et al., 2014). В таблице кратко представлена сравнительная характеристика первичных изолятов и лабораторно-адаптированных штаммов ВИЧ-1, ИМК и *env*-псевдовirusов.

Важно также отметить, что на сайте Лос-Аламосской национальной лаборатории США в открытом доступе находятся протоколы и рекомендации по проведению анализа нейтрализации с использованием *env*-псевдовirusов (<https://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm>). Помимо этого, по программе предоставления реагентов для исследования ВИЧ/СПИДа – HIV Reagent Program, финансируемой Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний США и курируемой Американской коллекцией типовых культур, можно получить все необходимые компоненты (клеточные линии, плазмиды, моноклональные антитела) для освоения данной технологии.

Ниже приведен ряд примеров использования панелей псевдовirusов для оценки эффективности антиретровirusных препаратов и антител. Так, для доказательства противовirusной активности препарата маравирик (клинически одобренного антагониста корецептора ВИЧ-1) была использована панель из 160 *env*-псевдовirusов ВИЧ-1 подтипа В и 40 *env*-псевдовirusов других подтипов ВИЧ-1 (Dorr et al., 2005). Активность ибализумаба, моноклонального антитела, которое связывается с CD4-рецептором, была показана на 116 *env*-псевдовirusах, относящихся к подтипам А, В, С, CRF01_AE (Pace et al., 2013). С помощью панелей псевдовirusов ВИЧ-1 был исследован и спектр действия bnAbs в отношении различных генетических вариантов ВИЧ-1. Так, например, широта нейтрализации для bnAb 10E8 составила 98 % и была продемонстрирована на панели, включающей 181 вариант *env*-псевдовirusов подтипов А, В, С, D, G, CRF01_AE и CRF02_AG (Huang et al., 2012); широта нейтрализации bnAb VRC01 составила 91 % и была показана на 196 *env*-псевдовirusах (Wu X. et al., 2010); широта нейтрализации bnAb VRC34.01 составила 49 % и была продемонстрирована на 179 *env*-псевдовirusах (Kong et al., 2016). Именно благодаря внедрению панелей псевдовirusов, включающих большое разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1, произошел прорыв в получении и характеристике моноклональных широко-нейтрализующих антител.

Панели *env*-псевдовirusов активно используются для изучения гуморального иммунного ответа, индуцируемого кандидатными вакцинами против ВИЧ-1 в ходе их разработки, доклинических и клинических испытаний, так как одним из важных показателей эффективности

ВИЧ-вакцин является наличие у вакцинируемых вирус-нейтрализующих антител (Rudometov et al., 2019a; Ou et al., 2020). В качестве примера можно привести недавние работы К. Ху с коллегами, которые разработали схему вакцинации, основанную на пептиде слияния (fusion peptide, FP), ключевом структурном компоненте gp41 при проникновении ВИЧ-1. Ранее они идентифицировали антитело VRC34.01 от ВИЧ-положительного донора, которое нацелено на консервативный N-концевой участок пептида слияния ВИЧ-1. Поскольку FP представляет собой короткий линейный пептид, он имеет низкую природную иммуногенность, поэтому в качестве белка-носителя исследователи выбрали гемоцианин улитки, широко используемый в биотехнологии. Иммунизация лабораторных животных пептидом слияния, связанным с гемоцианином улитки, с последующим бустированием тримером BG505 приводила к индукции антител, широта нейтрализации которых составила 31 % и была продемонстрирована на панели, включающей 208 *env*-псевдовирuses различных подтипов ВИЧ-1 (Xu et al., 2018).

Завершая данный обзор, хотим отметить, что система псевдотипирования ВИЧ-1 толерантна к инкорпорации поверхностных белков различных оболочечных вирусов. Учитывая тот факт, что большинство лабораторных исследований и экспериментов с вирусами должны проводиться в условиях BSL-3 или BSL-4, использование технологии псевдовирuses вместо вирусов дикого типа предоставляет возможность изучать интересующий вирус различным исследовательским группам и проводить разработку противовирусных препаратов и вакцин против особо опасных патогенов. Например, с помощью системы псевдотипирования ВИЧ-1 были получены вирусные частицы, несущие поверхностные гликопротеины вируса Эбола (Mohan et al., 2015), вируса Марбург (Zhang L. et al., 2020), вируса Ласса (Zhang X. et al., 2019), коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (Zhao et al., 2013), вируса бешенства (Nie et al., 2017), вируса чикунгуньи (Wu J. et al., 2017) и вируса Нипах (Nie et al., 2019). Кроме того, на основе данной технологии активно разрабатываются псевдовиральные платформы для SARS-CoV-2 (Hu et al., 2020; Hyseni et al., 2020; Johnson et al., 2020).

Заключение

Каждая из рассмотренных выше технологий имеет свои достоинства и недостатки, и при проведении комплексных исследований все эти инструменты, несомненно, будут дополнять друг друга. Несмотря на трудоемкость применения первичных изолятов и ИМК в анализах нейтрализации, данные модели остаются бесценным инструментом для исследования биологических свойств вирусов. Однако в настоящее время основным методом оценки эффективности вакцин и противовирусных агентов (потенциальных ингибиторов проникновения) против ВИЧ-1 является технология *env*-псевдовирuses. К достоинствам псевдовиральной системы относятся безопасность, высокий уровень воспроизводимости результатов, возможность стандартизации, а также возможность работать с вирусными частицами, экспонирующими поверхностные гликопротеины множества вирусных подтипов.

Список литературы / References

- Зырянова Д.П., Богачева Н.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. Модели CRF63_02A6 ВИЧ-1 как инструмент для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных препаратов. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(4):769-774. DOI 10.15789/2220-7619-MHC-1261.
- [Zyryanova D.P., Bogacheva N.V., Totmenin A.V., Gashnikova N.M. HIV-1 CRF63_02A6 models as a tool for evaluating efficacy of developing antiretroviral drugs. *Infektsiya i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(4):769-774. DOI 10.15789/2220-7619-MHC-1261. (in Russian)]
- Чересиз С.В., Григорьев И.В., Семёнова Е.А., Пустыльник В.О., Власов В.В., Покровский А.Г. Псевдовиральная система для оценки активности противовирусных соединений с использованием различных культур клеток-мишеней. *Докл. АН*. 2010; 435(1):126-130.
- [Cheresiz S.V., Grigoryev I.V., Semenova E.A., Pustynnyak V.O., Vlasov V.V., Pokrovsky A.G. A pseudovirus system for the testing of antiviral activity of compounds in different cell lines. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2010;435:295-298. DOI 10.1134/S1607672910060049.]
- Arts E.J., Hazuda D.J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(4):1-23. DOI 10.1101/cshperspect.a007161.
- Baalwa J., Wang S., Parrish N.F., Decker J.M., Keele B.F., Learn G.H., Yue L., Ruzagira E., Ssemwanga D., Kamali A. Molecular identification, cloning and characterization of transmitted/founder HIV-1 subtype A, D and A/D infectious molecular clones. *Virology*. 2013; 436(1):33-48. DOI 10.1016/j.virol.2012.10.009.
- Chenine A.L., Merbah M., Wiczorek L., Molnar S., Mann B., Lee J., O'Sullivan A.M., Bose M., Sanders-Buell E., Kijak G.H., Herrera C., McLinden R., O'Connell R., Michael N.L., Robb M.L., Kim J.H., Polonis V.R., Tovanabutra S. Neutralization sensitivity of a novel HIV-1 CRF01_AE panel of infectious molecular clones. *J. Acquir. Immune Defic. Syndrom.* 2018;78(3):348-355. DOI 10.1097/QAI.0000000000001675.
- Dorr P., Westby M., Dobbs S., Griffin P., Irvine B., Macartney M., Mori J., Rickett G., Smith-Burchnell C., Napier C., Webster R., Armour D., Price D., Stammen B., Wood A., Perros M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(11):4721-4732. DOI 10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005.
- Edmonds T.G., Ding H., Yuan X., Wei Q., Smith K.S., Conway J.A., Wiczorek L., Brown B., Polonis V., West J.T., Montefiori D.C., Kappes J.C., Ochsenbauer Ch. Replication competent molecular clones of HIV-1 expressing *Renilla* luciferase facilitate the analysis of antibody inhibition in PBMC. *Virology*. 2010;408(1):1-13. DOI 10.1016/j.virol.2010.08.028.
- González N., Pérez-Olmeda M., Mateos E., Cascajero A., Alvarez A., Spijkers S., García-Pérez J., Sánchez-Palomino S., Ruiz-Mateos E., Leal M., Alami J. A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(12):2493-2501. DOI 10.1093/jac/dkq379.
- Gray G.E., Bekker L.G., Laher F., Malahleha M., Allen M., Moodie Z., Grunenberg N., Huang Yu., Grove D., Prigmore B. Vaccine efficacy of ALVAC-HIV and bivalent subtype C gp120-MF59 in adults. *New Eng. J. Med.* 2021;384(12):1089-1100. DOI 10.1056/NEJMoa2031499.
- Hsu D.C., O'Connell R.J. Progress in HIV vaccine development. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017;13(5):1018-1030. DOI 10.1080/21645515.2016.1276138.
- Hu J., Gao Q., He C., Huang A., Tang N., Wang K. Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Genes Dis.* 2020;7(4):551-557. DOI 10.1016/j.gendis.2020.07.006.

- Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., Munir Alam S., Wang T., Yang Y., Zhang B., Migueles S.A., Wyatt R., Haynes B.F., Kwong P.D., Mascola J.R., Connors M. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*. 2012;491(7424):406-412. DOI 10.1038/nature11544.
- Hyseni I., Molesti E., Benincasa L., Piu P., Casa E., Temperton N.J., Manenti A., Montomoli E. Characterisation of SARS-CoV-2 lentiviral pseudotypes and correlation between pseudotype-based neutralisation assays and live virus-based micro neutralisation assays. *Viruses*. 2020;12(9):1-18. DOI 10.3390/v12091011.
- Jackson J.B., Coombs R.W., Sannerud K., Rhame F.S., Balfour H.H., Jr. Rapid and sensitive viral culture method for human immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(7):1416-1418. PMID 3165981.
- Johnson M.C., Lyddon T.D., Suarez R., Salcedo B., LePique M., Graham M., Ricana C.L., Robinson C.A., Ritter D.G. Optimized pseudotyping conditions for the SARS-COV-2 spike glycoprotein. *J. Virol.* 2020;94(21):1-10. DOI 10.1128/JVI.01062-20.
- Johnston E., Dupnik K.M., Gonzales M.J., Winters M.A., Rhee S.Y., Imamichi T., Shafer R.W. Panel of prototypical infectious molecular HIV-1 clones containing multiple nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *AIDS*. 2005;19(7):731-733. DOI 10.1097/01.aids.0000166098.54564.0c.
- Jones L.D., Moody M.A., Thompson A.B. Innovations in HIV-1 vaccine design. *Clin. Ther.* 2020;42(3):499-514. DOI 10.1016/j.clinthera.2020.01.009.
- Kim J.H., Excler J.L., Michael N.L. Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu. Rev. Med.* 2015;66:423-437. DOI 10.1146/annurev-med-052912-123749.
- Kong R., Xu K., Zhou T., Acharya P., Lemmin T., Liu K., Ozorowski G., Soto C., Taft J., Bailer R., Cale E.M., Chen L., Choi C.W., Chuang G., Doria-Rose N.A., Druz A., Georgiev I.S., Gorman J., Huang J., Gordon Joyce M., Louder M.K., Ma X., McKee K., O'Dell S., Pancera M., Yang Y., Blanchard S.C., Mothes W., Burton D.R., Koff W.C., Connors M., Ward A.B., Kwong P.D., Mascola J.R. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody. *Science*. 2016;352(6287):828-833. DOI 10.1126/science.aae0474.
- Ladinsky M.S., Gnanaprasam P.N., Yang Z., West A.P., Kay M.S., Bjorkman P.J. Electron tomography visualization of HIV-1 fusion with target cells using fusion inhibitors to trap the pre-hairpin intermediate. *eLife*. 2020;9. DOI 10.7554/eLife.58411.
- Li M., Gao F., Mascola J.R., Stamatatos L., Polonis V.R., Koutsoukos M., Voss G., Goepfert P., Gilbert P., Greene K.M., Bilska M., Kothe D.L., Salazar-Gonzalez J.F., Wei X., Decker J.M., Hahn B.H., Montefiori D.C. Human immunodeficiency virus type 1 *env* clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2005;79(16):10108-10125. DOI 10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005.
- Li Q., Liu Q., Huang W., Li X., Wang Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Rev. Med. Virol.* 2018;28(1):1-10. DOI 10.1002/rmv.1963.
- Liu Y., Cao W., Sun M., Li T. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9(1):194-206. DOI 10.1080/22221751.2020.1713707.
- Mascola J.R., Snyder S.W., Weislow O.S., Belay S.M., Belshe R.B., Schwartz D.H., Clements M.L., Dolin R., Graham B.S., Gorse G.J. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 1996; 173(2):340-348. DOI 10.1093/infdis/173.2.340.
- Mascola J.R., D'Souza P., Gilbert P., Hahn B.H., Haigwood N.L., Morris L., Petropoulos C.J., Polonis V.R., Sarzotti M., Montefiori D.C. Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *J. Virol.* 2005;79(16): 10103-10107. DOI 10.1128/JVI.79.16.10103-10107.2005.
- Mavian C., Coman R.M., Zhang X., Pomeroy S., Ostrov D.A., Dunn B.M., Sleasman J.W., Goodenow M.M. Molecular docking-based screening for novel inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 protease that effectively reduce the viral replication in human cells. *bioRxiv*. 2020;1-11. DOI 10.1101/2020.11.14.382895.
- Mohan G.S., Ye L., Li W., Monteiro A., Lin X., Sapkota B., Pollock B.P., Compans R.W., Yang C. Less is more: Ebola virus surface glycoprotein expression levels regulate virus production and infectivity. *J. Virol.* 2015;89(2):1205-1217. DOI 10.1128/JVI.01810-14.
- Montefiori D.C., Roederer M., Morris L., Seaman M.S. Neutralization tiers of HIV-1. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2018;13(2):1-9. DOI 10.1097/COH.0000000000000442.
- Ng'uni T., Chasara C., Ndhlovu Z.M. Major scientific hurdles in HIV vaccine development: historical perspective and future directions. *Front. Immun.* 2020;11:1-17. DOI 10.3389/fimmu.2020.590780.
- Nie J., Liu L., Wang Q., Chen R., Ning T., Liu Q., Huang W., Wang Y. Nipah pseudovirus system enables evaluation of vaccines *in vitro* and *in vivo* using non-BSL-4 facilities. *Emerg. Microbes Infect.* 2019;8(1):272-281. DOI 10.1080/22221751.2019.1571871.
- Nie J., Wu X., Ma J., Cao S., Huang W., Liu Q., Li X., Li Y., Wang Y. Development of *in vitro* and *in vivo* rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system. *Sci. Rep.* 2017;7(1): 1-12. DOI 10.1038/srep42769.
- Ochsenbauer C., Edmonds T.G., Ding H., Keele B.F., Decker J., Salazar M.G., Salazar-Gonzalez J.F., Shattock R., Haynes B.F., Shaw G.M., Hahn B.H., Kappes J.C. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 2012;86(5):2715-2728. DOI 10.1128/JVI.06157-11.
- Ou L., Kong W.P., Chuang G.Y., Ghosh M., Gulla K., O'Dell S., Variale J., Barefoot N., Changela A., Chao C.W., Cheng Ch., Druz A., Kong R., McKee K., Rawi R., Sarfo E., Schön A., Shaddeau A., Tsybovsky Ya., Verardi R., Wang Sh. Preclinical development of a fusion peptide conjugate as an HIV vaccine immunogen. *Sci. Rep.* 2020;10(1):1-13. DOI 10.1038/s41598-020-59711-y.
- Pace C.S., Fordyce M.W., Franco D., Kao C.Y., Seaman M.S., Ho D.D. Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits breadth and potency against HIV-1, with natural resistance mediated by the loss of a V5 glycan in envelope. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2013;62(1):1-9. DOI 10.1097/QAI.0b013e3182732746.
- Peden K., Emerman M., Montagnier L. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology*. 1991;185:661-672. DOI 10.1016/0042-6822(91)90537-L.
- Phanuphak N., Gulick R.M. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2020;15(1):4-12. DOI 10.1097/COH.0000000000000588.
- Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., Chesebro B., Kabat D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1998;72:2855-2864. DOI 10.1128/JVI.72.4.2855-2864.1998.
- Polonis V.R., Brown B.K., Borges A.R., Zolla-Pazner S., Dimitrov D.S., Zhang M.Y., Barnett S.W., Ruprecht R.M., Scarlatti G., Fenyö E., Montefiori D.C., McCutchan F.E., Michael N.L. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology*. 2008;375(2):315-320. DOI 10.1016/j.virol.2008.02.007.
- Princen K., Hatse S., Vermeire K., De Clercq E., Schols D. Establishment of a novel CCR5 and CXCR4 expressing CD4+ cell line which is highly sensitive to HIV and suitable for high-throughput evaluation of CCR5 and CXCR4 antagonists. *Retrovirology*. 2004;1(1): 1-13. DOI 10.1186/1742-4690-1-2.
- Pugach P., Marozsan A.J., Ketas T.J., Landes E.L., Moore J.P., Kuhmann S.E. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 in-

- inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology*. 2007;361(1):212-228. DOI 10.1016/j.virol.2006.11.004.
- Rudometov A.P., Chikaev A.N., Rudometova N.B., Antonets D.V., Lomzov A.A., Kaplina O.N., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Artificial anti-HIV-1 immunogen comprising epitopes of broadly neutralizing antibodies 2F5, 10E8, and a peptide mimic of VRC01 discontinuous epitope. *Vaccines*. 2019a;7(3):1-18. DOI 10.3390/vaccines7030083.
- Rudometov A.P., Rudometova N.B., Shcherbakov D.N., Lomzov A.A., Kaplina O.N., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Bakulina A.Yu., Karpenko L.I. The structural and immunological properties of chimeric proteins containing HIV-1 MPER sites. *Acta Naturae*. 2019b; 11(3):56-65. DOI 10.32607/20758251-2019-11-3-56-65.
- Sarzotti-Kelsoe M., Bailer R.T., Turk E., Lin C.L., Bilska M., Greene K.M., Gao H., Todd C.A., Ozaki D., Seaman M.S., Mascola J.R., Montefiori D.C. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods*. 2014;409:131-146. DOI 10.1016/j.jim.2013.11.022.
- Seaman M.S., Janes H., Hawkins N., Grandpre L.E., Devoy C., Giri A., Coffey R.T., Harris L., Wood B., Daniels M.G. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J. Virol*. 2010;84(3):1439-1452. DOI 10.1128/JVI.02108-09.
- Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 as a novel aspect of the immune response. *Acta Naturae*. 2015;7(4):11-21. PMID 26798488.
- Stephenson K.E., Wagh K., Korber B., Barouch D.H. Vaccines and broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Annu. Rev. Immunol*. 2020;38:673-703. DOI 10.1146/annurev-immunol-080219-023629.
- Su S., Rasquinha G., Du L., Wang Q., Xu W., Li W., Lu L., Jiang S. A peptide-based HIV-1 fusion inhibitor with two tail-anchors and palmitic acid exhibits substantially improved *in vitro* and *ex vivo* anti-HIV-1 activity and prolonged *in vivo* half-life. *Molecules*. 2019;24(6):1-13. DOI 10.3390/molecules24061134.
- Van't Wout A.B., Schuitemaker H., Kootstra N.A. Isolation and propagation of HIV-1 on peripheral blood mononuclear cells. *Nat. Protoc*. 2008;3(3):363-370. DOI 10.1038/nprot.2008.3.
- Varghese V., Mitsuya Y., Fessel W.J., Liu T.F., Melikian G.L., Katzenstein D.A., Schiffer C.A., Holmes S.P., Shafer R.W. Prototypical recombinant multi-protease-inhibitor-resistant infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013;57(9):4290-4299. DOI 10.1128/AAC.00614-13.
- Voronin Y., Chohan B., Emerman M., Overbaugh J. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are usually dominated by the major variants found in blood. *J. Virol*. 2007;81(19):10232-10241. DOI 10.1128/JVI.01035-07.
- Wagstaff K.M., Headey S., Telwate S., Tyssen D., Hearps A.C., Thomas D.R., Tachedjian G., Jans D.A. Molecular dissection of an inhibitor targeting the HIV integrase dependent preintegration complex nuclear import. *Cell. Microbiol*. 2019;21(1):1-13. DOI 10.1111/cmi.12953.
- Wang Z., Hong K., Zhang J., Zhang L., Li D., Ren L., Liang H., Shao Y. Construction and characterization of highly infectious full-length molecular clones of a HIV-1 CRF07_BC isolate from Xinjiang, China. *PLoS One*. 2013;8(11):1-9. DOI 10.1371/journal.pone.0079177.
- Wei X., Decker J.M., Liu H., Zhang Z., Arani R.B., Kilby J.M., Saag M.S., Wu X., Shaw G.M., Kappes J.C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002; 46:1896-1905. DOI 10.1128/aac.46.6.1896-1905.2002.
- Wu J., Zhao C., Liu Q., Huang W., Wang Y. Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system. *Vaccine*. 2017;35(47):6387-6394. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.10.007.
- Wu X., Yang Z.Y., Li Y., Hoger Corp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*. 2010;329(5993):856-861. DOI 10.1126/science.1187659.
- Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G.Y., Liu K., Louder M.K., O'Dell S., Rawi R., Sastry M. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nat. Med*. 2018;24(6):857-867. DOI 10.1038/s41591-018-0042-6.
- Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23: 337-342. DOI 10.18699/VJ19.498.
- Zhang L., Lei S., Xie H., Li Q., Liu S., Liu Q., Huang W., Xiao X., Wang Y. Screening and identification of Marburg virus entry inhibitors using approved drugs. *Virol. Sin*. 2020;35:235-239. DOI 10.1007/s12250-019-00184-3.
- Zhang X., Yan F., Tang K., Chen Q., Guo J., Zhu W., He S., Banadyga L., Qiu X., Guo Y. Identification of a clinical compound losmapimod that blocks Lassa virus entry. *Antiviral Res*. 2019;167:68-77. DOI 10.1016/j.antiviral.2019.03.014.
- Zhao G., Du L., Ma C., Li Y., Li L., Poon V.K., Wang L., Yu F., Zheng B.J., Jiang S., Zhou Y. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV. *Virol. J*. 2013;10(1):1-8. DOI 10.1186/1743-422X-10-266.
- Zyryanova D.P., Totmenin A.V., Bogacheva N.V., Gashnikova N.M. Construction and characterization of infectious molecular clones of HIV-1 CRF63_02A6. *AIDS Res. Hum. Retrovir*. 2020;36(3):227-233. DOI 10.1089/aid.2019.0177.

ORCID ID

N.B. Rudometova orcid.org/0000-0002-1684-9071
D.N. Shcherbakov orcid.org/0000-0001-8023-4453
A.P. Rudometov orcid.org/0000-0003-2808-4309
A.A. Ilyichev orcid.org/0000-0001-5356-0843
L.I. Karpenko orcid.org/0000-0003-4365-8809

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-583.2020.4, РФФИ и Новосибирской области в рамках научного проекта № 19-44-543013 и государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.06.2021. После доработки 07.08.2021. Принята к публикации 09.08.2021.

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 22.03.2022. Выход в свет 31.03.2022. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 12.32.

Уч.-изд. л. 14.6. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–45 экз.) Заказ № 143. Цена свободная.

Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

